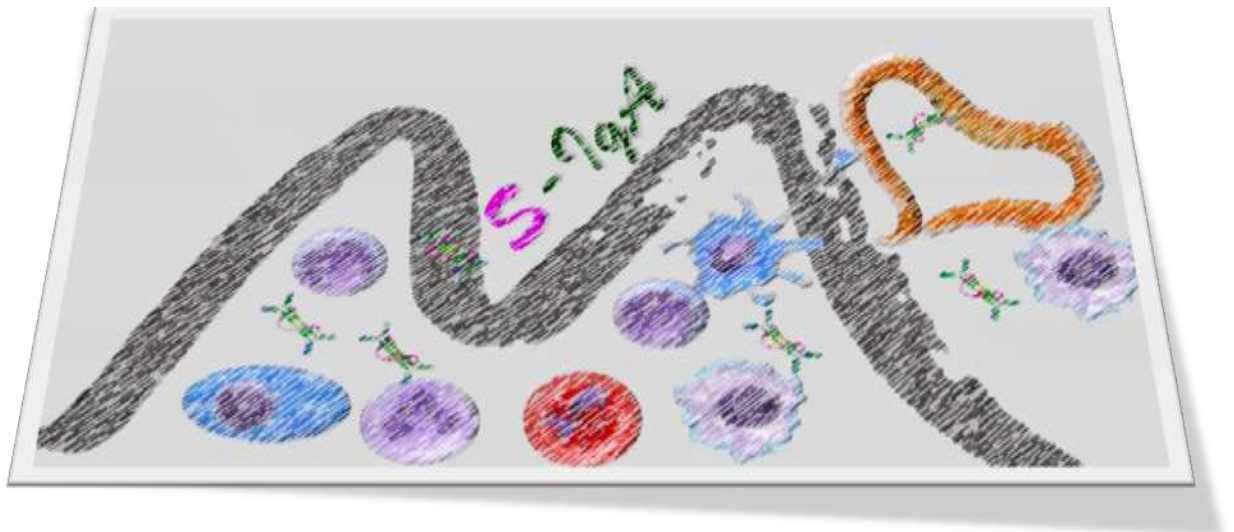


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LUCIANA MARIA DE OLIVEIRA



**O PAPEL DE SIgA NA RESPOSTA IMUNE DE
MUCOSA CONTRA ASCARIDIOSE LARVAL**

Belo Horizonte, MG

2017

LUCIANA MARIA DE OLIVEIRA

**O PAPEL DE SIgA NA RESPOSTA IMUNE DE MUCOSA
CONTRA ASCARIDIOSE LARVAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunohelminologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientadora: Dr^a. Soraya Torres Gaze Jangola

Belo Horizonte, MG

2017

Dedico esta tese a todos os meus familiares:
aos pertencentes à família formada pelos laços do DNA e do AMOR e,
aos que se tornaram tão queridos somente pela força da AMIZADE e do companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi mais do que um projeto de pesquisa. Ela se transformou num verdadeiro processo formativo e na realização de um sonho. E, como em todo sonho empreendido, muitas fases foram vivenciadas até tornar-se realidade. Desta forma, o número de pessoas que me ajudaram nesta caminhada é extenso e inviável de se registrar nestas páginas. Portanto, apesar dos próximos parágrafos trazerem uma lista resumida, esta simboliza meus sentimentos para com todos. Espero poder um dia retribuir tanto carinho e auxílio, de forma a mostrar meu agradecimento a cada um individualmente, mesmo àqueles cujos nomes não constem abaixo. Meus sinceros agradecimentos:

Ao amigo e orientador, **Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara** pela formação científica. Nem tenho como expressar meus sentimentos de dívida emotiva por toda confiança e incentivos constantes. Sua orientação, não apenas científica, mas humana, me foram um exemplo que muito tem inspirado minha vida profissional e pessoal.

À amiga e co-orientadora, **Dra. Soraya Torres Gaze Jangola**, pelo apoio, carinho, por estar sempre pronta a ajudar e por suas contribuições científicas. Obrigada, também, por me ajudar com meiguice, mas com firmeza, a reconhecer incompatibilidades entre os prazos a cumprir e meus mega sonhos de experimentações.

Às agências de fomento **Capes** e **CNPq** pelo apoio financeiro e, especialmente a **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida e pelo acesso ao Portal de Periódicos, que contribuiu de forma fundamental para o embasamento teórico deste trabalho.

Ao **Departamento de Parasitologia** do ICB-UFMG, em especial à **coordenação** e **professores do curso de Pós-Graduação**, pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho, além dos ensinamentos e agradável convivência.

Ao **Prof. Dr. Remo de Castro Russo** (Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, UFMG), pelo carinhoso empenho e pela imensurável contribuição nos experimentos e discussões científica sobre temas relacionados à imunologia de mucosa e fisiologia pulmonar. E também aos amigos do LIMB, **Lucas Kraemer** e **MSc. Matheus Mattos**, pela inegável contribuição com os experimentos para estudo do iBALT.

À **Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria** (Laboratório de Imunobiologia - LIB, UFMG), por todo o carinho, dedicação e inestimável contribuição científica com os temas relacionados à imunologia de mucosa. E à amiga e mestrande do LIB, **Natália Pinheiro**, pela inegável contribuição com os ensaios de IgA e com os experimentos de dieta probiótica.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Vidigal Calliari** e à aluna de doutorado **Luana** do Laboratório de Morfometria - LM, além de toda a equipe técnica do departamento de Patologia pela confecção das lâminas de histologia.

Aos membros da banca: **Prof. Dr. André Macedo Vale** (UFRJ), **Dra. Andréa Teixeira de Carvalho** (Fiocruz-MG), **Profa. Dra. Angélica Thomaz Vieira** (UFMG), **Profa. Dra. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira** (UFMG), **Dra. Denise Silveira Lemos** (Fiocruz-MG), **Dra. Patrícia Silveira** (UFMG), por aceitarem prontamente o convite para participar desta defesa de tese e, pelas valiosas contribuições científicas que aprimoraram este trabalho.

A **todos os amigos e colaboradores do LIGP** pela convivência agradável, pelo apoio mútuo durante as árduas horas de experimentações. E também, um especial agradecimento à **Dra. Mariana Santos Cardoso e João Luís Reis Cunha** (LIGP), por todos os bons momentos de conversas e apoio durante as longas horas de trabalho, quando os experimentos nos prendiam noite à dentro.

Um agradecimento especial aos amigos e colaboradores do Grupo (Família) Ascaris pelas valiosas e imprescindíveis colaborações nos experimentos e nas discussões dos resultados. Tenho orgulho de fazer parte deste grupo de profissionais com quem aprendi que posso contar sempre. O espírito de equipe, que é marca flagrante deste grupo, amenizou e ajudou a contornar dificuldades inerentes a todo processo de aprendizagem e também viabilizou a coleta de dados! Em especial, agradeço aos amigos: **MSc. Ana Clara Gazzinelli-Guimarães** (pela alegria e simpatia constantes e, por salvar os pulmões que eu, inevitavelmente, esquecia-me de coletar!), **Chiara Amorim** (pela ativa participação, desde o primeiro dia de estágio até o final deste trabalho e pela meiguice flagrante!), **MSc. Denise Nogueira** (pela sincera e autêntica amizade, pela coleta do BAL e por compartilhar seus conhecimentos e dados de experimentos com animais nocautes), **Prof. Dr. Fernando Barbosa** (pelas simpáticas brincadeiras, por compartilhar seus conhecimentos e por manter as culturas de ovos e realizar a infecção dos animais), **Profa. Dra. Lílian Bueno** (pela amizade sincera e por sugerir e incentivar meu doutorado neste programa, pela participação e direcionamentos científicos), **Profa. Dra. Natália Resende** (pela amizade genuína, por me incluir em projetos da sua área de atuação e, pelo incentivo e participação constantes, mesmo à distância! Inclusive por me doar um laptop que foi usado na produção desta tese.) e **Dr. Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães** (pela recepção inclusiva e, pela grande contribuição científica).

AGRADECIMENTOS

À **Michele Matos** (LIGP) pelo carinho e incentivos constantes. Obrigada por sua genuína amizade e por seu profissionalismo ao manter o laboratório funcionando sempre e pela disposição em ajudar a solucionar qualquer problema.

Aos **funcionários e secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**, em especial às amigas **Sumara e Luciana do Carmo**. E também ao **Sr. Neri**, pela agradável convivência e por seus salgados e cafezinhos, sempre tão bem-vindos..

Em especial agradeço à minha família: **pais, irmãos, cunhados e sobrinhos**, sempre presentes na minha vida me incentivando em todos os meus projetos pessoais e profissionais. Em especial, agradeço à minha **Mãe** por seu apoio, dedicação e amor altruísta me serviram de exemplo e me deram a força necessária para seguir meus sonhos. A meu **Pai**, cuja eterna vontade de aprender, sendo até mesmo autodidata, e seu amor pelos livros me inspiraram a seguir nessa caminhada eterna pelo conhecimento. **Amo todos vocês!**

Ao **Dr. Ricardo Marcelo Geraldi** (Laqua/UFMG), verdadeiro companheiro e cúmplice em todos os aspectos, com quem escolhi dividir todos os momentos da vida. Nada mais saudável e prazeroso que ter como parceiro um legítimo cientista para ruminar os dados e filosofar sobre ciência. Sou-lhe grata por toda contribuição pessoal e profissional para a concretização de mais este sonho compartilhado. Obrigada pelas valiosas sugestões científicas, pelos ensinamentos de estatística e por sua efetiva colaboração durante a realização dos experimentos e das análises dos resultados. Obrigada por me apoiar e incentivar. **Amo você!**

Às **pessoas mais importantes de minha vida: Rafael e Rinaldo**. Mesmo sem entender a dimensão deste trabalho, vocês compreenderam que a mamãe está se esforçando para conseguir “*um bom emprego e um bom salário para melhorar nossa vida*” e aceitaram de forma amena os sacrifícios impostos pelo distanciamento que muitas vezes se fizeram necessários. Obrigada, vocês são meus grandes amores e companheiros mirins de todos os momentos. Toda e qualquer conquista passou a ter um valor ainda maior desde que vocês surgiram em minha vida. **Amo vocês!**

Finalmente, à todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar a este momento. Devido ao grande volume de nomes seria impossível listar neste documento. Fica aqui meu sincero agradecimento especialmente aos amigos e colaboradores do CPqRR que iniciaram a minha formação acadêmica durante o tempo em que trabalhei no LICM e no LBDM, assim como durante o meu mestrado em Ciências da Saúde. Em especial ao **Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira**.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

A ascaridiose é uma geohelmintose crônica e mundialmente disseminada que acomete hospedeiros humanos e suínos. Morbidades severas associadas com altas cargas parasitárias geram impactos na saúde pública de áreas endêmicas. Embora grande parte do ciclo de vida do parasito ocorra em contato com mucosas (gastrointestinal e pulmonar), pouco se sabe sobre o papel da imunidade de mucosa nos mecanismos que geram proteção à doença. Considerando a importância da imunoglobulina de mucosa (SIgA) na proteção contra diversas infecções, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o papel da SIgA intestinal e pulmonar na proteção contra ascaridiose. Diversos parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos foram avaliados em camundongos selvagens (BALB/c e C57BL/6j) que apresentam diferentes susceptibilidades à ascaridiose larval (fase aguda) e também em animais depletados de eosinófilos ou de receptores do tipo Toll (TLRs). Foi examinado também o efeito de probiótico na indução de SIgA polireativa. Os resultados demonstraram que ambas as linhagens selvagens apresentaram variações cinéticas semelhantes na carga parasitária dos principais órgãos envolvidos na migração larval, sendo que a diferença de intensidade de infecção entre as linhagens foi evidenciada apenas nos picos de migração hepatopulmonar. Os níveis de SIgA de mucosa intestinal foram influenciados por diferenças genéticas, pois, a linhagem mais resistente apresentou os maiores níveis desta imunoglobulina, independente do tempo avaliado. Além disso, maiores níveis de SIgA intestinal se associaram com redução da intensidade de infecção e com menos patologia pulmonar. Aumentos nas concentrações de SIgA pulmonar foram induzidos pela infecção, com coincidência entre os picos de SIgA e de migração pulmonar. Ademais, observou-se correlações positivas entre SIgA de mucosa pulmonar e carga parasitária. Entretanto, uma coincidente inversão entre as curvas cinéticas de níveis de SIgA e carga parasitária foi identificada. Em animais depletados de eosinófilos, TLR2 ou TLR4 ocorreu redução nos níveis de SIgA concomitante com aumento da intensidade parasitária. O uso de probiótico induziu aumento nos níveis de SIgA, assim como redução da carga parasitária. Deste modo, o conjunto de dados deste estudo evidenciaram um papel protetor da SIgA de mucosa contra a ascaridiose experimental murina, sugerindo também que a produção eficiente desta SIgA é dependente da ativação de eosinófilos e envolve sinalização via TLR2 e TLR4.

Palavras-chave: *Ascaris*, Helminologia, Imunologia de Mucosa, IgA-Secretória.

ABSTRACT

Ascariidiosis is a chronic, globally widespread geohelminthosis that affects humans and swine. Severe morbidities associated with high parasitic loads generate impacts on public health in endemic areas. Although much of the life cycle of the parasite occurs in contact with mucous membranes (gastrointestinal and pulmonary) little is known about the role of mucosal immunity in the mechanisms that generate protection against the disease. Considering the importance of mucosal immunoglobulin-A (SIgA) in protecting against various infections, the objective of this work was to characterize the role of intestinal and pulmonary SIgA in the protection against ascariidiosis. Several immunopathological and pathophysiological parameters were evaluated in wild-type mice (BALB/c and C57BL/6j) that show different susceptibility to larval ascariidiosis (acute phase) and also in animals depleted of eosinophils or Toll-like receptors (TLR). It was also examined the use of a probiotic as an inducer of polyreactive SIgA. The results showed that both wild strains presented similar kinetic variations in the parasite load of the main organs involved in larval migration, and the difference in infection intensity among strains was just detected in hepatopulmonary migration peaks. The SIgA levels of intestinal mucosa were influenced by genetic differences, and the most resistant strain presented the highest levels of this immunoglobulin, regardless of the time evaluated. Moreover, higher levels of intestinal SIgA were associated with reduced infection intensity and less pulmonary pathology. Increases in pulmonary SIgA concentrations were induced by infection, with coincidence between SIgA peaks and pulmonary migration. In addition, positive correlations were observed between pulmonary SIgA and parasitic load. However, a coincident inversion between the kinetic curves of SIgA levels and total parasite load was identified. In animals depleted of eosinophils, TLR2 or TLR4, there was a reduction in the levels of total and specific SIgA coincident with increased parasite intensity. The use of probiotic induced increase in SIgA levels and reduction of parasitic load. Thus, the data set of this study evidenced a protective role of mucosal SIgA against murine experimental ascariidiosis, and suggesting that the efficient production of this SIgA is dependent on the activation of eosinophils and involving signaling via TLR2 and TLR4.

Keywords: *Ascaris sp.*, Secretory IgA, Mucosal immunology, Helminthology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estágios de desenvolvimento e ciclo de vida de <i>Ascaris</i> sp.....	23
Figura 2 Componentes funcionais básicos do MALT.....	27
Figura 3 Processo de transição da pIgA pelo pIgR.	29
Figura 4 Experimento para avaliação da variação cinética da resposta imune de mucosa.	39
Figura 5 Experimento para avaliação do papel de eosinófilos na resposta imune de mucosa.	40
Figura 6 Experimento para avaliação do papel de TLR na resposta imune de mucosa.	41
Figura 7 Experimento para avaliação do efeito de probiótico na resposta imune de mucosa.	42
Figura 8 Carga parasitária nos principais órgãos envolvidos na migração larval.	55
Figura 9 Carga parasitária total durante fase aguda da ascaridiose experimental murina.....	56
Figura 10 Carga parasitária no BAL e tecido pulmonar durante fase aguda da ascaridiose.	57
Figura 11 Carga parasitária no INL e tecido intestinal durante fase aguda da ascaridiose.	58
Figura 12 Níveis de SIgA-total no INL durante fase aguda da ascaridiose.	59
Figura 13 Níveis de SIgA-total no BAL durante fase aguda da ascaridiose.	60
Figura 14 Aumento coincidente de aumento nos níveis de SIgA e redução da carga parasitária durante fase aguda da ascaridiose.....	61
Figura 15 Variação cinética do número de células leucocitárias totais durante fase aguda da ascaridiose.	62
Figura 16 Variação cinética da composição das células leucocitárias mononucleadas durante fase aguda da ascaridiose.....	63
Figura 17 Variação cinética da composição das células leucocitárias polimorfonucleadas durante fase aguda da ascaridiose.....	64
Figura 18 Variação cinética dos níveis de proteínas totais no BAL durante fase aguda da ascaridiose.	66
Figura 19 Variação dos níveis de hemoglobina no BAL durante fase aguda da ascaridiose.	66
Figura 20 Efeito da fase aguda da ascaridiose nas variáveis CHORD e CDYN.....	68
Figura 21 Efeito da fase aguda da ascaridiose nas medidas de R.E. e FVC.....	69
Figura 22 Associação entre as variáveis SIgA-INL e -BAL com carga parasitária total.....	70
Figura 23 Influência de eosinófilos na carga parasitária pulmonar.....	75
Figura 24 Influência de eosinófilos nos níveis de SIgA-total e específica no INL.....	76
Figura 25 Influência de eosinófilos nos níveis de SIgA-total no BAL.	77
Figura 26 Influência de eosinófilos na produção de muco na mucosa pulmonar.....	78
Figura 27 Influência de TLRs na carga parasitária pulmonar.	81
Figura 28 Impacto da ausência de TLRs na produção de SIgA-total.....	82
Figura 29 Impacto da ausência de TLRs na composição das células leucocitárias.....	83
Figura 30 Impacto da ausência de TLRs nas variáveis R.E., CHORD e CDYN.	84
Figura 31 Impacto da ausência de TLRs nas variáveis FVC e FEV100.	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 32 Efeito da ingestão de probiótico na carga parasitária pulmonar.	87
Figura 33 Efeito da ingestão de probiótico na produção de SIgA no INL.	88
Figura 34 Efeito da ingestão de probiótico nos níveis de SIgA no BAL.	88
Figura 35 Efeito da ingestão de probiótico na composição leucocitária do BAL.	89
Figura 36 Mecanismos de ação da SIgA na indução de resposta imune contra helmintos...94	
Figura 37 Resumo dos resultados da avaliação cinética dos parâmetros imunoparasitológicos nas linhagens BALB/c e C57BL/6j.	102
Figura 38 Resumo dos resultados da avaliação do papel de eosinófilos na resposta imune de mucosa contra ascaridiose.	102
Figura 39 Resumo do papel de TLRs na resposta imune de mucosa contra ascaridiose.	103
Figura 40 Resumo dos resultados da ingestão de probiótico na resposta imune de mucosa contra ascaridiose.	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Tratamentos para a ascaridiose humana recomendados pela OMS/WHO	26
Quadro 2 Relação das linhagens de camundongos usadas no estudo da resposta imune de mucosa à infecção com <i>A. Suum</i>	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Carga parasitária nos compartimentos tecidual e de mucosa ao longo da infecção experimental murina por *A. suum*. 56
- Tabela 2 Resultados dos testes Correlação de Pearson entre parâmetros imunoparasitológicos. Foram sumarizadas apenas correlações fortes e estatisticamente significativas..... 71
- Tabela 3 Resultados dos testes Correlação de Pearson entre parâmetros imunológicos com fisiopatológicos. Apenas correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. 71
- Tabela 4 Resultados dos testes Correlação de Pearson entre parâmetros imunológicos com fisiopatológicos. Apenas correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. 72

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Nível de significância do teste estatístico
Δ dblGATA	Camundongos deficientes em eosinófilos
5-PL	Equação de cinco parâmetros logísticos
ABF-1	Fator de transcrição expresso em linfócitos B
ADL	Antígeno de extrato bruto de vermes adultos
ANOVA	Análise de variância
APC	Células apresentadoras de antígenos
APRIL	Ligante indutor de proliferação
B1	Linfócito B do tipo 1
BAFF	Fator de ativação do linfócito B
BAL	Lavado broncoalveolar
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongos de pelagem albina
BALT	Tecido linfoide associado aos brônquios
BCA	Ácido bicinônico
B.O.D.	Demanda biológica de oxigênio
BSA	Albumina bovina sérica
C57BL/6j	Linhagem isogênica de camundongos de pelagem negra
CALT	Tecido linfoide associado à conjuntiva
CBA/ca	Linhagem isogênica de camundongos
CHORD	Complacência estática
CDCP	Centers for Disease Control and Prevention
CD89	Receptor Fc de IgA (Fc α R) expresso em células de linhagem mielóide
CDYN	Complacência dinâmica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
D	Fator tipo de dieta do arranjo experimental tipo fatorial
DALT	Tecido linfoide associado ao ducto lacrimal
DALY	Índice da OMS que avalia a morbidade
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DC	Células dendríticas
d.p.i.	Dias pós-infecção
DMEM	Meio Dulbecco's Eagle modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fc	Fração constante
Fc α R	Receptor de fração constante do tipo alfa, também denominado CD89
Fc α / μ R	Receptor de fração constante do tipo alfa e mi
FEV100	Volume expiratório forçado no primeiro milissegundo
FVC	Capacidade vital forçada
G	Fator tipo de grupo do arranjo experimental tipo fatorial
GALT	Tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal
GST	Glutathione S-transferase

LISTA DE ABREVIATURAS

Hb	Hemoglobina
HRP	Horseshoe Peroxidase
HSD	Teste de contraste de Tukey
iBALT	Tecido linfóide induzível associado aos brônquios
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Alfa-Imunoglobulina
IgE	Epsilon-Imunoglobulina
IgG	Gama-Imunoglobulina
IgM	Mi-Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Célula linfóide inata
ILF	Folículo linfóide isolado
INFT	Infiltrado celular
INL	Lavado intestinal
L4	Larva no 4º estágio de desenvolvimento
L	Fator tipo de linhagem de camundongos do arranjo experimental fatorial
LALT	Tecido linfóide associado à laringe
LDALT	Tecido linfóide associado aos ductos lacrimais
LEU	Leucócitos
LIGP	Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos
LINF	Linfócitos
LP	Lâmina própria
LRV	Extrato bruto de larvas de <i>Ascaris</i> sp.
M-17	Meio de cultura bacteriana M-17 Broth
MAC	Macrófagos
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
MZ	Linfócitos da zona marginal
NALT	Tecido linfóide associado à nasofaringe
NCDO	Linhagem bacteriana probiótica de <i>L. lactis</i>
NEUT	Neutrófilos
N.I.	Grupo de animais não infectados (Grupo controle)
NTD	Doenças tropicais negligenciadas
O.D.	Densidade óptica
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde
OPD	Diidro o-fenilendiamina
PAS	Ácido periódico-Schiff
PAT	Patologia pulmonar
PBS	Tampão fosfato salínico
P.I.	Grupo de animais infectados uma única vez (infecção primária)
pIgA	Imunoglobulina-alfa polimérica
pIgR	Receptor de Ig polimérica
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride (Inibidor de protease)

LISTA DE ABREVIATURAS

PP	Placas de Peyer
PROT	Proteínas totais
RA	Ácido retinóico
R.E.	Resistência elástica pulmonar
R.I.	Grupo de animais reinfestado
SC	Componente secretor
SCID	Linhagem de camundongos que não apresentam células B e T funcionais
SIgA	IgA secretória
T	Fator tempo de infecção do arranjo experimental fatorial
T. A.	Temperatura ambiente
TECI	Tecido intestinal
TECP	Tecido pulmonar
TD	Produção de IgA por via timo dependente
TGF- β	Fator de crescimento tumoral do tipo β
TI	Produção de IgA por via timo independente
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo α
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
UNLB	Não marcado
W	Teste de Shapiro-Wilk

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRAT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 Aspectos parasitológicos	20
1.1.1 Contextualização e epidemiologia	20
1.1.2 Taxonomia	21
1.1.3 Biologia.....	22
1.1.4 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento da ascaridiose	24
1.2 Aspectos imunológicos	26
1.2.1. Resposta imune sistêmica à ascaridiose	30
1.2.2. Resposta imune de mucosa nas helmintoses: papel da SIgA	31
2 JUSTIFICATIVAS	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Questões éticas na experimentação animal.....	38
4.2 Modelos experimentais	38
4.3 Delineamento experimental	38
4.4 Preparo e administração da dieta probiótica	41
4.5 Obtenção e cultura de ovos	42
4.6 Preparo dos ovos para infecção	43
4.7 Protocolos de infecção	43
4.7.1 Protocolo de infecção	43
4.7.2 Protocolo de reinfecção	43
4.8 Procedimento de eutanásia	44
4.9 Obtenção e processamento do lavado de mucosa broncoalveolar (BAL)	44
4.9.1 Processamento do BAL	44
4.10 Obtenção e processamento do lavado de mucosa intestinal (INL).....	45
4.10.1 Processamento do INL.....	45
4.11 Obtenção e processamento de tecidos	45
4.12 Determinação da carga parasitária	46
4.13 Dosagem de proteínas totais	46

SUMÁRIO

4.14	Dosagem de hemoglobina.....	46
4.15	Prova de função pulmonar por espirometria.....	46
4.16	Preparo de antígenos (Extrato bruto de larvas).....	47
4.17	Ensaio imunoenzimático para avaliação de SIgA total e específica	48
4.18	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
	CAPÍTULO 1: Caracterização da resposta imune de mucosa contra ascaridiose larval murina.....	52
5.1	Variação cinética do parâmetro parasitológico: intensidade de infecção	54
5.2	Variação cinética dos parâmetros imunológicos de mucosa	59
5.2.1	Produção de SIgA	59
5.2.2	Composição celular no BAL	61
5.3	Parâmetros fisiopatológicos de mucosa.....	65
5.3.1	Presença de proteínas totais e hemoglobina no BAL	65
5.3.2	Avaliação do impacto da migração larval na função pulmonar.....	67
5.4	Relação entre os parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos	70
	CAPÍTULO 2: Importância de eosinófilos na indução de SIgA e na proteção contra a infecção por ascaridiose larval.....	73
5.5	Influência de eosinófilos nos parâmetros imunoparasitológicos de mucosa	75
5.6	Influência dos eosinófilos na produção de muco na mucosa pulmonar	77
	CAPÍTULO 3: Influência de receptores do tipo Toll (TLR) na produção de SIgA-total e na proteção contra ascaridiose larval	79
5.7	Avaliação dos parâmetros imunoparasitológicos: carga parasitária e SIgA-total	81
5.8	Composição das células leucocitárias no BAL.....	82
5.9	Avaliação do impacto da ausência de TLR na função pulmonar	83
	CAPÍTULO 4: Influência da administração de probiótico na produção de SIgA e na proteção contra ascaridiose larval.....	85
5.10	Avaliação da carga parasitária após ingestão de probiótico	87
5.11	Produção de SIgA após ingestão de probiótico	87
5.12	Composição das células leucocitárias no BAL após ingestão de probiótico.....	89
6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	90
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
8	CONCLUSÕES	104
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO CEUA.....	125

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos parasitológicos

1.1.1 Contextualização e epidemiologia

Diversos helmintos causam doenças parasitárias crônicas que afetam diversas espécies de hospedeiros, inclusive a humana. Dentre os vermes pertencentes ao filo Nematoda encontram-se os agentes etiológicos de importantes parasitoses intestinais transmitidas pelo solo, as geo-helminoses: ascaridiose, tricurirose e ancilostomose¹.

As geo-helminoses representam um problema de saúde pública com grande impacto socioeconômico, como demonstrado pelo índice DALY (disability-adjusted life year) da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO). Este índice leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma deficiência². De acordo com o DALY, em 2010 a população mundial perdeu, aproximadamente, cinco milhões de anos de vida saudável devido às infecções causadas por geo-helminoses³, sendo que somente a ascaridiose contribuiu para a perda de 1,32 milhões⁴. Além disso, a ascaridiose apresenta a maior taxa de mortalidade entre as geohelminoses⁶ provavelmente porque a ascaridiose é a mais prevalente dentre as geo-helminoses³ devido ao grande número de ovos liberados pela fêmea (aproximadamente 240.000 ovos/dia)⁷ e à longa viabilidade e resistência dos mesmos⁸.

A ascaridiose é mundialmente disseminada⁹⁻¹². A doença apresenta estimativa de prevalência mundial acima de 800 milhões de infecções, sendo que 59 milhões de pessoas se encontram em risco de desenvolverem alguma morbidade e, 10-60 mil óbitos ocorrem anualmente devido a morbidades severas⁵. Na região da América Latina e Caribe é estimada uma prevalência de 86 milhões de infecções⁵. No caso específico do Brasil, em 2008 a incidência era estimada em 40,1 milhões de infecções¹³.

Vários fatores de riscos para a transmissão da ascaridiose já foram relatados na literatura. Os fatores ambientais positivamente relacionados à transmissão da doença foram os relacionados ao clima (maiores níveis de precipitação e temperatura) e características do solo (menor aridez e pH entre 5,35 - 5,65)¹⁴⁻¹⁷. Ao contrário, ações de saneamento básico foram associadas à redução do risco de transmissão da ascaridiose, assim como de outras helmintoses¹⁸.

Com relação ao hospedeiro, a idade é um importante fator de risco devido aos picos de prevalência e de intensidade parasitária ocorrerem na faixa etária entre seis a dez anos, apesar de a infecção poder ocorrer em todas as faixas etárias¹⁹. Ademais, crianças portadoras de infecções crônicas e intensamente parasitadas são mais susceptíveis a apresentarem desnutrição e consequente déficit cognitivo¹⁰.

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

Outro fator crítico para a transmissão da ascaridiose é a condição socioeconômica do hospedeiro, pois, a renda familiar, o nível de escolaridade da dona de casa, o índice de desenvolvimento humano e as condições peridomiciliares foram associados com o risco de transmissão da ascaridiose ^{16, 20-23}.

Em resumo, a ascaridiose humana é uma parasitose crônica com grande impacto socioeconômico. É também considerada uma das mais prevalentes doenças tropicais negligenciadas - NTD ^{13, 24} devido à associação entre altas taxas de prevalência e intensidade de infecção com situações de pobreza aguda e precárias condições sanitárias ocorrerem em países em desenvolvimento de regiões tropicais ^{1, 9, 10}.

1.1.2 Taxonomia

Os agentes etiológicos da ascaridiose são helmintos pertencentes ao Filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Ascaridida, família Ascarididae e gênero *Ascaris*. Neste gênero já foram descritas duas espécies, *A. lumbricoides* (Linnaeus, 1758) e *A. suum* (Goeze, 1782). Estudos de infecções experimentais ^{25, 26} e de observações epidemiológicas ^{27, 28} têm associado *A. lumbricoides* à infecção em humanos e *A. suum* a infecções em suínos.

Entretanto, evidências também sugerem que as duas espécies de *Ascaris* sp. podem ser patogênicas para ambos hospedeiros, visto que já foi demonstrada a ocorrência de transmissão cruzada experimental ^{25, 29}. E, ainda, recentes estudos epidemiológicos têm sugerido a ocorrência de transmissão cruzada natural ^{12, 29-32}.

Em termos de características biológicas e morfológicas, as duas espécies são indistinguíveis em todos os estágios de desenvolvimento ³³⁻³⁵. Exceções ocorrem apenas por uma pequena diferença no espaço entre os dentículos dos vermes adultos ^{29, 36, 37} e de pouquíssimas diferenças genômicas no DNA nuclear e mitocondrial ^{29, 34, 35}. Logo, com base na semelhança morfológica e molecular, e também em dados paleoparasitológicos, alguns autores questionam serem estas duas espécies distintas ^{34, 35}.

Para alguns pesquisadores as pequenas diferenças observadas nos exemplares provenientes de humanos e suínos seriam reflexos de pequenas modificações adaptativas no genótipo e fenótipo destas populações. Neste contexto é sugerido que os termos *A. lumbricoides* e *A. suum* sejam considerados sinônimos, com o primeiro tendo prioridade taxonômica em relação ao segundo ³⁴. Todavia, como ainda não se definiu a controvérsia na comunidade científica, neste trabalho continuaremos a identificar os exemplares provenientes de suínos como sendo *A. suum*.

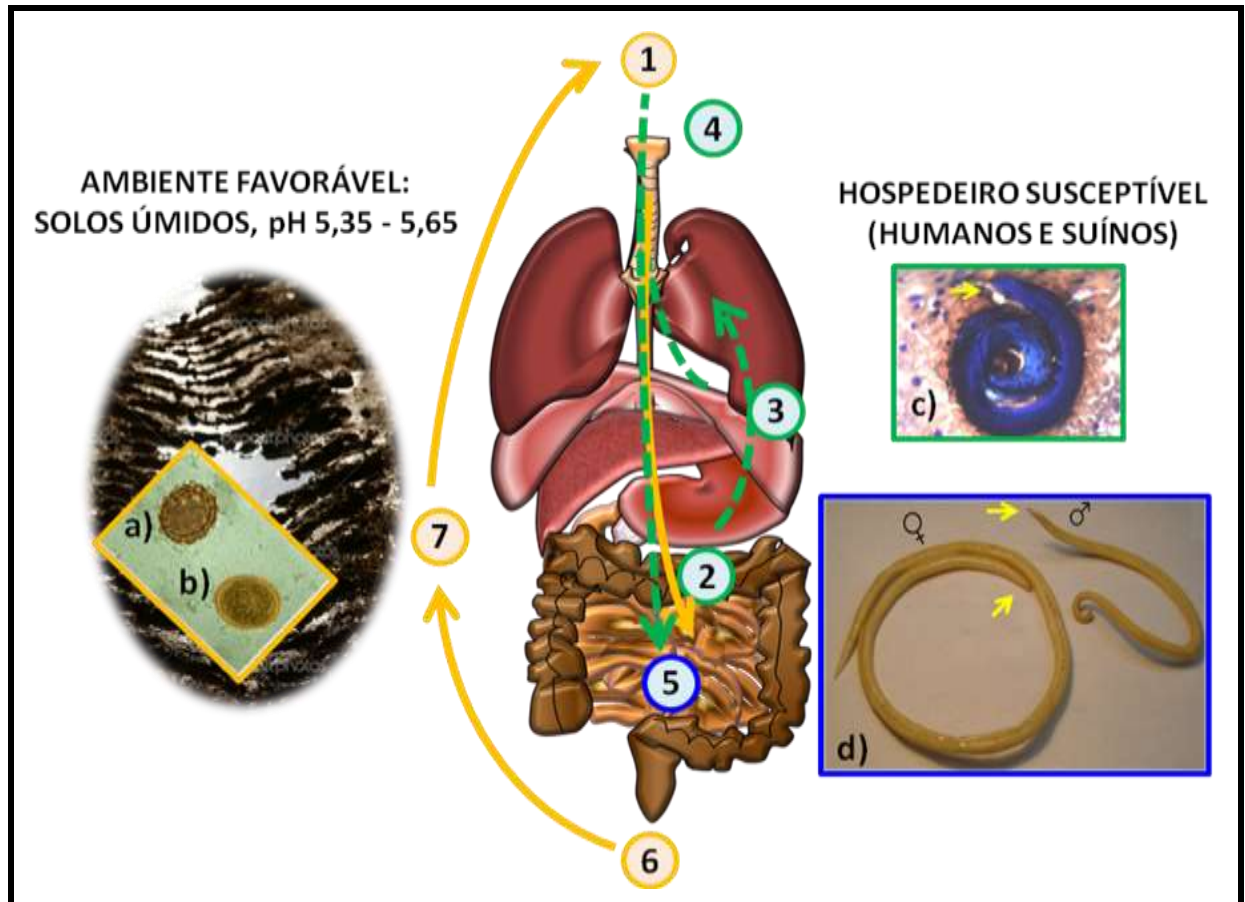
Contudo, para além de discussões taxonômicas, a existência de infecções cruzadas entre estas espécies pode impactar as ações profiláticas e de vigilância epidemiológica da doença. Dados recentes sugerem que, devido à adaptação de *A. suum* ao hospedeiro suíno, a infecção humana por esta espécie pode levar ao desenvolvimento da síndrome da larva migrans visceral ao invés de ascaridiose intestinal clássica, o que elevaria a morbidade da doença³⁰. Apesar de não haver dados de prevalência desta síndrome, vários relatos de casos têm associado casos de larva migrans visceral a infecções por *A. suum*, principalmente em áreas endêmicas para ascaridiose suína no Japão. Em alguns destes relatos são descritos presença de larvas detectadas em exames de imagens, pronunciada eosinofilia, sorologia positiva para *A. suum* e ausência de ovos nas fezes³⁸⁻⁴⁵. Entretanto, alguns autores chamam a atenção para a possibilidade de reações cruzadas entre *Ascaris* sp., *Toxocara* sp. e outros helmintos em exames de sorologia⁴⁶⁻⁴⁸. Assim, mais estudos epidemiológicos deverão ser realizados considerando a possibilidade de ocorrência desta síndrome para propor ações de saúde públicas.

1.1.3 Biologia

Como outros vermes nematódeos, *Ascaris* sp. apresentam três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e adultos (Figura 1). Os ovos férteis e não embrionados recém-liberados nas fezes possuem um tamanho aproximado de 30 a 40 µm de largura por 50 a 60 µm de comprimento, contendo uma massa células germinativas. Apresentam coloração marrom e uma casca formada por três camadas: Uma membrana vitelina interna, uma camada intermediária quitinosa e uma membrana mamimolada externa composta por mucopolissacarídeos (Figura 1a)⁷.

Em algumas situações a membrana mamimolada pode não estar presente, sendo os ovos denominados, decorticados (Figura 1b). Alguns ovos liberados nas fezes podem ser inférteis, sendo que estes são maiores que os férteis, possuem camada mamilonada menos espessa e material interno desorganizado⁷.

As larvas se desenvolvem até o terceiro estágio (L3 – forma infectante) dentro do ovo. As larvas L3 recém-eclodidas recuperadas de tecidos de camundongos medem de 271 a 343 µm de comprimento por 17 a 20 µm de espessura. Durante a migração pulmonar as larvas se desenvolvem até o quarto estágio (L4), sendo que larvas L4 encontradas nos pulmões (Figura 1c) medem de 1.357 a 2.400 µm de comprimento por 34 a 71 µm de espessura⁴⁹.

Figura 1 Estágios de desenvolvimento e ciclo de vida de *Ascaris* sp.

Estágios de desenvolvimento e representação esquemática do ciclo de vida de *Ascaris* sp.. **1:** Ingestão de ovos embrionados infectantes por hospedeiros suscetíveis (humanos e suínos). **2:** Eclusão das larvas e invasão da mucosa intestinal **3:** Migração hepatopulmonar **4:** Ascensão das larvas à árvore brônquica, deglutição e retorno das larvas ao trato gastrointestinal **5:** Desenvolvimento de machos e fêmeas, acasalamento e postura de ovos no intestino delgado. **6:** Liberação de ovos nas fezes. **7:** Desenvolvimento dos ovos em ambiente favorável. Em **detalhe:** a) Ovo contendo membrana mamimolada. b) Ovo decorticado. c) Microfotografia mostrando larva cercada de leucócitos no sedimento do BAL corados por H.E. (aumento: 40 X). b) Fotografia representativa de um casal de vermes adultos. Setas indicam a região anterior da larva e dos vermes adultos. Os tamanhos representados não correspondem às proporções reais entre os estágios.

Fonte: Adaptação de figura encontrada no site do Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>

Os vermes adultos são grandes, alongados e cilíndricos. Apresentam uma camada exterior quitinosa formada por uma cutícula anucleada que é secretada pelo epitélio adjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui dentículos envoltos por três lábios. Apresentam dimorfismo sexual (Figura 1d), sendo as fêmeas geralmente maiores (20 a 49 cm de comprimento por 0,3 a 0,6 cm de diâmetro) que os machos (15 a 30 cm de comprimento por 0,2 a 0,4 cm de diâmetro). Além disso, a região posterior das fêmeas é retilínea enquanto a dos machos é curvada na direção ventral ⁷.

Os ascarídeos possuem longevidade média de um ano e apresentam ciclo de vida monoxênico que envolve um único hospedeiro e um período de incubação dos ovos no ambiente (Figura 1). A transmissão ocorre por via oro-fecal, sendo a infecção iniciada pela ingestão de ovos embrionados ⁷. Em suínos já foi demonstrado que, aproximadamente três horas após a ingestão dos ovos, as larvas eclodem, penetram a mucosa intestinal e são transportadas para o fígado via sistema vascular portal ^{7,50}.

Apesar do camundongo não ser hospedeiro natural nem albergar estágios adultos de *Ascaris* sp., o padrão migratório das larvas em infecções experimentais é análogo ao de humanos e suínos ⁵¹. Assim, após penetração pela parede intestinal, as larvas realizam uma migração hepatopulmonar na qual se desenvolvem até o quarto estágio larval (L4). O pico de recuperação de larvas no fígado ocorre no 4º d.p.i., sendo que do 4º ao 7º d.p.i. ocorre a migração pelo parênquima pulmonar. A migração pelo parênquima pulmonar, denominada Ciclo de Loss, leva as larvas até os alvéolos e, então, estas ascendem à traqueia/esôfago e retornam ao trato gastrointestinal. O pico de recuperação das larvas no intestino ocorre entre o 8º e o 10º d.p.i. ^{7,50}. A variação cinética da migração hepatopulmonar é semelhante à descrita para suínos quando avaliado o modelo experimental com murinos ^{52,53}

No intestino delgado de hospedeiros susceptíveis, as larvas se estabelecem e completam o desenvolvimento até o estágio adulto. Após acasalamento cada fêmea pode liberar uma média de 240.000 ovos/dia que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro. Os ovos férteis recém-liberados possuem apenas uma massa celular interna, necessitando de um período de incubação, em ambiente propício para a formação do embrião ⁷.

1.1.4 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento da ascaridiose

Frequentemente infecções com cargas leves (0 – 5.000 ovos/g de fezes) a moderadas (5.001 a 50.000 ovos/g de fezes) se apresentam assintomáticas ou com sintomatologia inespecífica, tais como: dor ou desconforto abdominal, náusea, anorexia e diarreia. Contudo, em virtude da morbidade e a mortalidade aumentarem em função da carga parasitária, infecções robustas com cargas altas (> 50.000 ovos/g de fezes) se associam com complicações severas da doença ⁹. De acordo com estimativas, aproximadamente 58,1 milhões de pessoas encontravam-se infectadas com altas cargas parasitárias ⁵⁴.

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

Na fase aguda (ascaridiose larval), isto é, no período de migração hepatopulmonar, altas cargas parasitárias são associadas a casos de pneumonite eosinofílica⁵⁵. Além disso, migração larval “atípica” pode causar raras, mas graves complicações em órgãos não relacionados ao padrão migratório, como a ascaridiose escrotal⁵⁶.

Na ascaridiose intestinal (fase crônica) as complicações se relacionam, principalmente, com anemia e desnutrição. Já foi relatada a secreção de enzimas pancreáticas por exemplares do gênero *Ascaris* e também foi demonstrada a ação bloqueadora destas enzimas na absorção de nutrientes no intestino delgado⁵⁷. Corroborando estes achados, evidências epidemiológicas demonstraram que hospedeiros portadores de infecções com intenso parasitismo podem apresentar desnutrição com graves consequências nutricionais, além de impactos no desenvolvimento físico e cognitivo¹⁰.

A presença massiva de vermes adultos pode também causar outras raras, mas graves morbidades, tais como: obstrução intestinal aguda ou subaguda, apendicite, abscesso hepático, ascaridiose pancreática e biliar^{11, 58-68}.

A ascaridiose é diagnosticada pela presença de ovos nas fezes do hospedeiro. O método de diagnóstico recomendado pela OMS/WHO é o teste de Kato-Katz, que permite a quantificação de ovos de geo-helmintos nas fezes humanas⁶⁹ com simplicidade e baixo custo⁷⁰. Contudo, este método apresenta desvantagens, tais como: comprometimento da eficácia nos casos de baixa intensidade da infecção⁷¹ e total ineficácia em casos nos quais não há produção de ovos. Por exemplo, durante a pré-patência (período após a infecção e anterior ao início da eliminação de ovos nas fezes) ou em infecções com todos os exemplares pertencentes ao mesmo sexo²⁹.

As limitações do teste tornam-se evidentes no período pré-patente (até o 40º a 53º dias pós-infecção com *A. suum* e até o 54º a 61º dias pós-infecção com *A. lumbricoides*)²⁶ que corresponde à fase de migração larval e pode causar complicações severas, principalmente, nos casos de infecções maciças.

A fim de desenvolver uma alternativa de diagnóstico mais sensível, específico e eficaz que possibilite a detecção da infecção ainda na fase inicial, estudos sorológicos usando antígenos obtidos de larvas e vermes adultos têm sido realizados com algum sucesso^{38-40, 72, 73}. E, ainda, o potencial de aplicação destes testes sorológicos no diagnóstico da ascaridiose em suínos e humanos é ressaltado pela comprovada homologia entre os antígenos secretados por estágios larvais de *A. suum* e *A. lumbricoides*⁷².

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

Ainda assim, apesar dos avanços em imunodiagnóstico, mais estudos são necessários para superar limitações relativas a tais métodos e que podem ocasionar superestimativas de prevalência da infecção. Exemplos destas limitações incluem a dificuldade em diferenciar acuradamente infecções helmínticas ativas de prévias infecções curadas⁷⁴ e a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de ascarídeos, como o *Toxocara* sp. ou outros helmintos^{46, 75}.

Dados da literatura confirmam a eficácia do tratamento químico contra os estágios de desenvolvimento de vermes adultos do parasito: dose única oral de albendazol, mebendazol e pamoato de pirantel apresentou altas taxas de cura para *A. lumbricoides*⁷⁶. Ademais, levamisole em dose única apresentou taxa de cura de 92 %⁷⁷ e, ivermectin sozinha ou conjugada com albendazol apresentaram taxas de cura de 94 e 99,5 %, respectivamente⁷⁸. Deste modo, a OMS/WHO recomenda estas cinco drogas para o tratamento da ascarirose⁷⁹ de acordo com quadro 1.

Quadro 1: Tratamentos para a ascarirose humana recomendados pela OMS/WHO.

Droga	Dose recomendada
Albendazol	500mg (Dose única)
Ivermectina	50-200µg/kg
Levamisole	2,5mg/kg
Mebendazole	500mg (Dose única)
Pirantel	10mg/kg (Dose única)

Fonte: OMS/WHO, 1998.

1.2 Aspectos imunológicos

Considerando a interação dos estágios de desenvolvimento de *Ascaris* sp. com as mucosas intestinal e pulmonar, o entendimento de como ocorre a indução da resposta imune de mucosa durante esta infecção se torna preponderante. Semelhante ao que acontece no sistema imunitário sistêmico (que envolve medula, timo e linfonodos), a ativação antigênica e a ação efetora da resposta imune também ocorrem nos tecidos linfóides associados às mucosas (MALT).

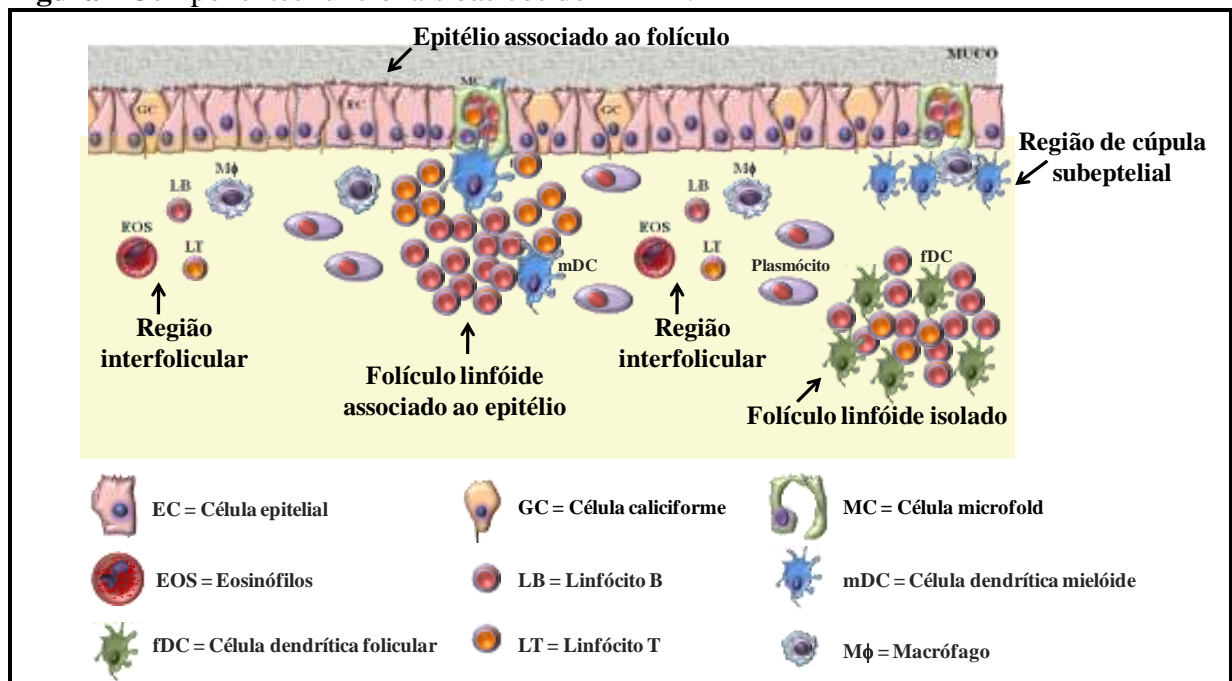
O MALT é encontrado ao longo de toda superfície das mucosas e, dependendo do órgão onde se localiza, pode apresentar diferenças em aspectos anatômicos, morfológicos e funcionais. Assim, de acordo com sua localização e características, foi classificado em diferentes subtipos, sendo os mais conhecidos os tecidos linfóides associados ao trato gastrointestinal (GALT), aos brônquios (BALT) e à nasofaringe (NALT). Contudo, outros

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

subtipos também já foram descritos, tais como, os tecidos linfóides associados à conjuntiva (CALT), ao ducto lacrimal (LDALT), à laringe (LALT) e aos ductos salivares (DALT) ⁸⁰.

Apesar das diferenças já citadas, todos os subtipos de MALT apresentam os mesmos compartimentos funcionais básicos (Figura 2): os folículos linfóides isolados, as regiões interfoliculares, as regiões de cúpula subepiteliais e os folículos associados ao epitélio que contém as células M ⁸⁰. Além disso, independente do subtipo de MALT, os antígenos são reconhecidos diretamente via células apresentadoras profissionais (APC), incluindo células dendríticas (DC) e macrófagos, e também por células especializadas do epitélio das mucosas (células Microfold) ⁸⁰⁻⁸².

Figura 2 Componentes funcionais básicos do MALT.



Representação esquemática dos componentes funcionais básicos (Folículo linfóide associado ao epitélio, folículo linfóide isolado, região de cúpula subepitelial e região interfolicular) que ocorrem em todos os tipos de MALT. De acordo com o órgão no qual este se localiza, a espécie e a idade do indivíduo podem causar diferenças morfológicas, no número e na quantidade de componentes em cada tipo de MALT. No GALT, o folículo linfóide associado ao epitélio é denominado de Placa de Peyer.

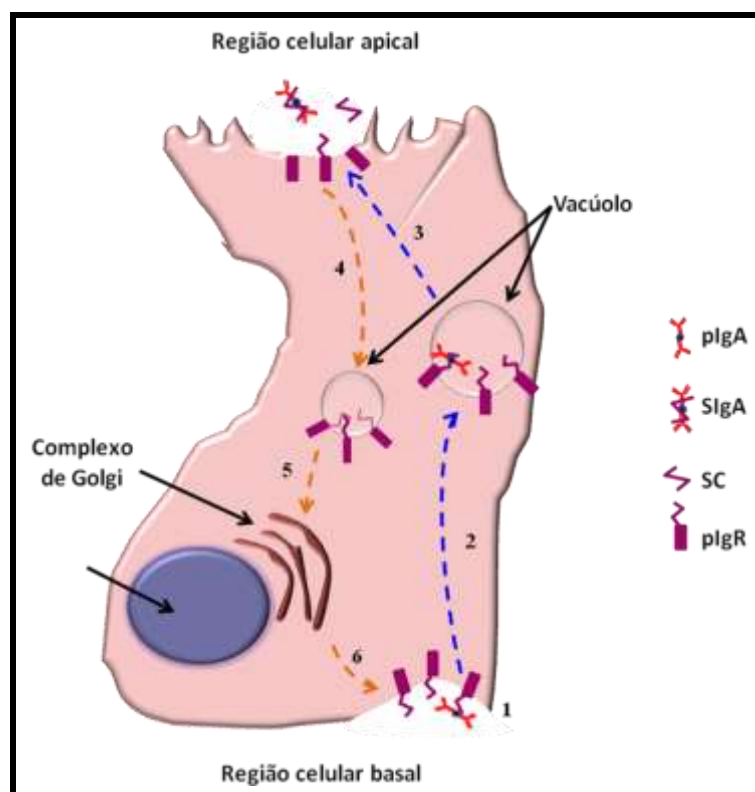
Fonte: Créditos à autora.

O GALT é o subtipo mais bem descrito e se constitui dos sítios indutores que ocorrem no apêndice, nas placas de Peyer (PP), nos centros germinativos e nos folículos linfóides isolados (ILF). Este subtipo de MALT é constitutivo e se forma no período fetal. Já o BALT e o NALT possuem organização estrutural semelhante à encontrada nas PP, porém, o BALT é inexistente em humanos e camundongos saudáveis, sendo induzido apenas durante infecções pulmonares (iBALT) ⁸³⁻⁸⁷.

IgA polimérica (pIgA) é a principal imunoglobulina sintetizada no MALT, sendo que vários mediadores humorais participam da regulação da produção desta imunoglobulina. Por exemplo, durante a resposta imune inata contra helmintos, a produção de IgA ocorre pela via extrafolicular independente de células T (TI). A ligação de antígenos de helmintos a receptores de padrão molecular (PAMPs) expressos nas células epiteliais e células dendríticas foliculares liberam TSLP, TGF- β , IL-10, ácido retinóico (RA) e óxido nítrico (NO). Estes fatores humorais ativam as células linfoides inatas (ILCs) que, por sua vez, ativam as células B foliculares via ligação de mediadores, tais como: CD40L, TGF- β , IL-4, -10, -21, BAFF e APRIL (Ref). Além disso, IL-33 induz ativação de células B1 e, TGF- β e IL-5 agem sinergeticamente na produção de IgA. Já na resposta imune adaptativa contra helmintos a produção de IgA é induzida pela via dependente de células T (DT) que envolve a participação de células T regulatórias, assim como de células Th2, Th9 e Th17⁸⁸⁻⁹².

Também já foi demonstrado que a citocina IL-17 é importante para a produção do receptor de imunoglobulinas poliméricas (pIgR), uma proteína transmembrana expressa na superfície de células do epitélio glandular secretor e das mucosas⁹³. Este receptor é responsável pelo processo de transcitose, isto é, o transporte até o muco da pIgA produzida no MALT (Figura 3). Na região apical destas células epiteliais a porção extracelular de ligação do pIgR é clivado e liberado juntamente com a pIgA, sendo este complexo denominado IgA secretória (SIgA). Além disso, o receptor não ligado à IgA também pode ser eficientemente transportado e liberado no muco, sendo este denominado componente secretor (SC) livre⁹⁴⁻⁹⁸.

A importância da SIgA na resposta imune de mucosa pode ser evidenciada pela ampla variedade de células efetoras (basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos) que apresentam receptores para esta molécula⁹⁷⁻¹⁰¹. O receptor de fração constante α (Fc α R ou CD89) é expresso na superfície de células de linhagem mieloide e, sua interação com SIgA é capaz de estimular “burst respiratório”, fagocitose, desgranulação e produção de citocinas. Já o receptor de fração constante alfa/mi (Fc α / μ R) é expresso na membrana de células B maduras e macrófagos, já tendo sido demonstrada sua capacidade de induzir endocitose de microesferas adsorvidas com IgM e, ou *Staphylococcus aureus* cobertos por IgM^{98, 102}.

Figura 3 Processo de transcitose da pIgA pelo pIgR.

Representação esquemática dos processos celulares e moleculares envolvidos no processo de transporte da pIgA pela célula epitelial. 1) Reconhecimento e ligação da pIgA pela região extra-celular do pIgR. 2) Endocitose do complexo pIgA-pIgR, formação de vacúolo e início do processo de transcitose. 3) Fusão do vacúolo com a membrana plasmática da região apical com liberação da parte extracelular do pIgR complexado à pIgA no muco (SIgA) ou livre (SC). 4) Endocitose da membrana contendo a parte intracelular do pIgR e formação de vacúolo para reciclagem da proteína. 5) Fusão do vacúolo com o complexo de Golgi e reconstrução da parte extracelular do pIgR. 6) Transporte do pIgR do complexo de Golgi para a exposição da proteína na superfície basolateral da célula epitelial. pIgA = Imunoglobulina-A polimérica. pIgR = Receptor de imunoglobulina polimérica. SC = Componente secretor. SIgA = Imunoglobulina-A secretória.

Fonte: Créditos à autora.

Ademais, os eosinófilos, células residentes de tecidos que têm um papel chave em reações protetoras e patológicas em mucosas, expressam diferentes e importantes receptores de IgA, dentre eles: pIgR e o Fc α R. O receptor de pIg induz a desgranulação de eosinófilos com liberação de proteína catiônica e peroxidase^{97,99,100}.

É especulado que a existência simultânea de Fc α R e pIgR nos eosinófilos possa ser a base da potente desgranulação induzida pela ligação de SIgA⁹⁹. Assim, a SIgA poderia atuar como uma molécula coestimuladora de eosinófilos, podendo representar novo mecanismo de regulação da magnitude da resposta inflamatória de tecido¹⁰⁰. Assim, estes receptores podem ser elementos-chave na ação de eosinófilos nas mucosas, incluindo reações protetoras e patológicas.

1.2.1. *Resposta imune sistêmica à ascaridiose*

Estudos da resposta imune na fase aguda da ascaridiose, frequentemente realizados em modelos animais, relatam a ocorrência de um padrão celular misto, com a participação de citocinas sistêmicas do tipo 2 (IL-4, -5, -9 e -13), do tipo 17 (IL-17A) e regulatórias (IL-10 e TGF- β)^{52, 103}. Concomitantemente, foi demonstrada uma modulação da resposta imune e da ativação de células dendríticas^{103, 104}.

Nos casos de reinfecções, ocorre um aumento da presença de células inflamatórias circulantes e da produção de citocinas, principalmente, IL-4, -5, -6, -10, -17A e TNF- α , em comparação com a infecção primária. Além disso, a intensa inflamação pulmonar associada com o padrão de resposta polarizada Th2/Th17 parece ser crucial para o controle da migração larval¹⁰⁵.

Anticorpos séricos específicos contra antígenos brutos de *Ascaris* sp. já foram detectados em camundongos infectados^{106, 107}. Em um estudo de imunização em modelo experimental, por via intranasal, com uma proteína recombinante de *Ascaris* sp. (As14) ocorreu um aumento do nível das imunoglobulinas IgE e IgG séricas e de IgA de mucosa, sendo este aumento associado a uma redução de 64% no número de larvas recuperadas no tecido pulmonar, em comparação com o grupo não vacinado¹⁰⁸.

Na fase crônica da doença, estudos da resposta imune em humanos também reportaram existência de um padrão misto de resposta imune celular e simultânea modulação da atividade de citocinas típicas da resposta imune tipo 1. Relata-se, ainda, uma significativa eosinofilia e baixa proliferação linfocitária¹⁰⁹⁻¹¹³. Na resposta imune humoral, elevados títulos de IgG total e de IgG4 específicos foram encontrados em pacientes infectados¹¹⁰. Pouco relatos são encontrados sobre a resposta imune induzida por eventos de reinfecção por *Ascaris* sp. em humanos. Em um estudo longitudinal realizado, antes e após tratamento quimioterápico, foi demonstrado que crianças com altos níveis de IgE total antes do tratamento são mais propensas à reinfecção. Contudo, quando os níveis de IgE específicos para *Ascaris* foram avaliados, foi observada uma correlação inversa entre níveis de IgE específicos e as taxas de reinfecção neste mesmo grupo estudado^{114, 115}.

1.2.2. Resposta imune de mucosa nas helmintoses: papel da SIgA

A importância da SIgA na proteção contra infecções por diferentes patógenos já foi consolidada, principalmente em infecções bacterianas e virais^{95, 116-120}. Já o papel de SIgA na proteção contra helmintos vem ganhando destaque na literatura apenas nas últimas décadas.

Neste contexto, estudos com diferentes hospedeiros e parasitos revelaram que altos níveis de IgA específica contra antígenos derivados de larvas e, ou adultos de helmintos se relacionam inversamente com carga parasitária ou positivamente com resistência à infecções helmínticas. Estas relações protetoras já foram demonstradas em diversos modelos, tais como, ovinos infectados com *Ostertagia circumcincta*¹²¹, *Haemonchus contortus*¹²², *Teladorsagia circumcincta*¹²³⁻¹²⁶ e, ainda, em hamsters infectados com *Ancylostoma ceylanicum*¹²⁷, camundongos infectados com *Pygidiopsis suuma*¹²⁸ ou vacinados com proteína recombinante de *Trichinella spiralis*¹²⁹ ou com antígeno de *Schistosoma mansoni*¹³⁰. Além disso, anticorpos IgA monoclonais específicos contra *Trichinella britovi* injetados via intraperitoneal em camundongos BALB/c e SCID protegeram os animais do desafio com o parasito (95% proteção)¹³¹.

Quanto a infecção por *A. suum* em suínos, foi encontrado um alto número de células IgA-positivas na região de brônquios e peribrônquios dos pulmões e na lâmina própria (LP) intestinal de suínos resistentes à infecção, sugerindo que a produção local de IgA pode estar envolvida na proteção contra larvas migrantes^{107, 132}.

2 JUSTIFICATIVAS

2 JUSTIFICATIVA

Estudos paleoparasitológicos demonstram a presença de infecções por *Ascaris* sp. desde tempos medievais e períodos pré-Colombianos^{133, 134}. Contudo, apesar da ascaridiose ser uma doença de ciclo simples, evitável e facilmente tratável, esta doença ainda apresenta relevância epidemiológica nos dias atuais, impactando a saúde pública de áreas endêmicas.

Por ser uma doença com transmissão oro-fecal e sem presença de hospedeiros intermediários, a manutenção da ascaridiose nas áreas endêmicas se deve às precárias condições de saneamento básico do ambiente e à pouca ou nenhuma educação em saúde das populações afetadas^{16, 20-23, 135}.

Neste cenário, apesar da demonstrada eficácia dos tratamentos quimioterápicos contra vermes adultos de *Ascaris* sp., as intervenções profiláticas são limitadas, ocorrendo elevadas taxas de reinfecção após tratamento (entre um a seis meses) tanto em humanos quanto em suínos. Ademais, as taxas de prevalência da ascaridiose nas reinfecções podem ser tão altas quanto antes do tratamento¹³⁶⁻¹⁴¹. Mas, ainda não são claros quais são os mecanismos que levam à susceptibilidade/resistência à infecção.

O papel de SIgA de diferentes mucosas como fator protetor contra diversas helmintoses vem sendo delineado recentemente, inclusive, contra a ascaridiose^{107, 122-128, 130, 132}. Contudo, ainda existem várias lacunas sobre o papel de SIgA na resistência/susceptibilidade à ascaridiose, principalmente sobre a SIgA de mucosa intestinal. Além disso, o papel de células imunes inatas e de receptores de sinais de padrão molecular na indução de SIgA de mucosa, assim como a relação desta imunoglobulina com a proteção e patogenia induzidos pela infecção por *Ascaris* sp. ainda necessitam de maiores detalhamentos.

O estudo da resposta imune de mucosa contra a ascaridiose é preponderante, pois, durante o ciclo de vida de *Ascaris* sp. ocorrem interações deste com várias mucosas do hospedeiro (infecção por via mucosa oral, a eclosão das larvas e a manutenção de vermes adultos na mucosa intestinal, além do desenvolvimento larval durante migração pela mucosa pulmonar). Assim, os resultados aqui obtidos podem vir a embasar estudos mecanísticos ou o desenvolvimento de vacinas contra a ascaridiose, bem como auxiliar no entendimento da importância desta imunoglobulina em outras helmintoses.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Caracterizar parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos nos lavados de mucosa intestinal e pulmonar, com foco no papel de SIgA nos eventos de susceptibilidade/resistência, durante migração larval na fase aguda da infecção experimental murina com *A. suum*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar e comparar as linhagens BALB/c e C57BL/6 com relação:
 - À variação cinética do parâmetro parasitológico (carga parasitária) nos tecidos e, ou lavados de (broncoalveolar: BAL e intestinal: INL) dos principais órgãos afetados pela migração larval;
 - À variação cinética dos parâmetros imunológicos e fisiopatológicos:
 - Níveis de SIgA no BAL e INL;
 - Composição das populações leucocitárias no BAL;
 - Níveis de proteínas totais e de hemoglobina no BAL;
 - Aos impactos na capacidade respiratória;
 - ✓ Averiguar existência de relação entre eosinófilos e a produção de SIgA, investigando as linhagens selvagem (BALB/c) e deficiente em eosinófilos (Δ dblGATA) em relação ao impacto de infecções múltiplas (reinfecções) com *A. suum* nos parâmetros:
 - Parasitológico (carga parasitária) nos tecidos e lavados de mucosa (BAL) pulmonar;
 - Imunológicos e fisiopatológicos:
 - Níveis de SIgA no BAL e INL;
 - Composição das populações leucocitárias no BAL;
 - Histopatologia e produção de muco no pulmão;
-

3 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar se a produção de SIgA é dependente de ativação de receptores de padrões moleculares, pela comparação das linhagens selvagem (C57BL/6j) e deficientes em TLR (TLR2 e TLR4) através da análise dos parâmetros:
 - Parasitológico (carga parasitária) nos tecidos e lavados de mucosa (BAL) pulmonar;
 - Imunológicos:
 - Níveis de SIgA no BAL e INL;
 - Composição das populações leucocitárias no BAL;
 - Capacidade respiratória;

 - ✓ Verificar o efeito da administração de um probiótico que favorece a produção de SIgA polireativa para avaliação *in vivo* de possível papel protetor desta imunoglobulina, através da análise dos parâmetros:
 - Parasitológico (carga parasitária) nos tecidos e lavados de mucosa (BAL) pulmonar;
 - Imunológicos:
 - Níveis de SIgA no BAL e INL;
 - Composição das populações leucocitárias no BAL;
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Questões éticas na experimentação animal

Após aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo n°. 187/2014 (Anexo 1), as atividades de pesquisas envolvendo modelos animais foram iniciadas e conduzidas de acordo com princípios éticos de boas práticas na experimentação com animais.

4.2 Modelos experimentais

Para atingir os objetivos propostos neste estudo foram usados camundongos (*Mus musculus*) de diferentes linhagens isogênicas, machos e com idade entre seis a nove semanas no início dos experimentos. As linhagens selvagens BALB/c e C57BL/6j foram obtidas do Biotério Central da UFMG. A escolha destas linhagens se baseou no fato de serem isogênicas, geneticamente bem definidas¹⁴² e amplamente usadas na pesquisa biomédica, com destaque para os estudos de resposta imune contra antígenos de *Ascaris* sp.^{52, 53, 106, 143-149}. As linhagens geneticamente modificadas foram gentilmente cedidas por colaboradores deste trabalho (Quadro 2).

Todos os animais foram mantidos, até o momento da eutanásia, no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica (LIGP), local com clima controlado e boas condições de higiene, sendo fornecidas água e comida *ad libitum* e fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro (controlado por um temporizador digital) de acordo com a preconização do CEUA.

Quadro 2 Relação das linhagens de camundongos usadas no estudo da resposta imune de mucosa contra ascaridiose larval experimental.

Linhagem		Característica do animal geneticamente modificado	Colaborador
Selvagem	Modificada		
BALB/c	Δ dblGATA	Deficiente na diferenciação de EOS	Prof. Dr. Remo Russo (UFMG)
C57BL/6j	TLR2 ^{-/-}	Deficiente para o gene do TLR2	Fiocruz (CPqRR)
	TLR4 ^{-/-}	Deficiente para o gene do TLR4	Fiocruz (CPqRR)

4.3 Delineamento experimental

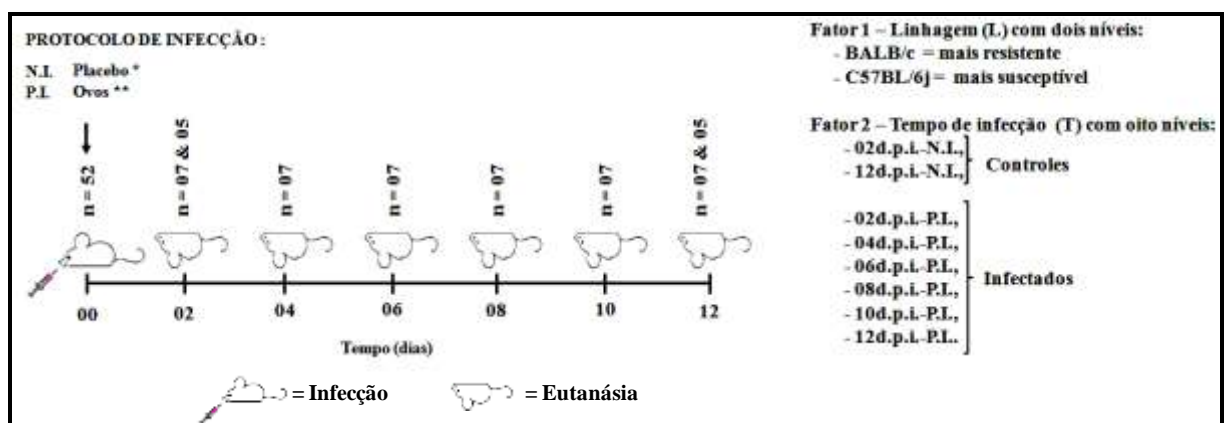
Conforme ilustrado nas figuras 4-7, para atingir os objetivos deste estudo usamos quatro tipos de delineamento experimental, todos com arranjo bifatorial, os quais permitiram a avaliação simultânea da influência de dois fatores sobre a carga parasitária e os parâmetros imunopatológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No experimento para avaliação da variação cinética dos parâmetros imunoparasitológicos e fisopatológicos, as linhagens (L) de *M. musculus* representaram um fator, sendo que o ciclo temporal (T) representou o segundo fator, com seus respectivos níveis (Figura 4). Para avaliação da influência da depleção de eosinófilos (Figura 5) ou de TLR (Figura 6) nos parâmetros imunoparasitológicos e fisopatológicos, as linhagens (L) de *M. musculus* representaram um fator, sendo que os grupos (G) de diferentes tipos de infecção representaram o segundo fator, com seus respectivos níveis. E, na análise do efeito de probiótico (Figura 7), um fator foi o tratamento (T) e o segundo fator foi o grupo (G) de diferentes tipos de infecção.

No experimento de variação cinética, um total de 52 animais de cada linhagem (BALB/c e C57BL/6j) foi aleatoriamente dividido em dois grupos: Não infectados (N.I.) e primoinfectados (P.I.) contendo, respectivamente, 10 e 42 indivíduos. Estes 104 animais foram submetidos ao procedimento de infecção (conforme protocolo descrito no item 4.7.1). Em seguida, os grupos N.I. e P.I. foram aleatoriamente subdivididos em dois grupos de cinco indivíduos ou seis grupos de sete indivíduos, respectivamente. Um grupo P.I. de cada linhagem foi sorteado a partir do 2º até o 12º d.p.i., em intervalo de dois dias, para ser submetido ao procedimento de eutanásia descrito no item 4.8. para coleta de material. Como controle do experimento, nos 2º e 12º d.p.i. um grupo N.I. de cada linhagem também foi aleatoriamente selecionado para o procedimento de eutanásia e coleta de material (Figura 4).

Figura 4 Experimento para avaliação da variação cinética da resposta imune de mucosa.



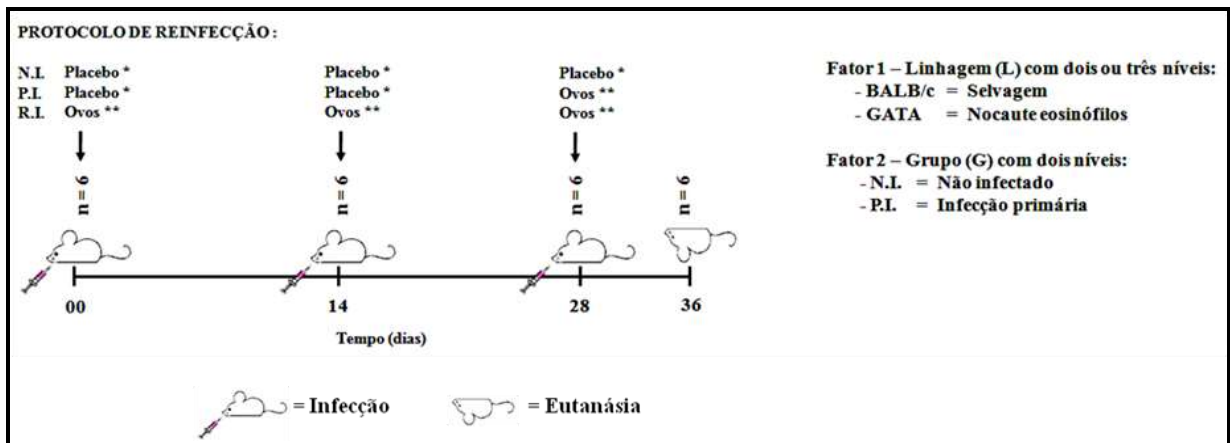
Representação esquemática do delineamento experimental usado para avaliar a resposta imune de mucosa em duas linhagens com diferentes resistências à ascarirose larval murina. d.p.i. = Dias pós-infecção. Ovos** = 200 µl de suspensão contendo 2.500 ovos completamente embrionados. N.I. = Grupo não infectado. Placebo* = 200 µl de solução fisiológica. P.I. = Grupo primoinfectado.

Fonte: Créditos à autora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No experimento para avaliação do papel de eosinófilos, um total de um total de 18 animais de cada linhagem (BALB/c e Δ dblGATA) foi aleatoriamente divididos em três grupos contendo seis indivíduos: não infectados (N.I.), primoinfectados (P.I.) e reinfectedados (R.I.). Por um período de 28 dias, todos os animais foram submetidos aos procedimentos de reinfecção (conforme protocolo descrito no item 4.7.2). Sete a oito dias após o final do procedimento de reinfecção, todos os animais foram submetidos à eutanásia (conforme descrito no item 4.8.) para coleta de material (Figura 5).

Figura 5 Experimento para avaliação do papel de eosinófilos na resposta imune de mucosa.



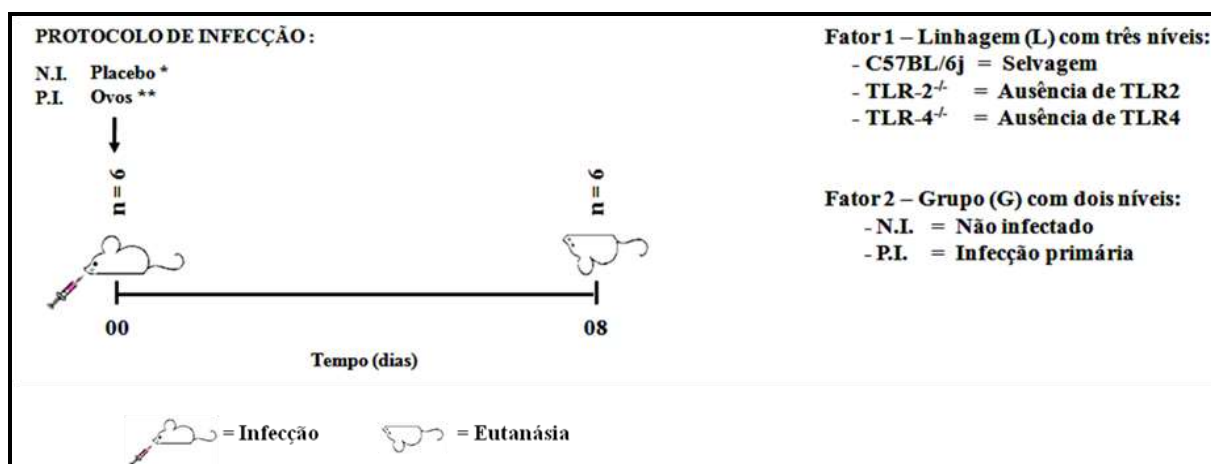
Representação esquemática do delineamento experimental usado para avaliar o papel de eosinófilos na resposta imune de mucosa contra a ascariidose larval murina. N.I. = Grupo não infectado. Ovos** = 200 μ l de suspensão contendo 2.500 ovos completamente embrionados. Placebo* = 200 μ l de solução fisiológica. P.I. = Grupo primoinfectado. R.I. = Grupo reinfectedado.

Fonte: Créditos à autora.

Para avaliação do papel de TRL, um total de um total de 12 animais de cada linhagem (C57BL/6j, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}) foi aleatoriamente dividido em dois grupos contendo seis indivíduos: não infectados (N.I.) e primoinfectados (P.I.). No início do experimento (dia 0), todos os animais foram submetidos ao procedimento de infecção (conforme protocolo descrito no item 4.7.1). Sete a oito dias após o final do procedimento de infecção, todos os animais foram submetidos à eutanásia (conforme descrito no item 4.8.) para coleta de material (Figura 6).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 6 Experimento para avaliação do papel de TLR na resposta imune de mucosa.



Representação esquemática do delineamento experimental usado para avaliar o papel de receptores do tipo TOLL (TLR) na resposta imune de mucosa contra a ascaridiose larval murina. N.I. = Grupo não infectado. Ovos** = 200 µl de suspensão contendo 2.500 ovos completamente embrionados. Placebo* = 200 µl de solução fisiológica. P.I. = Grupo primoinfectado. TLR2^{-/-} = Linhagem depletada do TLR2. TLR4^{-/-} = Linhagem depletada do TLR4.

Fonte: Créditos à autora.

Para avaliação do efeito do uso de probiótico na resposta imune de mucosa contra ascaridiose experimental murina, um total de um total de 24 animais da linhagem BALB/c foi aleatoriamente dividido em dois grupos contendo 12 indivíduos: tratamento com meio M-17 (D1) ou com probiótico (D2). Do início (dia 0) até o final do experimento (dia 22), todos os animais receberam tratamento com meio M-17 ou probiótico. Após 14 dias do início do experimento, os animais foram submetidos ao procedimento de infecção (conforme protocolo descrito no item 4.7.1). Sete a oito dias após o final do procedimento de infecção os animais foram submetidos à eutanásia (conforme descrito no item 4.8.) para coleta de material (Figura 7).

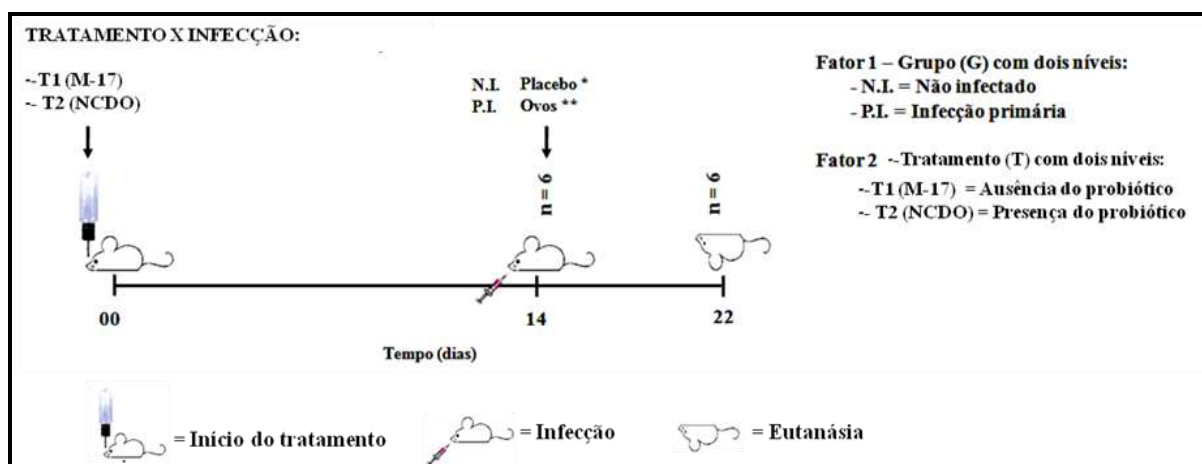
4.4 Preparo e administração da dieta probiótica

O tratamento com probiótico foi realizado de acordo com protocolo descrito por Luerce e colaboradores (2014) com algumas modificações. Resumidamente, a linhagem da bactéria gram-positiva e não invasiva *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 foi cultivada por 18 a 21 horas, à 30°C em meio M-17 Broth (Sigma) suplementado com 0,5 % de glicose e 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma).

Foi oferecido diariamente 5 ml/animal de meio glicosado para o grupo controle (T1) ou de cultura bacteriana para o grupo teste (T2) durante um período de 22 dias. A dieta foi disponibilizada sem alterações, sendo ingerida pelos animais por livre demanda.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 7 Experimento para avaliação do efeito de probiótico na resposta imune de mucosa.



Representação esquemática do delineamento experimental usado para avaliar o efeito da dieta com probiótico na resposta imune de mucosa contra a ascariíose larval murina. D1= Grupo que ingeriu dieta com meio M-17. D2 = Grupo que ingeriu dieta contendo probiótico (*L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118). N.I. = Grupo não infectado. Ovos** = 200 µl de suspensão contendo 2.500 ovos completamente embrionados. Placebo* = 200 µl de solução fisiológica. P.I. = Grupo primoinfectado. T1 = Grupo que recebeu tratamento com placebo (meio M-17). T2 = Grupo que recebeu tratamento com probiótico (NCDO).

Fonte: Créditos à autora.

4.5 Obtenção e cultura de ovos

O ciclo de vida de *A. suum* vem sendo mantido experimentalmente em suínos (CEUA – Protocolo N^o:54-2012). Suínos são infectados oralmente com 2.500 ovos totalmente embrionados. Após 98 d.p.i. as fezes dos animais são examinadas pela técnica de sedimentação espontânea. Os animais positivos são submetidos à eutanásia e os vermes adultos de *A. suum* são recuperados do intestino. As fêmeas são identificadas e dissecadas para a obtenção de úteros. Estes, então, são macerados e os ovos isolados por processo de filtração em telas de nylon 100 µm.

A cultura para embrionamento dos ovos foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita, com algumas modificações. Suspensões contendo 25 ovos/µl foram preparadas em garrafas de cultura contendo 50 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,2 M) e mantidas em estufas a 26 °C em incubadora do tipo BOD (SP 50 RDE 35 Super) por até 400 dias, com oxigenação por agitação manual realizada três vezes por semana. O percentual de embrionamento dos ovos foi determinado a partir da contagem do número de ovos embrionados em três alíquotas independentes ¹³⁶.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.6 Preparo dos ovos para infecção

O preparo dos ovos para a os procedimentos de infecção foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito. Uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* (de aproximadamente 100 dias) contendo 25 ovos/ μL em H_2SO_4 0,2 M foi centrifugada por dez minutos, a 800 g e à temperatura ambiente (T. A.). O sobrenadante foi desprezado, o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5,0 % e incubado por 120 minutos em estufa de CO_2 (Water – Jacketed Incubator) a 37 °C. Em seguida, a suspensão foi novamente centrifugada por dez minutos, a 300 g e à T.A. e o sobrenadante recolhido. A lavagem dos ovos e retirada de resíduo de hipoclorito deu-se pela adição de água filtrada e nova etapa de centrifugação por 10 minutos, a 600 g, em T.A. O processo de lavagem foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em solução salina tamponada (PBS) e três alíquotas de 10 μL foram removidas da suspensão e usadas para a contagem de ovos embrionados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente embrionados por μl e determinar diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 200 μl . A suspensão de ovos foi, então, usada para nos protocolos de infecção⁵².

4.7 Protocolos de infecção

4.7.1 Protocolo de infecção

A infecção foi realizada por via intragástrica de acordo com protocolo previamente descrito¹⁴⁸. Basicamente, com o auxílio de uma agulha de gavage foram administrados 200 μl de uma suspensão contendo uma carga padrão de 2.500 ovos totalmente embrionados, seguidos por 100 μl de água. A dose de ovos usadas para a infecção foi escolhida com base no trabalho de Gazzinelli-Guimarães et al., 2013. Animais do grupo controle foram submetidos ao protocolo descrito acima, contudo ao invés de suspensão de ovos, os mesmos receberam 200 μl de PBS (placebo).

4.7.2 Protocolo de reinfeção

Três infecções, com intervalos de 14 dias entre elas, foram realizadas por via intragástrica (conforme descrito na seção 4.7.1). Aos animais do grupo não infectado (N.I.) foram administrados placebos (PBS) nas três infecções. O grupo primoinfectado (P.I.) recebeu duas vezes o placebo e, na última infecção a suspensão contendo 2.500 ovos/200 μl . Ao grupo reinfectado (R.I.) foram administrados três suspensões contendo 2.500 ovos/200 μl

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.8 Procedimento de eutanásia

Para a coleta de materiais para avaliações dos parâmetros propostos neste estudo, os animais receberam uma sobredose de anestésico geral (Cetamina 120mg/Kg e Xilazina 45mg/Kg) pela via intraperitoneal. Os animais anestesiados foram, então, submetidos a processo de eutanásia por hipovolemia através de uma incisão realizada na veia axilar.

4.9 Obtenção e processamento do lavado de mucosa broncoalveolar (BAL)

Após a eutanásia, foram realizadas dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18 G x 1³/₄", Terumo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueal com duas alíquotas de 1 ml de PBS a 4 °C. O líquido recuperado, num volume final de 2 ml, foi mantido a 4°C até o processamento.

4.9.1 Processamento do BAL

O BAL coletado, conforme descrito na *seção* 4.9, foi imediatamente passado em um filtro celular de 70 µm de diâmetro (BD Biosciences) e recolhido em um tubo, previamente identificado e mantido a 4°C. Em seguida, o filtrado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 600g por 10 min a 4°C. Ao sobrenadante coletado foi acrescentado solução contendo inibidor de protease (PMSF 100 Mm, Sigma Aldrich). Em seguida o sobrenadante foi separado em alíquotas e congelado a -80 °C para posteriores análises dos níveis de SIgA, proteínas totais e hemoglobina.

O sedimento do BAL resultante foi suspenso com 100 µl de PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) 3%. Uma alíquota de 10 µl foi removida e usada para obtenção do número global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5×10^4 células/ml. O volume ajustado foi, então, centrifugado por cinco minutos, a 135 g e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge) e as lâminas obtidas foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e usadas para a contagem diferencial do número de leucócitos.

A recuperação das larvas retidas no filtro celular foi realizada por lavagem do filtro com 10 ml de PBS seguido de centrifugação por 10 minutos a 800 g e 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi suspenso com 20 ml de PBS com formol 4 %. Nova etapa de centrifugação foi realizada, o volume do sobrenadante reduzido para 2 ml, homogeneizado e armazenado à T.A. para posterior contagem do número de larvas recuperadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.10 Obtenção e processamento do lavado de mucosa intestinal (INL)

O intestino foi removido, transferido para placas de Petri contendo PBS e separado em duas porções: intestino delgado e grosso. Com o auxílio de uma seringa, o intestino delgado e grosso foram lavados com 10 e 5 ml de PBS, respectivamente. As porções intestinais foram espremidas gentilmente entre uma pinça para remover todo o muco. Os lavados obtidos foram transferidos para tubos cônicos de 15 ml, previamente identificados, e mantidos a 4 °C até o processamento.

4.10.1 Processamento do INL

Os lavados obtidos conforme descrito na *seção* 4.10 foram centrifugados por 10 minutos, a 1.940 g e a 4 °C. Ao sobrenadante coletado foi acrescentado solução contendo inibidor de protease (PMSF 100 Mm, Sigma Aldrich). Em seguida o sobrenadante foi separado em alíquotas e congelado a -80 °C para posteriores análises dos níveis de SIgA.

O sedimento resultante do processamento de centrifugação foi suspenso em 20 ml de PBS contendo formol 4 % e centrifugado por 10 minutos a 800 g e a 4 °C. Nova etapa de centrifugação foi realizada, o volume do sobrenadante reduzido para 2 ml, homogeneizado e guardado para posterior contagem do número de larvas.

4.11 Obtenção e processamento de tecidos

Os pulmões, o fígado e as porções lavadas do intestino delgado e grosso foram transferidos separadamente para placas de Petri contendo PBS. Cada órgão foi individualmente e extensivamente picotado com tesouras cirúrgicas e transferidos para tamis imersos em aparatos de Baermann contendo PBS.

O sistema foi, então, incubado “*overnight*” a 37 °C. Os sedimentos contendo as larvas foram coletados com o auxílio de pipetas Pasteur e transferidos para tubos cônicos de 15 ml que foram centrifugados por dez minutos, a 800 g e 25 °C. Os sobrenadantes foram reduzidos a aproximadamente 2 ml e acrescentados 10 ml de PBS com formol 4 %. Nova etapa de centrifugação foi realizada, os volumes os sobrenadantes foram reduzidos para 2 ml, homogeneizados e guardados para posterior contagem do número de larvas recuperadas (ver *seção* 4.12).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.12 Determinação da carga parasitária

Para caracterizar o padrão de migração das larvas foi realizada a contagem do número total de larvas recuperadas nos sedimentos dos lavados de mucosa intestinal e pulmonar, assim como nos tecidos intestinal, hepático e pulmonar. A contagem das larvas foi realizada em microscopia ótica (ampliação de 40 x) pela varredura de todo o volume de cada amostra, sendo registradas todas as larvas encontradas nos materiais. Para o cálculo do percentual de diferença (% dif) entre a carga obtida nas linhagens ao longo da infecção e também o percentual de diferença entre a carga de uma mesma linhagem a cada ponto da avaliação, foi aplicado as seguintes equações:

$$1) \text{ \% dif entre linhagens} = [(\bar{X}_{\text{Lnh A}} - \bar{X}_{\text{Lnh B}}) / \bar{X}_{\text{Lnh A}}] \times 100 \text{ ou,}$$

$$2) \text{ \% dif entre tempos} = [(\bar{X}_{\text{Tf}} - \bar{X}_{\text{Ti}}) / \bar{X}_{\text{Tf}}] \times 100, \text{ onde:}$$

\bar{X} = valor médio; Lnh = linhagem; Tf = tempo final; Ti = tempo inicial

4.13 Dosagem de proteínas totais

As concentrações das proteínas totais no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicinônico usando kit comercial (BCA, Sigma-Aldrich) e seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de densidades ópticas (O.D.) obtidos a 562 nm foram interpolados para se determinar a concentração das mesmas.

4.14 Dosagem de hemoglobina

A concentração de hemoglobina (Hb) no BAL foi dosada por colorimetria usando-se o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm contra solução de Drabkin, modificada (Labtest Diagnóstica). O padrão de hemoglobina (Labtest Diagnóstica) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de O.D. das amostras para se determinar a concentração das mesmas.

4.15 Prova de função pulmonar por espirometria

Avaliações da função pulmonar foram realizadas antes (grupos controles no 00 d.p.i.) e após fase aguda da ascaridiose (grupos experimentais no 12º d.p.i.). Antes de realizar a eutanásia, os camundongos foram pesados e anestesiados, por via intraperitoneal, com xilazina (18,5 mg/kg) e cetamina (130 mg/kg), de forma a manter respiração espontânea após a anestesia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir foi realizada uma traqueostomia seguida da introdução de uma cânula traqueal (0,8 ml) acoplada a um ventilador mecânico controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System, Buxco Research Systems, Wilmington, North Carolina USA).

Os camundongos foram ventidados a uma taxa de 160 respirações / min controlada por pressão até um padrão de respiração regular e expiração, sendo cada ciclo respiratório obtido. Sob respiração mecânica, a complacência dinâmica (CDYN), a complacência estática (CHORD), a resistência elástica pulmonar (RE), a Capacidade vital forçada (FVC) e o volume expiratório forçado a 100 milisegundos (FEV100) foram obtidos conforme metodologia previamente descrita¹⁰⁵.

4.16 Preparo de antígenos (Extrato bruto de larvas)

A eclosão de larvas presentes em ovos embrionados obtidos de culturas com mais de 100 dias foi induzida de acordo metodologia previamente descrita¹⁵⁰, com algumas modificações. A cultura das larvas foi realizada conforme previamente descrito¹⁵¹. Resumidamente, uma alíquota da suspensão de ovos embrionados foi centrifugada por 10 minutos, à T.A. e 3.000 g. O sedimento foi suspenso em solução de hipoclorito de sódio 5 % e incubado por 1 hora e 45 minutos a 37 °C, na presença de 5 % de CO₂ (Water – Jacketed Incubator). Em seguida a suspensão foi submetida a três processos de lavagem (adição de PBS seguida de centrifugação por 5 minutos, 4.000 g e T.A.). Após a última centrifugação foi adicionada solução salina Hanks (pH 2,0) ao sedimento.

A suspensão obtida foi incubada por 30 minutos a 37 °C, na presença de 5 % de CO₂ (Water – Jacketed Incubator). Outra etapa de lavagem foi realizada e, ao sedimento foi adicionado meio de cultura não suplementado Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma). A suspensão foi incubada à T.A. e ao abrigo da luz. Após 72 horas de incubação, o sedimento contendo as larvas foi coletado e sonicadas, sendo o extrato centrifugado a 8.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, aliqotado e congelado para ser usado como antígenos nos experimentos de quantificação de SIgA específica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.17 Ensaio imunoenzimático para avaliação de SIgA total e específica

Para determinar os níveis de SIgA total, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 0,5 µg/ml de Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-UNLB (Southern Biotechnology Associate Inc.). Já para avaliação de SIgA específica, as microplacas foram sensibilizadas com 1 µg/ml de antígeno de larva. Ambos reagentes foram diluídos em tampão carbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas “*overnight*” a 4 °C e, então, as placas foram lavadas oito vezes com PBS contendo 0,05 % Tween-20 (SIGMA Chemical Co). O bloqueio foi realizado à T.A. por, no mínimo, uma hora com PBS + BSA 3% (SIGMA Chemical Co.).

As amostras (BAL e INL) foram diluídas em PBS-BSA contendo inibidor de protease (PMSF 100 Mm, Sigma Aldrich) e incubadas por uma hora, à T.A.. Em seguida as amostras foram adicionadas às placas e incubadas “*overnight*” a 4 °C. Nova etapa de lavagem foi realizada e as placas incubadas a 37°C durante 1 h com anti-IgA de camundongo biotinizada (0,5 µg/ml, Southern Biotechnology Associate Inc.). As placas foram novamente lavadas e incubadas, por 1 h e ao abrigo da luz, com uma solução de estreptavidina conjugada a HRP (Horseradish Peroxidase) (Streptavidin-HRP, R&D Systems).

A presença de IgA foi revelada através da incubação, por 20 minutos e ao abrigo da luz, com o substrato o-phenilenedianime (OPD, SIGMA Chemical Co., + 30 % H₂O₂) diluído em tampão citrato pH 5,0. Ao final, foi adicionada uma solução de H₂SO₄ (2,0 N) e a intensidade da reação foi determinada no comprimento de onda 492 nm no leitor automático (VersaMax™ Tunable Microplate Reader, Molecular Devices).

Em todas as placas de avaliação de SIgA total foram incluídas diluições seriadas de padrões de IgA (Mouse IgA standard, Southern Biotechnology). As concentrações de SIgA total (em µg/ml) foram determinadas pela interpolação dos valores de O.D. das amostras em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL). Para controle de qualidade, em todas as placas foram incluídos controles positivos e negativos (uma mistura de soros de animais reativos ou de animais não reativos, respectivamente).

Análise histopatológica do muco

As alterações na produção de muco foram avaliadas nos pulmões de camundongos selvagens das linhagens BALB/c e GATA no oitavo dia após a infecção. Amostras do tecido pulmonar foram fixadas em PBS-formol 4% por cinco dias, desidratadas gradualmente em etanol (70, 90 e 100 %) e imersas em parafina. Cortes histológicos (4-5 µm de espessura) dos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

blocos de parafina contendo os tecidos foram obtidos, montados em lâminas e corados com Periodic Acid-Schiff (PAS). Os cortes histológicos foram visualizados em objetivas de 40 x e as imagens digitalizadas por uma microcâmara Leica DFC340FX, associada ao microscópio ótico Leica DM5000B do Laboratório de Patologia do ICB/UFMG.

A análise qualitativa do muco presente na mucosa pulmonar foi realizada nos bronquíolos presentes no corte histológico de uma lâmina por animal. Amostras de tecidos de camundongos não infectados foram usadas como grupo controle.

4.18 Análise estatística

A verificação dos pressupostos de Normalidade da Distribuição e de Homogeneidade das Variâncias foram avaliados através da aplicação dos testes de Shapiro-Wilk (W) e Levene, respectivamente. Nos casos em que os pressupostos não foram atingidos, repetiu-se os testes após a transformação logarítmica dos dados com o $\text{Log}(X+1)$.

Nos casos em que os testes aceitaram os pressupostos, a existência de diferenças entre as médias foi verificada pela aplicação do teste de Análise de Variância Multifatorial (ANOVA Two-Way). Diferenças significativas entre os fatores e respectivas combinações de seus níveis foram analisadas pela aplicação do teste de contraste de Tukey (HSD). Quando os resultados dos testes rejeitaram os pressupostos, mesmo após a transformação logarítmica dos dados, foi realizada uma nova análise dos dados originais usando o teste Não-Paramétrico equivalente, isto é, o teste de Friedman¹⁵².

Embora os testes Não-Paramétricos possuam menos poder do que testes Paramétricos, nas situações em que ambos detectaram diferenças entre as médias, optou-se por expressar os resultados obtidos com os testes paramétricos. Esta decisão teve por base o fato do desenho amostral adotado neste estudo ter sido balanceado e ortogonal e ao fato das técnicas de ANOVA serem bastante robustas e tolerarem desvios consideráveis de heterogeneidade de variâncias e não-normalidade da distribuição, principalmente se as réplicas em análise forem em números iguais¹⁵².

Para verificar e quantificar a existência de relação entre as variáveis foi aplicado o teste de correlação linear de Pearson (r), ou o teste de correlação em postos de Spearman (ρ), o qual é um teste Não-Paramétrico equivalente. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância $\alpha = 0,05$ ¹⁵².

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para facilitar a apresentação dos resultados obtidos neste estudo, estes foram organizados em quatro capítulos. No primeiro capítulo encontram-se os resultados dos experimentos para avaliação da variação cinética dos parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos de mucosa durante ascaridiose experimental murina nas linhagens BALB/c e C57BL/6j. No segundo capítulo estão representados os resultados dos experimentos realizados para avaliação do papel de eosinófilos na produção de SIgA contra a ascaridiose. Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação do papel de TLRs na produção de SIgA contra a ascaridiose foram abordados no terceiro capítulo. No quarto capítulo foram apresentados os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram a influência do probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118.

CAPÍTULO 01

Caracterização da resposta imune de mucosa contra ascaridiose larval murina

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

O entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência/susceptibilidade à ascaridiose tem sido foco de vários estudos em humanos ou em modelos experimentais. Um estudo genealógico de uma população humana isolada, combinado com análises de bioinformática, revelaram três genes como os mais prováveis candidatos relacionados à resistência à ascaridiose. Estes genes (o gene da citocina IL-7, o gene do fator de ativação de célula B (ABF-1) e o gene TNFSF13B - também conhecido como BlyS/BAFF) estão associados à hematopoese de células B, à regulação da diferenciação de células B de memória e à regulação da ativação de células B e da secreção de Igs¹⁵³⁻¹⁵⁶.

Várias linhagens de camundongos também apresentam diferenças na predisposição à infecção por *Ascaris* sp.^{148, 157} e, estas diferenças vem sendo exploradas em diversos estudos. Em um desses, foi relatado que a presença da ascaridiose aumentou a expressão de genes da resposta imune em duas linhagens com diferentes susceptibilidades. Todavia, este aumento foi mais pronunciado na linhagem C57BL/6j que apresenta maior susceptibilidade relativa¹⁵⁸. Corroborando estes dados, Lewis e colaboradores (2007) também compararam a resposta imune celular das linhagens CBA/ca e C57BL/6j e demonstraram que a mais susceptível (C57BL/6j) produziu resposta inflamatória de mucosa quase duas vezes mais intensa que a resistente, com intensa participação de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos nos infiltrados celulares (observados no sedimento do lavado de mucosa pulmonar).

Considerando os fatos relatados acima, a primeira pergunta deste trabalho foi se a resposta imune de mucosa influencia a susceptibilidade à infecção murina por *A. suum*. Assim, neste primeiro capítulo foram apresentados os resultados da comparação dos eventos imunoparasitológicos e fisiopatológicos de mucosa ocorridos na fase inicial da infecção experimental murina por *A. suum* entre as linhagens de camundongos (BALB/c = mais resistente e C57BL/6j = mais susceptível).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

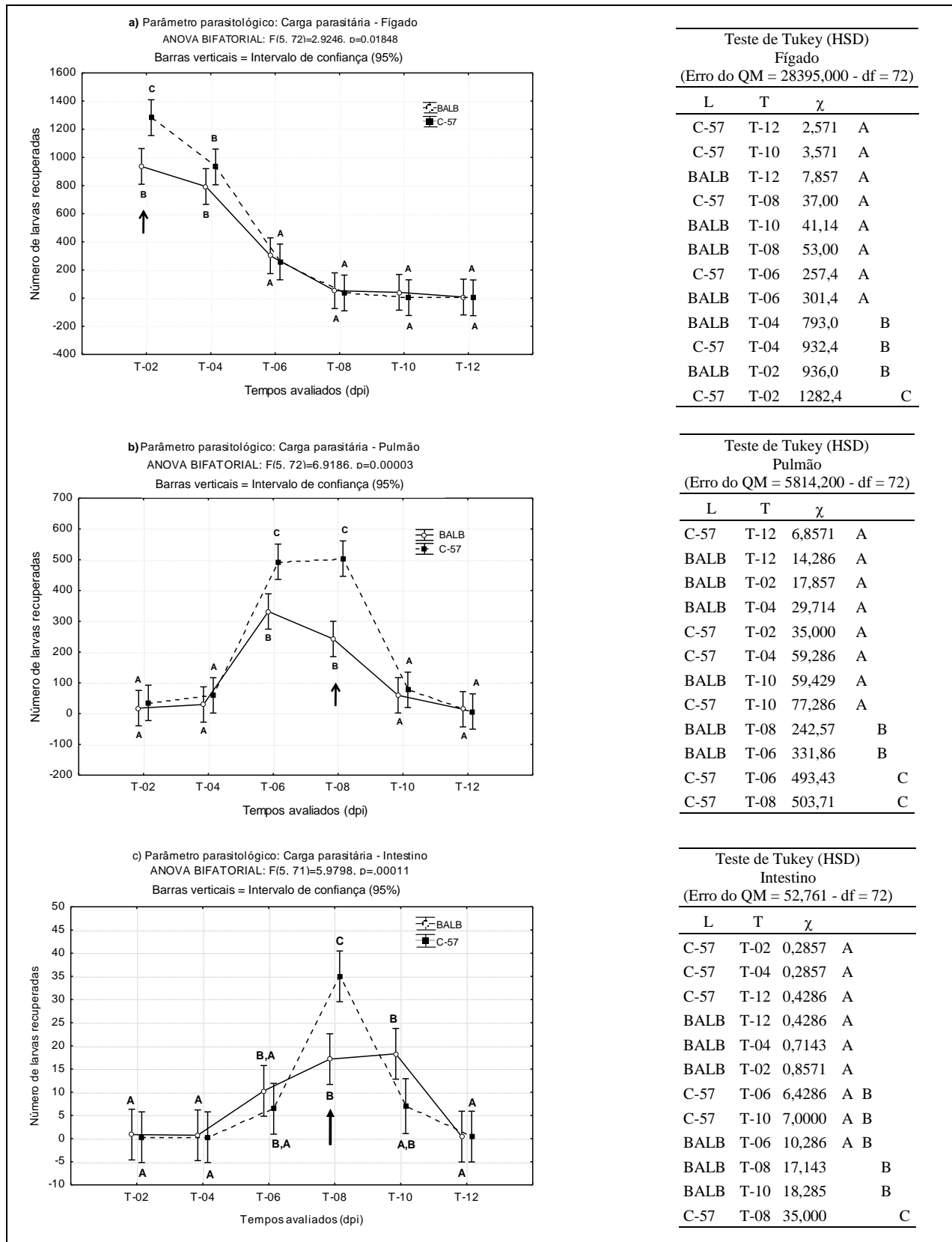
5.1 Variação cinética do parâmetro parasitológico: intensidade de infecção

A variação na carga parasitária ao longo do tempo de infecção experimental aguda foi avaliada nos principais órgãos envolvidos na rota migratória das larvas. A maior recuperação de larvas ocorreu no fígado no 2º d.p.i. (Figura 8a,b). O pulmão foi o segundo órgão com maior recuperação de larvas (Figura 6c,d), com o pico de migração larval sendo observado no 6º e 8º d.p.i. (BALB/c e C57BL/6j, respectivamente). E o intestino foi o órgão com menor recuperação de larvas, sendo o pico observado no 8º d.p.i. (Figura 8e).

Na maior parte dos tempos avaliados, não foi possível observar diferença de carga parasitária entre as duas linhagens. Contudo, no 2º e 8º d.p.i. (correspondentes aos picos de recuperação de larvas no fígado e pulmão/intestino, respectivamente) a linhagem mais susceptível (C57BL/6j) apresentou diferença estatisticamente significativa (maior valor médio) quando comparada à BALB/c (Figura 8a,b,c). As diferenças entre a carga parasitária no pico de migração hepática e pulmonar ficou evidente ao se comparar as taxas de redução percentual observadas nas duas linhagens (Tabela 1). A diferença percentual entre as taxas de redução da carga parasitária foi igual a 15 e 10 pontos percentuais nos picos de migração hepática e pulmonar, respectivamente. Os resultados da carga total mostraram um padrão cinético semelhante entre as linhagens, com duração de 12 dias (Figura 9).

Após avaliação da carga parasitária nos principais órgãos, foi realizada uma análise mais minuciosa, separando os compartimentos teciduais (parênquima) e de mucosa, tanto no pulmão quanto no intestino. Independente do compartimento, o padrão cinético de recuperação das larvas foi semelhante ao já descrito para os órgãos, com a maior concentração de larvas ocorrendo no período entre o 6º e 8º d.p.i. (Figuras 10 e 11). Contudo, em termos de intensidade parasitária, o compartimento tecidual pulmonar apresentou tendência de ter os maiores valores médios, quando comparados ao compartimento de mucosa deste órgão. Ao contrário, no intestino observou-se que os maiores valores médios foram obtidos na mucosa e não no tecido (Tabela 2).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 8 Carga parasitária nos principais órgãos envolvidos na migração larval.

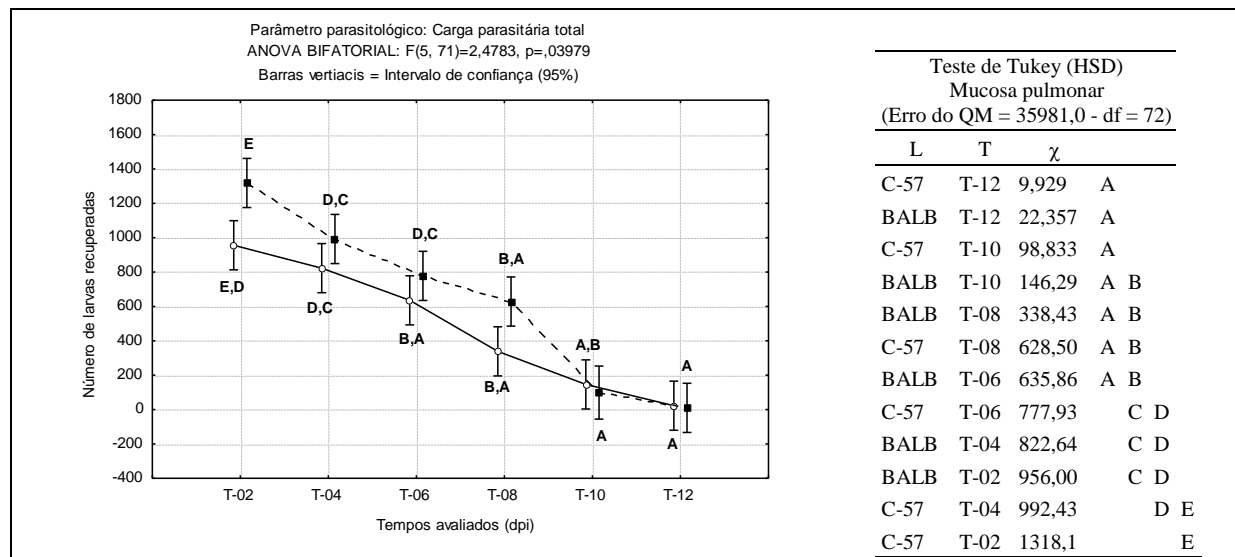
Representação gráfica dos dados de variação cinética da carga parasitária recuperada ao longo do tempo de infecção por *A. suum* nos principais órgãos envolvidos na migração larval. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C < D$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Tabela 1 Comparação da taxa de redução da carga parasitária em BALB/c e C57BL/6j.

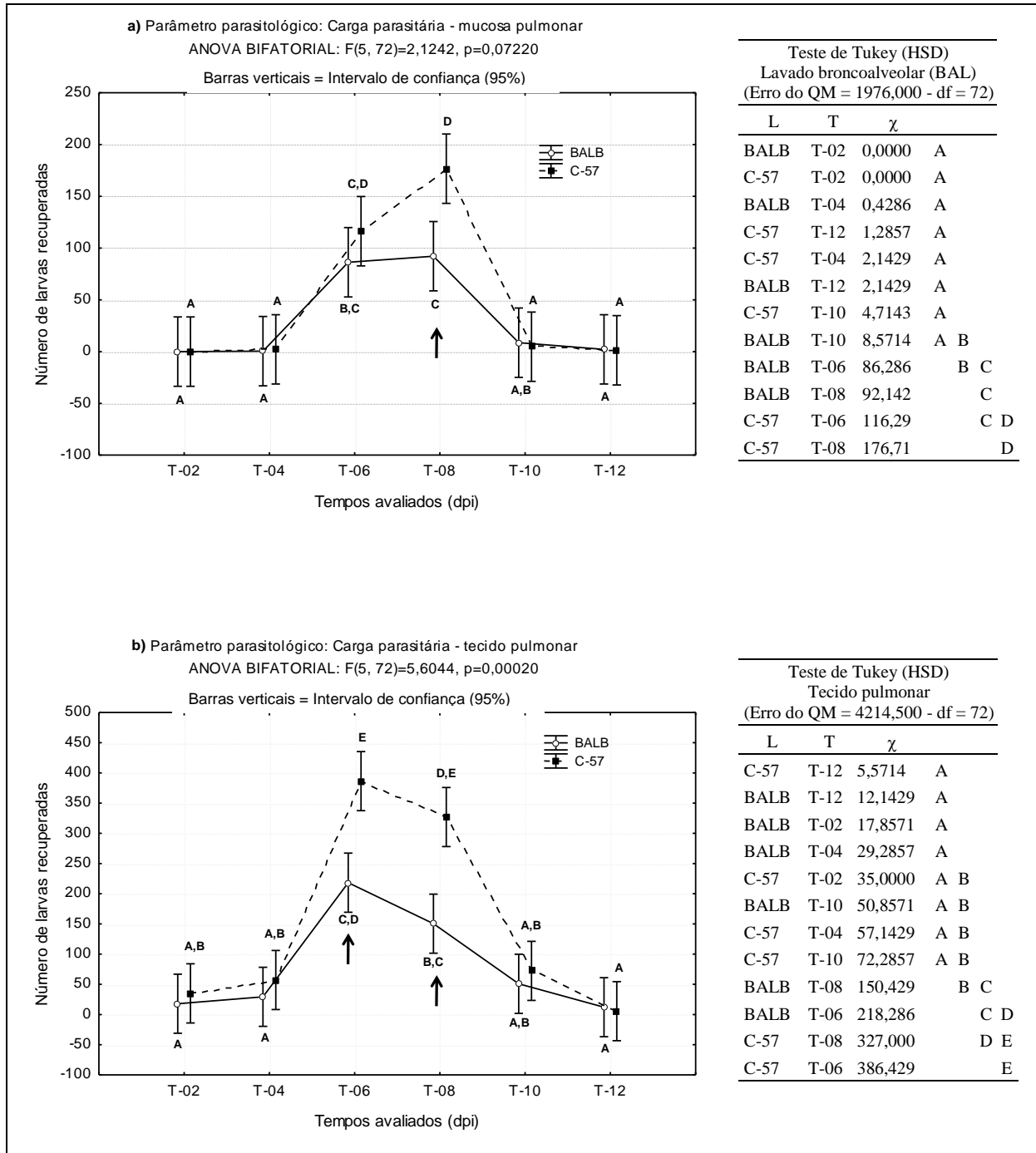
<i>VALORES MÉDIOS DE RECUPERAÇÃO DE LARVAS</i>			
Órgão avaliado	Tempo de inf. (d.p.i.)	Recuperação (χ)	
		BALB/c	Linhagem (χ) C57BL/6j
Fígado ^(a)	2°	936 (63 %)	1.282 (49 %)
Pulmão	8°	243 (74 %)	504 (61 %)
Intestino	12°	18 (93 %)	35 (93 %)

^(a) = Cálculo considerou a carga padrão de 2.500 ovos usados na infecção por gavagem. d.p.i. = Dias pós-infecção. (%) = Taxa de redução da carga parasitária. (χ) = Média.

Figura 9 Carga parasitária total durante fase aguda da ascarirose experimental murina.

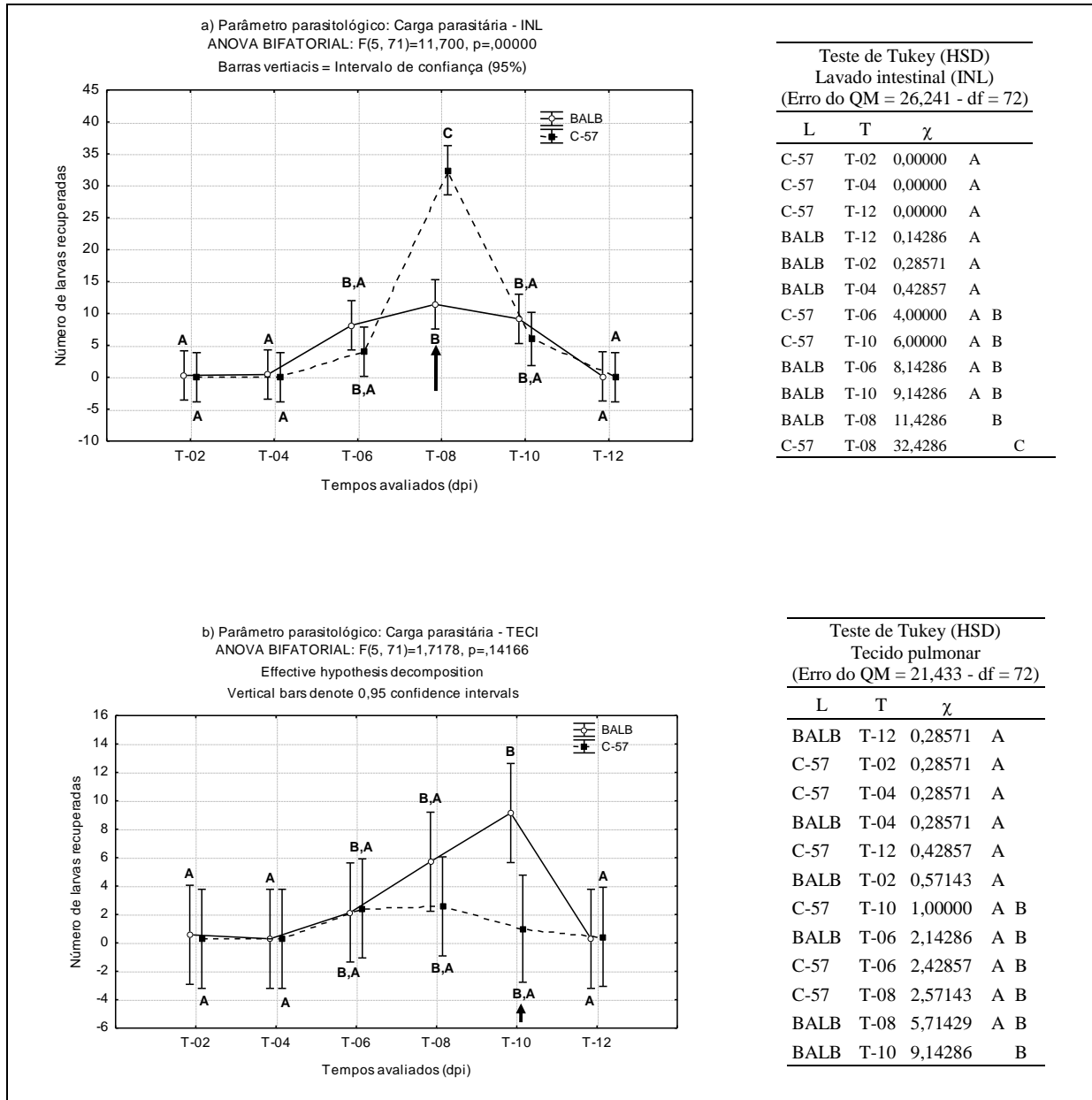
Representação gráfica dos dados de variação cinética do somatório da carga parasitária total recuperada ao longo do tempo de infecção por *A. suum* nos principais órgãos envolvidos na migração larval. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C < D$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 10 Carga parasitária no BAL e tecido pulmonar durante fase aguda da ascariíose.

Representação gráfica dos dados de variação cinética da carga parasitária, recuperada ao longo do tempo de infecção por *A. suum*, no lavado e no tecido pulmonar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C < D < E$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 11 Carga parasitária no INL e tecido intestinal durante fase aguda da ascariíose.

Representação gráfica dos dados de variação cinética da carga parasitária, recuperada ao longo do tempo de infecção por *A. suum*, no lavado e no tecido intestinal. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C < D < E$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). INL = Lavado intestinal. TECI = Tecido intestinal. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

5.2 Variação cinética dos parâmetros imunológicos de mucosa

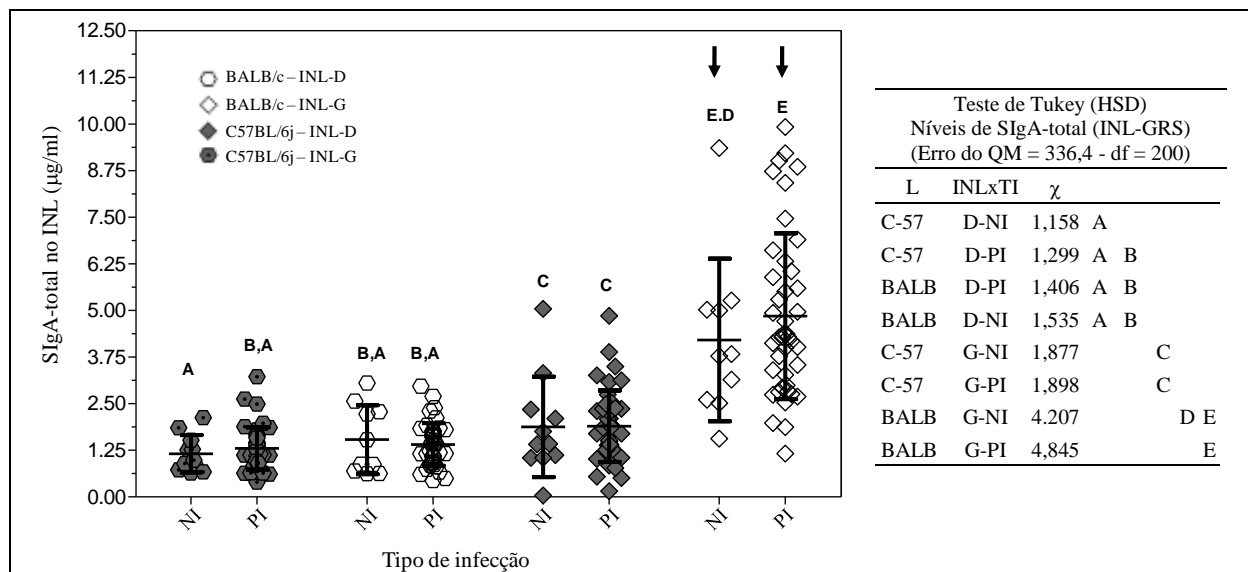
5.2.1 Produção de SIgA

As análises dos valores de SIgA-total no lavado obtidos nos lavados do intestino (INL) revelaram ausência de interação entre os fatores principais linhagem (L) e tempo de infecção (T), tanto para o INL do intestino delgado quanto do intestino grosso.

No intestino delgado, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias, independentemente do fator analisado. Além disso, as médias dos níveis de SIgA-total no INL-D foram expressivamente menores que aquelas observadas no INL-G.

As análises isoladas dos fatores principais indicou que os níveis desta variável no INL do intestino grosso (INL-G) foram influenciados apenas pelo fator linhagem, com maiores valores médios de SIgA-total ocorrendo na linhagem mais resistente à infecção (BALB/c) comparado à linhagem mais susceptível (Figura 12a,b).

Figura 12 Níveis de SIgA-total no INL durante fase aguda da ascariidose.



Representação gráfica dos dados de níveis de SIgA dosados no lavado intestinal. Os resultados demonstraram não haver interação entre os fatores principais (L x T) e, as análises dos fatores principais isolados relataram que apenas o fator principal linhagem (L) apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as médias. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo A<B<C<D<E. Setas = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). D ou DEL = Lavado do intestino delgado. G ou GRS = Lavado do intestino grosso. L = Linhagem. INLxTI = Lavado intestinal x tipo de infecção. N.I. = Grupo controle (Tempo 00). P.I. = Grupo infectado (Tempos 02-12). T = Tempo de infecção. χ = Média.

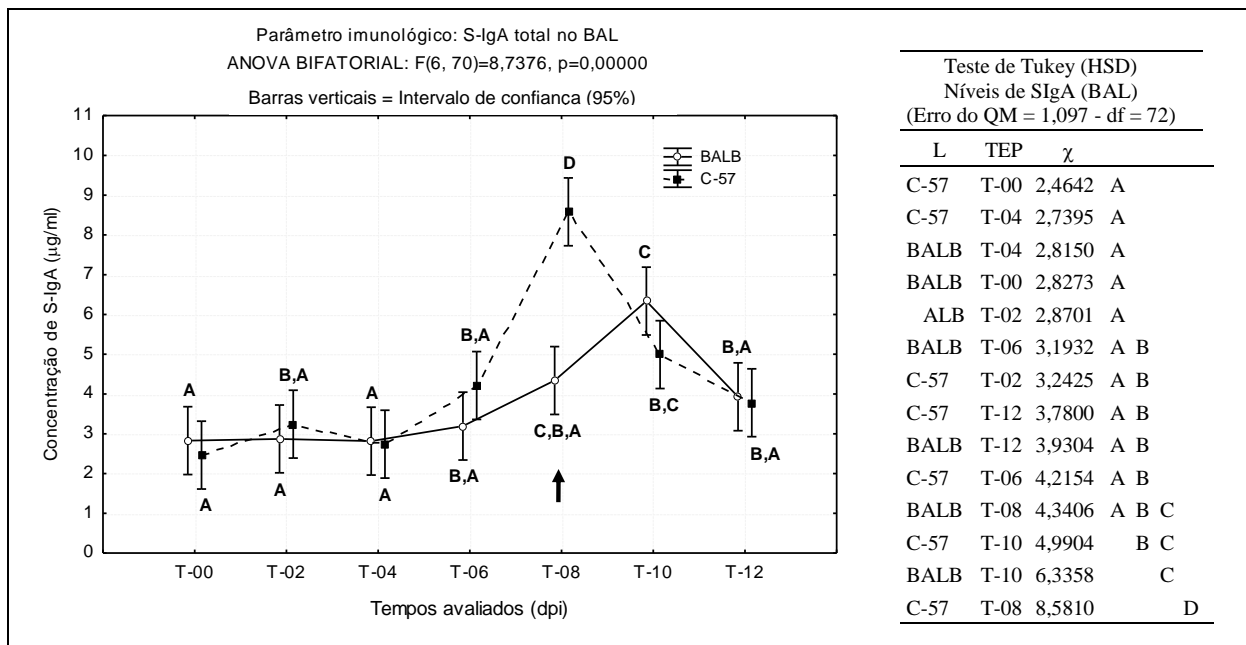
5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

O padrão de produção de SIgA-BAL foi diferente daquele observado no lavado intestinal, pois, a análise isolada dos fatores principais (L e T) mostrou que apenas o tempo de infecção influenciou a produção de SIgA-total no BAL, independentemente da linhagem.

As médias de concentração nos tempos iniciais da infecção (2º e 4º d.p.i.) foram iguais aos valores basais observados nos controles (tanto no início quanto no final do experimento cinético. Entretanto, um padrão geral de aumento dos níveis de SIgA-total foi verificado a partir do 6º d.p.i. em ambas as linhagens, apesar do pico de produção desta imunoglobulina ter ocorrido mais precocemente (8º d.p.i.) e com maior intensidade na linhagem C57BL/6j em comparação à BALB/c (10º d.p.i.) (Figura 13 a,b). Este atraso na produção de SIgA na linhagem BALB/c resultou numa diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens aparecendo no 8º d.p.i.

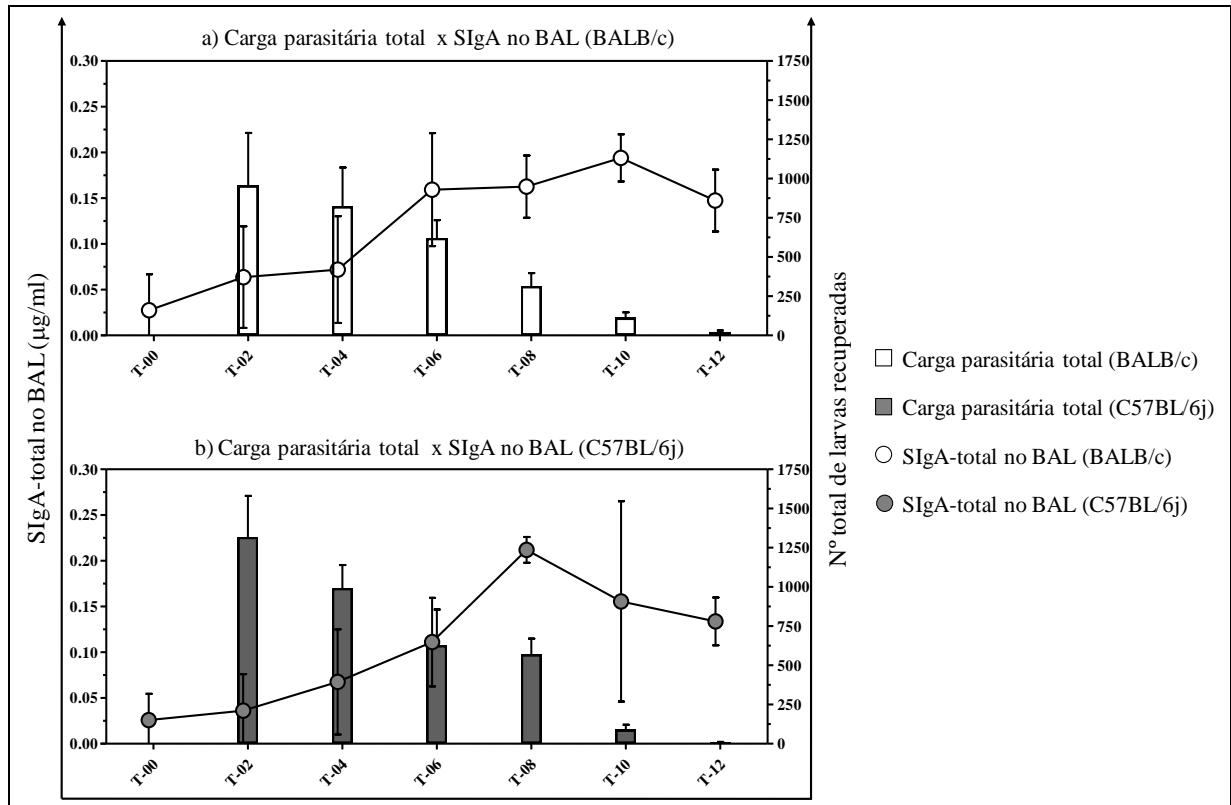
Apesar da tendência dos níveis de SIgA-total aumentarem com o tempo de infecção, também foi possível identificar, nas duas linhagens, uma coincidente redução da carga parasitária total à medida em que ocorreram aumentos dos níveis de SIgA-total no BAL (Figura 14a,b).

Figura 13 Níveis de SIgA-total no BAL durante fase aguda da ascariíose.



Representação gráfica dos níveis de SIgA dosados no lavado pulmonar. Os resultados demonstraram não haver interação entre os fatores principais (L x T) e, as análises dos fatores principais isolados, revelaram que apenas o fator principal tempo de infecção (T) apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as médias. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C < D$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 14 Aumento coincidente de aumento nos níveis de SIgA e redução da carga parasitária durante fase aguda da ascarirose.

Gráficos representativos da variação cinética da carga parasitária total (somatório da carga de todos os órgãos avaliados) e dos níveis de SIgA-total dosados no BAL durante fase aguda da ascarirose experimental murina. BAL = Lavado broncoalveolar. N.I. = Grupo de indivíduos não infectados (controle). P.I. = Grupo de indivíduos infectados.

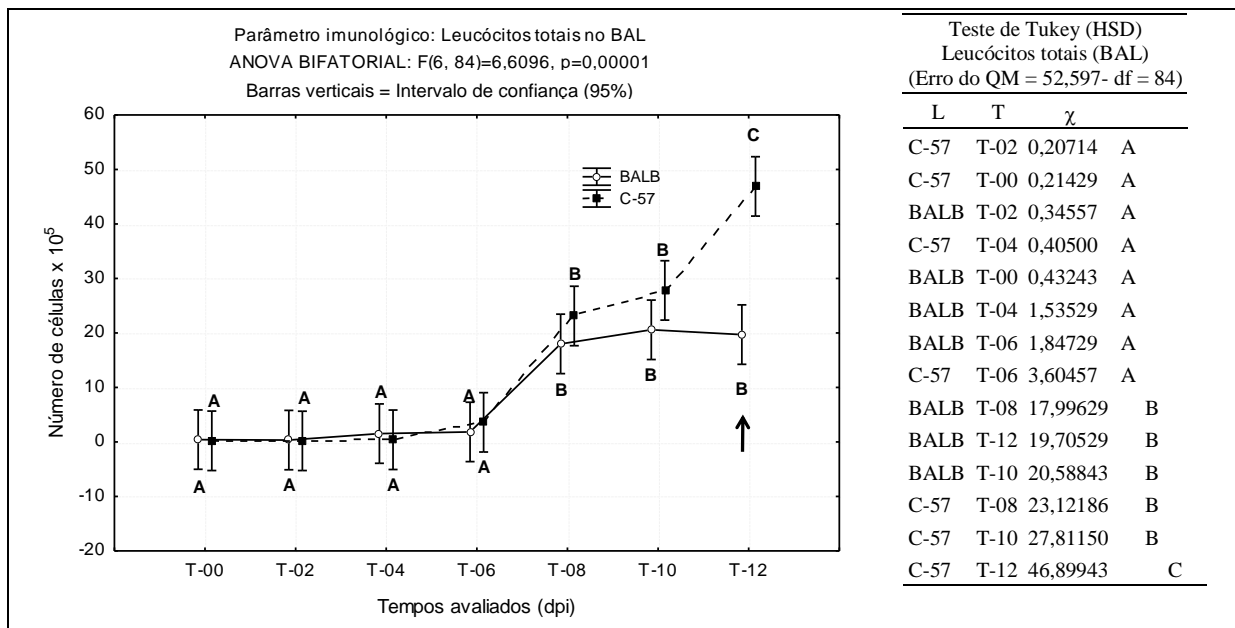
5.2.2 Composição celular no BAL

A resposta imune celular foi avaliada nos sedimentos do BAL coletado ao longo do experimento cinético. De acordo com as contagens global e diferencial de leucócitos, todas as subpopulações celulares, exceto a de eosinófilos, apresentaram um padrão cinético semelhante no qual aumentos estatisticamente significativos no número absoluto das populações celulares ocorreram a partir do 8º d.p.i., com o pico de contagem das células ocorrendo no 12º d.p.i. (Figuras 15 a 17). Diferenças entre as linhagens no número de células também aconteceram no final da infecção, sendo as maiores médias observadas nos camundongos da linhagem C57BL/6j (Figuras 15 a 17). Entretanto, o padrão cinético verificado na subpopulação de eosinófilos mostrou um pico no 8º d.p.i., seguido de reduções no 10º e 12º d.p.i. (Figura 17c-d) ocorrendo nas duas linhagens.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

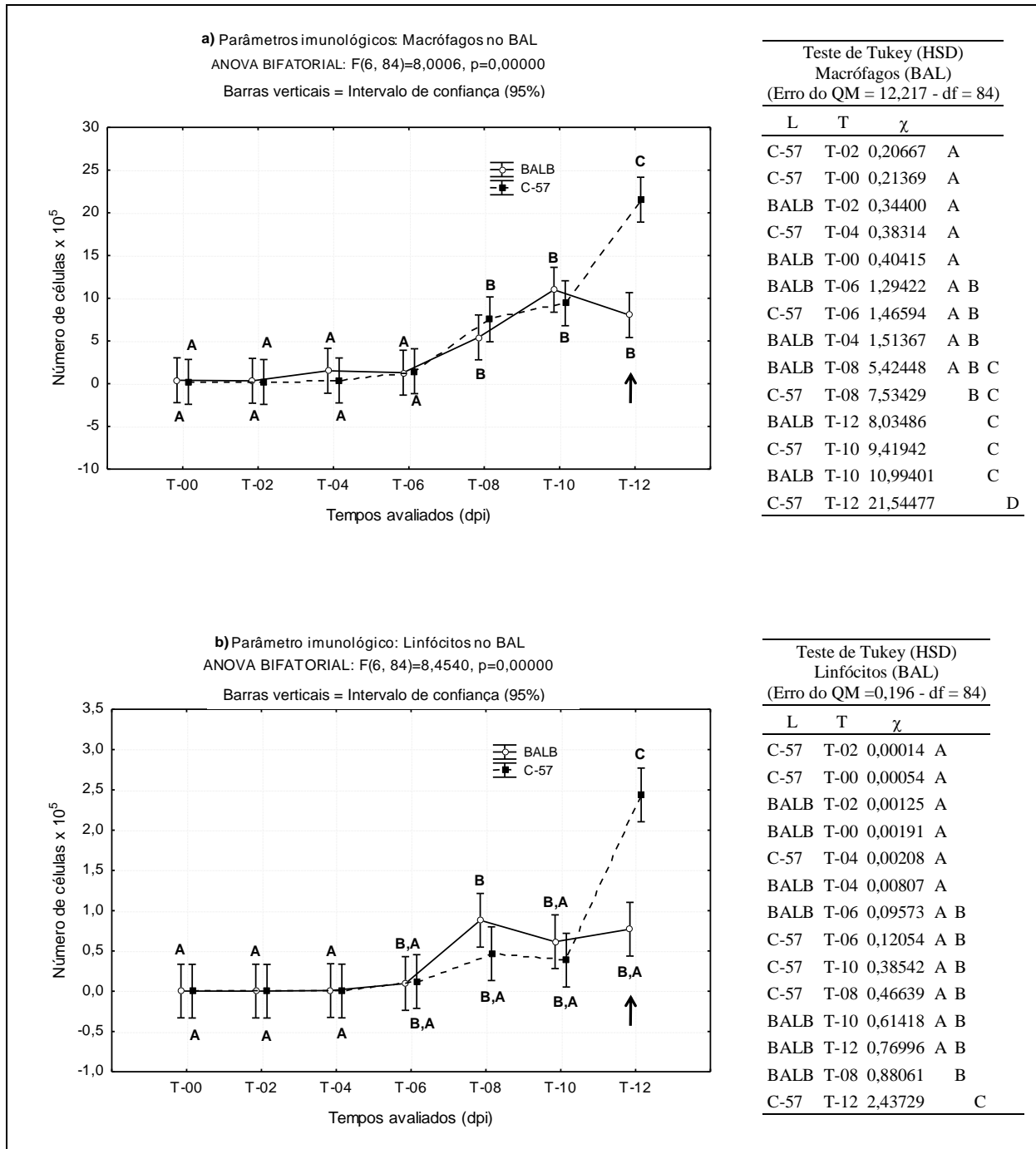
Apesar de ambas as linhagens terem apresentado um perfil semelhante de variação cinética no número de leucócitos obtidos no BAL, foi possível observar uma heterogeneidade no pico de aparecimento de cada tipo celular, de acordo com a linhagem (Tabela 02). No início da infecção (4º d.p.i.), os macrófagos foram os únicos representantes leucocitários. Contudo, a contribuição relativa desta subpopulação celular se reduziu a partir do 6º d.p.i., apesar do aumento expressivo em números absolutos terem sido verificados a partir deste período. A partir do 6º d.p.i. até o final da infecção predominou um perfil misto de células mono e polimorfonucleadas, sendo que a subpopulação de eosinófilos apresentou sua maior contribuição relativa no pico de migração pulmonar (8º d.p.i.) e os neutrófilos aumentaram sua participação relativa no final da infecção (12º d.p.i.), de forma que, em ambas as linhagens, ocorreu coincidente aumento do número de eosinófilos e redução do número de neutrófilos.

Figura 15 Variação cinética do número de células leucocitárias totais durante fase aguda da ascarirose.



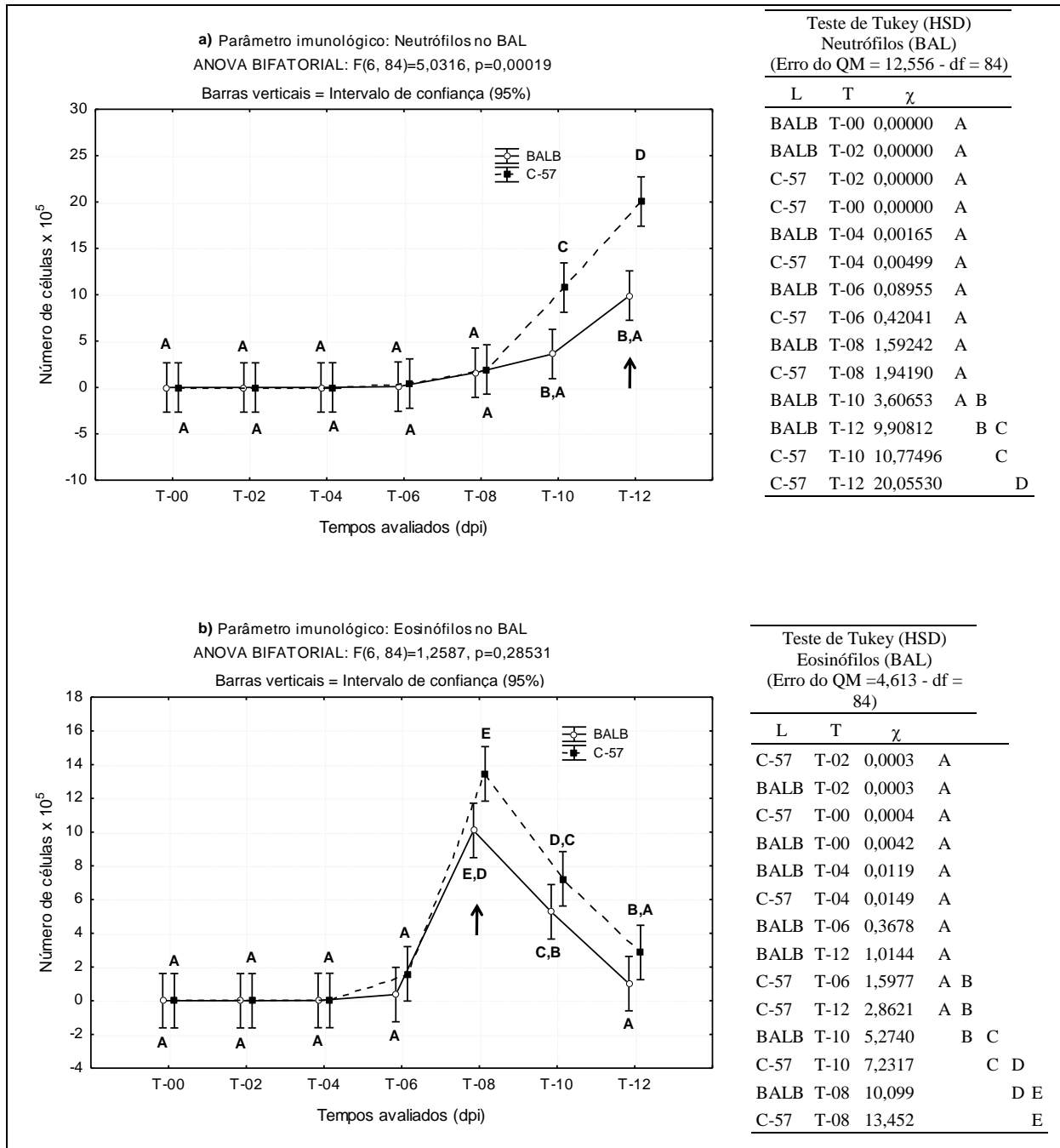
Representação gráfica dos números de leucócitos totais presentes no lavado pulmonar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). BAL = Lavado brocoalveolar. L = Linhagem. T = Tempo de infecção. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 16 Variação cinética da composição das células leucocitárias mononucleadas durante fase aguda da ascariidiose.

Representação gráfica dos números de leucócitos mononucleados presentes no lavado pulmonar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). BAL = Lavado brocoalveolar. L = Linhagem. T = Tempo de infecção. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 17 Variação cinética da composição das células leucocitárias polimorfonucleadas durante fase aguda da ascariíose.

Representação gráfica dos números de leucócitos polimorfonucleados presentes no lavado pulmonar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j ($p > 0,05$). BAL = Lavado brocoalveolar. L = Linhagem. T = Tempo de infecção. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Tabela 02 Evolução da migração das células leucocitárias durante a ascariíose larval murina.

<i>POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS AO LONGO DO TEMPO DE INFECÇÃO</i>		
Tipo de célula leucocitária	BALB/c (Mais resistente)	C57BL/6j (Mais susceptível)
Macrófago	8° ao 12° d.p.i. (Pico no 10° d.p.i.)	8° ao 12° d.p.i. (Pico no 12° d.p.i.)
Linfócito	8° ao 12° d.p.i. (Platô)	8° ao 12° d.p.i. (Pico no 12° d.p.i.)
Neutrófilo	10° ao 12° d.p.i. (Pico no 12° d.p.i.)	10° ao 12° d.p.i. (Pico no 12° d.p.i.)
Eosinófilo	8° ao 12° d.p.i. (Pico no 8° d.p.i.)	8° ao 12° d.p.i. (Pico no 8° d.p.i.)

Comparação do pico de aparecimento das subpopulações leucocitárias de acordo com a linhagem e o tempo de infecção experimental por *A. suum*. BAL = Lavado broncoalveolar.

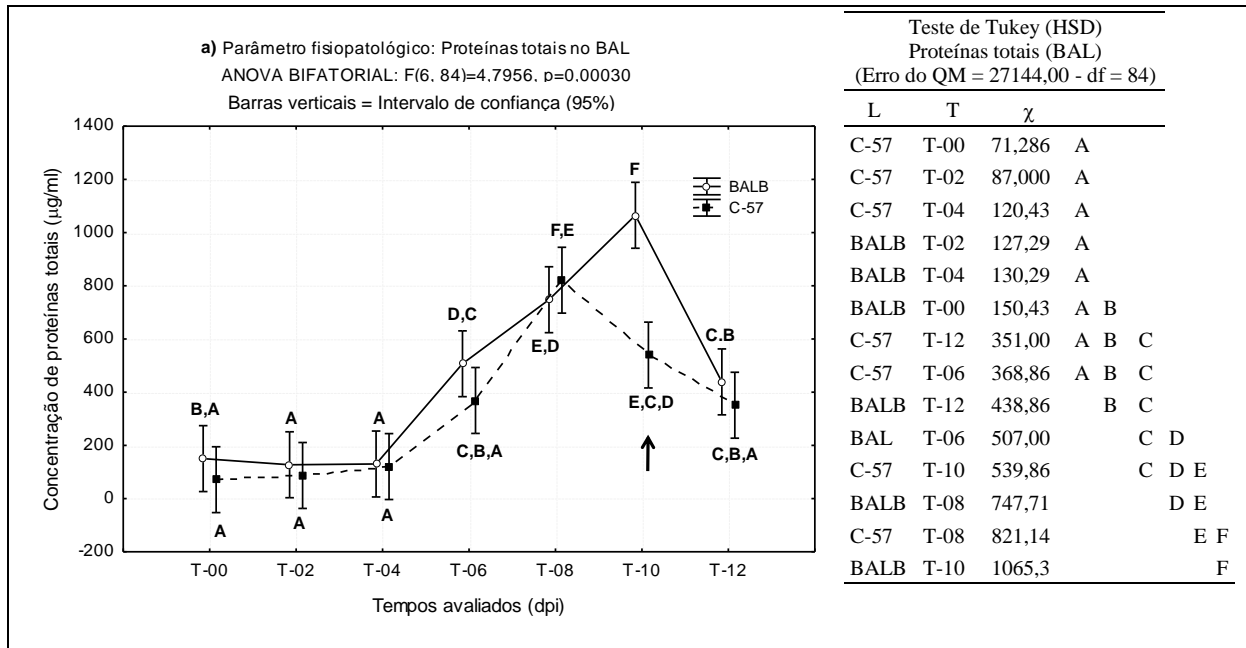
5.3 Parâmetros fisiopatológicos de mucosa

5.3.1 Presença de proteínas totais e hemoglobina no BAL

Alterações fisiopatológicas no pulmão foram investigadas pela dosagem de proteínas totais e de hemoglobina no sobrenadante do BAL. Em ambas as linhagens, ocorreram incrementos significativos na concentração média de proteínas totais a partir do 6° d.p.i., com pico ocorrendo no 8° (BALB/c) e 10° d.p.i. (C57BL/6j) (Figura 18a-d). Contudo, maiores alterações na concentração de proteínas totais foram verificadas na linhagem BALB/c, comparada à C57BL/6j. Além disso, aumentos estatisticamente significativos na concentração de hemoglobina somente foram verificados na linhagem BALB/c, no período entre o 6° e 10° d.p.i. (Figura 19c,d). Além disso, na linhagem C57BL6/j foi possível verificar que, à medida que os níveis de proteínas totais aumentaram, ocorreu redução dos níveis de hemoglobina.

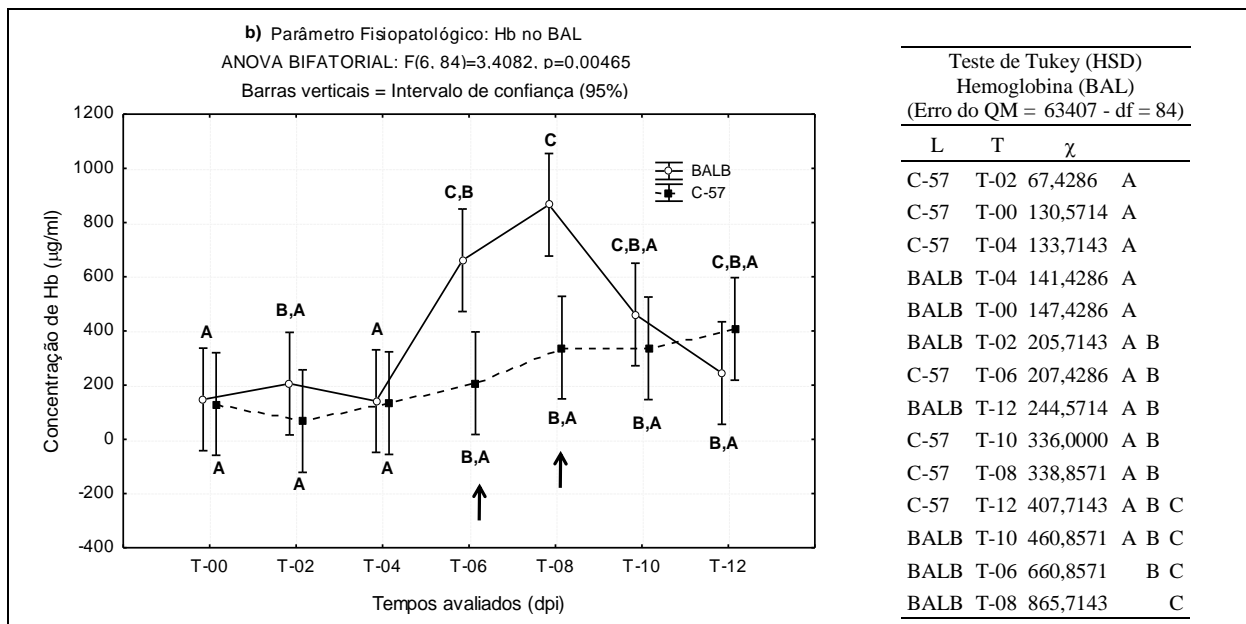
5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 18 Variação cinética dos níveis de proteínas totais no BAL durante fase aguda da ascarirose.



Representação gráfica dos níveis de proteínas totais dosados no lavado broncoalveolar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo A<B<C<D<E<F. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j (p > 0,05). BAL = Lavado brocoalveolar. L = Linhagem. T = Tempo de infecção. χ = Média.

Figura 19 Variação dos níveis de hemoglobina no BAL durante fase aguda da ascarirose.

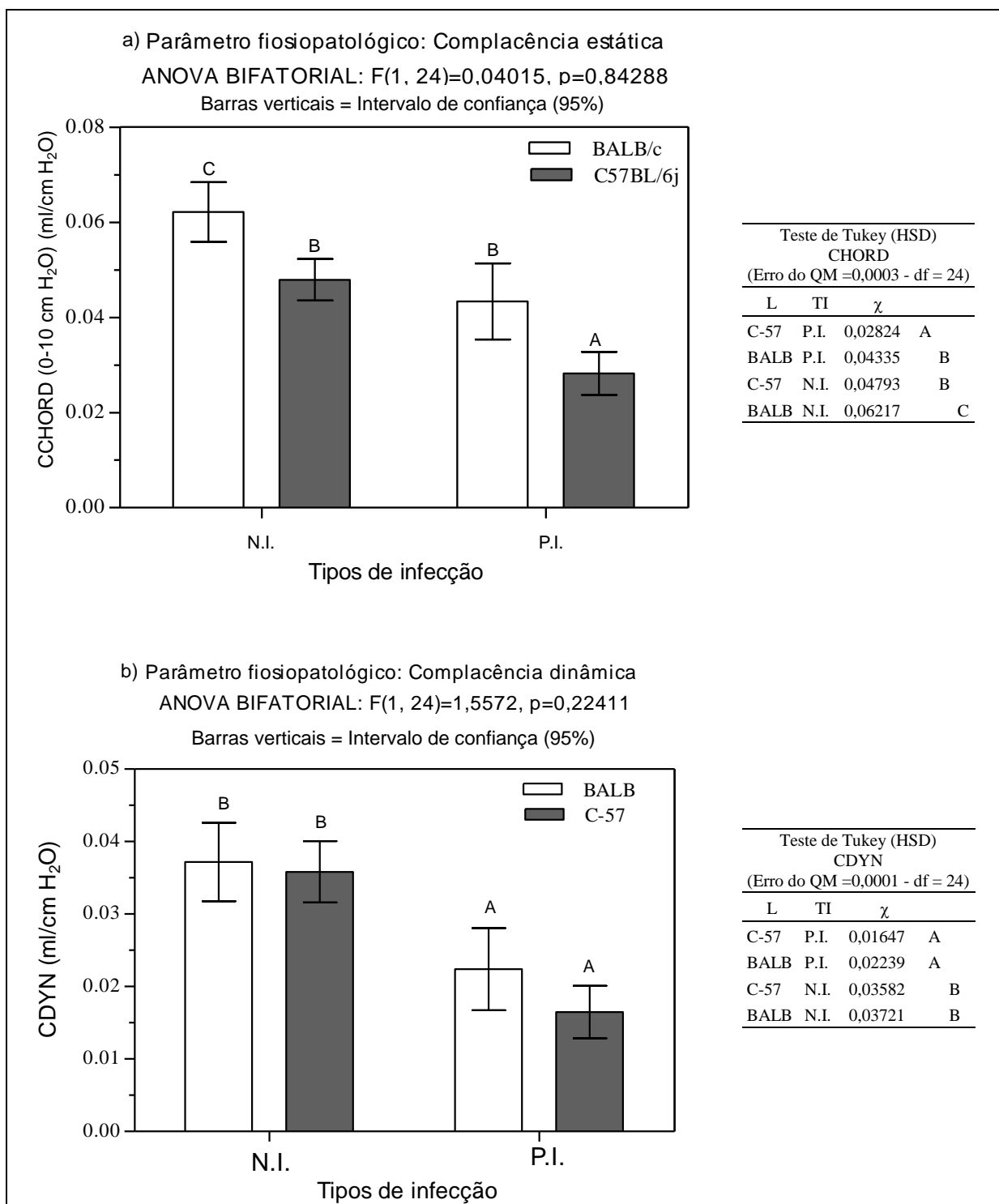


Representação gráfica dos níveis de hemoglobina (Hb) dosados no lavado broncoalveolar. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo A<B<C. Seta = Destaca o ponto em que o valor médio observado na linhagem BALB/c diferiu estatisticamente de C57BL/6j (p > 0,05). BAL = Lavado brocoalveolar. Hb = Hemoglobina. L = Linhagem. T = Tempo de infecção. χ = Média.

5.3.2 Avaliação do impacto da migração larval na função pulmonar

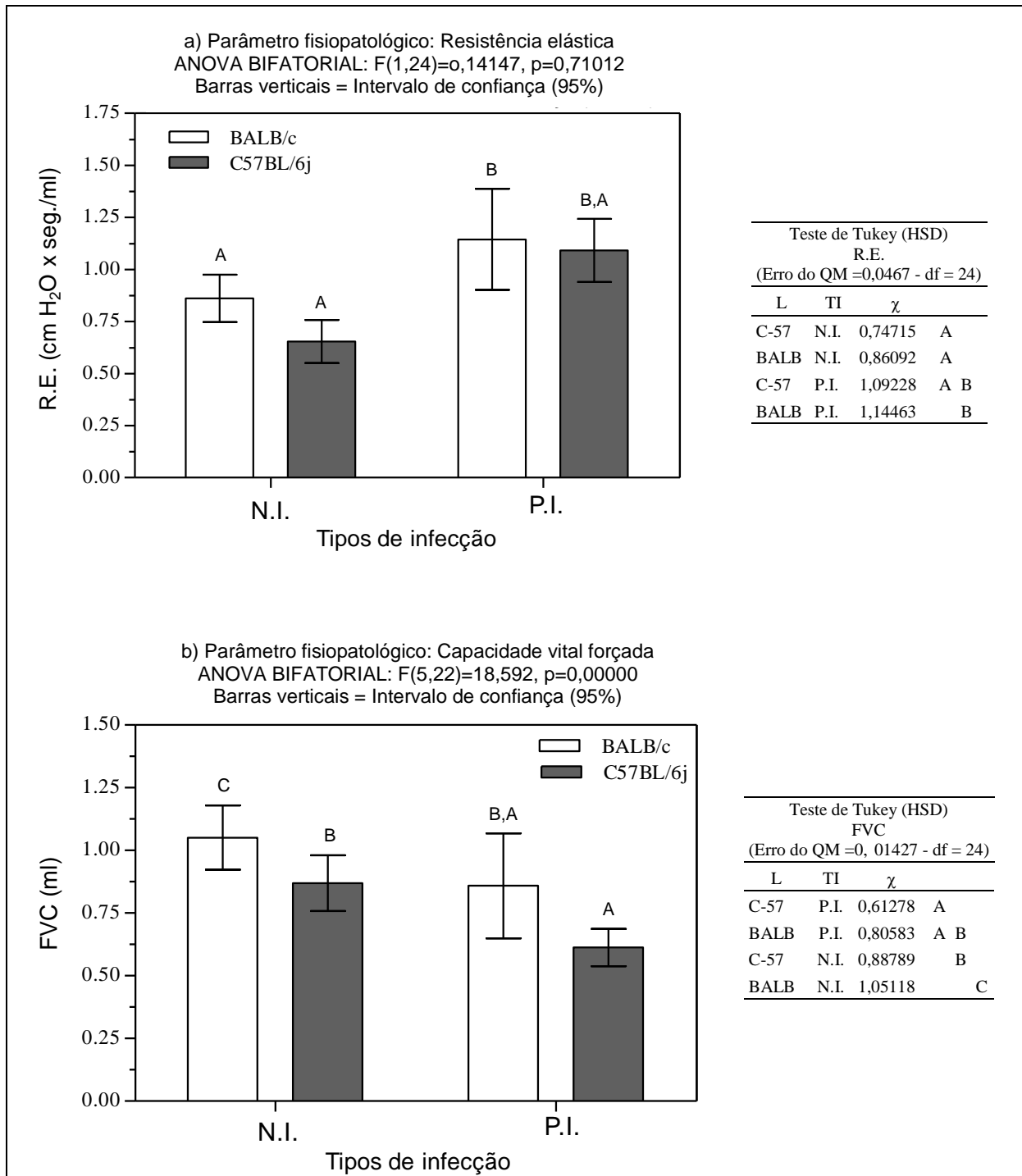
Os resultados da avaliação de mecânica pulmonar demonstraram que, independente da linhagem de camundongos, a presença da infecção causou alterações em todas as variáveis analisadas, ou seja, em ambas as linhagens foi possível detectar aumento da resistência pulmonar (RE) e redução da complacência estática (CHORD) e, ou dinâmica (CDYN) (Figura 20a-c). Estas alterações se refletiram em redução da capacidade vital forçada (FVC) (Figura 21a-b). A variável volume expiratório forçado no 100° mseg (FEV₁₀₀) não apresentou diferenças estatisticamente significativas (dados não apresentados).

Figura 20 Efeito da fase aguda da ascariidose nas variáveis CHORD e CDYN.



Representação gráfica dos dados obtidos nas provas de função pulmonar em indivíduos saudáveis (N.I.) e após a fase aguda da infecção (P.I.) com *A. suum*. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. CHORD = Complacência estática. CDYN = Complacência dinâmica. L = Linhagem. N.I. = Grupo de indivíduos não infectados (00 d.p.i.). P.I. = Grupo de indivíduos infectados (12 d.p.i.). R.E. = Resistência elástica. TI = Tipo de infecção. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 21 Efeito da fase aguda da ascarirose nas medidas de R.E. e FVC.

Representação gráfica dos dados obtidos nas provas de função pulmonar em indivíduos saudáveis (N.I.) e após a fase aguda da infecção (P.I.) com *A. suum*. Letras iguais indicam semelhança entre as médias, sendo $A < B < C$. FVC = Capacidade vital forçada. L = Linhagem. N.I. = Grupo de indivíduos não infectados (00 d.p.i.). P.I. = Grupo de indivíduos infectados (12 d.p.i.). R.E. = Resistência elástica. TI = Tipo de infecção. χ = Média.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

5.4 Relação entre os parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos

Associações fortes ($r \leq 0,66$) e estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros imunobiológicos, avaliadas neste estudo, foram identificadas em todos os tempos de infecção, principalmente, após o pico de migração das larvas no pulmão. A intensidade de infecção se correlacionou negativamente com os níveis de SIgA-total no INL e, positivamente com SIgA-total no BAL, independente do tempo de infecção no qual a interação ocorreu (Figura 22a,b; Tabela 2).

Além disso, o tempo de infecção influenciou as interações entre carga parasitária intestinal e número de leucócitos, sendo a associação positiva com linfócitos (8° d.p.i.) e negativa com linfócitos e macrófagos (12° d.p.i.) (Tabela 3).

Correlações negativas foram observadas entre níveis de SIgA no lavado de mucosa intestinal com contagem de linfócitos e de eosinófilos no BAL, enquanto correlações positivas foram detectadas entre a contagem de macrófagos com as de linfócitos e eosinófilos (Tabela 4). E, interações fortes ocorreram entre os parâmetros imunológicos com os fisiopatológicos (PROT e Hb), sendo que neste caso, as correlações foram sempre positivas, exceto nos casos em que se compararam variáveis de função pulmonar com células leucocitárias (Tabela 4).

Figura 22 Associação entre as variáveis SIgA-INL e -BAL com carga parasitária total.

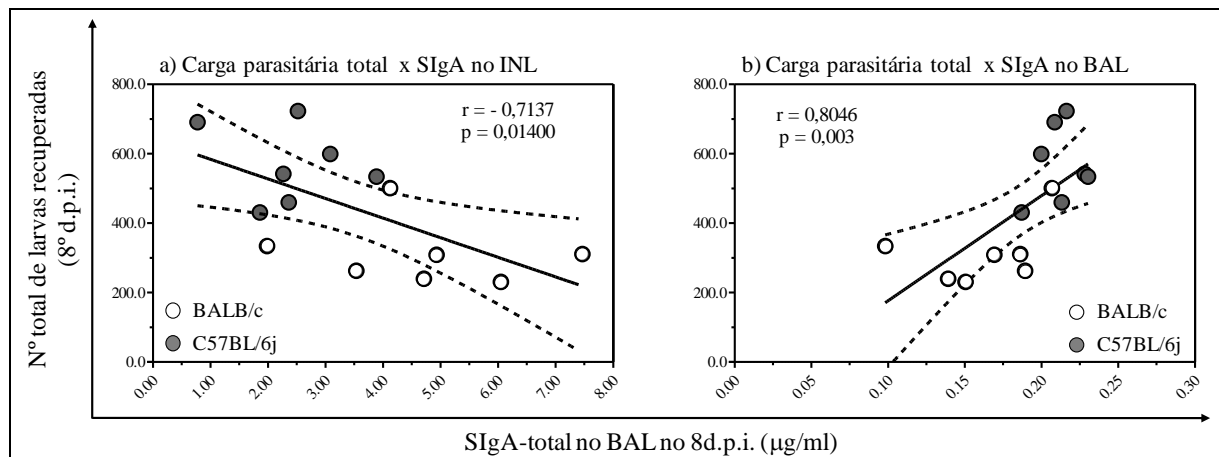


Gráfico representativo da dispersão de pontos das variáveis SIgA-total (x) em relação à carga parasitária total (y).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Tabela 3 Associação entre variáveis dos parâmetros imunoparasitológicos.

<i>INTERAÇÃO ENTRE PARÂMETROS IMUNOPARASITOLÓGICOS</i>				
<i>CORRELAÇÃO DE PEARSON</i>				
Tempo de inf. (d.p.i.)	Variável 1	Variável 2	r	p
8°	CRG-BAL	SIgA-INL-DEL	-0,7160	0,013
8°	CRG-TEC-PUL	SIgA-INL-GRS	-0,7489	0,008
8°	CRG-GRS	SIgA-INL-GRS	-0,6795	0,021
8°	CRG-PUL	SIgA-INL-GRS	-0,7133	0,014
8°	CRG-INT	SIgA-INL-GRS	-0,7311	0,011
8°	CRG-TOT	SIgA-INL-GRS	-0,7137	0,014
12°	CRG-TOT	LINF-BAL	-0,7000	0,023
12°	CRG-TOT	MAC-BAL	-0,7100	0,022
8°	CRG-TEC-PUL	SIgA-BAL	0,7825	0,004
8°	CRG-BAL	SIgA-BAL	0,7689	0,006
8°	CRG-PUL	SIgA-BAL	0,8277	0,002
8°	CRG-TOT	SIgA-BAL	0,8046	0,003
12°	CRG-PUL	SIgA-BAL	0,6600	0,038
8°	CRG-INT	LINF-BAL	0,8186	0,002

Resultados dos testes da correlação de Pearson para as variáveis dos parâmetros imunoparasitológicos. Apenas correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. BAL = Lavado broncoalveolar. CRG = Carga parasitária. DELL = Lavado do intestino delgado. INL = Lavado intestinal. GRS = Lavado do intestino grosso. INT = Intestino. LINF = Linfócito. MAC = Macrófago. PUL = Pulmão. SIgA = IgA secretória. TEC-PUL = Tecido pulmonar. TOT = Total.

Tabela 4 Associação entre variáveis do parâmetro imunológico.

<i>INTERAÇÃO ENTRE CARGA (CRG) x LEUCÓCITOS</i>				
<i>CORRELAÇÃO DE PEARSON</i>				
Tempo Inf. (d.p.i.)	Variável 1	Variável 2	r	p
8°	SIgA-INL-GRS	EOS-BAL	-0,9100	0,000
8°	SIgA-INL-GRS	LINF-BAL	-0,7200	0,019
8°	MAC-BAL	LINF-BAL	0,7796	0,005
8°	MAC-BAL	EOS-BAL	0,9419	0,000
12°	MAC-BAL	LINF-BAL	0,7900	0,007
12°	MAC-BAL	EOS-BAL	0,8000	0,006
12°	LINF-BAL	EOS-BAL	0,6600	0,039

Resultados dos testes da correlação de Pearson para as variáveis dos parâmetros imunológicos. correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. Apenas correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. BAL = Lavado broncoalveolar. INL-GRS = Lavado do intestino grosso. LINF = Linfócito. MAC = Macrófago. EOS = Eosinófilo.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Tabela 5 Associação entre parâmetros imunopatológicos.

<i>INTERAÇÃO ENTRE CARGA (CRG) x LEUCÓCITOS</i>				
<i>CORRELAÇÃO DE PEARSON</i>				
Tempo Inf. (d.p.i.)	Variável 1	Variável 2	r	p
8°	PROT-BAL	LINF-BAL	0,6721	0,023
12°	CDYN	SIgA-INL-GRS	0,7500	0,012
12°	FVC	SIgA-INL-GRS	0,8300	0,003
12°	CDYN	MAC-BAL	-0,6500	0,042
12°	CDYN	EOS-BAL	-0,6800	0,031
12°	FVC	EOS-BAL	-0,6900	0,028

Resultados dos testes da correlação de Pearson para as variáveis dos parâmetros imunopatológicos. correlações estatisticamente significativas foram sumarizadas. BAL = Lavado broncoalveolar. Apenas PROT = Proteínas totais. INL = Lavado intestinal. INL-GRS = Lavado do intestino grosso. LINF = Linfócito. MAC = Macrófago. CDYN = Complacência dinâmica. FVC = Capacidade funcional vital.

CAPÍTULO 02

Importância de eosinófilos na indução de SIgA e na proteção contra a infecção por ascaridiose larval

Eosinófilos são células leucocitárias de linhagem granulocítica geralmente associados à resposta imune pró-inflamatória e na imunopatologia associadas às helmintoses e reações alérgicas ^{41, 159-163}. Contudo, tem sido demonstrado que os eosinófilos também representam papel importante como célula reguladora da resposta imune local, tanto inata quanto adquirida. Além disso, contibuem para uma ampla gama de processos imunopatológicos ou de homeostase de mucosas, dependendo do estado de ativação em que se encontram ^{162, 164-167}.

Na imunidade inata os eosinófilos podem funcionar como célula apresentadora de antígenos ¹⁶⁸⁻¹⁷². Além disso, evidências experimentais (*in vitro* e *in vivo*) indicam que eosinófilos são importantes para a homeostase de plasmócitos IgA⁺, assim como para a produção de muco e composição da microbiota intestinal ^{173, 174}. E, camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA-1) apresentam comprometimento do evento de mudança de classe para IgA, tanto pela via T-independente como T-dependente. Por outro lado, esta imunoglobulina pode aumentar a sobrevivência e potentemente ativar eosinófilos ^{99-101, 173-177}.

A ação sinérgica entre eosinófilos e imunoglobulinas na proteção contra infecções parasitárias tem sido relatada ¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Assim, considerando os fatos expostos, a pergunta norteadora do segundo capítulo foi se os eosinófilos representam importante papel na produção de SIgA e na proteção contra ascaridiose. Assim, este capítulo apresenta os resultados da avaliação do papel de eosinófilos na produção de SIgA e nos eventos imunes de mucosa durante ascaridiose larval murina.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

5.5 Influência de eosinófilos nos parâmetros imunoparasitológicos de mucosa

Conforme observado na figura 23, os resultados revelaram que a carga parasitária pulmonar foi menor em animais de fundo genético selvagem (BALB/c) reinfectados ($\bar{x} = 78$) comparado à BALB/c primoinfectados ($\bar{x} = 184$). Na ausência de eosinófilos (Δ dblGATA) a carga parasitária pulmonar foi maior na reinfecção ($\bar{x} = 346$) em relação à primoinfecção ($\bar{x} = 193$).

Ao se comparar as duas linhagens, observou-se que a carga parasitária pulmonar foi semelhante na primoinfecção, mas, Δ dblGATA reinfectados apresentaram maior recuperação de larvas que os BALB/c. Além disso, maior recuperação de larvas no BAL ocorreu nesta linhagem tanto na primo- quanto na reinfecção.

Figura 23 Influência de eosinófilos na carga parasitária pulmonar.

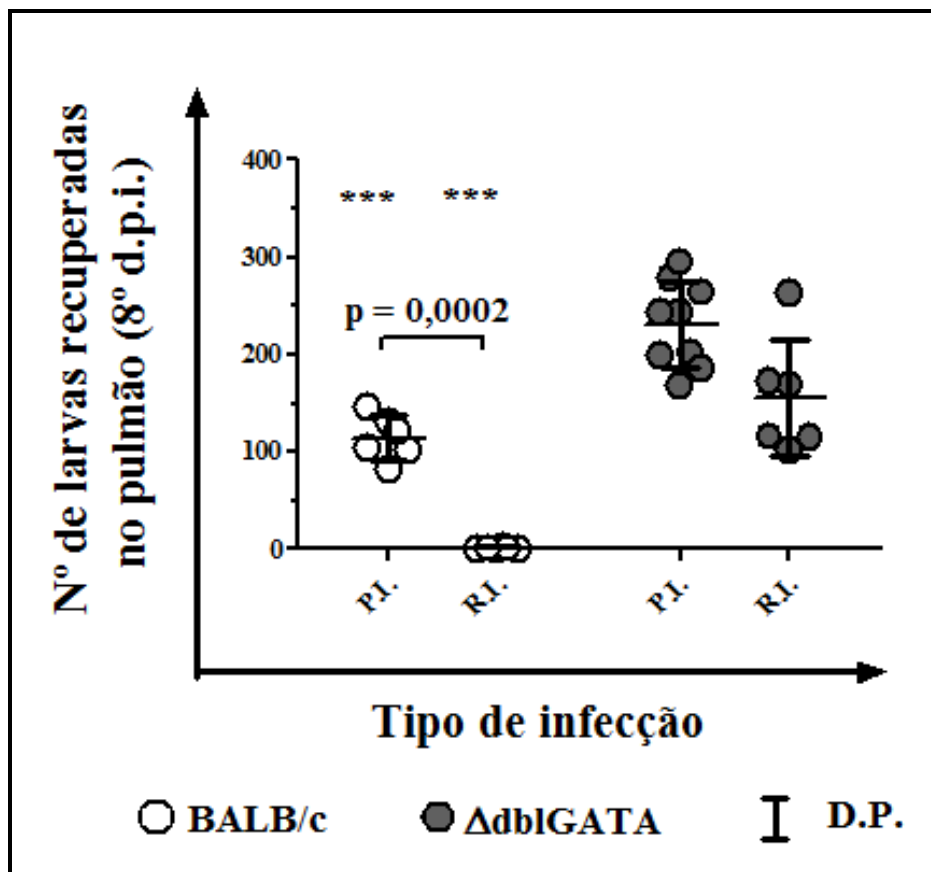


Gráfico representativo da carga parasitária pulmonar (8º d.p.i.) de camundongos selvagens BALB/c comparada aos animais depletados de eosinófilos (Δ dblGATA). D.P. = Desvio padrão. N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo controle com infecção primária. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (BALB/c) diferiu estatisticamente do valor de obtido para Δ dblGATA ($p \leq 0,001$).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

As dosagens de SIgA no lavado de mucosa intestinal (INL-GRS) revelaram que nem a linhagem do camundongo nem o tipo de infecção influenciaram os níveis de SIgA nos lavados de mucosa intestinal durante a infecção (Figura 24a,b). Contudo, nos lavados de mucosa pulmonar (BAL) os animais Δ dblGATA apresentaram reduzidas concentrações de SIgA (total e específica), comparadas aos da linhagem selvagem (Figura 25a,b).

Figura 24 Influência de eosinófilos nos níveis de SIgA-total e específica no INL-GRS.

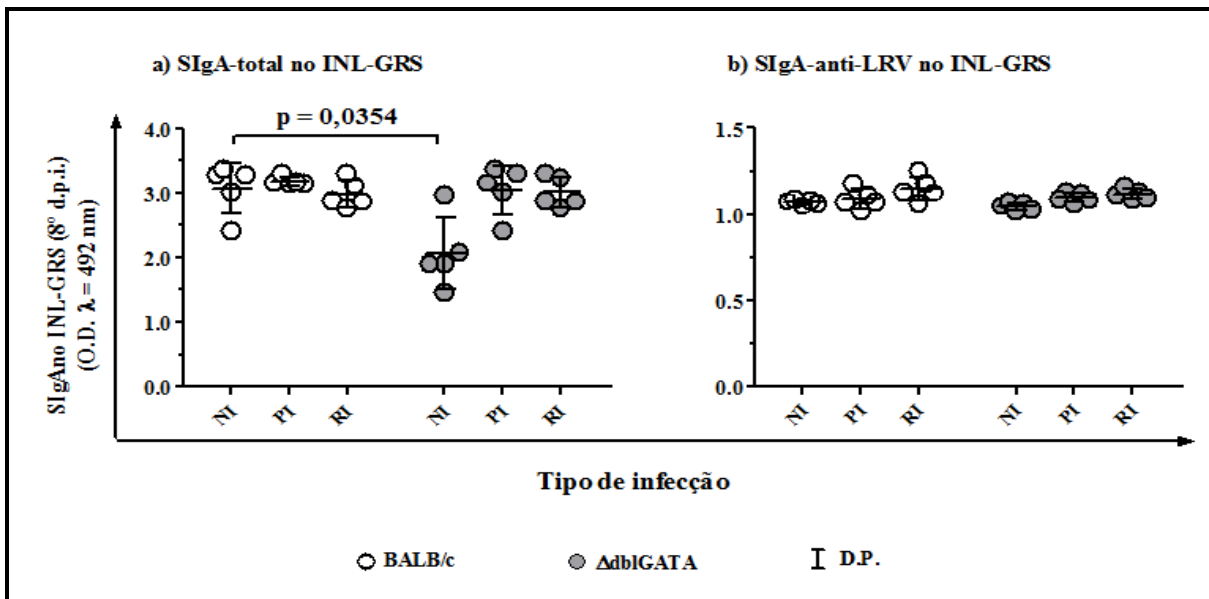


Gráfico representativo dos níveis de SIgA–total e específico contra antígenos de *A. suum* dosados no lavado intestinal de camundongos BALB/c comparada à produção em animais Δ dblGATA. D.P. = Desvio padrão. INL-GRS = Lavado do intestino grosso. N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo controle com infecção primária.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

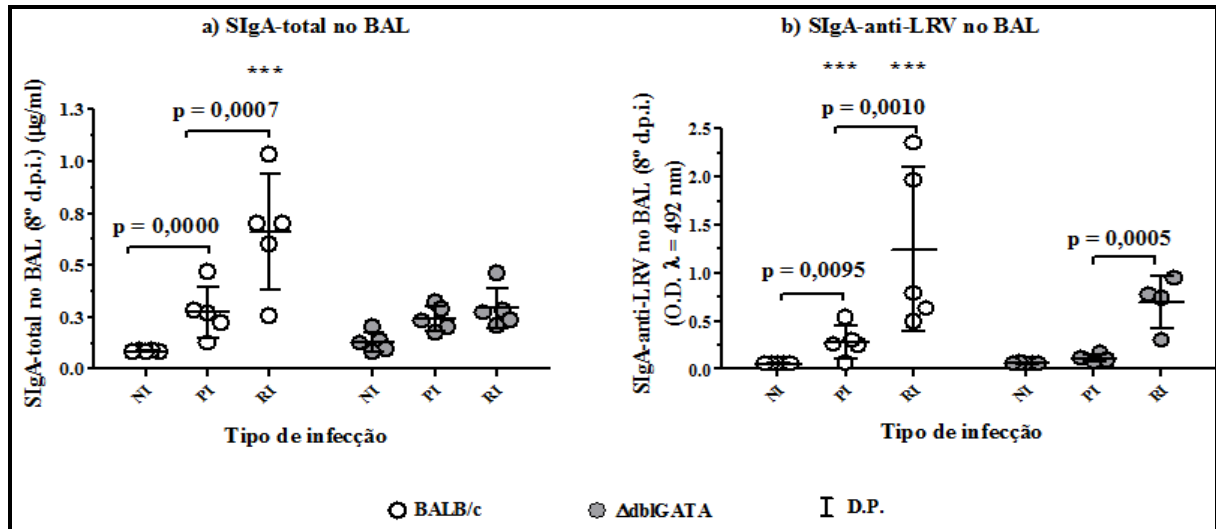
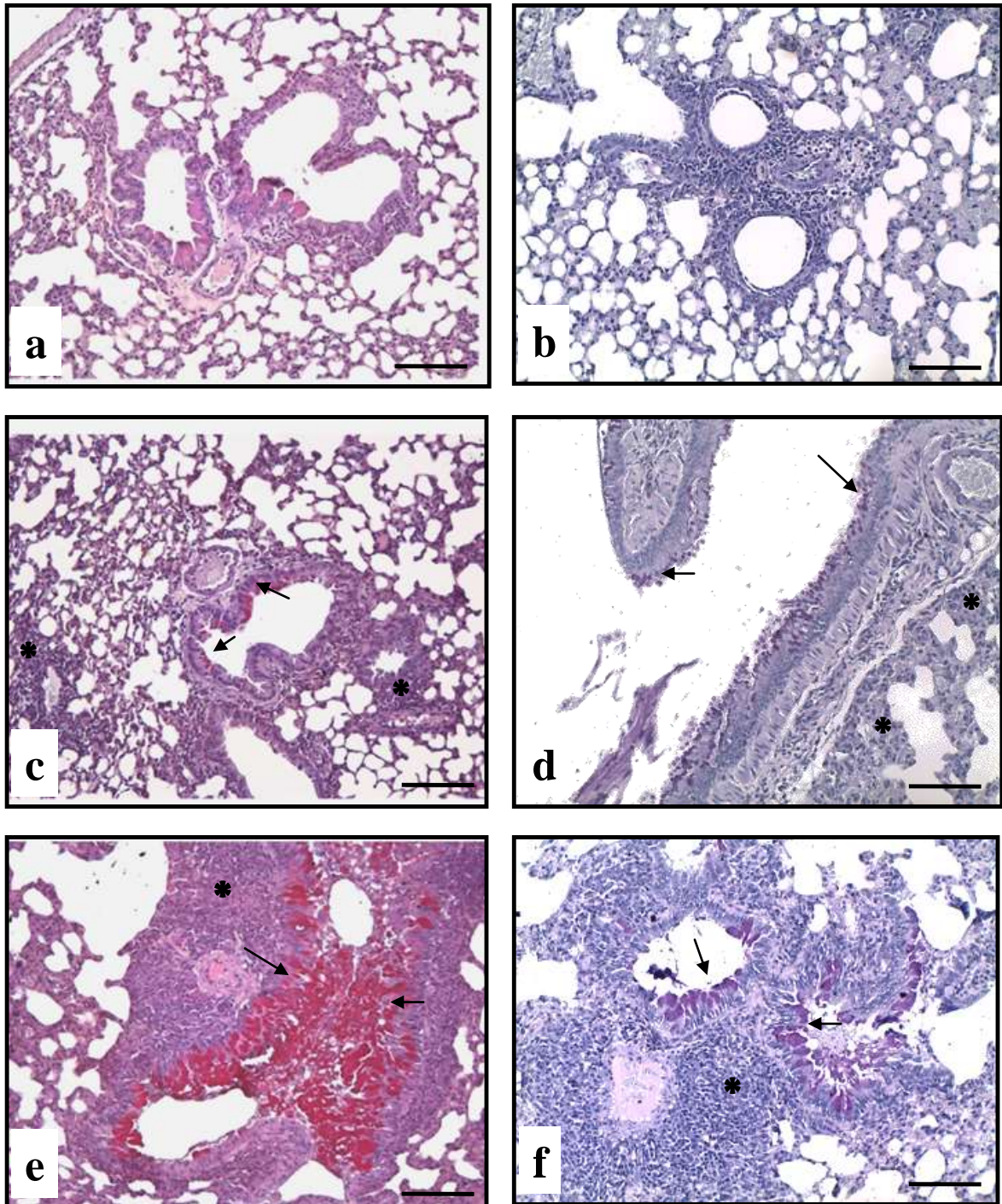
Figura 25 Influência de eosinófilos nos níveis de SIgA-total no BAL.

Gráfico representativo dos níveis de SIgA–total e específico contra antígenos de *A. suum* dosados no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c comparada à produção em animais ΔdblGATA. D.P. = Desvio padrão. N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo controle com infecção primária.

5.6 Influência dos eosinófilos na produção de muco na mucosa pulmonar

Uma análise histopatológica preliminar revelou presença de infiltrado inflamatório e produção de mucinas pelas células caliciformes (positivas para PAS) nos pulmões dos grupos primo- e reinfectedos das duas linhagens (Figura 26a-f). Em ambas as linhagens a produção de muco foi mais intensa nos grupos reinfectedos em relação ao grupo controle e de primoinfectados. Contudo, na linhagem ΔdblGATA a produção de muco foi menor que a de BALB/c (Figura 26e,f).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 01

Figura 26 Influência de eosinófilos na produção de muco na mucosa pulmonar.

Prancha histológica mostrando parênquima pulmonar com a presença de bronquíolos de camundongos das linhagens BALB/c e Δ dblGATA não infectados e oito dias após infecção experimental com *A. suum*, corados por PAS. a) Grupo controle não infectado BALB/c (N.I.): parênquima e epitélio de revestimento bronquiolar normais. b) Grupo controle não infectado Δ dblGATA (N.I.): presença de infiltrado inflamatório. c-d) Grupos primoinfectados (P.I.): presença de infiltrado inflamatório e de células caliciformes produtoras de mucinas. e-f) Grupos reinfectedos (R.I.): presença de infiltrado inflamatório e intensa produção de mucinas pelas células caliciformes. Coloração por PAS: Presença de células caliciformes produtoras de mucinas (PAS⁺) indicadas por setas. Infiltrados inflamatórios indicados por asteriscos.

a,c,e = Microfotografias representativas da linhagem BALB/c.

b,d,e = Microfotografias representativas da linhagem Δ dblGATA.

Barra = 100 μ m.

CAPÍTULO 03

Influência de receptores do tipo Toll (TLR) na produção de SIgA-total e na proteção contra ascaridiose larval

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 03

Helminhos apresentam em sua superfície e, ou excretam/secretam uma variedade de moléculas (glicoproteínas, lipoproteínas, glicolipídeos) que são ligantes de TLR e que ativam granulócitos e os levam a produzir alarminas e citocinas que dirigem a resposta imune celular para o tipo Th2, favorável à produção de IgA^{182, 183}.

Eosinófilos diferencialmente expressam vários TLR em sua superfície, incluindo TLR2 e TLR4¹⁸⁴. Peptídeoglicanos (ligante de TLR2) podem induzir a liberação de citocinas (IL-1, -6, -8), superóxidos e proteína catiônica eosinofílica (ECP)¹⁸⁵. E, embora tenha sido demonstrado, em experimentos *in vitro*, que ECP inibe a proliferação de células B e a produção de Igs por plasmócitos¹⁸⁶, altos níveis de Igs e ECP, além de uma associação positiva entre estes fatores, foram encontrados no BAL de pacientes apresentando pneumonia eosinofílica crônica¹⁸⁷ e no soro de pacientes com rinite alérgica¹⁸⁸. Além disso, o aumento da produção de IgA em ensaios com células epiteliais expressando constitutivamente TLR4 sugere a participação deste receptor na produção de SIgA¹⁸⁹.

Assim, considerando que a produção de SIgA no BAL foi positivamente influenciada pela presença eosinófilos, a próxima pergunta do terceiro capítulo foi se a produção de SIgA durante a ascaridiose seria dependente da ativação de TLR2 e TLR4. Portanto, este capítulo apresenta resultados da comparação da resposta imune de mucosa contra ascaridiose experimental obtidos de animais depletados para os genes que regulam a expressão de TLR2 e TLR4 com os animais do respectivo fundo genético selvagem (C57BL/6j).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 03

5.7 Avaliação dos parâmetros imunoparasitológicos: carga parasitária e SIgA-total

A influência de receptores do tipo Toll (TLR) na produção de SIgA e na resistência à infecção foi avaliada. Conforme figura 27, a intensidade de infecção pulmonar foi maior nos animais deficientes para a produção de TLR em comparação com camundongos selvagens. Ademais, a recuperação de larvas no BAL dos animais deficientes foi expressivamente aumentada em relação à linhagem selvagem.

As dosagens de SIgA-total, tanto no INL-GRS quanto no BAL, foram menores nas linhagens deficientes para a expressão de TLR (TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}), em comparação aos níveis obtidos na linhagem selvagem (Figura 28a-c).

Figura 27 Influência de TLRs na carga parasitária pulmonar.

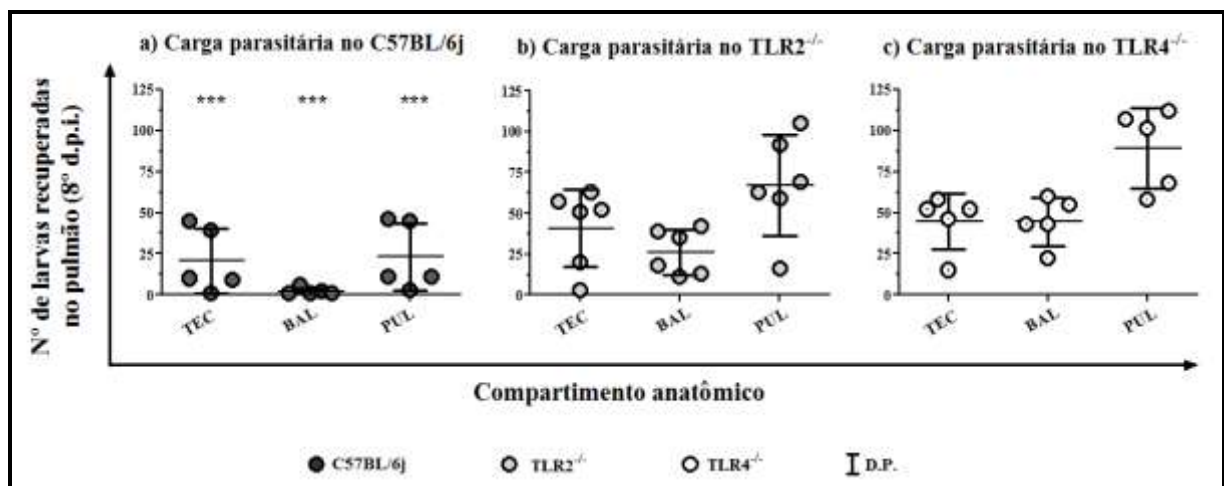


Gráfico representativo do número de larvas recuperadas no pulmão (8º d.p.i.) de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j e de camundongos depletados para TLR2 e TLR4. BAL = Carga no lavado broncoalveolar. D.P. = Desvio padrão. N.I. = Grupo controle. P.I. = Grupo infectado. PUL = Carga no pulmão. TEC = Carga no tecido pulmonar. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (C57BL/6j) diferiu estatisticamente de TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} (p < 0,05).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 03

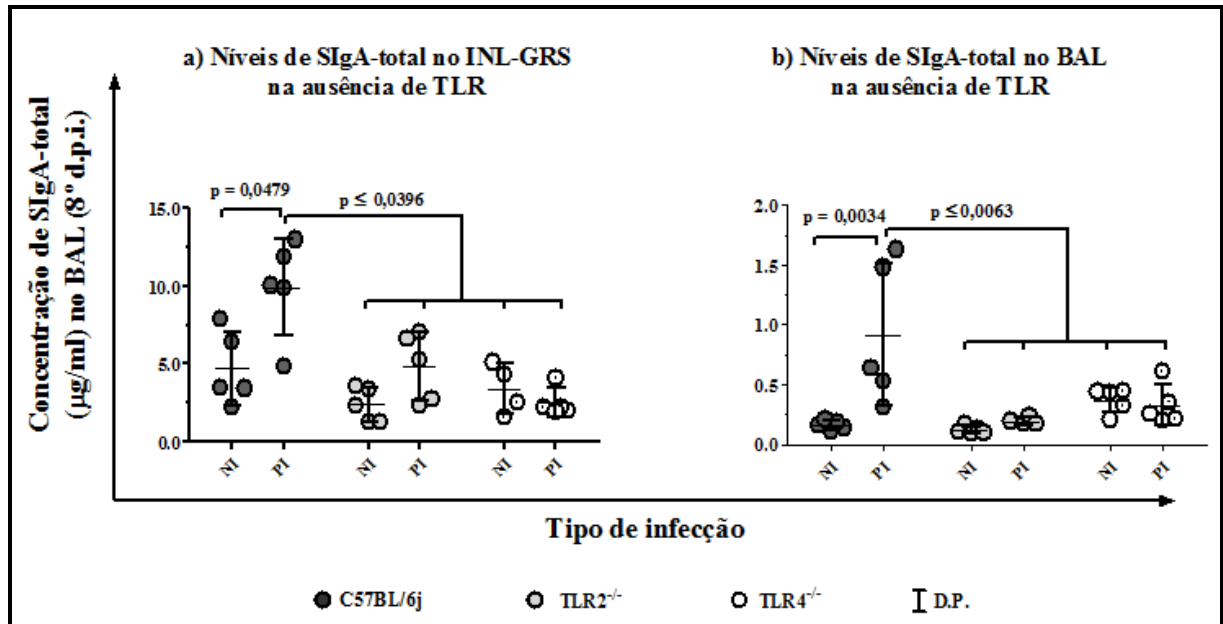
Figura 28 Impacto da ausência de TLRs na produção de SIgA-total.

Gráfico representativo dos níveis de SIgA-total e específico dosados n BAL(8° d.p.i.) de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j e de camundongos deficientes na expressão de TLR2 e TLR4. D.P. = Desvio padrão. N.I. = Grupo controle. P.I. = Grupo infectado. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (C57BL/6j) diferiu estatisticamente de TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} ($p < 0,05$).

5.8 Composição das células leucocitárias no BAL

Na ausência do TLR2 ocorreu expressiva redução na contagem de todas as subpopulações de células leucocitárias no BAL, tanto em comparação com a linhagem selvagem quanto com TLR4^{-/-}). Nos animais TLR4^{-/-} foram observados redução do número de eosinófilos e linfócitos e, um concomitante aumento de neutrófilos (Figura 29).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 03

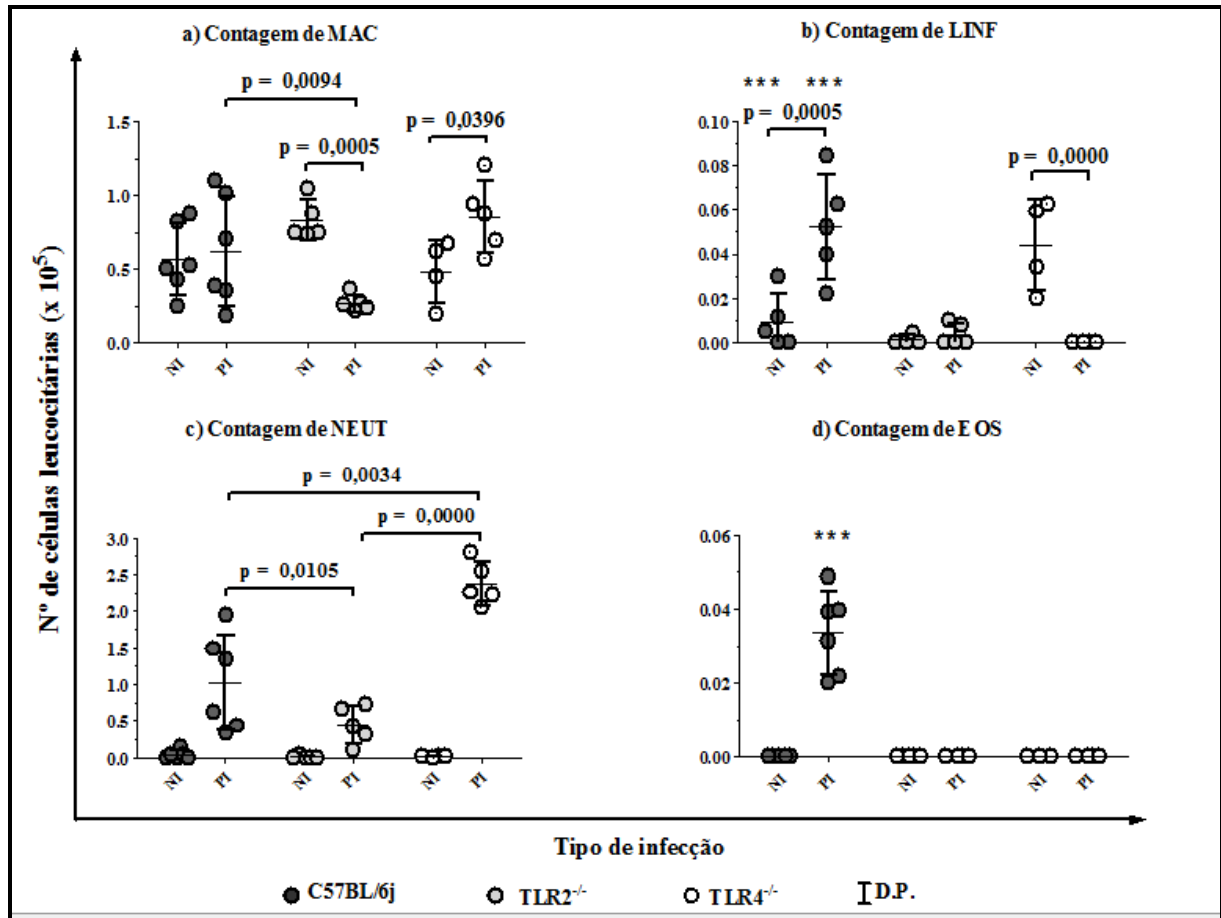
Figura 29 Impacto da ausência de TLRs na composição das células leucocitárias.

Gráfico representativo da contagem de células leucocitárias no BAL (8º d.p.i.) de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j e de camundongos deficientes na expressão de TLR2 e TLR4. D.P. = Desvio padrão. EOS = Eosinófilos. LINF = Linfócitos. MAC = Macrófagos. NEU = Neutrófilos. N.I. = Grupo controle. P.I. = Grupo infectado. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (C57BL/6j) diferiu estatisticamente de TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} (p < 0,05).

5.9 Avaliação do impacto da ausência de TLR na função pulmonar

A infecção causou aumento da resistência e diminuição da complacência dinâmica dos animais de todas as linhagens, contudo, animais depletados de TLR2 apresentaram maior aumento da resistência comparado à linhagem selvagem e também com os animais depletados de TLR4 (Figura 30).

Estas alterações mais acentuadas nas medidas de resistência se refletiram em maior comprometimento da capacidade funcional pulmonar dos animais da linhagem TLR2^{-/-}, em comparação com as outras linhagens avaliadas (Figura 31).

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 03

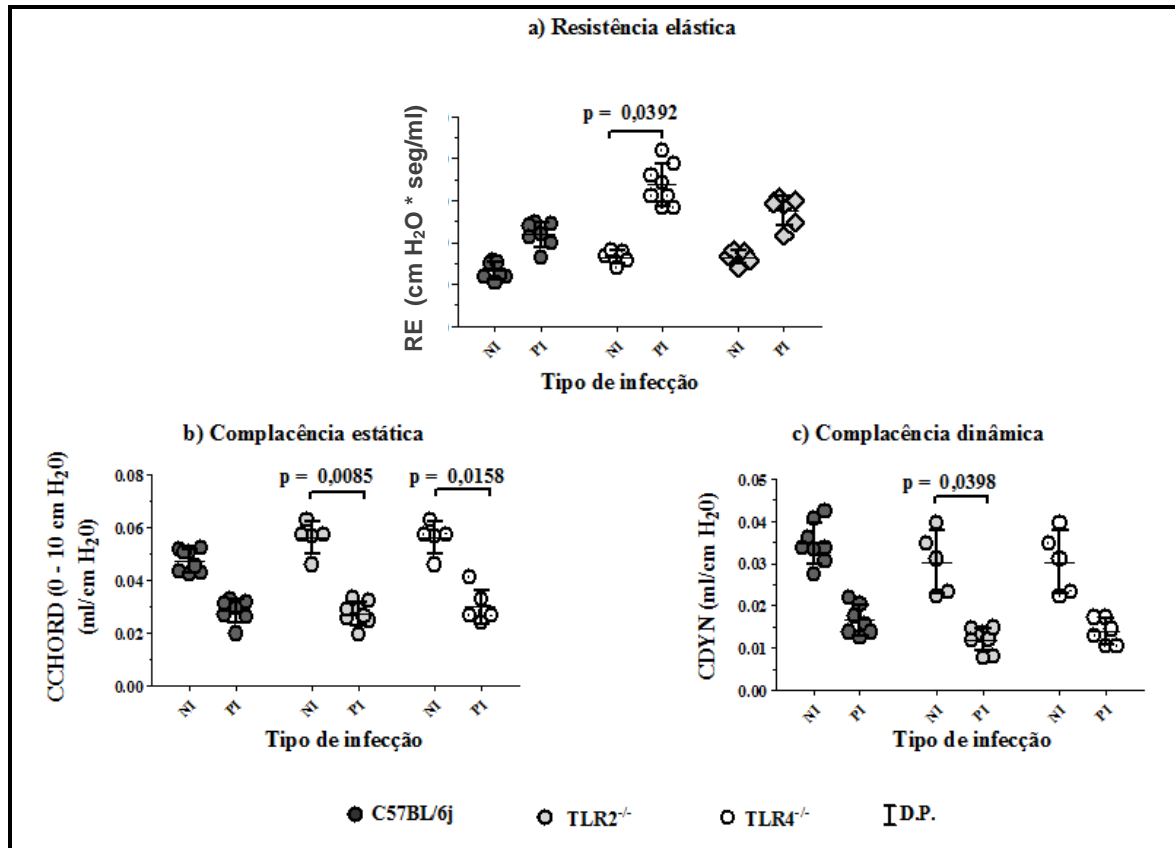
Figura 30 Impacto da ausência de TLRs nas variáveis R.E., CHORD e CDYN.

Gráfico representativo dos resultados obtidos durante a avaliação da função pulmonar logo após a fase aguda (12º d.p.i.) da infecção primária com *A. suum*. CHORD = Complacência estática. CDYN = Complacência dinâmica. D.P. = Desvio padrão. N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo infectado. RE = Resistência elástica. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (C57BL/6j) diferiu estatisticamente de TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} ($p \leq 0,001$).

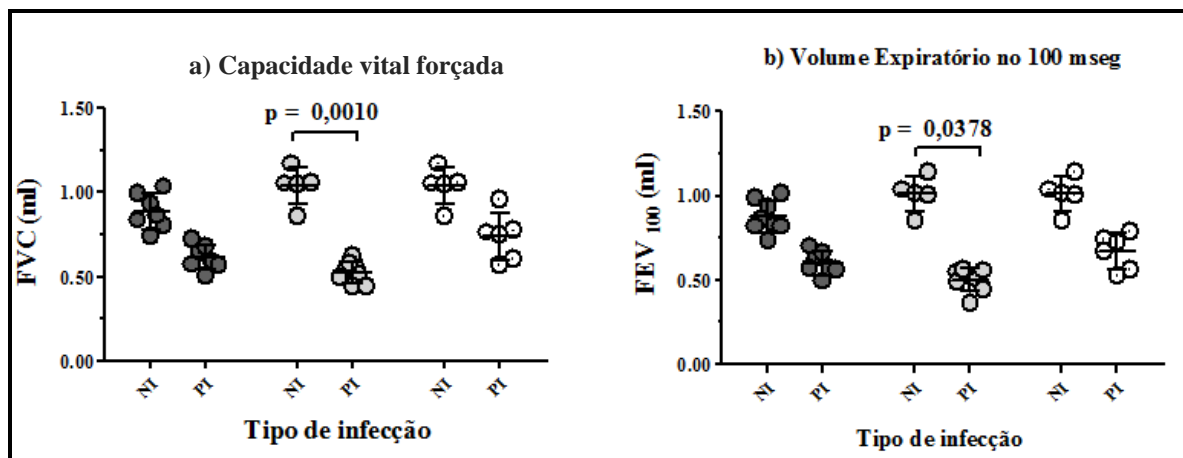
Figura 31 Impacto da ausência de TLRs nas variáveis FVC e FEV100.

Gráfico representativo dos resultados obtidos durante a avaliação da função pulmonar logo após a fase aguda (12º d.p.i.) da infecção primária com *A. suum*. D.P. = Desvio padrão. FEV₁₀₀ = Volume expiratório forçado no 100 mseg. FVC = Capacidade vital forçada. N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo infectado. RE = Resistência elástica. *** = Indica que o valor médio observado na linhagem selvagem (C57BL/6j) diferiu estatisticamente de TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} ($p \leq 0,001$).

CAPÍTULO 04

Influência da administração de probiótico na produção de SIgA e na proteção contra ascaridiose larval

Probióticos são definidos como ingredientes alimentar microbiano vivo que induz benefícios para a saúde ¹⁹⁰. O efeito de probióticos em diversas infecções helmínticas vem sendo estudado e os resultados indicam que, em geral, os probióticos causam aumento da proteção, contudo, aumento de susceptibilidade também já foi relatado ¹⁹¹⁻¹⁹⁹. Entretanto, nenhum estudo foi publicado com relação à ação de probióticos na resistência/susceptibilidade à ascaridiose.

A modificação da microbiota do hospedeiro pode modificar a susceptibilidade hospedeiros à infecções helmínticas. Já foi demonstrado que a introdução de *Lactobacillus* sp. causou um efeito modulador na resposta imune contra *Heligmosomoides polygyrus*, sendo este efeito mais pronunciado na linhagem mais resistente à infecção helmíntica ²⁰⁰⁻²⁰².

Lactococcus lactis é uma bactéria gram-positiva reconhecida como segura para uso na indústria alimentícia pela Food and Drug Administration (FDA), sendo que existe uma ampla lista de enzimas, compostos industriais e produtos terapêuticos recombinantes produzidos por várias linhagens desta bactéria ^{203, 204}. Linhagens recombinantes de *L. lactis* também têm sido usadas para vacinação por via nasal ou oral ²⁰³⁻²⁰⁸.

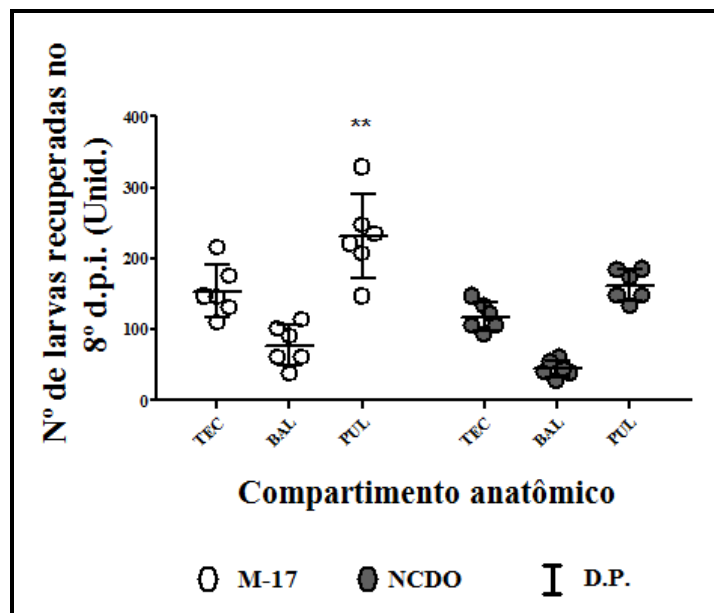
Com base nos achados sobre a interação entre resposta imune, microbiota e helmintos, além dos dados sobre a ação de probióticos nas infecções helmínticas, a pergunta que norteou os experimentos relacionados a este capítulo foi se o uso do probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 poderia melhorar a resistência de camundongos da linhagem BALB/c à infecção por *A. suum*. Assim, este capítulo apresenta os resultados obtidos na avaliação do efeito deste probiótico nos parâmetros imunoparasitológicos de mucosa durante a ascaridiose experimental murina.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 04

5.10 Avaliação da carga parasitária após ingestão de probiótico

A análise dos resultados parasitológicos indicou que a ingestão do probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO2118) reduziu a carga parasitária pulmonar ($\bar{x} = 162$), quando comparados à dieta com o meio de cultura M-17 ($\bar{x} = 231$) (Figura 32), correspondendo a uma taxa de redução percentual igual a 30 %.

Figura 32 Efeito da ingestão de probiótico na carga parasitária pulmonar.

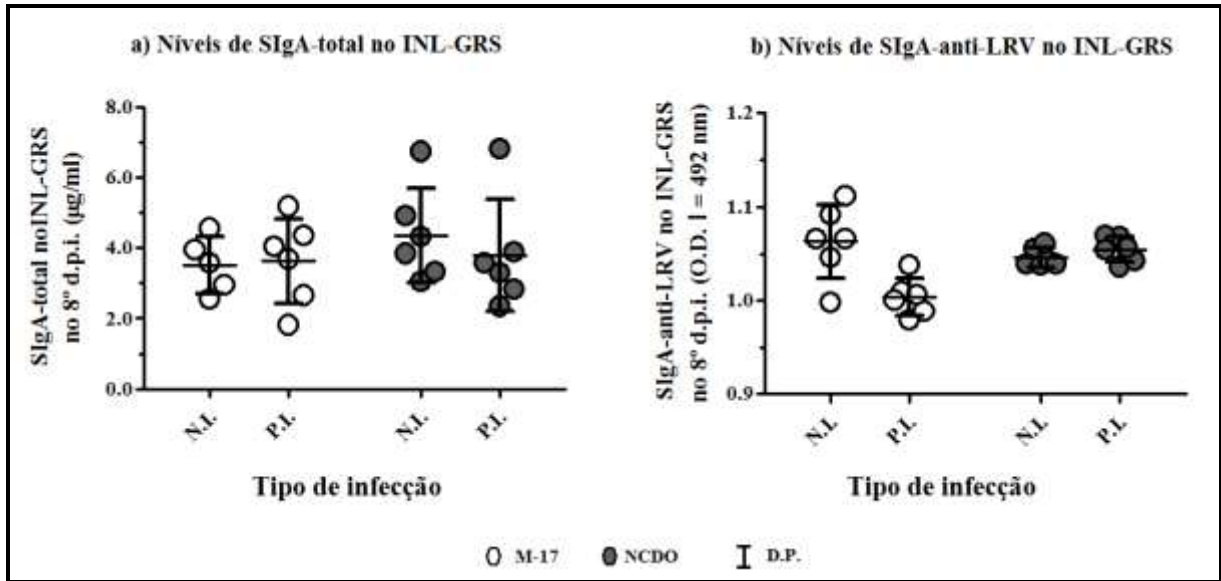


Representação gráfica da carga parasitária pulmonar de camundongos BALB/c que ingeriram placebo (M-17) ou probiótico (NCDO) antes e durante ascarirose experimental murina. D.P. = Desvio padrão. M-17 = Meio de cultura bacteriana. NCDO = Probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO). ** = Indica que o valor médio observado na dieta com probiótico diferiu estatisticamente do controle ($p \leq 0,01$).

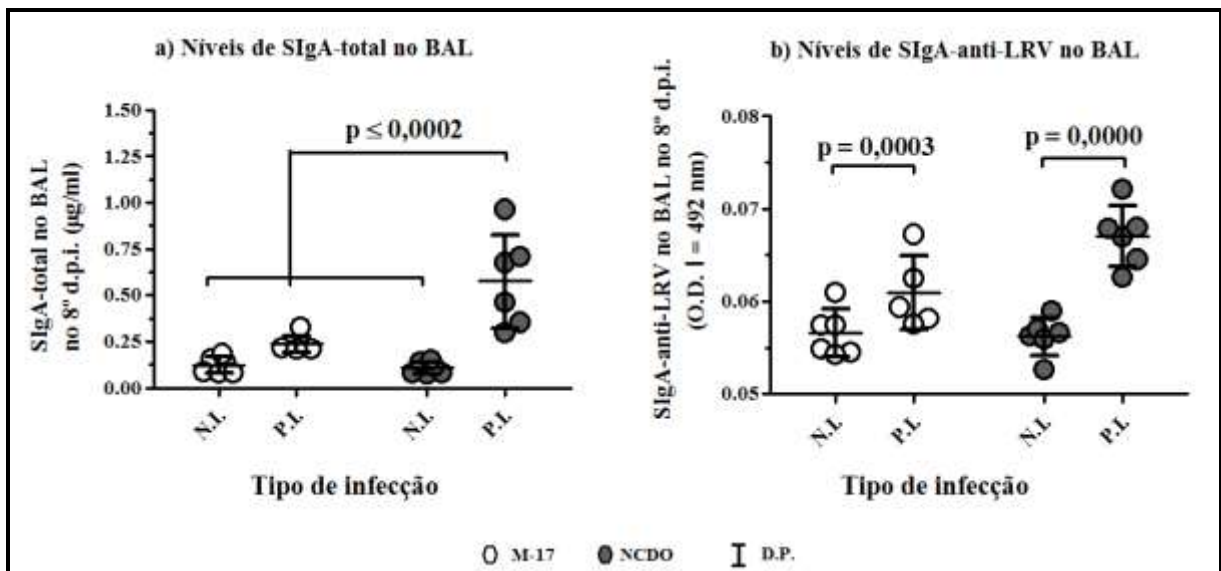
5.11 Produção de SIgA após ingestão de probiótico

Os resultados dos parâmetros imunológicos demonstraram que não houve variações estatisticamente significativas nos níveis de SIgA-total e nem nos de SIgA específico contra antígenos de extrato bruto de larvas (LRV) medidos no INL-GRS (Figura 33a,b). Contudo, a ingestão do probiótico elevou os valores de SIgA-total no BAL (Figura 34a), apesar de não ter influenciado os níveis de SIgA antígeno-específico.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 04

Figura 33 Efeito da ingestão de probiótico na produção de SIgA no INL-GRS.

Representação gráfica dos níveis de SIgA-total e específica contra *A. suum* dosados no lavado intestinal (8° d.p.i.) de camundongos BALB/c que ingeriram placebo (M-17) ou probiótico (NCDO) antes e durante ascaridiose experimental murina. D.P. = Desvio padrão. LRV = Extrato bruto de larvas. M-17 = Meio de cultura bacteriana. NCDO = Probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO). N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo primoinfectado.

Figura 34 Efeito da ingestão de probiótico nos níveis de SIgA no BAL.

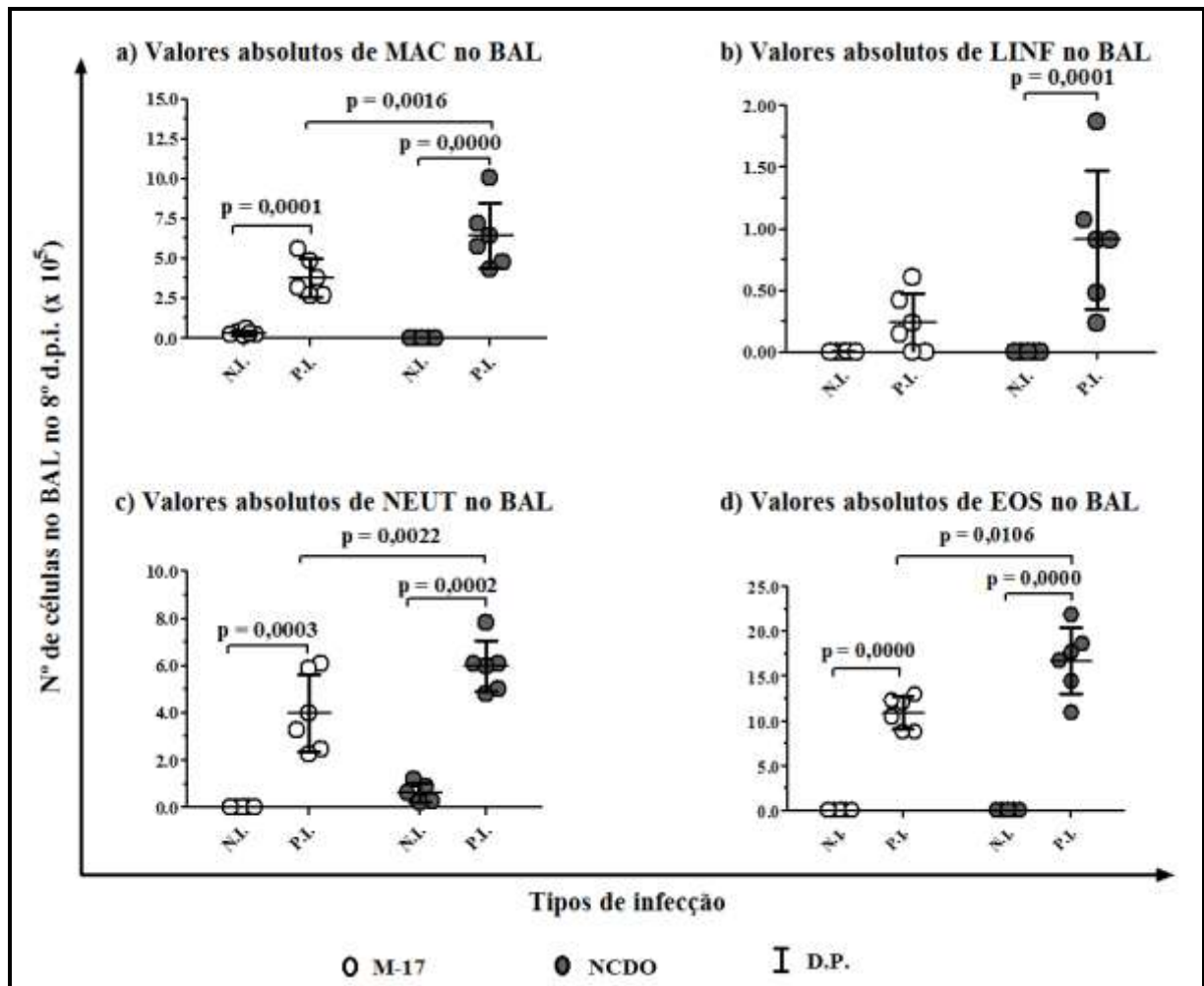
Representação gráfica dos níveis de SIgA-total e específica contra *A. suum* dosados no lavado intestinal (8° d.p.i.) de camundongos BALB/c que ingeriram placebo (M-17) ou probiótico (NCDO) antes e durante ascaridiose experimental murina. D.P. = Desvio padrão. LRV = Extrato bruto de larvas. M-17 = Meio de cultura bacteriana. NCDO = Probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO). N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo primoinfectado.

5 RESULTADOS – CAPÍTULO 04

5.12 Composição das células leucitárias no BAL após ingestão de probiótico

Os valores absolutos de todas as subpopulações de células leucitárias do BAL, exceto as de linfócitos, obtidos de animais submetidos a uma dieta com o probiótico *L. lactis* (NCDO) foram expressivamente superiores àqueles de observados nos animais controles (Figura 35a-d).

Figura 35 Efeito da ingestão de probiótico na composição leucitária do BAL.



Representação gráfica do número de células leucitárias identificadas (8º d.p.i.) no BAL de camundongos que ingeriram placebo (M-17) ou probiótico (NCDO) antes e durante ascarirose experimental murina. D.P. = Desvio padrão. EOS = Eosinófilo. LINF = Linfócito. MAC = Macrófago. Neut = Neutrófilo. M-17 = Meio de cultura bacteriana. NCDO = Probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO). N.I. = Grupo controle não infectado. P.I. = Grupo primoinfectado.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A infecção experimental murina com *A. suum* realizada neste estudo se mostrou bem padronizada já que o padrão migratório das larvas encontrado foi condizente com o descrito na literatura com relação ao tempo de infecção, órgãos afetados pela migração larval e variação da intensidade de infecção ao longo do tempo^{52, 53, 148, 209}. Além disso, a comparação da carga parasitária nas linhagens C57BL/6j e BALB/c também corroborou dados já publicados nos quais a diferença entre as cargas não foi constante ao longo do tempo, sendo observada apenas nos picos de migração hepatopulmonar⁵³.

Os resultados da avaliação imunoparasitológica da mucosa intestinal foram sugestivos de uma possível rede de resposta imune inata e adaptativa funcionando como barreira contra a migração hepatopulmonar e culminando com menor patologia associada ocorrendo na linhagem mais resistente. Contudo, pouco se sabe a respeito participação da imunidade intestinal contra esta infecção, muito menos sobre os mecanismos envolvidos neste processo.

Uma hipótese interessante é que a presença de SIgA inata no sítio de infecção seja um fator de proteção natural que reduz o número de larvas migrantes e, conseqüentemente, as patologias hepatopulmonar associadas ao desenvolvimento da ascaridiose. A menor recuperação de larvas no fígado da linhagem BALB/c, assim como os achados de maior concentrações de SIgA-total no INL-GRS, independente do tempo de infecção, aliados à existência de correlações negativas entre a concentração desta SIgA variáveis como a carga parasitária total e a contagem de células leucocitárias (linfócitos e eosinófilos), assim associações positivas com variáveis que medem a função pulmonar, reforçam esta hipótese.

À medida que aumenta o entendimento do processo de homeostase da mucosa intestinal mais evidente se torna a associação de uma intrincada rede de relações entre a composição da microbiota, o desenvolvimento da imunidade e os mecanismos de susceptibilidade/resistência a infecções helmínticas. A presença de helmintos na mucosa intestinal pode modificar tanto a composição quanto a abundância das espécies bacterianas que compõem a microbiota intestinal. E, do mesmo modo, variações na composição desta microbiota alteram a susceptibilidade do hospedeiro à infecções helmínticas. Em um estudo com o helminto *Heligmosomoides polygyrus*, a introdução de *Lactobacillus* sp., causou aumento da frequência de células Treg no GALT, sendo este efeito modulador mais pronunciado na linhagem mais resistente à infecção helmíntica do que na linhagem mais susceptível^{200-202, 210-213}.

Entretanto, a resposta imune de mucosa intestinal sozinha não explica totalmente a resistência às infecções helmínticas. Os mecanismos de resistência se associam a múltiplos locais envolvidos na rota migratória, começando com a barreira pré-hepática, passando pela

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

imobilização de larvas no tecido hepático e culminando com a expulsão dos vermes¹⁰⁹. Os dados aqui obtidos também reforçam a importância do fígado nestes mecanismos de resistência. Conforme descrito na tabela 1, a taxa percentual de redução da carga parasitária foi semelhante antes (barreira pré-hepática) e após a migração pelo fígado (barreira hepática), sendo maior na linhagem mais resistente.

O fígado vem sendo reconhecido como uma importante barreira entre o trato gastrointestinal e outros órgãos²¹⁴⁻²¹⁶. Inclusive, um novo conceito de que o fígado representa um órgão linfóide vem tomando corpo com base em aspectos estruturais e funcionais deste órgão^{214, 215}. Em relação ao papel de SIgA no fígado como mecanismo de proteção do trato gastrointestinal, evidências vem sendo reunidas de que a bÍlis está envolvida na circulação de anticorpos. A bÍlis já foi relacionada como uma importante fonte de SIgA em ratos²¹⁷⁻²²¹.

De acordo com revisão do assunto, a quantidade e o mecanismo de transporte de SIgA para a bÍlis varia nas espécies, sendo que em camundongos grande quantidade desta imunoglobulina é transportada do plasma para a bÍlis pelo pIgR presente em hepatócitos. Já em humanos, suínos e outras espécies, este transporte ocorre por células biliares epiteliais. Neste caso, menos transporte hepático ocorre e a maior parte da SIgA lançada na bile é originada por plasmócitos na árvore biliar²²².

Os resultados deste presente estudo mostraram expressiva redução da carga após migração hepática, principalmente na linhagem resistente, corroborando dados da literatura. Contudo, não avaliamos parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos no fígado. Futuras investigações do papel de SIgA na bile durante ascaridiose pode ajudar a clarificar nosso entendimento do processo de resistência a esta parasitose.

A produção de SIgA-total e a presença de células leucocitárias no BAL dependente do tempo de infecção, assim como as correlações positivas entre a carga parasitária com variáveis imunológicas (SIgA-BAL, linfócitos e eosinófilos) são condizentes com a biologia do BAL, pois, em camundongos e humanos este tecido é induzido apenas na presença de infecções^{84, 86, 87}.

A observação de uma coincidente inversão das curvas cinéticas de SIgA-BAL e da carga parasitária total ao longo da infecção associada à identificação de uma taxa redução da carga parasitária de, aproximadamente, 90 % após o pico de migração pulmonar formam um corpo de evidências de que a resposta imune de mucosa pulmonar é outra etapa importante para a resistência contra a ascaridiose larval.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Corroborando esta hipótese, foram identificadas correlações negativas entre a contagem de linfócitos no BAL com carga parasitária total, além de correlações positivas entre SIgA-BAL com marcadores de função pulmonar (CDYN, FVC e FEV100). Assim, maiores níveis de SIgA no BAL reduzem as patologias associadas à migração pelo parênquima pulmonar. Inflamação aguda com liberação de vários mediadores e citocinas que resultam em infiltrado celular (principalmente de neutrófilos e eosinófilos) e fibrose subepitelial são processos imunopatológicos associados com migração larval na ascaridiose ^{52, 105, 148}.

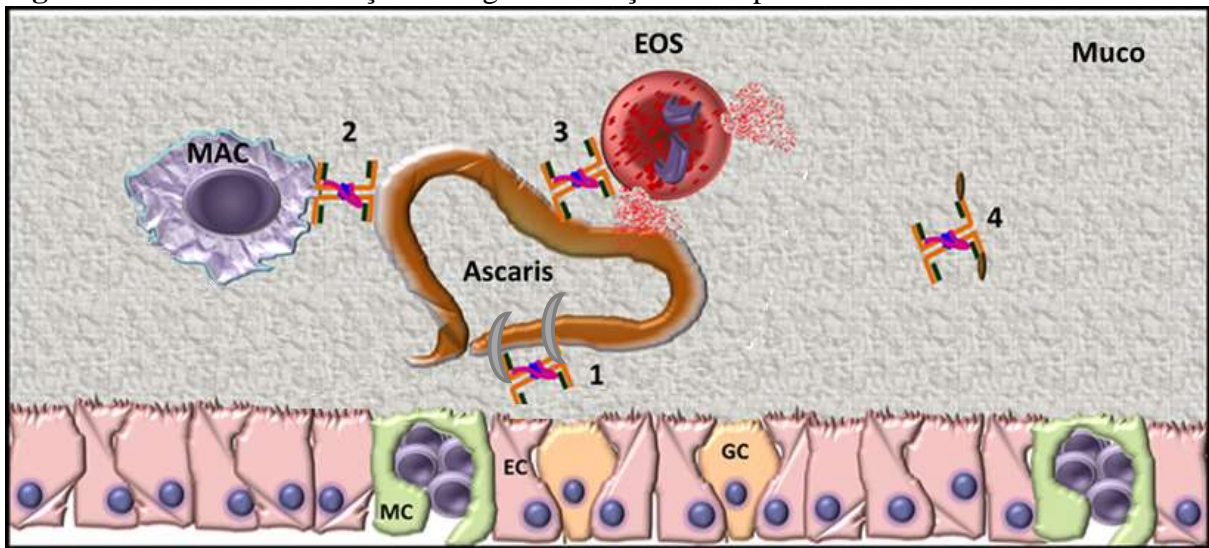
Variações na resistência elástica (causada, por exemplo, por processo de fibrose) se repercutem em alterações nas medidas de complacência (dinâmica e estática) ao comprometerem o processo de expansão e retração pulmonar. Além disso, excesso de secreções e obstruções das vias aéreas (edemas, processos inflamatórios) também podem alterar as medidas de resistência e complacência, pois, levam a aumento do pico de pressão ²²³. Assim, os achados de aumento de proteínas totais e hemoglobina no BAL, assim como de leucócitos, são condizentes com os resultados de comprometimento da capacidade pulmonar.

Juntos estes dados delineiam um papel protetor para a SIgA-BAL. À medida que as larvas migram para o parênquima pulmonar, ocorre a indução de iBALT e consequente resposta imune celular e humoral. O aumento da produção de SIgA-BAL contribui para a eliminação da infecção e, conseqüentemente, reduz o influxo de células leucocitárias e as patologias pulmonares associadas à inflamação. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar esta ação protetora e dissecar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência à infecção.

Uma gama de mecanismos de proteção associados à SIgA já foi descrita e, estes podem ser relacionadas à função protetora desta imunoglobulina contra helmintoses (Figura 36). Dentre eles, a potente desgranulação de eosinófilos, o aprisionamento de larvas de helmintos, a fagocitose mediada por ativação alternativa da cascata de complemento e a neutralização de proteínas secretadas/excretadas pelo parasito.

A ativação da desgranulação de eosinófilos é um mecanismo de ação possivelmente relacionado à proteção contra ascaridiose e outras helmintoses. A eosinofilia e o papel de eosinófilos na proteção contra helmintos está bem registrada na literatura ^{181, 224-226}, assim como a interação de SIgA e de eosinófilos na proteção contra helmintos ^{180, 227}.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 36 Mecanismos de ação da SIgA na indução de resposta imune contra helmintos.

Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação da SIgA na indução de resposta imune protetora contra helmintos, de acordo com o corpo de conhecimentos atuais.

1 Aprisionamento das larvas no muco. 2 Facilitação de fagocitose por ativação da via alternativa do complemento. 3 Indução potente de eosinófilos. 4 Neutralização de produtos excretados-secretados pelo parasito. EC = Célula epitelial. EOS = Eosinófilos. GC = Células caliciforme. MAC = Macrófagos. MC = Célula M (célula com micropregas, em inglês microfold cell).

Fonte: Créditos à autora.

A interação de SIgA com eosinófilos regula tanto a sobrevivência quanto a expressão gênica destas células. A simples ligação de SIgA pode primar eosinófilos, aumentando a sobrevivência e a produção de citocinas. Mas, a ligação de imunocomplexos de SIgA com antígenos pode ativar completamente a função efetora de desgranulação e gerar potente liberação de superóxidos¹⁷⁵. A SIgA já foi implicada como a principal imunoglobulina a mediar a desgranulação de eosinófilos, induzindo desgranulação duas ou três vezes mais potente que a ativação por IgG^{99, 176}. Evidências recentes de um estudo com suínos sugerem que anticorpos antígeno-específicos contra *A. suum* são requeridos para que eosinófilos eficientemente eliminem larvas deste parasito^{181, 224}.

Uma variação cinética semelhante da resposta de IgA e de eosinófilos foi demonstrada em ovelhas infectadas com *Teladorsagia circumcincta*. Além disso, mudanças em ambos fatores explicaram grande parte da variabilidade no comprimento e na sobrevivência dos vermes adultos do que qualquer outro fator isolado, sugerindo que IgA e eosinófilos interagem na resposta imune ao parasito¹⁸⁰.

Também já foi relatado que eosinófilos são importantes fontes dos mediadores APRIL e IL-6 na medula óssea, fatores cruciais para a sobrevivência de plasmócitos. E, que na ausência de eosinófilos, plasmócitos rapidamente morrem por apoptose¹⁷⁴. Ademais, em diferentes modelos de animais depletados de eosinófilos (Δ dbiGATA-1 ou PHIL) ocorreu

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

redução do número de plasmócitos IgA⁺ e também dos níveis de SIgA na lâmina própria intestinal. E, ainda, culturas de eosinófilos produziram fatores que promovem a mudança de classe para IgA por via T-independente¹⁷³.

Em um estudo *in vitro*, foi demonstrado que eosinófilos humanos também promovem a sobrevivência e a proliferação de linfócitos B tanto por via de ativação T-dependente (TD) quanto T-independente (TI) e por mecanismos independentes de contato, aumentam a secreção de imunoglobulinas por células B ativadas por CpG. Além disso, contagens sanguíneas de eosinófilos correlacionaram-se com contagens de células B¹⁷⁷.

Mais uma vez os resultados desta tese (a coincidência entre o pico de migração larval no pulmão com os picos de SIgA-total e de eosinófilos no BAL, a semelhança entre as curvas cinéticas dos níveis de SIgA e, a expressiva redução de SIgA em resposta à infecção nos animais Δ dblGATA) corroboram dados da literatura e reforçam a hipótese de SIgA pode apresentar uma ação sinérgica com os eosinófilos na indução de proteção contra a ascaridiose larval.

A exclusão e aprisionamento de larvas como importante evento inicial no processo de expulsão de helmintos já foram descritos como mecanismos de proteção contra *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Hp)²²⁸⁻²³⁰. Anticorpos antígeno-específicos contra *H. polygyrus* representaram um importante papel protetor ao limitar danos teciduais causados pelos parasitos. As larvas foram imobilizadas na presença dos anticorpos e este evento foi dependente da ativação alternativa de macrófagos, independente de IL-4R α ²²⁸.

A ancoragem de SIgA, via SC, com o muco também parece ser importante para a função efetora de imuno-exclusão desta molécula, sendo esta interação demonstrada pela necessidade de ancoragem da SIgA no muco para as funções de imuno exclusão e aprisionamento de patógenos¹¹⁸. Também já foi relatado que a implantação de vermes adultos de *Nippostrongylus brasiliensis*, sensibilizados por mecanismos imunes dependentes de células T, no duodeno de ratos Wistar induziu alterações em resíduos glicosídicos de mucinas via processos independentes de células T do hospedeiro. E, esta alteração foi altamente efetiva para causar a expulsão dos vermes danificados estabelecidos e também em prevenir o estabelecimento de vermes adultos não sensibilizados. Sendo que o efeito preventivo foi espécie específica²³¹.

O aumento da secreção de muco em animais BALB/c infectados, principalmente os expostos à reinfeção, estão de acordo com este mecanismo de ação da SIgA. Futuras investigações sobre a quantificação (morfometria do muco) e alterações na composição do

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

muco serão necessárias para auxiliar no entendimento da relação entre SIgA e muco na indução contra a ascaridiose.

Outro mecanismo de ação protetora da SIgA pode envolver a fagocitose via ativação alternativa do sistema complemento. A presença de Fc α R na superfície de fagócitos já foi demonstrada, embora, o número destes receptores tenha sido considerado baixo em relação aos receptores de outras imunoglobulinas²³². Entretanto, novas descobertas têm sugerido que pode ocorrer ligação bivalente de moléculas IgA ao Fc α R e, esta ligação estaria associada a mecanismos de regulação da fagocitose envolvendo interações citocinas e pH-dependentes²³³.

Esse modelo de regulação da fagocitose dependente de citocinas e de pH explicaria a função dual da IgA atuando como molécula antiinflamatória em situações de homeostase e como inflamatória na presença de sinais de perigo (o aumento da avidéz causada por ligações bivalentes levariam à aderência de células fagocitárias e ao ataque de patógenos opsonizados por moléculas de IgA).

Contudo, parece que mecanismos de defesa dos helmintos restringiram o efeito da ativação do sistema complemento. O componente C3 foi identificado no tegumento de oncosferas incubadas *in vitro* com soro de camundongos não imunizados, mas, não foi detectada a presença de uma protease necessária para a montagem do complexo de ataque à membrana. Além disso, larvas cultivadas a partir destas oncosferas não apresentaram lesões de membrana e, ainda, sobreviveram à incubação com soros de camundongos resistentes e susceptíveis à teníase²³⁴.

Apesar deste mecanismo de escape, a ativação do sistema complemento ainda parece ter importância na proteção, pelo menos do ponto de vista imunopatológico. Em um trabalho recente foi demonstrado que anticorpos polireativos se ligam à membrana e ao citoplasma de células apoptóticas, fixam o complemento e geram a anafilatoxina C5a, aumentando até cinco vezes a fagocitose mediada por macrófagos, via complemento²³⁵.

A contribuição relativa de macrófagos no BAL durante todo o período de infecção, assim como as correlações negativas entre a carga parasitária total e contagem macrófagos e de linfócitos no BAL corroboram com o mecanismo de proteção descrito. Deste modo, SIgA polireativa presente nas mucosas e tecidos da rota migratória das larvas de *Ascaris* sp. poderia contribuir para a remoção de células apoptóticas geradas pela inflamação.

Outro possível mecanismo de ação da SIgA poderia envolver a neutralização de moléculas importantes para desenvolvimento do parasito. Exemplos destas moléculas podem ser aquelas derivadas de produtos excretados/secretados (ES), encontradas na superfície ou em órgãos específicos do parasito. A demonstração deste mecanismo de ação já foi relatada

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

em experimentos de vacinação com proteínas recombinantes de Ancilostomídeos e de *Schistosoma mansoni*^{72, 236}.

Produtos ES são altamente antigênicos, sendo que grande parte destas moléculas foram caracterizadas como imunomoduladoras da resposta imune^{151, 237, 238}. Assim, entre as moléculas já identificadas com função moduladora encontram-se inibidores de proteases que bloqueiam a função de células inatas, moléculas antioxidantes e moléculas homólogas a citocinas, tal como um homólogo do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) que, em um ambiente Th2, sinergiza com IL-4 para induzir ativação alternativa de macrófagos²³⁷.

Estudos com *Toxocara canis* revelou que as larvas deste parasito liberam grande quantidade de produtos ES, sendo que uma das frações deste extrato contém mucinas o-glicosiladas^{239, 240}. Estas mucinas (TES-120) formam uma cobertura com função protetora contra ataques de anticorpos e de eosinófilos^{241, 242}. Recente estudo com *Toxocara* sp. também apresentou evidências de que antígenos presentes em mucinas TES possuem potentes propriedades imunoregulatórias²⁴³.

A neutralização de moléculas potencialmente imunomoduladoras por SIgA no sítio de infecção helmíntica poderia minimizar a ativação desta resposta imune. Desta forma, parece razoável hipotetizar que, ao mesmo tempo em que SIgA poderia prejudicar a atividade de enzimas envolvidas na biologia do parasito, esta ação neutralizante poderia também impactar os mecanismos de escape do parasito, reduzindo o número de indivíduos que poderiam completar com sucesso a migração larval.

Finalmente, a maior susceptibilidade à infecção por *A. suum* apresentada por animais depletados de TLR2 e TLR4 associada à redução da produção de anticorpos SIgA-total nas mucosas intestinal e pulmonar também reforça a hipótese de um papel protetor desta imunoglobulina. E, ainda, evidencia que a proteção via SIgA é dependente da ativação destes receptores.

Um estudo recente foi publicado sobre a avaliação proteômica da resistência hepática à ascaridiose em modelo murino usando as linhagens C57BL/6j e CBA/ca. Os resultados evidenciaram um perfil de ativação de genes relacionados à resposta imune inata e à precoce resposta adaptativa em ambas as linhagens infectadas quando comparado aos controles. Alguns dos genes ativados codificam para moléculas com ação quimiotática para leucócitos, tais como, os peptídeos S100A8 e S100A9 que, na presença de cálcio, formam a proteína heterodimérica calprotectina¹⁵⁸. Esta proteína pode atuar como um sinalizador de padrão molecular associado ao perigo (DAMP) ao interagir com TLR4²⁴⁴.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Um possível mecanismo ligando a ativação de TLR com a produção de SIgA já foi descrito, no qual a ativação de TLR associada ao sistema do complemento está envolvida na indução de anticorpos timo-independente (TI) ²⁴⁵. Neste caso, subpopulações de células MZ e B1 são ativadas sem auxílio de células T e independente de apresentação no timo, produzindo anticorpos de menor afinidade, mas, de maior espectro de especificidade (anticorpos polireativos) ²⁴⁶⁻²⁴⁸.

A ativação de TLR4, assim como a presença de danos teciduais, induz um aumento (40x) de anticorpos polireativos ^{249, 250}. Além disso, a presença de sinalização via DAMP é um dos sinais que induzem o processo de hipermutação somática, culminando com o aumento da afinidade antigênica de anticorpos polireativos. Este processo parece ser devido à ação ambivalente desta imunoglobulina, pois, permite a SIgA discriminar e atuar contra patógenos potencialmente danosos ao mesmo tempo em que atua como molécula antinflamatória no processo de homeostase das mucosas ²⁵¹.

Neste sentido, os dados de que uma dieta contendo lactococcus probióticos aumentou a produção de SIgA total e específica contra o parasito, assim como o número absoluto das subpopulações celulares no BAL, validam ideia de que a produção desta imunoglobulina seja produzida via ativação dos TLR. E, provavelmente, o *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO2118) funciona como um adjuvante na indução de uma resposta imune de mucosa contra a ascaridiose, potencializando a ativação de TLR. Corroborando esta hipótese, estudos relatando o uso de *L. lactis* como adjuvante em vacinas vem sendo publicados ²⁰⁶⁻²⁰⁸.

A importância de SIgA polireativa na resposta imune induzida em estágios iniciais de infecções em geral vem sendo delineada ^{235, 251-256}. E, ainda, variações na predisposição genética em produzir SIgA polireativa foi demonstrada em diferentes linhagens de camundongos, sendo que a linhagem BALB/c possui número aumentado de linfócitos B1a, além de maior abundância e diversidade de SIgA polireativa quando comparado com C57BL/6j ²⁵⁷.

Helmintos apresentam ampla variedade de glicoproteínas e glicolipídeos que se ligam a TLR e podem ativar ou modular a resposta imune mediada por tais receptores. Dentre as ações moduladoras já foi descrita a modulação de DCs e de células B por ativação de TLR2 ²⁵⁸. Neste sentido, já foi constatado que uma fração de alto peso molecular de extrato de *A. suum* (PI) apresentou efeito modulador sobre a produção de anticorpos, mas, este efeito foi independente de TLR2 e TLR4 ¹⁰³.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de variáveis parasitológicas demonstraram que a diferença de intensidade de infecção entre as linhagens BALB/c e C57BL/6j não são constantes ao longo do tempo, sendo percebidas apenas nos picos de migração hepatopulmonar. Assim, para efeito de comparações entre as linhagens e correlações com análises imunopatológicas de mucosa, o ideal é que as avaliações sejam realizadas entre o 2º e 4º d.p.i. no fígado e entre o 6º e 8º d.p.i. no pulmão, tempos nos quais há acúmulo de larvas suficientes para se identificar as diferenças entre as linhagens.

Em termos imunológicos, a produção de SIgA no intestino delgado não mostrou grandes variações nem ao longo do tempo nem entre as linhagens. Contudo, a mucosa do intestino grosso apresentou diferenças entre as linhagens, com a linhagem mais resistente produzindo mais SIgA que a linhagem C57BL/6j, sem grandes variações ao longo do tempo. Além disso, as correlações negativas entre esta variável com carga parasitária e números absolutos de linfócitos e macrófagos no BAL, assim como interações positivas com as variáveis de capacidade funcional pulmonar são fortes indícios de um papel protetor desta imunoglobulina contra a ascaridiose larval.

Juntos estes resultados delineiam um cenário no qual a maior concentração de SIgA natural na mucosa intestinal reduz o número de larvas que conseguem iniciar a migração hepatopulmonar e, assim, culminam com menor recrutamento de células leucocitárias para estes órgãos. Em consequência, menores patologias associadas à migração larval são induzidas nos tecidos hepatopulmonar (aqui somente avaliado o impacto no pulmão). Deste modo, maiores níveis de SIgA na mucosa intestinal reduz a morbidade da ascaridiose larval.

A produção de SIgA na mucosa pulmonar foi induzida pela infecção, sendo que as duas linhagens apresentaram um perfil semelhante de produção desta imunoglobulina ao longo do tempo. Correlações positivas entre a carga parasitária com imunoglobulina e com a contagem de linfócitos no BAL refletem este cenário e é condizente com a biologia do BALT que, em camungondos somente é estimulado na presença de infecções. Contudo, a coincidente inversão das curvas cinéticas de produção de SIgA e carga parasitária, associadas à alta taxa percentual de redução da carga parasitária após migração pulmonar (~ 95 %) também evidenciam um papel protetor desta imunoglobulina de mucosa pulmonar.

Juntos os dados obtidos na parte de avaliação cinética dos parâmetros imunoparasitológicos e fisiopatológicos demonstram que a resistência à infecção murina por *Ascaris* sp. é mediada pela interação sinérgica entre SIgA produzidas nas mucosas intestinal e pulmonar (Figura 37).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A semelhança entre as curvas cinéticas de SIgA e de eosinófilos no BAL sugere uma interação entre estes dois componentes da resposta imune de mucosa. Corroborando esta hipótese, nos experimentos de reinfecção, a ausência de eosinófilos aboliu a resistência induzida por infecções prévias observada no grupo selvagem (BALB/c), pois, a carga parasitária do grupo GATA reinfectado foi maior que a carga obtida no grupo primoinfectado. Além disso, ocorreu redução da produção de SIgA antígeno-específica no lavado intestinal e de SIgA total e antígeno-espetífico no lavado broncoalveolar. Assim, estes achados sugerem que a produção de SIgA induzida pela infecção é dependente de eosinófilos. Contudo, a produção de SIgA-total na mucosa intestinal é independente da presença destas células, pois, ocorreu um aumento desta imunoglobulina nos animais eosinófilos depletados (Figura 38).

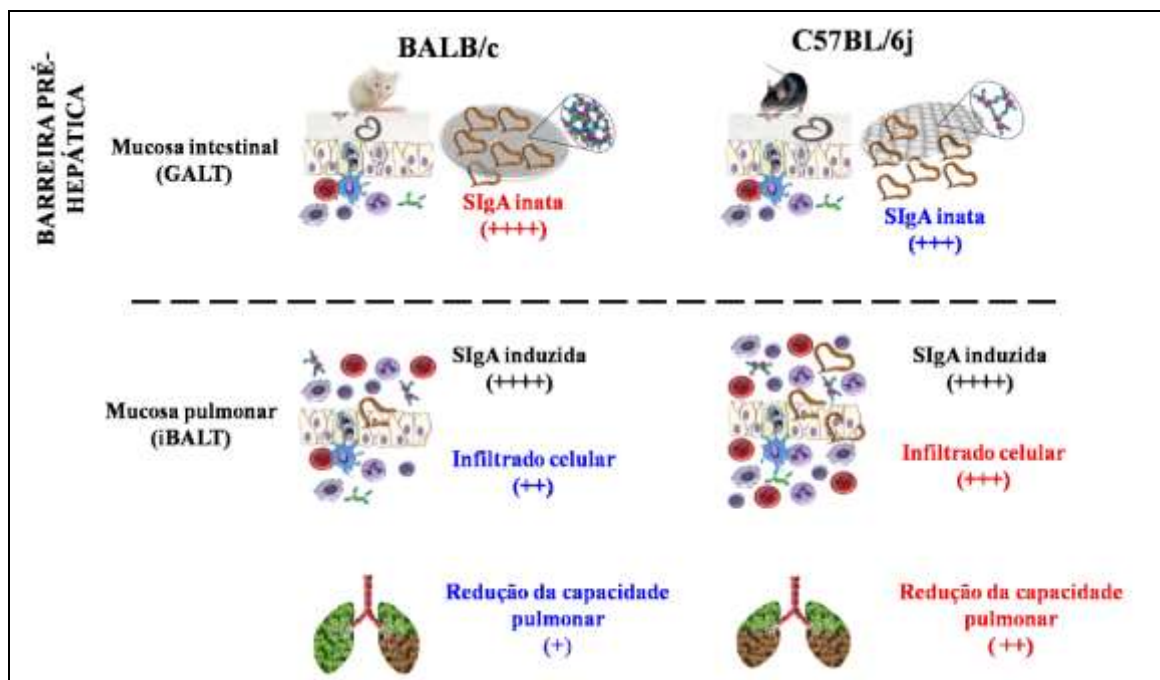
A proteção de SIgA de mucosa contra a ascariíose murina parece ser dependente de ativação de TLR2 e TLR4, já que animais depletados deste receptor apresentaram menores níveis de SIgA tanto na mucosa intestinal quanto pulmonar e, concomitantemente uma maior intensidade de infecção comparados aos animais da linhagem selvagem (Figura 39). Em relação às contagens de células leucocitárias no BAL, a ausência de TLR2 resultou em redução de todas as subpopulações avaliadas. Além disso, o comprometimento da função pulmonar foi maior nesta linhagem, sugerindo que TLR2 possui um papel importante na proteção contra a infecção.

Com relação aos resultados obtidos na ausência de TLR4, foi observado redução apenas das subpopulações de linfócitos e eosinófilos. Inesperadamente, porém, foi verificado um aumento do número de neutrófilos, quando comparado com a linhagem selvagem C57BL/6j. Dados da literatura indicam que este receptor é importante para a migração destas células²⁵⁹. Contudo, também já foi demonstrado que em certas infecções, a ausência deste receptor não impediu a migração destas células e que óxido nítrico está envolvido neste processo^{260, 261}.

Finalmente, os resultados de aumento da produção de SIgA-total na mucosa pulmonar, assim como do nível de resistência à infecção induzidos pela ingestão de uma dieta com o probiótico *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO2118) reforçam a hipótese de um papel protetor desta imunoglobulina (Figura 40).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

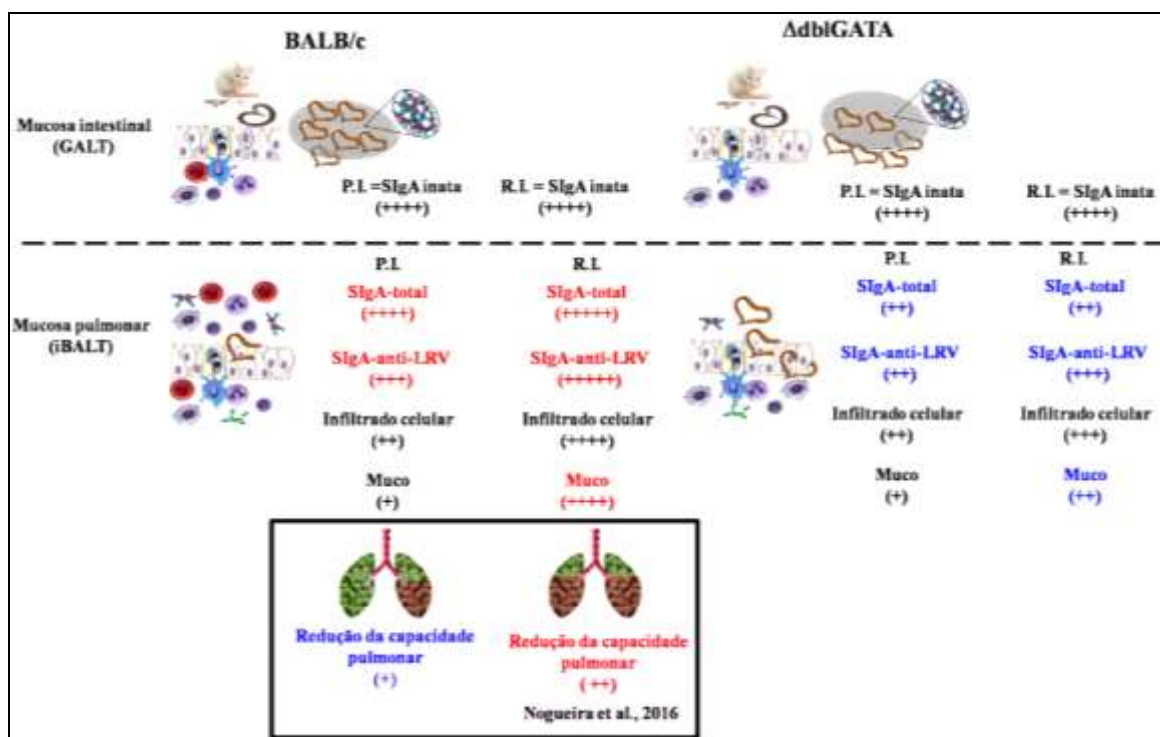
Figura 37 Resumo dos resultados da avaliação cinética dos parâmetros imunoparasitológicos nas linhagens BALB/c e C57BL/6j.



Esquema representativo dos eventos imunoparasitológicos e fisiopatológicos de mucosa induzidos pela ascariose em linhagens de camundongos mais resistentes (BALB/c) e mais susceptível (C57BL/6j).

Fonte: Créditos à autora.

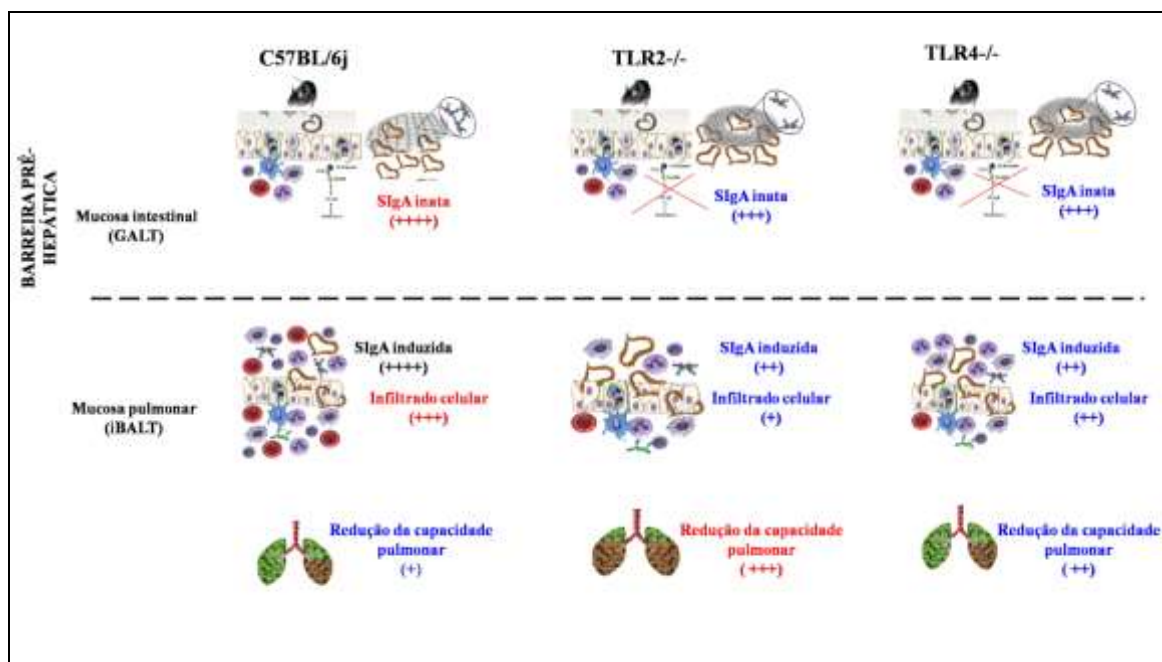
Figura 38 Resumo dos resultados da avaliação do papel de eosinófilos na resposta imune de mucosa contra ascariose.



Esquema representativo dos eventos imunoparasitológicos e fisiopatológicos de mucosa induzidos pela ascariose em linhagens de camundongos das linhagens BALB/c e ΔdblGATA.

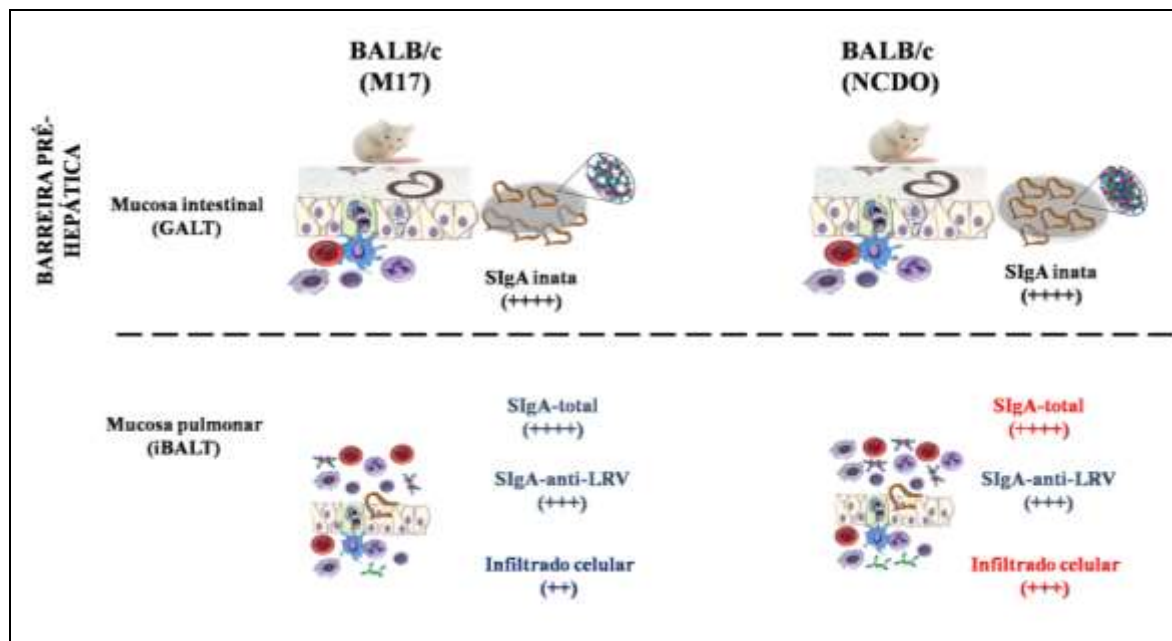
Fonte: Créditos à autora.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 39 Resumo do papel de TLRs na resposta imune de mucosa contra ascariíose.

Esquema representativo dos eventos imunoparasitológicos e fisiopatológicos de mucosa induzidos pela ascariíose em linhagens de camundongos das linhagens C57BL/6j, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}.

Fonte: Créditos à autora.

Figura 40 Resumo dos resultados da ingestão de probiótico na resposta imune de mucosa contra ascariíose.

Esquema representativo dos eventos imunoparasitológicos de mucosa induzidos pela ascariíose na linhagem de camundongos BALB/c que ingeriram o probiótico (NCDO) comparados aos animais que ingeriram placebo (M-17).

Fonte: Créditos à autora.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Foi possível identificar uma associação positiva entre níveis de anticorpos SIgA-total de lavado intestinal com proteção contra a infecção murina por *Ascaris* sp. sugestiva de existência de uma proteção natural (barreira pré-hepática) contra ascaridiose na mucosa intestinal.

A produção de SIgA contra a ascaridiose é dependente da ativação de TLR2, TLR4 e de eosinófilos. A ausência de TLR2 parece ser importante para o recrutamento de eosinófilos e linfócitos, sendo que a ausência deste receptor também causou maior impacto no desenvolvimento de morbidade.

A imunidade de mucosa pulmonar parece ser formada por uma resposta imune local (indução de iBALT) e também pela migração de células leucocitárias ativadas da mucosa intestinal, pois, a ingestão de probiótico aumentou os níveis de SIgA e de leucócitos no lavado broncoalveolar.

Assim, os dados descritos nesta tese permitem concluir que SIgA das mucosas intestinal e pulmonar devem agir de forma sinérgica para reduzir a infecção e minimizar os eventos patológicos advindos da migração larval. A eficiente produção desta imunoglobulina parece ser dependente da ativação de eosinófilos e envolve sinalização via TLR2 e TLR4.

PERPECTIVAS

Têm-se como perspectivas deste projeto responder aos seguintes questionamentos:

- ✓ Anticorpos SIgA das mucosas intestinal e pulmonar identificados na primoinfecção e na reinfecção por *Ascaris* sp. são polireativos? E, qual a contribuição relativa destes para o total de SIgA (total e específica)?
- ✓ Anticorpos SIgA reconhecem antígenos de superfície, de produtos ES ou antígenos de órgãos específicos do parasito?
- ✓ Larvas que não se coram pelo Rosa de Bengala possuem SIgA e, ou diferentes mucinas ligadas à sua superfície comparadas às que se coram intensamente ou parcialmente? E os produtos ES teriam diferentes perfis de composição de mucinas para estas larvas?
- ✓ Transferência passiva de SIgA purificados de lavados de mucosa obtidos após primoinfecção ou reinfecção com *Ascaris* sp. protege animais de infecções desafios?
- ✓ A deleção de SIgA aumenta a susceptibilidade dos animais à primoinfecção ou à reinfecção por *Ascaris* sp? E, seria esta proteção espécie específica?
- ✓ Se o modelo de estudo fosse infecção murina por *Tricuris muris* (hospedeiro completamente susceptível e parasito com ciclo de vida que não envolve migração hepatopulmonar), os resultados sugestivos de papel protetor da SIgA obtidos nesta tese poderiam ser reproduzidos?

REFERÊNCIAS

1. Lustigman, S.; Prichard, R. K.; Gazzinelli, A.; Grant, W. N.; Boatman, B. A.; McCarthy, J. S.; Basáñez, M. G., A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, *6* (4), e1582.
2. WHO, W. H. O., WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 200-2011. Geneva, 2013.
3. Pullan, R. L.; Smith, J. L.; Jasrasaria, R.; Brooker, S. J., Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* **2014**, *7*, 37.
4. King, C. H., Health metrics for helminth infections. *Acta Trop* **2015**, *141* (Pt B), 150-60.
5. Hotez, P. J.; Alvarado, M.; Basáñez, M. G.; Bolliger, I.; Bourne, R.; Boussinesq, M.; Brooker, S. J.; Brown, A. S.; Buckle, G.; Budke, C. M.; Carabin, H.; Coffeng, L. E.; Fèvre, E. M.; Fürst, T.; Halasa, Y. A.; Jasrasaria, R.; Johns, N. E.; Keiser, J.; King, C. H.; Lozano, R.; Murdoch, M. E.; O'Hanlon, S.; Pion, S. D.; Pullan, R. L.; Ramaiah, K. D.; Roberts, T.; Shepard, D. S.; Smith, J. L.; Stolk, W. A.; Undurraga, E. A.; Utzinger, J.; Wang, M.; Murray, C. J.; Naghavi, M., The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (7), e2865.
6. Martins-Melo, F. R.; Ramos, A. N.; Alencar, C. H.; Lima, M. S.; Heukelbach, J., Epidemiology of soil-transmitted helminthiases-related mortality in Brazil. *Parasitology* **2017**, 1-11.
7. Khuroo, M. S., Ascariasis. *Gastroenterol Clin North Am* **1996**, *25* (3), 553-77.
8. Yoshida, S., On the **resistance** of *Ascaris* eggs. *The Journal of Parasitology* **1920**, *6* (3), 9.
9. WHO, W. H. O., Prevention and control of parasitic infections. Geneva, 1987; Vol. 749.
10. de Silva, N. R.; Chan, M. S.; Bundy, D. A., Morbidity and mortality due to ascariasis: re-estimation and sensitivity analysis of global numbers at risk. *Trop Med Int Health* **1997**, *2* (6), 519-28.
11. Umetsu, S.; Sogo, T.; Iwasawa, K.; Kondo, T.; Tsunoda, T.; Oikawa-Kawamoto, M.; Komatsu, H.; Inui, A.; Fujisawa, T., Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (38), 14058-62.
12. Miller, L. A.; Colby, K.; Manning, S. E.; Hoenig, D.; McEvoy, E.; Montgomery, S.; Mathison, B.; de Almeida, M.; Bishop, H.; Dasilva, A.; Sears, S., Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010-2013. *Emerg Infect Dis* **2015**, *21* (2), 332-4.
13. Hotez, P. J., The giant anteater in the room: Brazil's neglected tropical diseases problem. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**, *2* (1), e177.
14. Brooker, S.; Kabatereine, N. B.; Tukahebwa, E. M.; Kazibwe, F., Spatial analysis of the distribution of intestinal nematode infections in Uganda. *Epidemiol Infect* **2004**, *132* (6), 1065-71.
15. Chammartin, F.; Scholte, R. G.; Guimarães, L. H.; Tanner, M.; Utzinger, J.; Vounatsou, P., Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **2013**, *13* (6), 507-18.

REFERÊNCIAS

16. Chammartin, F.; Guimarães, L. H.; Scholte, R. G.; Bavia, M. E.; Utzinger, J.; Vounatsou, P., Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. *Parasit Vectors* **2014**, *7*, 440.
17. Pullan, R. L.; Brooker, S. J., The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* **2012**, *5*, 81.
18. Barreto, M. L.; Genser, B.; Strina, A.; Teixeira, M. G.; Assis, A. M.; Rego, R. F.; Teles, C. A.; Prado, M. S.; Matos, S.; Alcântara-Neves, N. M.; Cairncross, S., Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. *Environ Health Perspect* **2010**, *118* (11), 1637-42.
19. Martin, J.; Keymer, A.; Isherwood, R. J.; Wainwright, S. M., The prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in Moslem children from northern Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1983**, *77* (5), 702-6.
20. Brooker, S.; Alexander, N.; Geiger, S.; Moyeed, R. A.; Stander, J.; Fleming, F.; Hotez, P. J.; Correa-Oliveira, R.; Bethony, J., Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *Int J Parasitol* **2006**, *36* (10-11), 1143-51.
21. Ellis, M. K.; Raso, G.; Li, Y. S.; Rong, Z.; Chen, H. G.; McManus, D. P., Familial aggregation of human susceptibility to co- and multiple helminth infections in a population from the Poyang Lake region, China. *Int J Parasitol* **2007**, *37* (10), 1153-61.
22. Shapiro, A. E.; Tukahebwa, E. M.; Kasten, J.; Clarke, S. E.; Magnussen, P.; Olsen, A.; Kabatereine, N. B.; Ndyomugenyi, R.; Brooker, S., Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2005**, *99* (1), 18-24.
23. Walker, M.; Hall, A.; Basáñez, M. G., Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**, *5* (4), e1047.
24. de Silva, N. R.; Brooker, S.; Hotez, P. J.; Montresor, A.; Engels, D.; Savioli, L., Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* **2003**, *19* (12), 547-51.
25. TAKATA, I., Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. *Kitasato Arch Exp Med* **1951**, *23* (4), 151-9; English transl, 49-59.
26. Galvin, T. J., Development of human and pig ascaris in the pig and rabbit. *J Parasitol* **1968**, *54* (6), 1085-91.
27. Anderson, T. J.; Romero-Abal, M. E.; Jaenike, J., Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology* **1993**, *107* (Pt 3), 319-34.
28. Anderson, T. J.; Jaenike, J., Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology* **1997**, *115* (Pt 3), 325-42.
29. Barbosa, F. S. Potencial Zoonótico da Ascariíose Humana e Suína: Aspectos Moleculares, Morfológicos, Genéticos e Filogenéticos das Espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

REFERÊNCIAS

30. Betson, M.; Nejsum, P.; Bendall, R. P.; Deb, R. M.; Stothard, J. R., Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of ascaris in people and pigs. *J Infect Dis* **2014**, *210* (6), 932-41.
31. Nejsum, P.; Betson, M.; Bendall, R. P.; Thamsborg, S. M.; Stothard, J. R., Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *J Helminthol* **2012**, *86* (2), 148-55.
32. (CDC), C. f. D. C. a. P., Notes from the field: ascariasis associated with pig farming - Maine, 2010-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2013**, *62* (20), 413.
33. Anderson, T. J., The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol* **2001**, *17* (4), 183-8.
34. Leles, D.; Gardner, S. L.; Reinhard, K.; Iñiguez, A.; Araujo, A., Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasit Vectors* **2012**, *5*, 42.
35. Liu, G. H.; Wu, C. Y.; Song, H. Q.; Wei, S. J.; Xu, M. J.; Lin, R. Q.; Zhao, G. H.; Huang, S. Y.; Zhu, X. Q., Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* **2012**, *492* (1), 110-6.
36. SPRENT, J. F., On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I. Distribution of larvae in tissues. *J Infect Dis* **1952**, *90* (2), 165-76.
37. Maung, M., *Ascaris lumbricoides* Linné, 1758 and *Ascaris suum* Goeze, 1782: morphological differences between specimens obtained from man and pig. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1973**, *4* (1), 41-5.
38. Schneider, R.; Auer, H., Incidence of *Ascaris suum*-specific antibodies in Austrian patients with suspected larva migrans visceralis (VLM) syndrome. *Parasitol Res* **2016**, *115* (3), 1213-9.
39. Schneider, R.; Obwaller, A.; Auer, H., Immunoblot for the detection of *Ascaris suum*-specific antibodies in patients with visceral larva migrans (VLM) syndrome. *Parasitol Res* **2015**, *114* (1), 305-10.
40. Pinelli, E.; Herremans, T.; Harms, M. G.; Hoek, D.; Kortbeek, L. M., *Toxocara* and *Ascaris* seropositivity among patients suspected of visceral and ocular larva migrans in the Netherlands: trends from 1998 to 2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2011**, *30* (7), 873-9.
41. Izumikawa, K.; Kohno, Y.; Hara, K.; Hayashi, H.; Maruyama, H.; Kohno, S., Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn J Infect Dis* **2011**, *64* (5), 428-32.
42. Inatomi, Y.; Murakami, T.; Tokunaga, M.; Ishiwata, K.; Nawa, Y.; Uchino, M., Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci* **1999**, *164* (2), 195-9.
43. Umehara, F.; Ookatsu, H.; Hayashi, D.; Uchida, A.; Douchi, Y.; Kawabata, H.; Goto, R.; Hashiguchi, A.; Matsuura, E.; Okubo, R.; Higuchi, I.; Arimura, K.; Nawa, Y.; Osame, M., MRI studies of spinal visceral larva migrans syndrome. *J Neurol Sci* **2006**, *249* (1), 7-12.
44. Osoegawa, M., [Diagnosis and treatment of CNS parasite infection with special reference to parasitic myelitis]. *Rinsho Shinkeigaku* **2004**, *44* (11), 961-4.
45. Okada, F.; Ono, A.; Ando, Y.; Yotsumoto, S.; Tanoue, S.; Matsumoto, S.; Wakisaka, M.; Mori, H., Pulmonary computed tomography findings of visceral larva migrans caused by *Ascaris suum*. *J Comput Assist Tomogr* **2007**, *31* (3), 402-8.

REFERÊNCIAS

46. Nunes, C. M.; Tundisi, R. N.; Garcia, J. F.; Heinemann, M. B.; Ogassawara, S.; Richtzenhain, L. J., Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1997**, *39* (5), 253-6.
47. Fan, C. K.; Su, K. E., Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Int* **2004**, *53* (3), 263-71.
48. Petithory, J. C., Can *Ascaris suum* cause visceral larva migrans? *Lancet* **1996**, *348* (9028), 689.
49. Rim, H. J., Distribution of the larvae of *Toxocara canis* and *Ascaris lumbricoides* in the tissues of mice. *The Korean Journal of Parasitology* **1963**, *1* (1), 9.
50. Douvres, F. W.; Tromba, F. G.; Malakatis, G. M., Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine. *J Parasitol* **1969**, *55* (4), 689-712.
51. Slotved, H. C.; Eriksen, L.; Murrell, K. D.; Nansen, P., Early *Ascaris suum* migration in mice as a model for pigs. *J Parasitol* **1998**, *84* (1), 16-8.
52. Gazzinelli-Guimarães, P. H.; Gazzinelli-Guimarães, A. C.; Silva, F. N.; Mati, V. L.; Dhom-Lemos, L. e. C.; Barbosa, F. S.; Passos, L. S.; Gaze, S.; Carneiro, C. M.; Bartholomeu, D. C.; Bueno, L. L.; Fujiwara, R. T., Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int J Parasitol* **2013**, *43* (9), 697-706.
53. Lewis, R.; Behnke, J. M.; Cassidy, J. P.; Stafford, P.; Murray, N.; Holland, C. V., The migration of *Ascaris suum* larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/Ca mice. *Parasitology* **2007**, *134* (Pt 9), 1301-14.
54. Brooker, S., Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers--a review. *Int J Parasitol* **2010**, *40* (10), 1137-44.
55. Akuthota, P.; Weller, P. F., Eosinophilic pneumonias. *Clin Microbiol Rev* **2012**, *25* (4), 649-60.
56. Dey, R. K.; Dey, R.; Saha, R., Right-sided scrotal ascariasis. *Trop Parasitol* **2012**, *2* (1), 80-1.
57. GREEN, N. M., Protease inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. *Biochem J* **1957**, *66* (3), 416-9.
58. Azhar, M.; Sheikh, A. S.; Khan, A.; Mustafa, S.; Shah, I. A.; Hameed, B., HEPATOBILIARY ASCARIASIS COMPLICATED BY PANCREATITIS. *J Ayub Med Coll Abbottabad* **2015**, *27* (2), 479-81.
59. Chauhan, V.; Thakur, S.; Rana, B., Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. *Indian J Med Microbiol* **2015**, *33* (3), 427-9.
60. de Silva, N. R.; Guyatt, H. L.; Bundy, D. A., Morbidity and mortality due to *Ascaris*-induced intestinal obstruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1997**, *91* (1), 31-6.
61. Galzerano, A.; Sabatini, E.; Durì, D., *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. *East Mediterr Health J* **2010**, *16* (3), 350-1.
62. Khuroo, M. S.; Rather, A. A.; Khuroo, N. S., Hepatobiliary and pancreatic ascariasis. *World J Gastroenterol* **2016**, *22* (33), 7507-17.

REFERÊNCIAS

63. Khuroo, M. S., Hepatobiliary and pancreatic ascariasis. *Indian J Gastroenterol* **2001**, *20 Suppl 1*, C28-32.
64. Louw, J. H., Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. *Br J Surg* **1966**, *53* (6), 510-21.
65. Mwenda, A. S.; Ilkul, J. H., Images in clinical medicine. Obstructive ileal ascariasis. *N Engl J Med* **2013**, *368* (10), 943.
66. Wang, L.; Liu, W.; Yang, M.; Peng, D.; Chen, L., Development of a *Streptococcus gordonii* vaccine strain expressing *Schistosoma japonicum* Sj-F1 and evaluation of using this strain for intranasal immunization in mice. *Parasitol Res* **2013**, *112* (4), 1701-8.
67. Wang, J.; Pan, Y. L.; Xie, Y.; Wu, K. C.; Guo, X. G., Biliary ascariasis in a bile duct stones-removed female patient. *World J Gastroenterol* **2013**, *19* (36), 6122-4.
68. Khuroo, N. S.; Khuroo, M. S., Gastric ascariasis presenting as unique dyspeptic symptoms in an endemic area. *Am J Gastroenterol* **2010**, *105* (7), 1675-7.
69. Tarafder, M. R.; Carabin, H.; Joseph, L.; Balolong, E.; Olveda, R.; McGarvey, S. T., Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a 'gold standard'. *Int J Parasitol* **2010**, *40* (4), 399-404.
70. Ramsan, M.; Montresor, A.; Foun, A.; Ameri, H.; Di Matteo, L.; Albonico, M.; Savioli, L., Independent evaluation of the Nigrosin-Eosin modification of the Kato-Katz technique. *Trop Med Int Health* **1999**, *4* (1), 46-9.
71. Knopp, S.; Mgeni, A. F.; Khamis, I. S.; Steinmann, P.; Stothard, J. R.; Rollinson, D.; Marti, H.; Utzinger, J., Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**, *2* (11), e331.
72. Kennedy, M. W.; Qureshi, F.; Haswell-Elkins, M.; Elkins, D. B., Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Clin Exp Immunol* **1987**, *67* (1), 20-30.
73. González-Miguel, J.; Morchón, R.; Gussoni, S.; Bossetti, E.; Hormaeche, M.; Kramer, L. H.; Simón, F., Immunoproteomic approach for identification of *Ascaris suum* proteins recognized by pigs with porcine ascariasis. *Vet Parasitol* **2014**, *203* (3-4), 343-8.
74. Requena-Méndez, A.; Chiodini, P.; Bisoffi, Z.; Buonfrate, D.; Gotuzzo, E.; Muñoz, J., The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (1), e2002.
75. Romasanta, A.; Romero, J. L.; Arias, M.; Sánchez-Andrade, R.; López, C.; Suárez, J. L.; Díaz, P.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Paz-Silva, A., Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* **2003**, *32* (3), 131-42.
76. Keiser, J.; Utzinger, J., Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **2008**, *299* (16), 1937-48.
77. Lionel, N. D.; Mirando, E. H.; Nanayakkara, J. C.; Soysa, P. E., Levamisole in the treatment of ascariasis in children. *Br Med J* **1969**, *4* (5679), 340-1.

REFERÊNCIAS

78. Belizario, V. Y.; Amarillo, M. E.; de Leon, W. U.; de los Reyes, A. E.; Bugayong, M. G.; Macatangay, B. J., A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. *Bull World Health Organ* **2003**, *81* (1), 35-42.
79. WHO, W. H. O., Report of the WHO informal consultation on monitoring of drug efficacy in the control of schistosomiasis and intestinal nematodes. Geneva, 1998.
80. Cesta, M. F., Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* **2006**, *34* (5), 599-608.
81. Brandtzaeg, P.; Kiyono, H.; Pabst, R.; Russell, M. W., Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* **2008**, *1* (1), 31-7.
82. McGhee, J. R.; Fujihashi, K., Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol* **2012**, *10* (9), e1001397.
83. Eberl, G.; Lochner, M., The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol* **2009**, *2* (6), 478-85.
84. Zhu, M.; Fu, Y., Proinflammatory IL-17 induces iBALT development. *Cell Mol Immunol* **2012**, *9* (2), 101-2.
85. Wiley, J. A.; Richert, L. E.; Swain, S. D.; Harmsen, A.; Barnard, D. L.; Randall, T. D.; Jutila, M.; Douglas, T.; Broomell, C.; Young, M., Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. *PLoS One* **2009**, *4* (9), e7142.
86. Rangel-Moreno, J.; Carragher, D. M.; de la Luz Garcia-Hernandez, M.; Hwang, J. Y.; Kusser, K.; Hartson, L.; Kolls, J. K.; Khader, S. A.; Randall, T. D., The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol* **2011**, *12* (7), 639-46.
87. Hwang, J. Y.; Randall, T. D.; Silva-Sanchez, A., Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front Immunol* **2016**, *7*, 258.
88. Okahashi, N.; Yamamoto, M.; Vancott, J. L.; Chatfield, S. N.; Roberts, M.; Bluethmann, H.; Hiroi, T.; Kiyono, H.; McGhee, J. R., Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4⁺ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun* **1996**, *64* (5), 1516-25.
89. Artis, D.; Grencis, R. K., The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Mucosal Immunol* **2008**, *1* (4), 252-64.
90. Cerutti, A.; Puga, I.; Cols, M., Innate control of B cell responses. *Trends Immunol* **2011**, *32* (5), 202-11.
91. Pabst, O., New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12* (12), 821-32.
92. Magri, G.; Cerutti, A., Role of group 3 innate lymphoid cells in antibody production. *Curr Opin Immunol* **2015**, *33*, 36-42.
93. Jaffar, Z.; Ferrini, M. E.; Herritt, L. A.; Roberts, K., Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J Immunol* **2009**, *182* (8), 4507-11.

REFERÊNCIAS

94. Neurath, M. F.; Finotto, S.; Glimcher, L. H., The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* **2002**, *8* (6), 567-73.
95. Kaetzel, C. S., The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* **2005**, *206*, 83-99.
96. Kaetzel, C. S., Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Curr Biol* **2001**, *11* (1), R35-8.
97. Wines, B. D.; Hogarth, P. M., IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens* **2006**, *68* (2), 103-14.
98. Wines, B. D.; Trist, H. M.; Ramsland, P. A.; Hogarth, P. M., A common site of the Fc receptor gamma subunit interacts with the unrelated immunoreceptors FcalphaRI and FcepsilonRI. *J Biol Chem* **2006**, *281* (25), 17108-13.
99. Pleass, R. J.; Lang, M. L.; Kerr, M. A.; Woof, J. M., IgA is a more potent inducer of NADPH oxidase activation and degranulation in blood eosinophils than IgE. *Mol Immunol* **2007**, *44* (6), 1401-8.
100. Motegi, Y.; Kita, H., Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils. *J Immunol* **1998**, *161* (8), 4340-6.
101. Lamkhioed, B.; Gounni, A. S.; Gruart, V.; Pierce, A.; Capron, A.; Capron, M., Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur J Immunol* **1995**, *25* (1), 117-25.
102. Shibuya, A.; Sakamoto, N.; Shimizu, Y.; Shibuya, K.; Osawa, M.; Hiroyama, T.; Eyre, H. J.; Sutherland, G. R.; Endo, Y.; Fujita, T.; Miyabayashi, T.; Sakano, S.; Tsuji, T.; Nakayama, E.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Nakauchi, H., Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* **2000**, *1* (5), 441-6.
103. Favoretto, B. C.; Silva, S. R.; Jacysyn, J. F.; Câmara, N. O.; Faquim-Mauro, E. L., TLR2- and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*. *Mol Immunol* **2014**, *58* (1), 17-26.
104. McConchie, B. W.; Norris, H. H.; Bundoc, V. G.; Trivedi, S.; Boesen, A.; Urban, J. F.; Keane-Myers, A. M., *Ascaris suum*-derived products suppress mucosal allergic inflammation in an interleukin-10-independent manner via interference with dendritic cell function. *Infect Immun* **2006**, *74* (12), 6632-41.
105. Nogueira, D. S.; Gazzinelli-Guimarães, P. H.; Barbosa, F. S.; Resende, N. M.; Silva, C. C.; de Oliveira, L. M.; Amorim, C. C.; Oliveira, F. M.; Mattos, M. S.; Kraemer, L. R.; Caliari, M. V.; Gaze, S.; Bueno, L. L.; Russo, R. C.; Fujiwara, R. T., Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10* (1), e0004382.
106. Enobe, C. S.; Araújo, C. A.; Perini, A.; Martins, M. A.; Macedo, M. S.; Macedo-Soares, M. F., Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. *Parasite Immunol* **2006**, *28* (9), 453-61.
107. Frontera, E.; Roepstorff, A.; Serrano, F. J.; Gázquez, A.; Reina, D.; Navarrete, I., Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs. *Vet Parasitol* **2004**, *119* (1), 59-71.

REFERÊNCIAS

108. Tsuji, N.; Suzuki, K.; Kasuga-Aoki, H.; Matsumoto, Y.; Arakawa, T.; Ishiwata, K.; Isobe, T., Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun* **2001**, *69* (12), 7285-92.
109. Dold, C.; Holland, C. V., Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. *Microbes Infect* **2011**, *13* (7), 624-31.
110. Geiger, S. M.; Massara, C. L.; Bethony, J.; Soboslay, P. T.; Carvalho, O. S.; Corrêa-Oliveira, R., Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol* **2002**, *24* (11-12), 499-509.
111. Jackson, J. A.; Turner, J. D.; Rentoul, L.; Faulkner, H.; Behnke, J. M.; Hoyle, M.; Grecis, R. K.; Else, K. J.; Kamgno, J.; Boussinesq, M.; Bradley, J. E., T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. *J Infect Dis* **2004**, *190* (10), 1804-11.
112. Oshiro, T. M.; Enobe, C. S.; Araújo, C. A.; Macedo, M. S.; Macedo-Soares, M. F., PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunol Cell Biol* **2006**, *84* (2), 138-44.
113. Reina Ortiz, M.; Schreiber, F.; Benitez, S.; Broncano, N.; Chico, M. E.; Vaca, M.; Alexander, N.; Lewis, D. J.; Dougan, G.; Cooper, P. J., Effects of chronic ascariasis and trichuriasis on cytokine production and gene expression in human blood: a cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**, *5* (6), e1157.
114. Hagel, I.; Lynch, N. R.; Di Prisco, M. C.; Rojas, E.; Pérez, M.; Alvarez, N., *Ascaris* reinfection of slum children: relation with the IgE response. *Clin Exp Immunol* **1993**, *94* (1), 80-3.
115. McSharry, C.; Xia, Y.; Holland, C. V.; Kennedy, M. W., Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infect Immun* **1999**, *67* (2), 484-9.
116. Brandt, E. R.; Hayman, W. A.; Currie, B.; Carapetis, J.; Jackson, D. C.; Do, K. A.; Good, M. F., Functional analysis of IgA antibodies specific for a conserved epitope within the M protein of group A streptococci from Australian Aboriginal endemic communities. *Int Immunol* **1999**, *11* (4), 569-76.
117. Kilian, M.; Mestecky, J.; Russell, M. W., Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* **1988**, *52* (2), 296-303.
118. Phalipon, A.; Cardona, A.; Kraehenbuhl, J. P.; Edelman, L.; Sansonetti, P. J.; Corthésy, B., Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* **2002**, *17* (1), 107-15.
119. Corthésy, B., Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol* **2013**, *4*, 185.
120. Corthésy, B., Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2009**, *31* (2), 174-9.
121. Stear, M. J.; Bishop, S. C.; Doligalska, M.; Duncan, J. L.; Holmes, P. H.; Irvine, J.; McCririe, L.; McKellar, Q. A.; Sinski, E.; Murray, M., Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol* **1995**, *17* (12), 643-52.

REFERÊNCIAS

122. Amarante, A. F.; Bricarello, P. A.; Huntley, J. F.; Mazzolin, L. P.; Gomes, J. C., Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol* **2005**, *128* (1-2), 99-107.
123. Ahmed, A. M.; Sebastiano, S. R.; Sweeney, T.; Hanrahan, J. P.; Glynn, A.; Keane, O. M.; Mukhopadhyaya, A.; Thornton, K.; Good, B., Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Res* **2015**, *46*, 8.
124. DE Cisneros, J. P.; Matthews, L.; Mair, C.; Stefan, T.; Stear, M. J., The transfer of IgA from mucus to plasma and the implications for diagnosis and control of nematode infections. *Parasitology* **2014**, *141* (7), 875-9.
125. Ellis, S.; Matthews, J. B.; Shaw, D. J.; Paterson, S.; McWilliam, H. E.; Inglis, N. F.; Nisbet, A. J., Ovine IgA-reactive proteins from *Teladorsagia circumcincta* infective larvae. *Int J Parasitol* **2014**, *44* (10), 743-50.
126. Nisbet, A. J.; Smith, S. K.; Armstrong, S.; Meikle, L. I.; Wildblood, L. A.; Beynon, R. J.; Matthews, J. B., *Teladorsagia circumcincta*: activation-associated secreted proteins in excretory/secretory products of fourth stage larvae are targets of early IgA responses in infected sheep. *Exp Parasitol* **2010**, *125* (4), 329-37.
127. Bungiro, R. D.; Sun, T.; Harrison, L. M.; Shoemaker, C. B.; Cappello, M., Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. *Parasite Immunol* **2008**, *30* (5), 293-303.
128. Chai, J. Y.; Park, Y. J.; Park, J. H.; Jung, B. K.; Shin, E. H., Mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Pygidiopsis summa* (Trematoda: Heterophyidae). *Korean J Parasitol* **2014**, *52* (1), 27-33.
129. Gu, Y.; Zhan, B.; Yang, Y.; Yang, X.; Zhao, X.; Wang, L.; Yang, J.; Bi, K.; Wang, Y.; Zhu, X., Protective Effect of a Prime-Boost Strategy with the Ts87 Vaccine against *Trichinella spiralis* Infection in Mice. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 326860.
130. Ivanoff, N.; Phillips, N.; Schacht, A. M.; Heydari, C.; Capron, A.; Riveau, G., Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm 28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine* **1996**, *14* (12), 1123-31.
131. Inaba, T.; Sato, H.; Kamiya, H., Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *J Vet Med Sci* **2003**, *65* (11), 1227-31.
132. Miquel, N.; Roepstorff, A.; Bailey, M.; Eriksen, L., Host immune reactions and worm kinetics during the expulsion of *Ascaris suum* in pigs. *Parasite Immunol* **2005**, *27* (3), 79-88.
133. Bartosová, L.; Ditrich, O.; Benes, J.; Frolík, J.; Musil, J., Paleoparasitological findings in medieval and early modern archaeological deposits from Hradební Street, Chrudim, Czech Republic. *Interdisciplinaria Archaeologica Natural Sciences in Archaeology: 2011; Vol. 2*, pp 27-38.
134. Leles, D.; Araújo, A.; Ferreira, L. F.; Vicente, A. C.; Iñiguez, A. M., Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2008**, *103* (1), 106-8.

REFERÊNCIAS

135. Chammartin, F.; HOUNGBEDJI, C. A.; HÜRLIMANN, E.; YAPI, R. B.; SILUÉ, K. D.; SORO, G.; KOUAMÉ, F. N.; N GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; RASO, G.; VOUNATSOU, P., Bayesian risk mapping and model-based estimation of *Schistosoma haematobium*-*Schistosoma mansoni* co-distribution in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, 8 (12), e3407.
136. Boes, J.; Medley, G. F.; Eriksen, L.; Roepstorff, A.; Nansen, P., Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. *Parasitology* **1998**, 117 (Pt 6), 589-96.
137. Hall, A.; Anwar, K. S.; Tomkins, A. M., Intensity of reinfection with *Ascaris lumbricoides* and its implications for parasite control. *Lancet* **1992**, 339 (8804), 1253-7.
138. Hall, A.; Horton, S.; de Silva, N., The costs and cost-effectiveness of mass treatment for intestinal nematode worm infections using different treatment thresholds. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, 3 (3), e402.
139. Jia, T. W.; Melville, S.; Utzinger, J.; King, C. H.; Zhou, X. N., Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, 6 (5), e1621.
140. Pereira, F. E.; Sampaio, A. P.; Musso, C.; Castelo, J. S., *Ascaris lumbricoides*: reinfection in children bearing an established worm burden. *Rev Soc Bras Med Trop* **1991**, 24 (4), 217-21.
141. Yap, P.; Du, Z. W.; Wu, F. W.; Jiang, J. Y.; Chen, R.; Zhou, X. N.; Hattendorf, J.; Utzinger, J.; Steinmann, P., Rapid re-infection with soil-transmitted helminths after triple-dose albendazole treatment of school-aged children in Yunnan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg* **2013**, 89 (1), 23-31.
142. Casellas, J., Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal* **2011**, 5 (1), 1-7.
143. Crandall, R. B.; Crandall, C. A.; Jones, J. F., Analysis of immunosuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. *Clin Exp Immunol* **1978**, 33 (1), 30-7.
144. Crandall, C. A., *Ascaris suum*: homocytotropic antibody responses in mice. *Exp Parasitol* **1976**, 39 (1), 69-73.
145. Crandall, C. A.; Crandall, R. B., *Ascaris suum*: immunoglobulin responses in mice. *Exp Parasitol* **1971**, 30 (3), 426-37.
146. Tsuji, N.; Suzuki, K.; Kasuga-Aoki, H.; Isobe, T.; Arakawa, T.; Matsumoto, Y., Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Infect Immun* **2003**, 71 (9), 5314-23.
147. Islam, M. K.; Miyoshi, T.; Tsuji, N., Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* **2005**, 35 (9), 1023-30.
148. Lewis, R.; Behnke, J. M.; Stafford, P.; Holland, C. V., The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. *Parasitology* **2006**, 132 (Pt 2), 289-300.
149. Paterson, J. C.; Garside, P.; Kennedy, M. W.; Lawrence, C. E., Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. *Infect Immun* **2002**, 70 (11), 6058-67.

REFERÊNCIAS

150. Boes, J.; Eriksen, L.; Nansen, P., Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Vet Parasitol* **1998**, *75* (2-3), 181-90.
151. Teixeira-Carvalho, A.; Fujiwara, R. T.; Stemmy, E. J.; Olive, D.; Damsker, J. M.; Loukas, A.; Corrêa-Oliveira, R.; Constant, S. L.; Bethony, J. M., Binding of excreted and/or secreted products of adult hookworms to human NK cells in *Necator americanus*-infected individuals from Brazil. *Infect Immun* **2008**, *76* (12), 5810-6.
152. Zar, J. H., *Biostatistical analysis*. 4th ed.; Prentice Hall International: 1999; p 929.
153. Williams-Blangero, S.; VandeBerg, J. L.; Subedi, J.; Aivaliotis, M. J.; Rai, D. R.; Upadhyay, R. P.; Jha, B.; Blangero, J., Genes on chromosomes 1 and 13 have significant effects on *Ascaris* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (8), 5533-8.
154. Woodland, R. T.; Schmidt, M. R.; Thompson, C. B., B_LY_S and B cell homeostasis. *Semin Immunol* **2006**, *18* (5), 318-26.
155. Milford, T. A.; Su, R. J.; Francis, O. L.; Baez, I.; Martinez, S. R.; Coats, J. S.; Weldon, A. J.; Calderon, M. N.; Nwosu, M. C.; Botimer, A. R.; Suterwala, B. T.; Zhang, X. B.; Morris, C. L.; Weldon, D. J.; Dovat, S.; Payne, K. J., TSLP or IL-7 provide an IL-7R α signal that is critical for human B lymphopoiesis. *Eur J Immunol* **2016**, *46* (9), 2155-61.
156. Chiu, Y. K.; Lin, I. Y.; Su, S. T.; Wang, K. H.; Yang, S. Y.; Tsai, D. Y.; Hsieh, Y. T.; Lin, K. I., Transcription factor ABF-1 suppresses plasma cell differentiation but facilitates memory B cell formation. *J Immunol* **2014**, *193* (5), 2207-17.
157. Mitchell, G. F.; Hogarth-Scott, R. S.; Edwards, R. D.; Lewers, H. M.; Cousins, G.; Moore, T., Studies on immune responses to parasite antigens in mice. I. *Ascaris suum* larvae numbers and antiphosphorylcholine responses in infected mice of various strains and in hypothyroid nu/nu mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **1976**, *52* (1-4), 64-78.
158. Deslyper, G.; Colgan, T. J.; Cooper, A. J.; Holland, C. V.; Carolan, J. C., A Proteomic Investigation of Hepatic Resistance to *Ascaris* in a Murine Model. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10* (8), e0004837.
159. Sugane, K., Eosinophilia in *Ascaris suum*-reinfected mice. *J Helminthol* **1988**, *62* (1), 51-7.
160. Nutten, S.; Papin, J. P.; Woerly, G.; Dunne, D. W.; MacGregor, J.; Trottein, F.; Capron, M., Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol* **1999**, *29* (3), 799-808.
161. Norris, H. H.; Peterson, M. E.; Stebbins, C. C.; McConchie, B. W.; Bundoc, V. G.; Trivedi, S.; Hodges, M. G.; Anthony, R. M.; Urban, J. F.; Long, E. O.; Keane-Myers, A. M., Inhibitory receptor gp49B regulates eosinophil infiltration during allergic inflammation. *J Leukoc Biol* **2007**, *82* (6), 1531-41.
162. Allen, J. E.; Sutherland, T. E., Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Seminars in Immunology* **2014**, *26* (4), 329-340.
163. Dawson, H.; Solano-Aguilar, G.; Beal, M.; Beshah, E.; Vangimalla, V.; Jones, E.; Botero, S.; Urban, J. F., Localized Th1-, Th2-, T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in *Ascaris suum*-infected swine are increased by retinoic acid. *Infect Immun* **2009**, *77* (6), 2576-87.

REFERÊNCIAS

164. Jacobsen, E. A.; Taranova, A. G.; Lee, N. A.; Lee, J. J., Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, *119* (6), 1313-1320.
165. Kita, H., Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. *Int Arch Allergy Immunol* **2013**, *161 Suppl 2*, 3-9.
166. Strandmark, J.; Rausch, S.; Hartmann, S., Eosinophils in Homeostasis and Their Contrasting Roles during Inflammation and Helminth Infections. *Crit Rev Immunol* **2016**, *36* (3), 193-238.
167. Long, H.; Liao, W.; Wang, L.; Lu, Q., A Player and Coordinator: The Versatile Roles of Eosinophils in the Immune System. *Transfus Med Hemother* **2016**, *43* (2), 96-108.
168. Padigel, U. M.; Hess, J. A.; Lee, J. J.; Lok, J. B.; Nolan, T. J.; Schad, G. A.; Abraham, D., Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis* **2007**, *196* (12), 1844-51.
169. Padigel, U. M.; Lee, J. J.; Nolan, T. J.; Schad, G. A.; Abraham, D., Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun* **2006**, *74* (6), 3232-8.
170. Mawhorter, S. D.; Kazura, J. W.; Boom, W. H., Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology* **1994**, *81* (4), 584-91.
171. Farhan, R. K.; Vickers, M. A.; Ghaemmaghami, A. M.; Hall, A. M.; Barker, R. N.; Walsh, G. M., Effective antigen presentation to helper T cells by human eosinophils. *Immunology* **2016**, *149* (4), 413-422.
172. Akuthota, P., Eosinophil interactions: antigen presentation. *Methods Mol Biol* **2014**, *1178*, 251-5.
173. Chu, V. T.; Beller, A.; Rausch, S.; Strandmark, J.; Zänker, M.; Arbach, O.; Kruglov, A.; Berek, C., Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* **2014**, *40* (4), 582-93.
174. Chu, V. T.; Fröhlich, A.; Steinhauser, G.; Scheel, T.; Roch, T.; Fillatreau, S.; Lee, J. J.; Löhning, M.; Berek, C., Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* **2011**, *12* (2), 151-9.
175. Bartemes, K. R.; Cooper, K. M.; Drain, K. L.; Kita, H., Secretory IgA induces antigen-independent eosinophil survival and cytokine production without inducing effector functions. *J Allergy Clin Immunol* **2005**, *116* (4), 827-35.
176. Abu-Ghazaleh, R. I.; Fujisawa, T.; Mestecky, J.; Kyle, R. A.; Gleich, G. J., IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* **1989**, *142* (7), 2393-400.
177. Wong, T. W.; Doyle, A. D.; Lee, J. J.; Jelinek, D. F., Eosinophils regulate peripheral B cell numbers in both mice and humans. *J Immunol* **2014**, *192* (8), 3548-58.
178. Van Milligen, F. J.; Cornelissen, J. B.; Bokhout, B. A., Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol* **1999**, *21* (5), 243-51.

REFERÊNCIAS

179. Van Milligen, F. J.; Cornelissen, J. B.; Hendriks, I. M.; Gaasenbeek, C. P.; Bokhout, B. A., Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol* **1998**, *20* (6), 285-92.
180. Henderson, N. G.; Stear, M. J., Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Immunol Immunopathol* **2006**, *112* (1-2), 62-6.
181. Masure, D.; Vlaminck, J.; Wang, T.; Chiers, K.; Van den Broeck, W.; Vercruyse, J.; Geldhof, P., A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (3), e2138.
182. Perrigoue, J. G.; Marshall, F. A.; Artis, D., On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cell Microbiol* **2008**, *10* (9), 1757-64.
183. Magalhães, K.; Almeida, P. E.; Atella, G.; Maya-Monteiro, C. M.; Castro-Faria-Neto, H.; Pelajo-Machado, M.; Lenzi, H. L.; Bozza, M. T.; Bozza, P. T., Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis* **2010**, *202* (9), 1369-79.
184. Kita, H., Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev* **2011**, *242* (1), 161-77.
185. Wong, C. K.; Cheung, P. F.; Ip, W. K.; Lam, C. W., Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2007**, *37* (1), 85-96.
186. Kimata, H.; Yoshida, A.; Ishioka, C.; Jiang, Y.; Mikawa, H., Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation in vitro in human plasma cells. *Cellular Immunology* **1992**, *141* (2), 422-432.
187. Boomars, K. A.; van Velzen-Blad, H.; Mulder, P. G.; Koenderman, L.; Lammers, J. W.; van den Bosch, J. M., Eosinophil cationic protein and immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J* **1996**, *9* (12), 2488-93.
188. Min, H. J.; Hong, Y. H.; Yang, H. S.; Kim, K. S., The correlation of serum eosinophil cationic protein level with eosinophil count, and total IgE level in Korean adult allergic rhinitis patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* **2016**, *34* (4), 290-294.
189. Shang, L.; Fukata, M.; Thirunarayanan, N.; Martin, A. P.; Arnaboldi, P.; Maussang, D.; Berin, C.; Unkeless, J. C.; Mayer, L.; Abreu, M. T.; Lira, S. A., Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology* **2008**, *135* (2), 529-38.
190. Isolauri, E.; Sütas, Y.; Kankaanpää, P.; Arvilommi, H.; Salminen, S., Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* **2001**, *73* (2 Suppl), 444S-450S.
191. Oliveira-Sequeira, T. C.; David, É.; Ribeiro, C.; Guimarães, S.; Masseno, A. P.; Katagiri, S.; Sequeira, J. L., Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2014**, *56* (2), 105-9.
192. El Temsahy, M. M.; Ibrahim, I. R.; Mossallam, S. F.; Mahrous, H.; Abdel Bary, A.; Abdel Salam, S. A., Evaluation of newly isolated probiotics in the protection against experimental intestinal trichinellosis. *Vet Parasitol* **2015**, *214* (3-4), 303-14.

REFERÊNCIAS

193. Dea-Ayuela, M. A.; Rama-Iñiguez, S.; Bolás-Fernandez, F., Enhanced susceptibility to *Trichuris muris* infection of B10Br mice treated with the probiotic *Lactobacillus casei*. *Int Immunopharmacol* **2008**, *8* (1), 28-35.
194. de Avila, L. F.; de Leon, P. M.; de Moura, M. Q.; Berne, M. E.; Scaini, C. J.; Leivas Leite, F. P., Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunol* **2016**, *38* (5), 326-30.
195. Avila, L. F.; Telmo, P. e. L.; Martins, L. H.; Glaeser, T. A.; Conceição, F. R.; Leite, F. P.; Scaini, C. J., Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2013**, *55* (5), 363-5.
196. McClemens, J.; Kim, J. J.; Wang, H.; Mao, Y. K.; Collins, M.; Kunze, W.; Bienenstock, J.; Forsythe, P.; Khan, W. I., *Lactobacillus rhamnosus* ingestion promotes innate host defense in an enteric parasitic infection. *Clin Vaccine Immunol* **2013**, *20* (6), 818-26.
197. Martínez-Gómez, F.; Fuentes-Castro, B. E.; Bautista-Garfias, C. R., The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses. *Parasitol Res* **2011**, *109* (6), 1609-17.
198. Martínez-Gómez, F.; Santiago-Rosales, R.; Ramón Bautista-Garfias, C., Effect of *Lactobacillus casei* Shirota strain intraperitoneal administration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-*T. spiralis* production. *Vet Parasitol* **2009**, *162* (1-2), 171-5.
199. Bautista-Garfias, C. R.; Ixta-Rodríguez, O.; Martínez-Gómez, F.; López, M. G.; Aguilar-Figueroa, B. R., Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* **2001**, *8* (2 Suppl), S226-8.
200. Reynolds, L. A.; Finlay, B. B., Worming Their Way into the Picture: Microbiota Help Helminths Modulate Host Immunity. *Immunity* **2015**, *43* (5), 840-2.
201. Reynolds, L. A.; Finlay, B. B.; Maizels, R. M., Cohabitation in the Intestine: Interactions among Helminth Parasites, Bacterial Microbiota, and Host Immunity. *J Immunol* **2015**, *195* (9), 4059-66.
202. 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., Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract: lactobacilli promote infection with, and are promoted by, helminth parasites. *Gut Microbes* **2014**, *5* (4), 522-32.
203. Song, A. A.; In, L. L.; Lim, S. H.; Rahim, R. A., A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1), 55.
204. Bahey-El-Din, M.; Gahan, C. G.; Griffin, B. T., *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr Gene Ther* **2010**, *10* (1), 34-45.
205. Pacheco, L. G.; Zucconi, E.; Mati, V. L.; Garcia, R. M.; Miyoshi, A.; Oliveira, S. C.; de Melo, A. L.; Azevedo, V., Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop* **2005**, *95* (2), 132-42.
206. Yagnik, B.; Sharma, D.; Padh, H.; Desai, P., Dual recombinant *Lactococcus lactis* for enhanced delivery of DNA vaccine reporter plasmid pPERDBY. *Microbiol Immunol* **2017**, *61* (3-4), 123-129.

REFERÊNCIAS

207. Szczepankowska, A. K.; Szatraj, K.; Salański, P.; Rózga, A.; Górecki, R. K.; Bardowski, J. K., Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Haemagglutinin from a Polish Avian H5N1 Isolate and Its Immunological Effect in Preliminary Animal Trials. *Biomed Res Int* **2017**, *2017*, 6747482.
208. Pereira, V. B.; da Cunha, V. P.; Preisser, T. M.; Souza, B. M.; Zurita Turk, M.; De Castro, C. P.; Azevedo, M. S.; Miyoshi, A., *Lactococcus lactis* carrying a DNA vaccine coding for the ESAT-6 antigen increases IL-17 cytokine secretion and boosts the BCG vaccine immune response. *J Appl Microbiol* **2017**.
209. Dold, C.; Cassidy, J. P.; Stafford, P.; Behnke, J. M.; Holland, C. V., Genetic influence on the kinetics and associated pathology of the early stage (intestinal-hepatic) migration of *Ascaris suum* in mice. *Parasitology* **2010**, *137* (1), 173-85.
210. Holm, J. B.; Sorobetea, D.; Kiilerich, P.; Ramayo-Caldas, Y.; Estellé, J.; Ma, T.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Svensson-Frej, M., Chronic *Trichuris muris* Infection Decreases Diversity of the Intestinal Microbiota and Concomitantly Increases the Abundance of Lactobacilli. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0125495.
211. Giacomini, P.; Agha, Z.; Loukas, A., Helminths and Intestinal Flora Team Up to Improve Gut Health. *Trends Parasitol* **2016**, *32* (9), 664-6.
212. Ramanan, D.; Bowcutt, R.; Lee, S. C.; Tang, M. S.; Kurtz, Z. D.; Ding, Y.; Honda, K.; Gause, W. C.; Blaser, M. J.; Bonneau, R. A.; Lim, Y. A.; Loke, P.; Cadwell, K., Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. *Science* **2016**, *352* (6285), 608-12.
213. Rausch, S.; Held, J.; Fischer, A.; Heimesaat, M. M.; Köhl, A. A.; Bereswill, S.; Hartmann, S., Small intestinal nematode infection of mice is associated with increased enterobacterial loads alongside the intestinal tract. *PLoS One* **2013**, *8* (9), e74026.
214. Kita, H.; Mackay, I. R.; Van De Water, J.; Gershwin, M. E., The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* **2001**, *120* (6), 1485-501.
215. Mackay, I. R., Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol* **2002**, *80* (1), 36-44.
216. Racanelli, V.; Rehermann, B., The liver as an immunological organ. *Hepatology* **2006**, *43* (2 Suppl 1), S54-62.
217. Lemaître-Coelho, I.; Jackson, G. D.; Vaerman, J. P., Rat bile as a convenient source of secretory IgA and free secretory component. *Eur J Immunol* **1977**, *7* (8), 588-90.
218. Vaerman, J. P.; Lemaître-Coelho, I.; Jackson, G. D., Role of the liver in the rat intestinal s-IgA system. *Adv Exp Med Biol* **1978**, *107*, 233-9.
219. Lemaître-Coelho, I.; Jackson, G. D.; Vaerman, J. P., Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scand J Immunol* **1978**, *8* (5), 459-63.
220. Lemaître-Coelho, I.; Jackson, G. D.; Vaerman, J. P., High levels of secretory IgA and free secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction. *J Exp Med* **1978**, *147* (3), 934-9.
221. Jackson, G. D.; Lemaître-Coelho, I.; Vaerman, J. P.; Bazin, H.; Beckers, A., Rapid disappearance from serum of intravenously injected rat myeloma IgA and its secretion into bile. *Eur J Immunol* **1978**, *8* (2), 123-6.
222. Snoeck, V.; Peters, I. R.; Cox, E., The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* **2006**, *37* (3), 455-67.

REFERÊNCIAS

223. Mauad, T.; Silva, L. F.; Santos, M. A.; Grinberg, L.; Bernardi, F. D.; Martins, M. A.; Saldiva, P. H.; Dolhnikoff, M., Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**, *170* (8), 857-62.
224. Masure, D.; Wang, T.; Vlaminck, J.; Claerhoudt, S.; Chiers, K.; Van den Broeck, W.; Saunders, J.; Vercruyse, J.; Geldhof, P., the intestinal expulsion of the roundworm *Ascaris suum* is associated with eosinophils, intra-epithelial T cells and decreased intestinal transit time. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (12), e2588.
225. Balic, A.; Cunningham, C. P.; Meeusen, E. N., Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol* **2006**, *28* (3), 107-15.
226. El-Malky, M.; Maruyama, H.; Hirabayashi, Y.; Shimada, S.; Yoshida, A.; Amano, T.; Tominaga, A.; Takatsu, K.; Ohta, N., Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol Int* **2003**, *52* (1), 71-9.
227. Kanobana, K.; Ploeger, H. W.; Vervelde, L., Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. *Int J Parasitol* **2002**, *32* (11), 1389-98.
228. Esser-von Bieren, J.; Volpe, B.; Sutherland, D. B.; Bürgi, J.; Verbeek, J. S.; Marsland, B. J.; Urban, J. F.; Harris, N. L., Immune antibodies and helminth products drive CXCR2-dependent macrophage-myofibroblast crosstalk to promote intestinal repair. *PLoS Pathog* **2015**, *11* (3), e1004778.
229. Carlisle, M. S.; McGregor, D. D.; Appleton, J. A., The role of the antibody Fc region in rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunology* **1991**, *74* (3), 552-8.
230. Carlisle, M. S.; McGregor, D. D.; Appleton, J. A., Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology* **1991**, *74* (3), 546-51.
231. Ishikawa, N.; Horii, Y.; Oinuma, T.; Suganuma, T.; Nawa, Y., Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminths: T-cell-independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damaged' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites. *Immunology* **1994**, *81* (3), 480-6.
232. Shen, L., Receptors for IgA on phagocytic cells. *Immunol Res* **1992**, *11* (3-4), 273-82.
233. Herr, A. B.; White, C. L.; Milburn, C.; Wu, C.; Bjorkman, P. J., Bivalent binding of IgA1 to Fc α RI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. *J Mol Biol* **2003**, *327* (3), 645-57.
234. Davis, S. W.; Hammerberg, B., *Taenia taeniaeformis*: evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *Int J Parasitol* **1990**, *20* (5), 587-93.
235. Zhou, Z. H.; Wild, T.; Xiong, Y.; Sylvers, P.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Wahl, L.; Wahl, S. M.; Kozlowski, S.; Notkins, A. L., Polyreactive antibodies plus complement enhance the phagocytosis of cells made apoptotic by UV-light or HIV. *Sci Rep* **2013**, *3*, 2271.
236. Remoué, F.; Rogerie, F.; Gallissot, M. C.; Guyatt, H. L.; Neyrinck, J. L.; Diakkhate, M. M.; Niang, M.; Butterworth, A. E.; Auriault, C.; Capron, A.; Riveau, G., Sex-dependent neutralizing humoral response to *Schistosoma mansoni* 28GST antigen in infected human populations. *J Infect Dis* **2000**, *181* (5), 1855-9.

REFERÊNCIAS

237. Hewitson, J. P.; Grainger, J. R.; Maizels, R. M., Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* **2009**, *167* (1), 1-11.
238. Yatsuda, A. P.; Bakker, N.; Krijgsveld, J.; Knox, D. P.; Heck, A. J.; de Vries, E., Identification of secreted cysteine proteases from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* detected by biotinylated inhibitors. *Infect Immun* **2006**, *74* (3), 1989-93.
239. Gems, D.; Maizels, R. M., An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (4), 1665-70.
240. Loukas, A.; Hintz, M.; Linder, D.; Mullin, N. P.; Parkinson, J.; Tetteh, K. K.; Maizels, R. M., A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem* **2000**, *275* (50), 39600-7.
241. Page, A. P.; Maizels, R. M., Biosynthesis and glycosylation of serine/threonine-rich secreted proteins from *Toxocara canis* larvae. *Parasitology* **1992**, *105* (Pt 2), 297-308.
242. Badley, J. E.; Grieve, R. B.; Rockey, J. H.; Glickman, L. T., Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunol* **1987**, *9* (1), 133-43.
243. Długosz, E.; Wasyl, K.; Klockiewicz, M.; Wiśniewski, M., *Toxocara canis* mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. *Parasitol Res* **2015**, *114* (9), 3365-71.
244. Pham, D. L.; Yoon, M. G.; Ban, G. Y.; Kim, S. H.; Kim, M. A.; Ye, Y. M.; Shin, Y. S.; Park, H. S., Serum S100A8 and S100A9 Enhance Innate Immune Responses in the Pathogenesis of Baker's Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **2015**, *168* (2), 138-46.
245. Lanzavecchia, A.; Sallusto, F., Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* **2007**, *19* (3), 268-74.
246. Alugupalli, K. R.; Leong, J. M.; Woodland, R. T.; Muramatsu, M.; Honjo, T.; Gerstein, R. M., B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* **2004**, *21* (3), 379-90.
247. Alugupalli, K. R., A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **2008**, *319*, 105-30.
248. Alugupalli, K. R.; Abraham, D., B cell multitasking is required to control nematode infection. *Immunity* **2009**, *30* (3), 317-9.
249. Gunti, S.; Messer, R. J.; Xu, C.; Yan, M.; Coleman, W. G.; Peterson, K. E.; Hasenkrug, K. J.; Notkins, A. L., Stimulation of Toll-Like Receptors profoundly influences the titer of polyreactive antibodies in the circulation. *Sci Rep* **2015**, *5*, 15066.
250. Peterson, L. W.; Artis, D., Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14* (3), 141-53.
251. Brandtzaeg, P., Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol* **2013**, *4*, 222.
252. Panda, S.; Ding, J. L., Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol* **2015**, *194* (1), 13-20.

REFERÊNCIAS

253. Reed, J. L.; Welliver, T. P.; Sims, G. P.; McKinney, L.; Velozo, L.; Avendano, L.; Hintz, K.; Luma, J.; Coyle, A. J.; Welliver, R. C., Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis* **2009**, *199* (8), 1128-38.
254. Shimoda, M.; Inoue, Y.; Azuma, N.; Kanno, C., Natural polyreactive immunoglobulin A antibodies produced in mouse Peyer's patches. *Immunology* **1999**, *97* (1), 9-17.
255. Donadel, G.; Calabro, A.; Sigounas, G.; Hascall, V. C.; Notkins, A. L.; Harindranath, N., Human polyreactive and monoreactive antibodies: effect of glycosylation on antigen binding. *Glycobiology* **1994**, *4* (4), 491-6.
256. Quan, C. P.; Berneman, A.; Pires, R.; Avrameas, S.; Bouvet, J. P., Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun* **1997**, *65* (10), 3997-4004.
257. Fransen, F.; Zagato, E.; Mazzini, E.; Fosso, B.; Manzari, C.; El Aidy, S.; Chiavelli, A.; D'Erchia, A. M.; Sethi, M. K.; Pabst, O.; Marzano, M.; Moretti, S.; Romani, L.; Penna, G.; Pesole, G.; Rescigno, M., BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity* **2015**, *43* (3), 527-40.
258. Ludwig-Portugall, I.; Layland, L. E., TLRs, Treg, and B Cells, an Interplay of Regulation during Helminth Infection. *Front Immunol* **2012**, *3*, 8.
259. Fan, J.; Malik, A. B., Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* **2003**, *9* (3), 315-21.
260. Alves-Filho, J. C.; de Freitas, A.; Russo, M.; Cunha, F. Q., Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* **2006**, *34* (2), 461-70.
261. Alves-Filho, J. C.; Benjamim, C.; Tavares-Murta, B. M.; Cunha, F. Q., Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2005**, *100 Suppl 1*, 223-6.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO CEUA

**UFMG****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 187 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da resposta imune de mucosa contra a infecção experimental por *Ascaris spp.*", que tem como responsável Ricardo Toshio Fujiwara, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 16/12/2014. Este certificado expira-se em 16/12/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 187 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of the mucosal immune response against *Ascaris spp.* experimental infection", under the supervision of Ricardo Toshio Fujiwara, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 16/12/2014. This certificates expires in 16/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 16/12/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br