



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

DENISE SILVA NOGUEIRA

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO MEDIADOS PELA RESPOSTA IMUNE NA
ASCARIDIOSE LARVAL APÓS EXPOSIÇÃO PRIMÁRIA E MÚLTIPLAS
EXPOSIÇÕES AO PARASITO**

BELO HORIZONTE – MG

2018

DENISE SILVA NOGUEIRA

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO MEDIADOS PELA RESPOSTA IMUNE NA
ASCARIDIOSE LARVAL APÓS EXPOSIÇÃO PRIMÁRIA E MÚLTIPLAS
EXPOSIÇÕES AO PARASITO**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientador: Dr. Pedro Henrique Gazzinelli
Guimarães

Área de concentração: Imunoparasitologia

BELO HORIZONTE – MG

2018

DENISE SILVA NOGUEIRA

Essa tese foi sendo desenvolvida no *Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos*, Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, sob a orientação do Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e co-orientação do Dr. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas NIH.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Profa. Dra. Déborah Aparecida Negrão Corrêa

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG

Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar

Prof. Dr. Remo de Castro Russo

Departamento de Patologia – ICB/UFMG

Laboratório de Protozooses

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Laboratório de Imunologia - Instituto de Pesquisa René Rachou/Fiocruz

Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Ao meu irmão Denis, por estar sempre comigo me mostrando os caminhos.

AGRADECIMENTOS

Sou grata, primeiramente a Deus, por ter zelado pela minha família todos esses anos. Por ter me dado força quando precisei ser forte. Por ter colocado cada pessoa, situação, escolha e desafio na minha vida, levo tudo e a todos como aprendizado.

Aos meus pais, José Eugênio Nogueira de Oliveira e Maria Aparecida Silva Nogueira, por terem me dado a vida e me criado com amor e dedicação. E ao meu irmão Denis Silva Nogueira, pelo companheirismo, amizade e por ter me ajudado sempre que pôde. Sou grata pelas brigas, sermões e puxões de orelha, que foram de extrema importância na construção do meu caráter. Tenho muito orgulho que dizer que são as pessoas que eu mais amo, admiro, me espelho e que são a melhor família que eu poderia ter.

À minha segunda família, meus tios Cícera e Antônio (e toda a família), por terem me recebido, acolhido e feito de tudo para eu me sentir em casa. Conseguiram!

Às amigas de longa data Lets, Laura Fernanda, Josy, Neta, Laura e Anjim pelo apoio, compartilhamento de experiências, ideais e pelos momentos felizes.

Aos amigos maravilhosos que fiz em BH, que espero levar para vida inteira Dani, May, Ramón, Andressa e Tiago. Especialmente a Dani e May, que foram como irmãs e sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do "Grupo *Ascaris*": Chics, Aninha, Fernandão, Nathy, Lu e Ike, vocês são os melhores! Foi uma honra aprender com vocês... E foi duro ver a maioria indo embora, mas Deus me agraciou com uma excelente memória para coisas inúteis, então sempre me lembrarei das nossas palhaçadas que tornavam até os experimentos mais cansativos, agradáveis e divertidos. E aos que vieram depois, por continuarem os trabalhos com muita alegria. Sinto-me privilegiada por fazer parte deste grupo e sou imensamente grata por me permitirem compartilhar e participar do trabalho de cada um de vocês.

Às Gavetas originais, Aninha, Leão e Nalu pela amizade, companheirismo e acidez. Às Gavetas que vieram depois, Mari Clímaco, Thaís Elói e Williane, vocês são maravilhosas!

Aos demais amigos que fiz no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), por contribuírem para a boa convivência e tornarem o LIGP o melhor Lab. Especialmente aos que se tornaram amigos e que espero levar para a vida.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia, por tornarem os dias mais agradáveis. Em especial ao senhor Nery, pelo carinho ao longo desses anos e pelo humor capaz melhorar o dia de todos que o cercam.

Aos colaboradores, sem os quais esse trabalho não seria possível. Em especial aos professores Lilian e Remo, por todas as conversas e discussões que contribuíram à minha formação.

À Michele, por toda ajuda, paciência, competência, conselhos e amizade.

Ao meu orientador Ricardo, por todos os ensinamentos, paciência, apoio, confiança e, principalmente, por ser uma pessoa que transmite tranquilidade e segurança aos seus alunos, isso fez e faz muita diferença!

Ao meu co-orientador e amigo Pedro, pelo incentivo, muitas vezes empurrões, que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação, por compartilharem parte do seu conhecimento.

À Sumara e Sibebe que sempre são solícitas e acolhedoras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento de bolsa de estudos para que eu pudesse me dedicar ao doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, por tornar essa realização possível.

Gratidão!

“É detestável essa avareza espiritual que têm os que, sabendo algo, não procuram a transmissão desses conhecimentos”

Miguel de Unamuno

RESUMO

A ascaridiose humana é a doença tropical negligenciada mais prevalente do mundo afetando cerca de 800 milhões de pessoas. Em áreas endêmicas, a reinfecção é recorrente devido às precárias condições de saneamento básico e, sobretudo, à simplicidade do ciclo de vida do parasito. Após a ingestão de ovos infectantes, larvas de terceiro estágio (L₃) eclodem e penetram no intestino grosso, ganham a circulação sanguínea, chegando ao fígado e posteriormente aos pulmões do hospedeiro, caracterizando a ascaridiose larval. Nesses órgãos, as L₃ migram gerando lesões tanto mecânicas quanto provenientes da intensa resposta inflamatória, que é caracterizada principalmente pela intensa infiltração de neutrófilos e eosinófilos. O presente trabalho visou descrever e caracterizar os efeitos fisiopatológicos da migração das larvas de *Ascaris suum* nos pulmões de camundongos infectados, bem como avaliar o papel dos eosinófilos e da regulação das respostas Th1, Th2 e Th17 na patogênese da ascaridiose larval após primoinfecção e reinfecção. Para tal, inicialmente, foi realizada a avaliação parasitológica e imunopatológica em camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedos durante o pico de migração larval pelo fígado, pulmão e intestino. Posteriormente, camundongos geneticamente deficientes em GATA1, IFN- γ , IL-17RA, ST2, IL-4 e os respectivos selvagens foram infectados e reinfectedos e, após oito dias de infecção, foram submetidos à avaliação imunoparasitológica e fisiopatológicas. Os resultados mais importantes deste trabalho demonstraram que camundongos reinfectedos apresentaram uma relevante redução da carga parasitária no pulmão e aumento da celularidade no lavado broncoalveolar associado à intensa inflamação pulmonar granulocítica, que levaram ao comprometimento da função respiratória. Foi evidenciado que a inflamação pulmonar mista contribui para o controle da migração larval, contudo, no que se refere as respostas Th2/Th17, foram associadas ao maior comprometimento da função pulmonar. Além disso, este trabalho trouxe evidências contundentes da contribuição dos eosinófilos no controle da carga parasitária na ascaridiose em modelo de simples e múltiplas exposições. Foi evidenciado também que os eosinófilos são indispensáveis para a produção de SIgA e, que essas células dependem da sinalização mediada pela ativação de TLR2 e TLR4 para induzir a produção de SIgA na mucosa e, como consequência, controlar a carga parasitária. Por outro lado, foi comprovado que os eosinófilos contribuem para a fibrose do parênquima pulmonar em resposta às lesões teciduais, contudo, a maior perda fisiológica da função pulmonar foi associada às lesões agudas provocadas pela migração larval pelo parênquima pulmonar.

Palavras Chave: *Ascaris suum*, eosinófilos, reinfecção, resposta imune.

ABSTRACT

Human ascariasis is the most prevalent neglected tropical disease in the world affecting about 800 million people. In endemic areas, reinfection is recurrent due to poor basic sanitation conditions and, above all, the readiness of the parasite life cycle. After ingestion of infective eggs, third stage larvae (L₃) hatches and penetrates the large intestine, gaining blood circulation and reaching the liver and later the host lungs, characterizing larval ascariasis. In these organs, L₃ migrates generating both mechanical lesions and intense inflammatory response, which is characterized mainly by intense neutrophil and eosinophil infiltration. The present work aimed to describe and characterize the pathophysiological effects of the *Ascaris suum* larvae migration on the lungs of infected mice, as well as to evaluate the role of eosinophils and regulation of the Th1, Th2 and Th17 responses in the pathogenesis of larval ascariasis after single- and re-infection. For this, parasitological and immunopathological evaluation was initially performed in BALB / c mice single- and re-infected during the peak of larval migration within the liver, lung and intestine. Afterwards, mice genetically deficient in GATA1, IFN- γ , IL-17RA, ST2, IL-4 and the respective wild-type were infected and re-infected and, after eight days of infection, underwent immunoparasitological and pathophysiological evaluation. The most important results of this work demonstrated that re-infected mice presented a significant reduction of the parasitic load in the lung and increased cellularity in the bronchoalveolar lavage (BAL) associated to an intense granulocytic pulmonary inflammation, which led to a compromised respiratory function. It was evidenced that mixed pulmonary inflammation is of extreme importance for the control of larval migration. However, regarding Th2 / Th17 responses, they are associated with a greater impairment of pulmonary function, especially Th2. In addition, this work has brought strong evidence of the contribution of eosinophils in a ascariasis multiple exposition model. It was evidenced that eosinophils are indispensable for the production of SIgA in the pulmonary mucosa and that these cells depend on the signaling by TLR2 and TLR4 activation to induce SIgA production in the mucosa and to control the parasitic load. It has been demonstrated that eosinophils contribute to pulmonary parenchymal fibrosis in response to *A. suum* tissue damage. Extrapolating to the current scenario of human ascariasis, the data of this work could also explain the epidemiological distribution of *Ascaris* sp. since most of the infected individuals in high endemicity areas, where they are exposed multiple times to the parasite, present low parasitic load.

Keywords: *Ascaris suum*, eosinophils, immune response, reinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Ciclo biológico e formas evolutivas do <i>Ascaris</i> sp.....	15
Figura 02	Representação da diferenciação das células T CD4+ não primadas nos subtipos Th1, Th2 e Th17.....	19
Figura 03	Desenho experimental - Capítulo 1.....	27
Figura 04	Delineamento experimental para a avaliação do papel da inflamação Th1/Th17 na sscaridiose larval.....	28
Figura 05	Delineamento experimental para a avaliação do papel da resposta Th2 na ascaridiose larval.....	29
Figura 06	Delineamento experimental usado para avaliar a participação dos receptores TLR2 e TLR4 na ascaridiose larval.....	30
Figura 07	Delineamento experimental para a avaliação cinética da carga parasitária nos pulmões, do número de eosinófilos e produção de SIgA no BAL na ascaridiose larval primária.....	31
Figura 08	Delineamento experimental para a avaliação do papel de eosinófilos na ascaridiose larval.....	32
Figura 09	Número de larvas recuperadas dos órgãos de camundongos BALB/c selvagens.....	42
Figura 10	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval no fígado no quarto dia pós-infecção e área de lesão tecidual.....	44
Figura 11	Imagens representativas das lesões histopatológicas, área da lesão no oitavo dia pós-infecção, níveis de atividade de EPO e MPO.....	45
Figura 12	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c no oitavo dia pós-infecção de <i>A. suum</i>	47
Figura 13	Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL no oitavo dia pós-infecção.....	49
Figura 14	Contagem de células mononucleares e de granulócitos no sangue periférico em diferentes tempos após a infecção experimental por <i>A. suum</i>	51
Figura 15	Perfil de produção de citocinas sistêmicas desde o primeiro dia até 12 dias após a terceira infecção.....	52
Figura 16	Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectados no oitavo dia pós-infecção.....	55
Figura 17	Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação.....	56

Figura 18	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval.....	57
Figura 19	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57BL/6j primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção por <i>A suum</i>	58
Figura 20	Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados.....	59
Figura 21	BAL de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	60
Figura 22	Citocinas séricas dosadas em camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	61
Figura 23	Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL/6j e IL-17RA $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	62
Figura 24	Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação.....	63
Figura 25	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval.....	64
Figura 26	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos IL-17RA $^{-/-}$ e C57BL/6j primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção por <i>A suum</i>	65
Figura 27	Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j e IL-17RA $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados.....	66
Figura 28	BAL de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós- infecção.....	67
Figura 29	Citocinas séricas dosadas em camundongos C57BL/6j e IL-17RA $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	68
Figura 30	Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos BALB/c e ST2 $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	69
Figura 31	Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação de camundongos BALB/c e ST2 $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	70
Figura 32	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão.....	72
Figura 33	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c e ST2 $^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção por <i>A suum</i> .	73

Figura 34	Níveis de atividade EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e ST2 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados.....	74
Figura 35	BAL de camundongos BALB/c e ST2 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós- infecção.....	75
Figura 36	Citocinas séricas dosadas em camundongos BALB/c e ST2 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	76
Figura 37	Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos BALB/c e IL-4 ^{-/-} no oitavo dia pós-infecção.....	77
Figura 38	Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação.....	78
Figura 39	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval.....	79
Figura 40	Densidade óptica da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e IL-4 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados.....	80
Figura 41	Citocinas dosadas no tecido pulmonar no oitavo dia pós-infecção.....	81
Figura 42	Contagem de células mononucleares e de granulócitos no sangue periférico em diferentes tempos após a infecção experimental por <i>A. suum</i>	82
Figura 43	Citocinas séricas no oitavo dia pós-infecção.....	83
Figura 44	Impacto dos receptores do tipo Toll na ascarirose larval experimental no oitavo dia pós infecção.....	86
Figura 45	Cinética de migração das larvas pelos órgãos e da produção de SIgA-total na mucosa pulmonar.....	88
Figura 46	Número de larvas recuperadas dos pulmões dos camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} e no oitavo dia pós-infecção.....	89
Figura 47	Análise morfométrica das lesões provocadas pela migração das larvas de <i>A. suum</i> , inflamação e reparo tecidual, em camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados.....	90
Figura 48	Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval.....	91
Figura 49	Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados.....	92
Figura 50	Citocinas teciduais dosadas no pulmão no oitavo dia pós-infecção.....	93
Figura 51	BAL de camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção.....	95
Figura 52	Níveis de SIgA no BAL no oitavo dia pós-infecção.....	96
Figura 53	Cortes de pulmão de camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados, corados com Tricrômico de Gômori.....	97

Figura 54	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1 ^{-/-} primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção de <i>A suum</i>	98
Figura 55	Contagem de células mononucleares e de granulócitos no sangue periférico em diferentes tempos após a infecção experimental por <i>A. suum</i>	99
Figura 56	Citocinas séricas dosadas no oitavo dia pós-infecção.....	100
Figura 57	Representação esquemática dos principais resultados da ascarirose larval em modelo de deficiência em eosinófilos.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL	Lavado broncoalveolar - do inglês <i>Bronchoalveolar lavage</i>
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongos de pelagem albina
BALT	Tecido linfóide associado ao brônquio - do inglês <i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCA	Ácido bicinchrônico - do inglês <i>Bicinchoninic Acid</i>
B.O.D.	Demanda biológica de oxigênio - do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BSA	Albumina bovina sérica - do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
C57BL/6j	Linhagem isogênica de camundongos de pelagem negra
CCHORD	Complacência estática - do inglês <i>Static lung compliance</i>
CDCP	Centro de Prevenção e Controle de Doenças - do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDYN	Complacência dinâmica - do inglês <i>Dynamic compliance</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DALY	Anos de vida perdidos por incapacidade - do inglês <i>Disability-Adjusted Life Years</i>
GATA1 ^{-/-}	Camundongos geneticamente deficientes no fator de transcrição GATA1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática - do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Peroxidase eosinofílica - do inglês <i>Eosinophil peroxidase</i>
FEV	Volume expiratório forçado - do inglês <i>Forced expiratory volume</i>
FVC	Capacidade vital forçada - do inglês <i>Forced vital capacity</i>
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina & eosina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-4 ^{-/-}	Camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-4
IL-17RA ^{-/-}	Camundongos geneticamente deficientes no receptor IL-17RA
ILC	Células linfóides inatas - do inglês <i>Innate lymphoid cells</i>
IFN-γ	Interferon-gama
IFN-γ ^{-/-}	Camundongos geneticamente deficientes na produção de IFN-γ
L ₁₋₄	Estádios 1 a 4 do desenvolvimento larval
MPO	Mieloperoxidase de neutrófilos
ND	Não detectado
NI	Animais não infectados
O.D.	Densidade óptica - do inglês <i>Optical density</i>
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

OPAS/PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde / Pan American Health Organization
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Animais primoinfectados
PBS	Solução fosfato salina - do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
RE	Animais reinfectedados
RI	Resistência pulmonar - do inglês <i>Lung resistance</i>
ST2 ^{-/-}	Camundongos geneticamente deficientes no receptor ST2
T	Tempos avaliados
T.A.	Temperatura ambiente
TGF-β	Fator de transformação do crescimento do tipo beta - do inglês <i>Transforming growth factor-beta</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo um - do inglês <i>T helper-1</i>
Th2	Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo dois - do inglês <i>T helper-2</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa - do inglês <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TSLP	Linfopoetina estromal tímica – do inglês <i>Thymic stromal lymphopietin</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Contextualização e epidemiologia	13
1.2 Taxonomia.....	14
1.3 Biologia.....	15
1.4 Fisiopatologia e sintomatologia.....	16
1.5 Resposta imunológica.....	18
1.6 Resposta imune na ascaridiose larval	19
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Considerações éticas na experimentação animal	25
4.2 População do estudo	25
4.3 Obtenção e embrionamento dos ovos	25
4.4 Preparo dos ovos e Infecção experimental.....	26
4.5 Delineamentos experimentais.....	26
4.5.1 Delineamento experimental - Capítulo 1	26
4.5.2 Delineamento experimental - Capítulo 2	28
4.5.3 Delineamento experimental - Capítulo 3	29
4.6 Coleta e processamento do sangue, análise hematológica e contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico.....	32
4.7 Procedimentos de eutanásia para as análises histopatológicas, coleta de BAL, coleta de órgãos e análises de carga parasitária	32
4.8 Obtenção e processamento do BAL	33
4.8.1 Processamento do BAL	33
4.9 Dosagem de proteínas totais no BAL	34
4.10 Dosagem de hemoglobina no BAL	34
4.11 Preparo de antígeno larval.....	34
4.12 Ensaio imunoenzimático para avaliação de SIgA total e específica no BAL	35
4.13 Análise da carga parasitológica tecidual.....	36
4.14 Avaliação de função pulmonar: Espirometria, coleta do pulmão para histopatologia	36
4.15 Análise histopatológica dos tecidos hepático e pulmonar	37
4.16 Quantificação de citocinas séricas e teciduais	38
4.17 Quantificação da atividade de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar	38
4.17.1 Determinação dos níveis de EPO.....	39
4.17.2 Determinação dos níveis de MPO	39

4.18 Análise estatística dos dados.....	39
5. CAPÍTULO 01:	41
Múltiplas exposições ao <i>Ascaris suum</i> induz lesão tecidual e uma resposta imunológica mista Th2/Th17.....	41
5.1 RESULTADOS.....	42
5.1.1 A reinfecção por <i>A. suum</i> está associada a uma redução da carga parasitária durante a migração larval pelos pulmões.....	42
5.1.2 A reinfecção por <i>A. suum</i> induz uma intensa inflamação tecidual que pode estar associada ao controle da carga parasitária nos pulmões, mas conseqüentemente prejudica a função pulmonar.....	43
5.1.3 A reinfecção com <i>A. suum</i> provoca um aumento do número de células inflamatórias circulantes e da produção de citocinas Th2/Th17 sistêmicas na ascaridiose larval.....	50
6. CAPÍTULO 02:	53
Aspectos da resposta imune Th1, Th2 e Th17 na fisiopatologia pulmonar da ascaridiose larval após simples e múltiplas exposições.....	53
6.1 RESULTADOS.....	54
6.1.1 Na reinfecção por <i>A. suum</i> , a proteção da carga parasitária se mantém em camundongos deficientes na resposta Th1, contudo a ausência de IFN- γ induz um aumento da resposta Th17 e uma acentuada perda de função pulmonar.....	54
6.1.2 A deficiência na resposta Th17 contribui para a redução da carga parasitária, contudo, com aumento de IFN- γ sistêmico e da inflamação tecidual, contudo, sem perda da função pulmonar.....	62
6.1.3 A deficiência na sinalização IL-33/ST2 parece gerar um aumento na inflamação Th1/Th17, com conseqüente redução da carga parasitária e perda da função pulmonar.....	69
6.1.4 A regulação positiva da resposta Th2, por meio da citocina IL-4, está associada ao controle da migração larval na ascaridiose primária, contudo, a proteção observada na reinfecção parece ser independente de IL-4.....	77
7. CAPÍTULO 03:	85
O papel dos eosinófilos na fisiopatologia pulmonar da ascaridiose larval após múltiplas exposições.....	85
7.1 RESULTADOS.....	86
7.1.1 O controle da carga parasitária na ascaridiose larval é dependente de TLR2 e TLR4 que, contribuem para o aumento do número de eosinófilos e da produção SIgA no pulmão de camundongos infectados.....	86
7.1.2 Eosinófilos contribuem para produção de SIgA na mucosa pulmonar.....	87
7.1.3 O controle da carga parasitária na ascaridiose após múltiplas exposições é parcialmente dependente de eosinófilos.....	88
7.1.4 A inflamação tecidual em camundongos selvagens é do tipo mista, com acúmulos de neutrófilos e eosinófilos no tecido pulmonar e a formação de BALT.....	89

7.1.5 A presença de eosinófilos foi associada ao aumento da fibrose tecidual, contudo com melhora da função pulmonar.....	96
7.1.6 A ascaridiose larval em provoca um aumento do número de células inflamatórias circulantes e da produção de citocinas de perfil Th2/Th17 sistêmicas após a múltiplas exposições	98
8 DISCUSSÃO	101
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
10 CONCLUSÕES	111
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
12 ANEXOS	126
12.1 Termos de Aprovação CEUA/UFMG para o estudo da ascaridiose experimental.....	126
12.2 Fotomicrografia de pulmão de camundongos BALB/c e C57BL/c não infectados	128
12.3 Produção Científica.....	129
12.3.1 Multiple exposures to <i>Ascaris suum</i> induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice	129
12.3.2 New insights into the immunopathology of early <i>Toxocara canis</i> infection in mice..	129
12.3.3 Concomitant helminth infection downmodulates the <i>Vaccinia</i> virus-specific immune response and potentiates virus-associated pathology	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Helmintoses são infecções parasitárias causadas por vermes pertencentes aos Filos Nematoda e Platelminthes. No Filo Nematoda encontram-se os geo-helmintos, que são parasitos que desenvolvem parte do seu ciclo biológico no solo e, são agentes etiológicos das doenças parasitárias intestinais mais comuns nos países em desenvolvimento, como a ancilostomose, a tricurirose e a ascaridiose (LUSTIGMAN et al., 2012).

A ascaridiose humana representa um problema de saúde pública e possui grande impacto socioeconômico. Em 2010, as infecções por geo-helmintos causaram para a população humana, a perda de cerca de cinco milhões de anos devido a incapacidade (DALYs), o qual leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma incapacidade devido à morbidade causada pela doença (WHO, 2013). Somente a ascaridiose contribuiu para 1,32 milhões de anos perdidos por incapacidade (PULLAN et al., 2014).

A ascaridiose é considerada uma das mais prevalentes doenças tropicais negligenciadas, afetando mais de 800 milhões de pessoas no mundo, sendo que destas, 59 milhões apresentam elevado risco de desenvolverem alguma morbidade, com 10 a 60 mil óbitos anualmente, devido a forma grave da doença (SILVA et al., 2003; HOTEZ et al., 2008; HOTEZ, 2010). E apesar das infecções por *Ascaris* sp. serem mundialmente disseminadas e da existência de registros de ascaridiose em regiões economicamente desenvolvidas (WHO, 1987; SILVA et al., 1997a; BRENDALL et al., 2011; UMETSU et al., 2014; MILLER et al., 2015), as altas taxas de prevalências e intensidades de infecção se associam à pobreza aguda e à precárias condições sanitárias em países em desenvolvimento nas regiões tropicais tais como: África, Ásia e Américas Latina (WHO 1987; SILVA et al., 1997a; CAMPOS et al., 2002; FORTES et al., 2004; SHAPIRO et al., 2005; BROOKER et al., 2006; ELLIS et al., 2007; WALKER et al., 2011; LUSTIGMAN et al., 2012; CHAMMARTIN et al., 2014). Entre outros fatores associados à transmissão, destacam-se a idade do hospedeiro e as condições do ambiente. Em relação à idade do hospedeiro, a infecção pode ocorrer em todas as faixas etárias. Contudo, as crianças são as mais susceptíveis já que o pico de prevalência e de intensidade da doença ocorre entre seis a dez anos de idade (MARTIN et al., 1983).

Em relação aos fatores ambientais, o risco de transmissão de *Ascaris* spp. se relaciona positivamente com a precipitação anual (alta umidade acelera o desenvolvimento dos ovos), assim como com as características do solo, tais como: aridez, acidez (pH: 5,35 - 5,65) e temperatura (25 - 30°C) (BROOKER et al., 2004; PULLAN; BROOKER, 2012; CHAMMARTIN et al., 2013; CHAMMARTIN et al., 2014). Já as ações de saneamento se associam com um risco reduzido de transmissão de helmintoses em geral (ZIEGELBAUER et al., 2012), como foi demonstrado por Barreto e colaboradores (2010), em Salvador (BA, Brasil), onde a execução de um programa de sanitização reduziu em 42% a prevalência de *A. lumbricoides* em crianças em idade escolar.

Em relação à distribuição da doença na América Latina e Caribe, estima-se em 86 milhões o número de pessoas infectadas (PULLAN et al., 2014) sendo que, aproximadamente, 50% da prevalência desta doença ocorre no Brasil (HOTEZ et al., 2008). De acordo com um estudo de revisão da Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS/PAHO (CHAMMARTIN et al., 2014), entre 1995 a 2009 foram reportadas taxas de prevalência para *A. lumbricoides* acima de 50% em vários municípios do Brasil localizados nos estados de Alagoas (57,0%), Amazonas (51,2 %), Maranhão (61,5 a 64,7%), Minas Gerais (57,8 a 65,5%), Paraná (73,0 a 88,0%), Pernambuco (79,3 a 80,3%) e Rio Grande do Sul (51,0%).

1.2 TAXONOMIA

Os agentes etiológicos da ascaridiose humana e suína são parasitos pertencentes ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e gênero *Ascaris*. Com relação às espécies, *A. lumbricoides* (Linnaeus, 1758) foi associada à infecção em humanos, e *A. suum* (Goeze, 1782) à infecções em suínos. A associação entre a espécie e o hospedeiro vem de estudos de infecções experimentais (TAKATA, 1951; GALVIN, 1968) e de observações epidemiológicas (ANDERSON et al., 1993; ANDERSON; JAENIKE, 1997). Entretanto, não existe consenso na literatura e, alguns autores questionam a existência de duas espécies distintas, pois, todos os estágios de desenvolvimento destes parasitos são morfologicamente e biologicamente indistinguíveis (ANDERSON, 2001; LELES et al., 2012; LIU et al., 2012), exceto por uma pequena diferença no formato dos dentículos dos vermes adultos (SPRENT, 1952; BARBOSA, 2015). Outros autores defendem a existência de uma única espécie com base em estudos moleculares, paleoparasitológicos, na história de contato próximo entre humanos e porcos selvagens (iniciado há aproximadamente dez mil anos), e em análise comparativa do genoma mitocondrial (LELES et al., 2012; LIU et al., 2012).

Deste modo, os autores sugerem que os termos *A. lumbricoides* e *A. suum* sejam considerados sinônimos, com o primeiro tendo prioridade taxonômica em relação ao segundo. Esta controvérsia tem importância não apenas taxonômica, mas implicações diretas nas ações profiláticas e de vigilância epidemiológica da ascaridiose. Dados da literatura demonstram que ambas as espécies podem ser patogênicas tanto para humanos quanto para suínos, já que a transmissão cruzada experimental entre humanos e suínos já foi demonstrada (TAKATA, 1951; BARBOSA, 2015) e recentes estudos epidemiológicos têm sugerido a ocorrência de transmissão cruzada natural (NEJSUM et al., 2012; BETSON et al., 2014; MILLER et al., 2015; BARBOSA, 2015).

1.3 BIOLOGIA

Os representantes do gênero *Ascaris* apresentam ciclo de vida monoxênico, são vermes longos e cilíndricos, de coloração branca, dióicos, cujas formas adultas habitam o intestino delgado principalmente jejuno e íleo, causando a ascariíose crônica (DOLD; HOLLAND, 2011a).

O ciclo biológico desse parasito envolve três importantes estágios biológicos: vermes adultos, ovos e larvas. Vermes adultos (macho e fêmea) possuem uma camada exterior quitinosa consistindo de cutícula anucleada secretada pelo epitélio adjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui três lábios. Machos e fêmeas se desenvolvem no intestino delgado do hospedeiro e atingem em média de 20-30 cm e 30-40 cm de comprimento, respectivamente, e de 3 a 6 mm de diâmetro. Essas proporções podem variar em decorrência do estado nutricional do hospedeiro e da carga parasitária devido à competição intraespecífica por nutrientes (WALKER et al., 2010). Ao atingir a maturidade sexual, machos e fêmeas realizam a reprodução sexuada e estas passam a liberar ovos, em média 200.000 por dia, que chegam ao meio ambiente através das fezes do hospedeiro. Na ausência de machos, as fêmeas liberam ovos inférteis (KENNEDY, 1998; HOLLAND; BEHNKE; DOLD, 2013). O período pré-patente da infecção por *Ascaris* spp. é de aproximadamente 60 dias, os ovos férteis são liberados juntos com as fezes e permanecem viáveis do solo por longo período (KENNEDY, 1998; DOLD; HOLLAND, 2011b) (Figura 1).

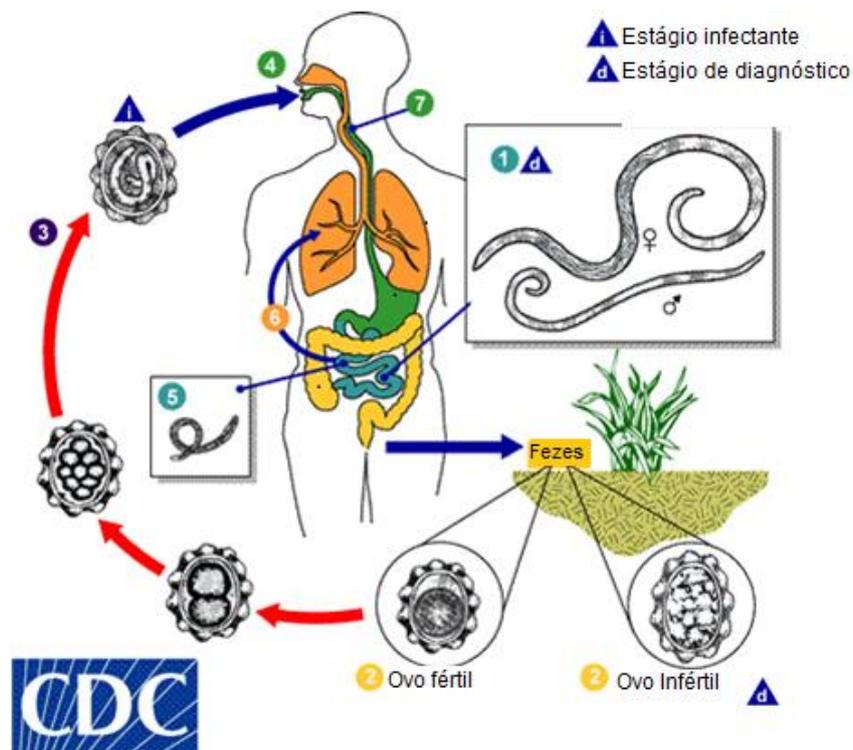


Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico e formas evolutivas do *Ascaris* spp.

Fonte: Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC)
<http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>

Os ovos apresentam forma oval com 45 a 75 µm de diâmetro, de coloração castanha devido aos pigmentos biliares contidos nas fezes e cápsula espessa composta por três membranas, sendo a externa mamilonada formada por mucopolissacarídeos, a média formada por quitina e a interna formada predominantemente por lipídios, garantindo aos ovos a capacidade de resistir às condições adversas do meio ambiente. Em algumas situações a membrana mamilonada pode ser perdida, sendo os ovos denominados, então, decorticados. Nas fezes podem ser encontrados ovos férteis embrionados medindo cerca de 30 a 40 µm de largura por 50 a 60 µm de comprimento e ovos inférteis, que são maiores e apresentam camada mamilonada menos espessa e com material interno desorganizado (KHUROO, 1996). Após serem liberados, com cerca de duas a três semanas no solo em condições adequadas de temperatura (25 - 30°C), umidade (70 %) e na presença de oxigênio, os ovos já apresentam a larva infectante de terceiro estágio (L₃) em seu interior (DOLD; HOLLAND, 2011b; HOLLAND, BEHNKE; DOLD, 2013).

Por meio de infecção experimental murina, a qual mimetiza a infecção inicial nos hospedeiros naturais, denominada de ascaridiose larval, verificou-se que após a ingestão de ovos infectantes pelo hospedeiro suscetível, a partir de alimentos ou água contaminados, larvas L₃ eclodem no lúmen do intestino delgado e penetram na mucosa intestinal na altura do ceco, ganham a circulação sanguínea e são carregadas ao fígado a partir do sistema vascular portal. A migração pelo fígado atinge o pico do terceiro ao quinto dia após a infecção. Posteriormente, as larvas chegam à circulação novamente e são passivamente carregadas aos pulmões, onde podem ser encontradas a partir do quinto dia de infecção, atingindo o pico no oitavo dia (MASSARA; COSTA; CARVALHO, 1990; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). As larvas migram pelo parênquima pulmonar (Ciclo de Looss), rompem as paredes dos alvéolos, sofrem muda de L₃ à L₅ devido à alta concentração de oxigênio e ascendem a árvore brônquica chegando à faringe, onde podem ser expectoradas ou deglutidas, nesse caso retornando ao trato gastrointestinal. Ao atingir o lúmen do intestino delgado as larvas L₅ tornam-se adultos jovens e, atingem a maturidade sexual tornando-se vermes adultos machos e fêmeas. As fêmeas começam a liberar ovos nas fezes do hospedeiro por volta do 60º dia pós-infecção (DOLD; HOLLAND, 2011a; HOLLAND; BEHNKE; DOLD, 2013; BAILEY; WARNER, 2010).

1.4 FISIOPATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA

A maioria das pessoas infectadas com cargas leves a moderadas não desenvolve sintomatologia ou esta, quando presente, é inespecífica e com sintomas leves tais como: dor ou desconforto abdominal, náusea, anorexia e diarreia (SILVA et al., 1997a). Contudo, infecções intensas são associadas a complicações graves, pois, a morbidade e a mortalidade aumentam em função da intensidade da doença. Segundo Brooker e colaboradores (2000), outro fator que impacta a morbidade é o poliparasitismo comum nas regiões endêmicas.

A fase aguda da doença ocorre durante a fase de migração hepatopulmonar ou ascaridiose larval. Complicações agudas são raras e, geralmente, associadas a infecções com alta carga

parasitária. Nesses casos, a literatura médica descreve casos de hematêmese (AHMED et al., 2015), pneumonite eosinofílica (HERRERA; MENESES, 2005), obstrução intestinal aguda ou subaguda (LOUW, 1966; SILVA et al., 1997b; MWENDA; ILKUL, 2013), apendicite (LOUW, 1966), abscesso hepático (CHAUHAN et al., 2015), ascaridiose pancreática (LOUW, 1966; GALZERANO et al., 2010; AZHAR et al., 2015) e biliar (LOUW, 1966; MORANO; MORANO, 1988; SANJEEV; LUM, 2012; WANG et al., 2013; ASIF et al., 2014; UMETSU et al., 2014; AZHAR et al., 2015; KHUROO et al., 2015). Além disso, migração larval “atípica” pode causar raras e graves complicações em órgãos não relacionados ao padrão migratório, como a ascaridiose escrotal (DEY et al., 2012).

Já a fase crônica ocorre após estabelecimento dos parasitos no intestino e, as complicações crônicas desta fase se relacionam principalmente com anemia e desnutrição. Ahmed e colaboradores (2011) realizaram um estudo longitudinal avaliando os impactos da infecção por geo-helminthos e identificaram a presença de carga moderada a alta de *Ascaris* como um dos principais aspectos preditores de raquitismo na população estudada (AHMED et al., 2011).

Com relação à desnutrição, evidências epidemiológicas demonstram que infecções crônicas, ou com intenso parasitismo podem contribuir para a desnutrição do hospedeiro devido ao bloqueio da absorção de nutrientes no intestino delgado, pela ação de inibidores de enzimas pancreáticas secretadas por *Ascaris* sp. (GREEN, 1957) e, como consequência gerar deficiências no desenvolvimento físico e cognitivo (SILVA et al., 1997a; JARDIM-BOTELHO et al., 2008).

Em termos de diagnóstico, a ascaridiose só é comprovada pela presença de ovos nas fezes do hospedeiro (GALVIN, 1968). Desse modo, o método mais utilizado na rotina dos serviços de saúde, para a identificação de ovos nas fezes de geo-helminthos é o de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) (1934), que consiste na técnica de sedimentação das fezes e posterior contagem dos ovos no sedimento utilizando microscopia de luz. Já para pesquisa científica, a OMS/WHO recomenda o método de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), que permite a quantificação de ovos por grama de fezes (opg), desse modo, a determinação da intensidade da infecção em baixa, moderada e alta (Tabela 1) (WHO, 2002a; WHO, 2002b).

Tabela 1: Classificação da intensidade da infecção por geo-helminthos por meio da quantificação do número de ovos por grama de fezes utilizando o método de Kato-Katz (KATZ et al, 1972).

Parasito	Infecção de intensidade baixa	Infecção de intensidade moderada	Infecção de intensidade alta
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 - 4.999 opg	5.000 - 49.999 opg	50.000 opg
<i>Trichuris trichiura</i>	1 - 999 opg	1.000 - 9.999 opg	10.000 opg
<i>Ancilostomídeos</i>	1 - 1.999 opg	2.000 - 3.999 opg	4.000 opg

Fonte: Organização Mundial de Saúde OMS/WHO (2002b).

Métodos de demonstração de ovos nas fezes apresentam simplicidade e baixo custo (CHAVES et al., 1979), contudo, a eficácia destes é comprometida em infecções de baixa intensidade (KNOPP et al., 2008), pela presença de infecções nas quais os parasitos não alcançam maturidade sexual ou são

todos do mesmo sexo. Neste sentido, e considerando que programas de controle das helmintoses têm reduzido a intensidade de infecção nas áreas endêmicas (CHAMMARTIN et al., 2014), estas limitações devem ser consideradas nos estudos e ações de vigilância epidemiológica.

Assim, visto a importância da morbidade causada pela migração das larvas no período pré-patente, torna-se clara a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e que sejam capazes de detectar a infecção ainda na fase inicial. Estudos sorológicos e moleculares têm sido realizados e podem resultar em uma alternativa de diagnóstico mais sensível, específico e eficaz para detectar a fase inicial da infecção.

Antígenos de extratos brutos e secretados/excretados ou proteínas purificadas de larvas e vermes adultos têm sido estudados para desenvolvimento de ensaios sorológicos (KENNED et al., 1987; LIND et al., 1993; CABRERA-BARROSO et al., 2014; GÁLVEZ et al., 2014; GONZÁLEZ-MIGUEL et al., 2014). A homologia comprovada entre os antígenos secretados por estágios larvais de *A. suum* e *A. lumbricoides* (KENNED et al., 1987) ressalta o potencial de aplicação de testes sorológicos em diagnóstico suíno e humano.

1.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Ao entrar em contato com antígenos derivados de patógenos, linfócitos T CD4⁺ não primados podem se diferenciar em subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), sendo que os mais conhecidos são os do tipo Th1, Th2 e Th17 (O'SHEA et al., 2010). No processo de diferenciação celular, linfócitos estimulados pelas citocinas interleucina (IL)-12 e interferon-gama (IFN- γ) produzidas principalmente por células dendríticas, diferenciam-se em Th1 e produzem IFN- γ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-2 e IL-12, e expressam o fator de transcrição T-bet (SAKAGUCHI et al., 2008).

Por outro lado, quando estimuladas pela citocina IL-4, linfócitos T CD4⁺ não primados diferenciam-se em Th2 e, passam a produzir IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, expressando o fator de transcrição GATA-3 (SAKAGUCHI et al., 2008). Uma importante citocina que participa do processo de diferenciação de linfócitos em Th2 é a IL-33. Essa citocina, considerada uma alarmina, é produzida por diversos tipos celulares, como células endoteliais, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos (MÜLLER et al., 2005; LIEW et al., 2010) e, é liberada no espaço extracelular mediante dano celular e tecidual, e estimula outras células adjacentes a produzir citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (LIEW et al., 2010), sendo desse modo, considerada importante para o direcionamento da resposta imune para o tipo Th2.

Já a presença de fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) e de IL-6 promove a diferenciação de células T CD4⁺ não primadas em Th17, produtoras de IL-17, e que expressam o fator de transcrição ROR- γ T (DONG, 2008; KAUFMANN; KUCHROO, 2009). É interessante ressaltar que durante a diferenciação dos linfócitos Th, a citocina TGF- β é também responsável pela indução do fator de transcrição Foxp3, responsável pela diferenciação de células Treg, contudo, a citocina IL-6, quando presente, atua na supressão da indução deste fator de transcrição. Assim, as duas citocinas em conjunto atuam na diferenciação de células Th17 (DONG, 2008; KAUFMANN; KUCHROO, 2009). Além

disso, outros fatores exibem uma relação recíproca entre células Treg Foxp3⁺ e células Th17. A citocina IL-2 e o ácido retinóico são fatores de crescimento para Treg, enquanto inibem a diferenciação de células Th17. A citocina IL-1 também atua na amplificação da diferenciação de Th17, mas não é a principal condutora da diferenciação dessas células (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; STOCKINGER; VELDHON, 2007) (Figura 2).

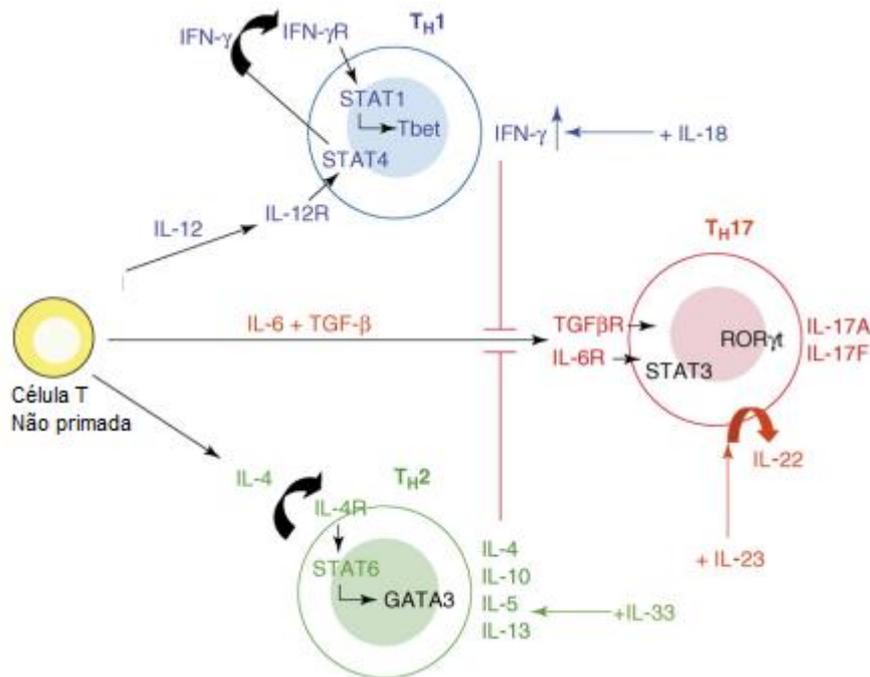


Figura 2: Representação da diferenciação das células T CD4⁺ não primadas nos subtipos Th1, Th2 e Th17.

Fonte: STOCKINGER; VELDHON, 2007.

1.6 RESPOSTA IMUNE NA ASCARIDIOSE LARVAL

A infecção por *A. lumbricoides* e *A. suum* pode ser dividida em duas fases distintas no hospedeiro: a primeira, denominada de infecção aguda ou ascaridiose larval, caracterizada pela migração das larvas pelo fígado e pulmões do hospedeiro, onde induzem uma intensa resposta inflamatória inata. A segunda fase, caracterizada pela cronicidade da infecção devido ao estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado; no lúmen intestinal os vermes adultos sobrevivem por um longo período e, são capazes de estimular constantemente o sistema imunológico (BRADLEY; JACKSON, 2004).

Estudos recentes da ascaridiose larval em modelo experimental murino, demonstraram que a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões induz uma resposta imune inata e adaptativa, caracterizada pelo aumento da produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (COOPER et al., 2000; PINEDA; RAMOS 2012; MAIZELS; HEWITSON; SMITH, 2012; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al.,

2013). No pico da migração das larvas pelos pulmões (sétimo ao oitavo dia da infecção), a elevada produção de IL-6 foi correlacionada com a proeminente infiltração de neutrófilos. Após a passagem das larvas pelo parênquima pulmonar, quando estas começam a migrar pelas vias aéreas, onde retornarão para o intestino delgado, o infiltrado neutrofílico é substituído por células mononucleares de origem mielóide, que coincide com a elevação gradual de IL-4 e TNF- α no tecido (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). No entanto, apesar de detectável no pulmão durante a migração das larvas, o papel das células da imunidade inata e os seus produtos, permanecem desconhecidos na ascaridiose larval.

Outro tipo celular amplamente relacionado às infecções por helmintos são os eosinófilos, esses são células da imunidade inata que, expressam vários TLR em sua superfície, dentre eles TLR2 e TLR4 (KITA, 2011), que têm a capacidade de se ligar a diferentes antígenos excretados/secretados por helmintos ou presentes em sua superfície. É um aspecto muito importante das infecções por *Ascaris* é a interação com as mucosas intestinais e pulmonares, onde a ligação entre os antígenos parasitários e receptores induz a liberação de uma série de mediadores inflamatórios que ativam granulócitos e os levam a produzir mediadores que dirigem a resposta imune para o tipo Th2, que é favorável à produção de IgA (PERRIGOUE; MARSHALL; ARTIS, 2018; MAGALHÃES et al., 2010; WONG; CHEUNG; LAM, 2007). Somado a isso, células da mucosa pulmonar expressam constitutivamente TLR4, contribuem para o aumento da produção de SIgA, sugerindo a participação deste receptor na produção de SIgA nesse órgão (SHANG et al., 2008) e na conseqüente eliminação dos parasitos.

Outro aspecto muito importante da interação entre o parasito e a mucosa pulmonar, onde ocorrem a ativação antigênica e a ação efetora da resposta imune inata, é a estimulação de tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) (WILEY et al, 2009; RANGEL-MORENO, 2011; HWANG et al, 2016). Esse tecido linfóide, apesar de inexistente em indivíduos saudáveis, durante processos infecciosos pulmonares, é induzido a partir do reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) por células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas (DC), macrófagos e por células especializadas do epitélio da mucosa. A partir daí as células epiteliais e células dendríticas foliculares liberam mediadores como a linfopoetina estromal tímica (TSLP), TGF- β , IL-10 e ácido retinóico. Estes fatores humorais ativam as células linfóides inatas (ILCs) que, por sua vez, ativam as células B foliculares, que produzirão IgA na mucosa. Além disso, IL-33 induz ativação de células B e, TGF- β e IL-5 agem sinergeticamente na produção de IgA (ARTIS; GRENCIS, 2008; CERUTTI, 2011).

Na fase crônica, a resposta imune contra os parasitos gastrointestinais é predominantemente do tipo Th2, marcada pela produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, por uma significativa eosinofilia periférica e tecidual, acompanhada por elevados níveis séricos de imunoglobulina E (IgE), um conjunto de mecanismos protetores da mucosa, como a secreção de muco e contratilidade do músculo liso intestinal e, ainda, pela baixa proliferação linfocitária e significativa modulação da atividade de citocinas típicas da resposta imune Th1 (COOPER et al., 2000; GEIGER et al., 2002; PATERSON et al., 2002; BRADLEY; JACKSON, 2004; JACKSON et al., 2004; DAWSON et al., 2005; O'SHIRO et al., 2006; MOLLER et al., 2007; DOLD; HOLLAND, 2011a; REINA et al., 2011). Desse modo, Turner e colaboradores (2003) sugeriram que as citocinas Th2 são importantes no controle das alterações

intestinais que tornam o ambiente do lúmen intestinal desfavorável para estabelecimento do verme adulto ao ponto de reduzir o número de vermes para que as consequências patológicas sejam mínimas.

Apesar da resposta Th2 polarizada na fase crônica, Cooper e colaboradores (2004) demonstraram que não existem evidências de diminuição da expressão de citocinas características da resposta Th1, como o IFN- γ , em crianças infectadas provenientes de áreas endêmicas, sugerindo a ocorrência de uma resposta sistêmica Th1/Th2 mista. Tal achado é análogo ao observado no início de infecções experimentais por *Ascaris* spp. bem como em infecções naturais e experimentais por outros geo-helminhos (COOPER et al., 2000; COOPER et al., 2004; GEIGER et al., 2007; GEIGER et al., 2011; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Além disso, Maizels e Balic (2004) e Jackson e colaboradores (2004), demonstraram que a resposta do tipo Th2 é crucial na fase aguda da infecção para a eliminação dos estágios larvais do parasito e que a citocina IL-5 tem uma forte correlação negativa com a reinfecção por *A. lumbricoides* em humanos.

Por outro lado, Souza e colaboradores (2004) demonstraram que as citocinas IL-4 e IL-10 são essenciais para a modulação da resposta celular tipo Th1 contra antígenos não relacionados à infecção, sugerindo que a infecção ativa por *Ascaris* sp. está associada à uma supressão inespecífica da resposta imune frente a outros estímulos. Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2016), demonstraram que a migração de larvas de *Ascaris* sp. nos pulmões de camundongos concomitantemente infectados por *Vaccinia virus*, modula negativamente a resposta imune celular específica ao vírus no tecido pulmonar, favorecendo a replicação viral, o que induz um aumento significativo na morbidade e mortalidade dos animais coinfectados. Contudo, aspectos da resposta imune na fase aguda da infecção experimental por *Ascaris* sp. restam ainda ser elucidados, sobretudo os mecanismos protetores associados a resposta do hospedeiro frente infecções repetidas e os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro.

2 JUSTIFICATIVA

A ascaridiose é a mais prevalente doença tropical negligenciada, atingindo mais de 800 milhões de pessoas (HOTEZ, 2010), com altas taxas de prevalências e intensidades de infecção associadas à pobreza aguda e à precárias condições sanitárias em países em desenvolvimento (WHO, 1987; SILVA et al. 1997a; BRENDALL et al. 2011; UMETSU et al. 2014; MILLER et al. 2015). E, apesar de a ascaridiose ser uma doença há muito tempo conhecida, como foi evidenciado pela presença de *Ascaris* sp. em populações medievais da República Checa (BARTOŠOVÁ et al., 2011), do leste asiático (OH et al., 2010) e em populações pré-Colombianas da América do Sul (LELES et al., 2008), ainda apresenta grande relevância epidemiológica impactando negativamente a saúde pública de áreas endêmicas.

Por outro lado, apesar da sua importância epidemiológica, pouco se conhece da fase inicial da doença, tendo em vista a dificuldade de diagnóstico inicial no hospedeiro natural. Desse modo, nas últimas décadas, um foco especial foi dado à fase tardia da ascaridiose, com a avaliação de aspectos imunológicos em indivíduos cronicamente infectados provenientes de áreas endêmicas. Como consequência, o conhecimento sobre a ascaridiose larval é ainda inicial, restando ainda muitas lacunas no conhecimento dos mecanismos que induzem resistência/susceptibilidade à infecção. Desse modo, descrever os aspectos imunobiológicos da ascaridiose larval em uma infecção primária e reinfecção, possibilita o entendimento do tipo de resposta imune inicial necessária para o controle da infecção, bem como, a caracterização dos mecanismos desenvolvidos pelo parasito para evadir a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente contribui para o conhecimento científico básico necessário que poderá ser traduzido no desenvolvimento de estratégias imunoproláticas, que visam interromper o ciclo de transmissão do parasito, pelo bloqueio da migração larval na fase aguda da infecção, impedindo o estabelecimento de vermes adultos.

Para o estudo da ascaridiose larval, o uso de modelo animal tem se mostrado eficiente no entendimento dos mecanismos da resposta imune e fisiopatologia, tanto da infecção primária, quanto após múltiplas exposições, onde foi evidenciado que após infecções por *A. suum* há um aumento de células mononucleares e granulócitos e, que apresenta um padrão de resposta imune misto Th1/Th2/Th17 (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al. 2013; NOGUEIRA et al. 2016). Todavia, estudos acerca dos mecanismos de evasão do sistema imunológico utilizados pelo parasito; a resposta imune e impacto no organismo nos indivíduos expostos múltiplas vezes à infecção, e ainda, os efeitos imunomoduladores de *Ascaris* sobre o hospedeiro ainda são escassos, tornando estudos nessa área extremamente relevantes.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos envolvidos na ascariíose larval e determinar o impacto de múltiplas exposições às larvas de *Ascaris suum*, na regulação da resposta imune celular e tecidual, bem como no controle da carga parasitária em modelo experimental murino.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a carga parasitária nos órgãos de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4, no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e nos receptores IL-17RA, TLR2 e TLR4, em diferentes tempos de infecção;

- Avaliar o impacto histopatológico da migração larval nos órgãos de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e no receptor IL-17RA, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

- Avaliar a função pulmonar de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e no receptor IL-17RA, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

- Avaliar a perfil de leucócitos (circulantes e nas vias aéreas) de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e nos receptores IL-17RA, TLR2 e TLR4, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

- Avaliar os níveis de proteína exsudada e de hemoglobina nas vias aéreas de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e nos receptores IL-17RA, no oitavo dia pós-infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

- Avaliar a atividade da mieloperoxidase de neutrófilos e peroxidase eosinofílica nos pulmões de camundongos primoinfectados e reinfectedos, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e nos receptores IL-17RA, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de citocinas sistêmicas e teciduais de camundongos primoinfectados e reinfectados, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes na produção de IL-4 e no receptor ST2 e no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes na produção de IFN- γ e no receptor IL-17RA, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

- Avaliar os níveis de SIgA no lavado broncoalveolar de camundongos primoinfectados e reinfectados, das linhagens BALB/c selvagens e geneticamente deficientes no fator de transcrição GATA1; e, de camundongos C57BL/6j selvagens e geneticamente deficientes nos receptores TLR2 e TLR4, em diferentes tempos de infecção, comparando-os aos respectivos não infectados;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Todas as atividades de pesquisas envolvendo modelo animal foram conduzidas de acordo com princípios éticos de boas práticas em experimentação animal, sendo que o projeto foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelos Protocolos de nº. 045/2012, nº 054/2012 e nº. 187/2014 (Anexo 12.1).

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para atingir os objetivos propostos neste trabalho, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, da linhagem BALB/c de estirpes selvagens e deficientes na produção de IL-4 (IL-4^{-/-}), no fator de transcrição GATA1 (GATA1^{-/-}) e, no receptor ST2 (ST2^{-/-}); e, da linhagem C57BL/6j de estirpes selvagens e deficientes na produção de IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) e nos receptores IL-17RA (IL-17RA^{-/-}), TLR2 (TLR2^{-/-}) e TLR4 (TLR4^{-/-}). Todos os camundongos estavam com oito semanas de idade no início dos experimentos.

Os camundongos foram mantidos nos biotérios do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar em gaiolas ventiladas até o dia da eutanásia, em local com boas condições de higiene, água e alimentação *ad libitum* e fotoperíodo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (controlado por temporizador digital), conforme preconização do CEUA.

4.3 OBTENÇÃO E EMBRIONAMENTO DOS OVOS

Esta etapa foi realizada de acordo com protocolo descrito por Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013). Brevemente, vermes adultos de *A. suum* foram recuperados de carcaças intestinais descartadas e doadas por um abatedouro de suínos, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As fêmeas foram separadas e dissecadas, os úteros das fêmeas adultas foram coletados, colocados em um cadinho de porcelana macerados mecanicamente para a liberação dos ovos. Em seguida, aos ovos foram adicionados cerca de 20 mL de PBS, homogeneizados e, por fim, purificados por filtração em tamis com telas de nylon de 100 μ m. Ao conteúdo resultante da filtração, foi colocado em garrafas de cultura contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ a 0,2 M) para o embrionamento dos ovos.

O embrionamento dos ovos foi induzido de acordo com metodologia descrita por Boes e colaboradores (1998), com algumas modificações. Suspensões contendo 25 ovos / μL foram preparadas em garrafas de cultura contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,2 M) e mantidas a 26°C em incubadora do tipo BOD (SP 50 RDE 35 Super) com oxigenação por agitação manual três vezes por semana.

Culturas de ovos com de aproximadamente 100 dias de incubação foram utilizadas para as infecções, uma vez que é o período de maior infectividade dos ovos (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013).

4.4 PREPARO DOS OVOS E INFECÇÃO EXPERIMENTAL

No dia das infecções, uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* (numa concentração de 25 ovos / μL em H_2SO_4 a 0,2 M) foi centrifugada por dez minutos, a 800 $\times\text{g}$ e em temperatura ambiente (T.A.), para a posterior remoção do ácido. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5 % e incubado por 120 minutos em estufa a 37°C e 5 % de CO_2 (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA). Após a incubação, o hipoclorito foi removido da solução após centrifugação por 10 minutos, a 800 $\times\text{g}$, em T.A., sendo descartado o sobrenadante. Posteriormente, foi adicionado água filtrada ao sedimento de ovos e nova etapa de centrifugação por 10 minutos, a 800 $\times\text{g}$, em T.A. O processo de lavagem foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em água filtrada e três alíquotas de 10 μL foram removidas da suspensão e usadas para a contagem de ovos larvados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por μL e determinar diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 0,2 mL.

A infecção foi realizada por via intragástrica de acordo com protocolo descrito por Lewis e colaboradores (2006). Basicamente, com o auxílio de uma agulha de gavage, foram inoculados 200 μL de uma suspensão contendo uma carga padrão de 2.500 ovos totalmente larvados, seguidos por 100 μL de água, seguindo os delineamentos experimentais estabelecidos para cada capítulo.

4.5 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - CAPÍTULO 1

O primeiro capítulo deste trabalho visou caracterizar e descrever os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos da ascaridiose larval após múltiplas exposições ao *A. suum*. Para isso, 90 camundongos BALB/c selvagens (provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO)

ICB/UFMG), foram, primeiramente, tratados com Ivermectina (Ouro Fino, Brasil) por via subcutânea (0,2 % / 20 mg de peso), seguido da realização de exame de fezes pelo método de HPJ 15 dias após o tratamento, para confirmar a ausência de qualquer infecção parasitária prévia. Confirmada a ausência de infecções, os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: não infectado (NI), os quais receberam três doses do PBS; primoinfectado (PI), sendo duas doses de PBS e uma dose contendo 2.500 ovos totalmente larvados de *A. suum* no último tempo de infecção; e reinfestado (RE), três doses contendo 2.500 totalmente larvados de *A. suum*, quinzenalmente (Figura 3).

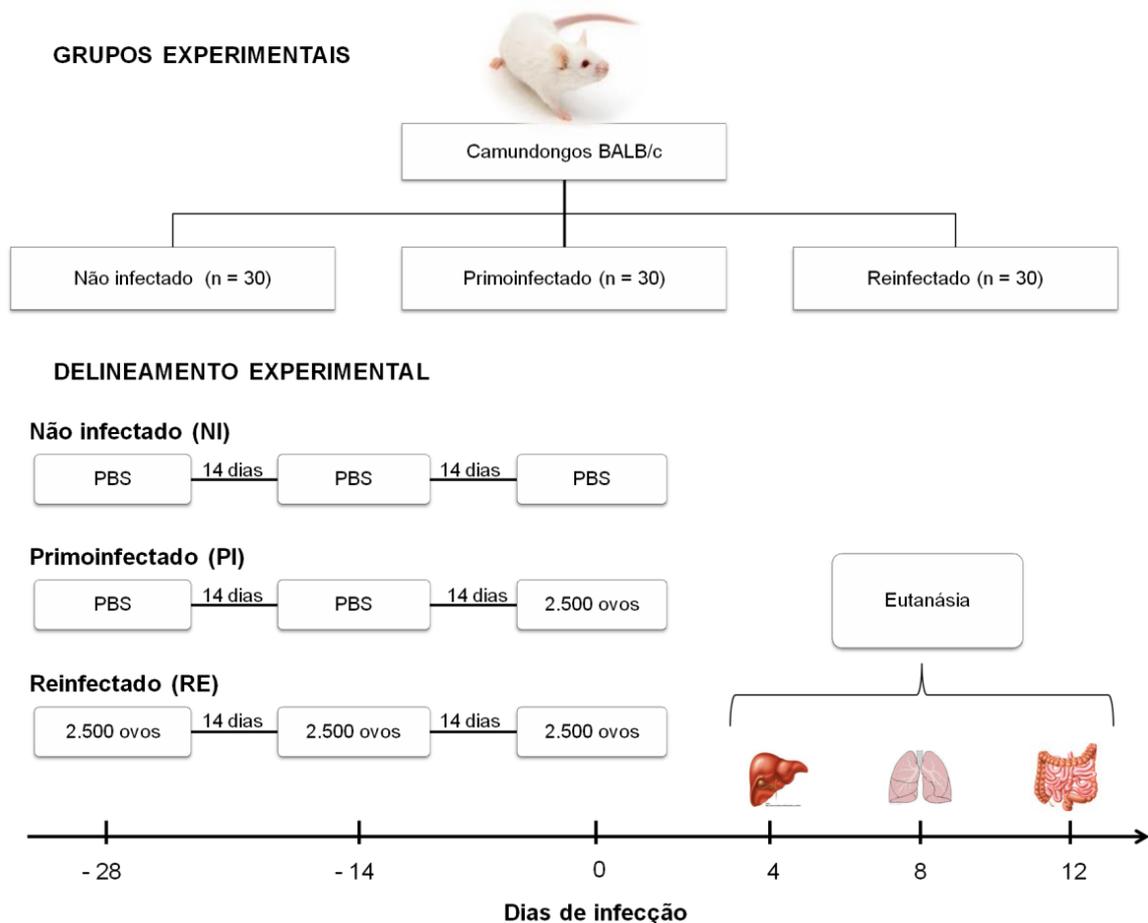


Figura 3: Delineamento experimental - Capítulo 1.

Os pontos de infecção e coleta de órgãos seguiram padronizações propostas em estudos anteriores (MASSARA; COSTA; CARVALHO, 1990; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013), em foi demonstrado que no quarto dia após a infecção ocorre o pico de recuperação de larvas pelo fígado; no oitavo dia após a infecção ocorre o pico de recuperação de larvas pelos pulmões; e, no 12º dia após a infecção ocorre o pico de recuperação de larvas no intestino delgado. Além disso, Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013) demonstraram que no 14º dia após a infecção, já não são encontradas larvas nos órgãos de camundongos, assim sendo, esse foi o intervalo adotado entre as reinfecções. Quanto

à eutanásia, recuperação e processamento dos órgãos, serão abordados mais adiante em tópicos específicos.

4.5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - CAPÍTULO 2

O segundo capítulo desse trabalho, visou elucidar os componentes e mediadores imunológicos envolvidos no controle da carga parasitária e fisiopatologia pulmonar durante a ascaridiose larval no oitavo dia pós-infecção, dando um enfoque nas respostas do tipo Th1, Th2 e Th17 e na participação dos neutrófilos e eosinófilos, utilizando o modelo padronizado no primeiro capítulo. Para isso, foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6j, de estirpes selvagens e deficientes.

Primeiramente, com o intuito de avaliar o papel da inflamação de perfil Th1 e Th17, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6j selvagens e os de estirpes deficientes em $IFN-\gamma^{-/-}$ e $IL-17RA^{-/-}$. Para a avaliação da resposta do tipo Th1, camundongos $IFN-\gamma^{-/-}$ e C57BL/6j selvagens utilizados como controles, foram cedidos pelo Instituto de Pesquisa René Rachou-FioCruz por intermédio da pesquisadora Dra. Soraya Gaze. Já com o intuito de avaliar o papel da inflamação de perfil Th17 foram utilizados camundongos da estirpe $IL-17RA^{-/-}$ cedidos pela professora Dra. Leda Quercia Vieira, Laboratório de Nutrição e Gnotobiologia ICB/UFMG e C57BL/6j selvagens como controles (provenientes do Biotério Central ICB/UFMG). Para os experimentos foram utilizados 144 camundongos, sendo 36 deficientes em $IFN-\gamma^{-/-}$, 36 deficientes em $IL-17RA^{-/-}$ e 36 selvagens controles para cada experimento. No início dos experimentos todos os camundongos foram divididos nos grupos: não infectado (NI), primoinfectado (PI) e reinfectado (RE), conforme apresentado na figura abaixo (Figura 4).

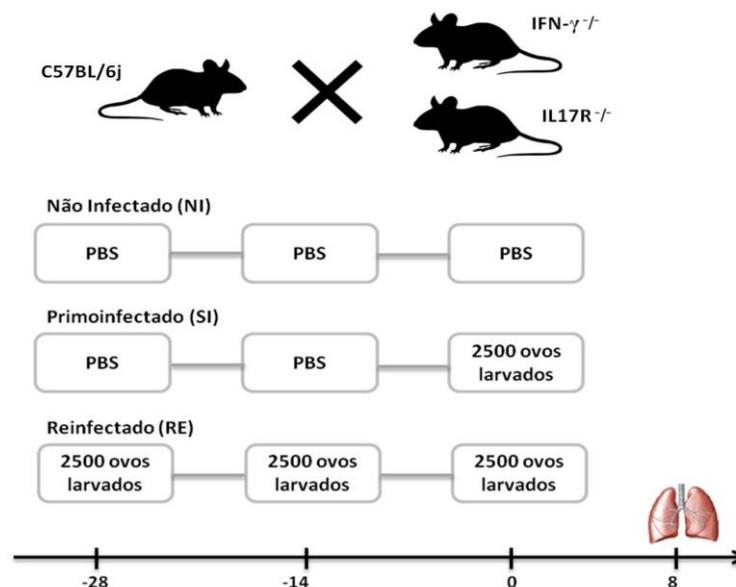


Figura 4: Delineamento experimental para a avaliação do papel da inflamação Th1/Th17 na ascaridiose larval.

E, a fim de elucidar os mecanismos da resposta imune Th2 na fase pulmonar da ascariíose larval, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c selvagens (provenientes do Biotério Central ICB/UFMG), e os de estirpe deficiente em IL-4^{-/-} (cedidos pela professora Dra. Déborah Aparecida Negrão-Corrêa, laboratório de Imunologia de Helmintos ICB/UFMG), e os da estirpe deficiente no receptor ST2 (ST2^{-/-}) (cedidos pelo professor Dr. João Santana da Silva, Departamento de Imunologia/USP - Riberão Preto). Para os experimentos foram utilizados um total de 144 camundongos, sendo 36 deficientes em IL-4^{-/-}, 36 deficientes em ST2^{-/-} e 36 selvagens que foram utilizados como controles dos experimentos. No início dos experimentos todos os camundongos foram divididos em grupos NI, SI e RE, conforme apresentado na figura abaixo (Figura 5).

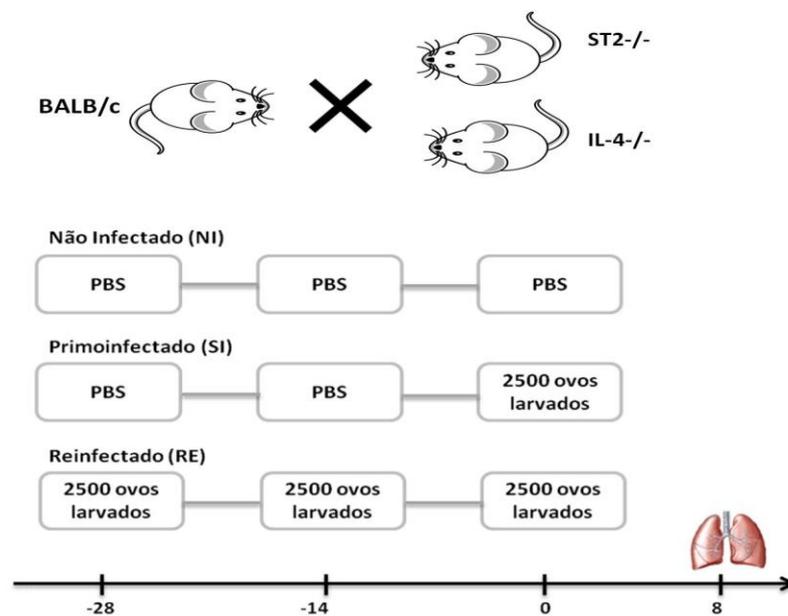


Figura 5: Delineamento experimental para a avaliação do papel da resposta Th2 na ascariíose larval.

4.5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - CAPÍTULO 3

O terceiro capítulo desse trabalho, visou avaliar os mecanismos nos quais os eosinófilos atuam na ascariíose larval pulmonar, bem como, avaliar a relação entre os receptores do tipo TLR2 e TLR4 com os eosinófilos e a produção de SIgA.

Para tal, inicialmente, foi realizada a avaliação da carga parasitária, celularidade nas vias aéreas, com enfoque nos eosinófilos e da produção SIgA em camundongos da linhagem C57BL/6j selvagem e de estirpes deficientes em nos receptores TLR2 (TLR2^{-/-}) e TLR4 (TLR4^{-/-}), que foram cedidos pelo Instituto de Pesquisa René Rachou-FioCruz por intermédio da pesquisadora Dra. Soraya Gaze. Foi utilizado um total de 36 camundongos machos, com idade de oito semanas no início dos experimentos. Os animais de cada linhagem foram divididos em dois grupos: não infectado (NI), que receberam uma dose de PBS e, primoinfectados (PI) que recebeu uma dose de 2.500 ovos totalmente

larvados. Oito dias após a infecção, todos os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do BAL para contagem de células inflamatórias e dosagens de SIgA das vias aéreas e, coleta do pulmão para avaliação da carga parasitária (Figura 6).

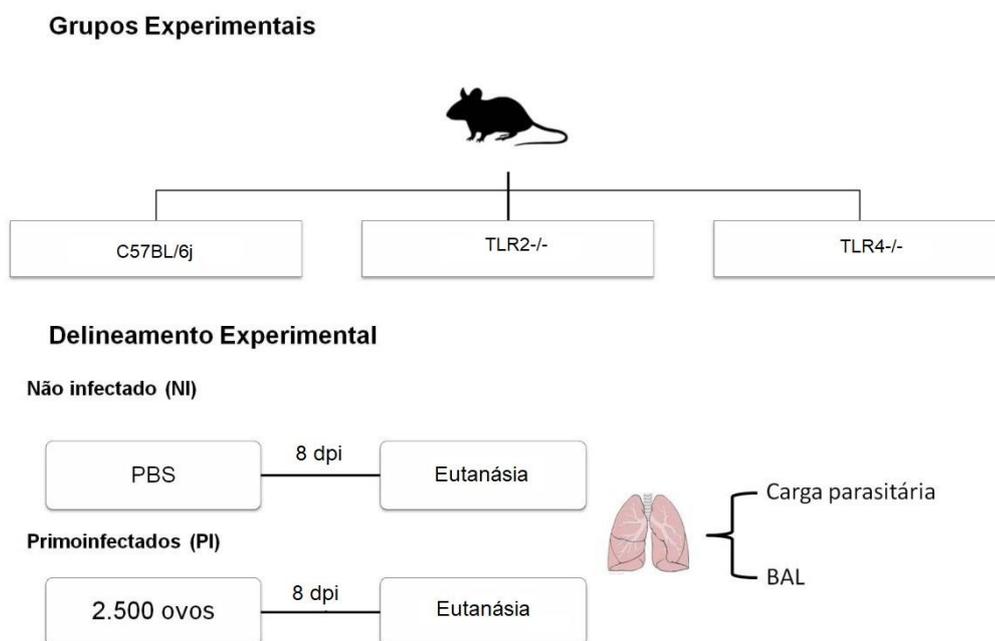


Figura 6: Delineamento experimental usado para avaliar a participação dos receptores TLR2 e TLR4 na ascarirose larval.

Para avaliar a variação cinética no aumento no número de eosinófilos e na produção de SIgA na mucosa pulmonar e a sua contribuição no controle da carga parasitária nos pulmões, foram infectados 52 camundongos BALB/c selvagens (provenientes do Biotério Central ICB/UFMG), que foram divididos em dois grupos, sendo: 10 camundongos não infectados (NI) e 42 camundongos primoinfectados (PI). Foram estabelecidos sete tempos de infecção (T0, T2, T4, T6, T8, T10 e T12), sendo que no primeiro tempo experimental (T0) foi realizada a administração de 200 µL de solução contendo aproximadamente 2.500 ovos larvados de *A. suum* no grupo primoinfectado e, 200 µL PBS no grupo não infectado. Posteriormente, do segundo (T2) ao 12º dia pós-infecção (T12) foram realizadas as eutanásias dos camundongos. Dos tempos T2 ao T12 foram eutanasiados sete camundongos PI em cada tempo. Os camundongos não infectados foram eutanasiados apenas nos tempos T2 e T12 (Figura 7). Após a eutanásia, foi realizada a coleta do BAL em todos os tempos e, seguida da avaliação da carga parasitária nos pulmões, que serão descritas mais adiante.

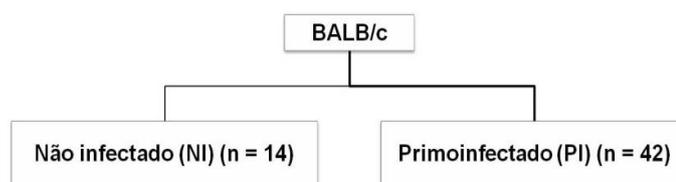
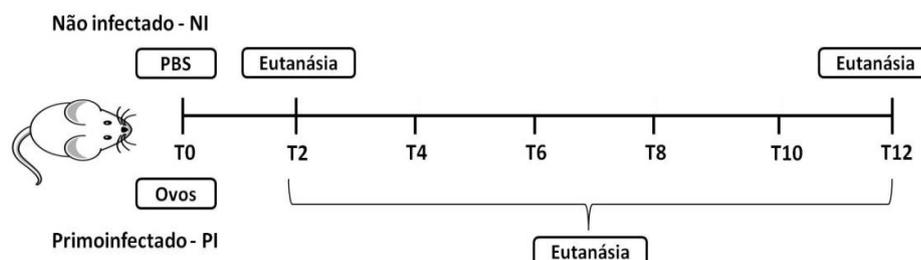
Grupos experimentais**Delineamento experimental**

Figura 7: Delineamento experimental para a avaliação cinética da carga parasitária nos pulmões, do número de eosinófilos e produção de SIgA no BAL na ascariíose larval primária.

Com o intuito de avaliar o papel dos eosinófilos na fase pulmonar da ascariíose larval, durante a primoinfecção e a reinfecção, foram realizadas infecções experimentais em camundongos BALB/c selvagens e de estirpe deficiente na diferenciação de eosinófilos devido à mutação no fator de transcrição GATA 1 ($GATA1^{-/-}$), sendo que 30 camundongos foram cedidos pela professora Dra. Déborah Aparecida Negrão-Corrêa, do laboratório de Imunologia de Helminhos ICB/UFMG, para a realização de um experimento piloto. Os demais camundongos foram cedidos pelo professor Dr. Remo de Castro Russo, do laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar ICB/UFMG, para as posteriores avaliações. Os camundongos BALB/c selvagens utilizados como controles dos experimentos foram adquiridos do Biotério Central ICB/UFMG. Foram utilizados um total de 144 camundongos machos, com idade de oito semanas no início dos experimentos. Foram realizados dois experimentos como repetição, sendo que em cada experimento foram utilizados 36 camundongos da linhagem BALB/c de estirpe selvagens e 36 camundongos da estirpe $GATA1^{-/-}$. A fim de contemplar os objetivos propostos, os camundongos BALB/c e $GATA1^{-/-}$ foram divididos nos seguintes em grupos: não infectados (NI), primoinfectados (PI) e reinfectedos (RE), contudo, com enfoque na avaliação da fase pulmonar no oitavo dia pós-infecção (Figura 8).

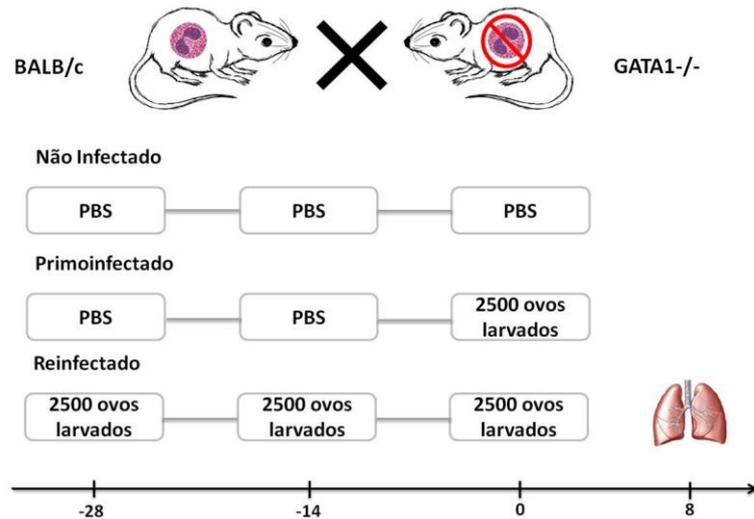


Figura 8: Desenho experimental para a avaliação do papel de eosinófilos na ascariíose larval.

4.6 COLETA E PROCESSAMENTO DO SANGUE, ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO

Coletas de sangue foram realizadas em todos os tempos experimentais. Basicamente, 500 μ L de sangue foram coletados do plexo retro-orbital de cada camundongo utilizando uma pipeta Pasteur capilar sem anticoagulante. O sangue coletado foi transferido para microtubos para coagulação, seguido por centrifugação e coleta dos soros que foram armazenados em -80°C para posteriores análises.

Para análise hematológica, 100 μ L do sangue coletado foi transferido para tubos contendo o anticoagulante EDTA. A contagem global de leucócitos foi realizada em contador hematológico automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). Para a determinação do número relativo e absoluto de leucócitos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo, coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e, posteriormente, contadas em microscopia óptica.

Para a determinação do número relativo de cada população celular: linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, foi realizada pela contagem diferencial de 100 células por esfregaço sanguíneo. O número absoluto de cada população celular foi calculado utilizando o número global de leucócitos.

4.7 PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA PARA AS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS, COLETA DE BAL, COLETA DE ÓRGÃOS E ANÁLISES DE CARGA PARASITÁRIA

Basicamente, nos tempos estabelecidos em cada delineamento experimental para as eutanásias, os camundongos receberam uma dose de anestésico geral (cetamina 120 mg / kg e xilazina

45 mg / kg) pela via intraperitoneal, em seguida, a eutanásia se deu por hipovolemia através da coleta de sangue do plexo retro-orbital nos animais anestesiados.

Todavia, é importante ressaltar que para a avaliação da função pulmonar, os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de anestésico (8,5 mg / kg de xilazina e 130 mg / kg de cetamina) para a manutenção da respiração espontânea e, posteriormente à essa avaliação, foi realizada a eutanásia por hipovolemia, como será descrito mais detalhadamente no item 4.14.

4.8 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO BAL

Após a eutanásia, foi realizada em cada animal, dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18 G x 1¼", Termo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1 mL de PBS filtrado a 4°C. O líquido recuperado, num volume final de 2 mL, foi mantido a 4°C até o processamento.

4.8.1 PROCESSAMENTO DO BAL

O BAL coletado foi imediatamente passado em um filtro celular de 40 µm de diâmetro (BD Biosciences) para remoção das larvas presentes no lavado e recolhido em um tubo, previamente identificado. Em seguida, o filtrado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 600 xg em 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado em -80°C para a quantificação de proteína total, hemoglobina e SIgA total e específico para antígenos de *A. suum*.

Posteriormente, o sedimento do BAL resultante do processamento, foi suspenso com 100 µL de PBS contendo 3 % albumina sérica bovina (BSA). Uma alíquota foi removida para obtenção da contagem global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5x10⁴ células / mL. O volume ajustado foi, então, centrifugado por cinco minutos, a 135 xg e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). Lâminas obtidas após citocentrifugação foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e usadas para a contagem diferencial de leucócitos. Em cada lâmina foram contadas 400 células e o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado.

Larvas retidas no filtro celular, durante processamento foram recuperadas pela lavagem dos filtros com 10 mL de PBS seguido de centrifugação por 10 minutos a 800 xg em T.A. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso com 10 mL de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenado para posterior contagem em microscópio óptico, do número de larvas recuperadas nas vias aéreas.

4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO BAL

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicinônico usando kit comercial (Pierce, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de densidade óptica (OD) das amostras foram interpolados para se determinar a concentração de proteínas nas mesmas. Os resultados foram expressados por μg ou pg de proteína total por mL de BAL.

4.10 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA NO BAL

A concentração de hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico usando-se o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm contra solução de Drabkin, modificada (Labtest Diagnóstica). O padrão de hemoglobina (Labtest Diagnóstica) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de O.D. das amostras para se determinar a concentração das mesmas (GUABIRABA et al., 2013). Os resultados foram expressos por μg ou pg de proteína total por mL de BAL.

4.11 PREPARO DE ANTÍGENO LARVAL

A eclosão de larvas presentes em ovos embrionados obtidos de culturas com mais de 100 dias foi induzida de acordo metodologia previamente descrita (BOES, 1998), com algumas modificações. A cultura das larvas foi realizada conforme previamente descrito (TEIXEIRA-CARVALHO, et al. 1998). Resumidamente, uma alíquota da suspensão de ovos embrionados foi centrifugada por 10 minutos, à T.A. e 3.000 xg. 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, Thermo Scientific, EUA). Em seguida a suspensão foi submetida a três processos de lavagem (adição de PBS seguida de centrifugação por 5 minutos, 4.000 xg 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. 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 sonicado a 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre cada ciclo, totalizando 10 ciclos. Após a sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 800 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante então foi

coletado e as proteínas totais dosadas utilizando o kit comercial BCA (Pierce, EUA), conforme as instruções do fabricante.

Após a dosagem, o antígeno foi coletado, aliquotado e congelado a -80°C , para ser usado nos experimentos de quantificação de SIgA específica no BAL.

4.12 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICO PARA AVALIAÇÃO DE SIgA TOTAL E ESPECÍFICA NO BAL

Para determinar os níveis de SIgA total, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com $0,5\ \mu\text{g} / \text{mL}$ de Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-UNLB (Southern Biotechnology Associate Inc., EUA). Já para avaliação de SIgA específica, as microplacas foram sensibilizadas com $1\ \mu\text{g} / \text{mL}$ de antígeno larval. Ambos reagentes foram diluídos em tampão carbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas por no mínimo 24 horas a 4°C e, então, as placas foram lavadas oito vezes com PBS contendo 0,05 % Tween-20 (SIGMA Chemical Co. EUA). O bloqueio foi realizado à T.A. por, no mínimo, uma hora com PBS + BSA 3 % (Fitzgerald Industries, EUA).

As amostras (BAL) foram diluídas em PBS-BSA contendo inibidor de protease (PMSF 100 Mm, Sigma Aldrich, EUA) e incubadas por uma hora, à T.A. Em seguida as amostras foram adicionadas às placas e incubadas por no mínimo 24 horas a 4°C . Nova etapa de lavagem foi realizada e as placas incubadas a 37°C durante 1 hora com anti-IgA de camundongo biotinizada ($0,5\ \mu\text{g} / \text{mL}$, Southern Biotechnology Associate Inc.). As placas foram novamente lavadas e incubadas, por 1 hora e ao abrigo da luz, com uma solução de estreptavidina conjugada a HRP (Horseradish Peroxidase) (Streptavidin-HRP, R&D Systems, EUA).

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 % H_2O_2) diluído em tampão citrato pH 5,0. Ao final, foram adicionados $50\ \mu\text{L}$ de uma solução de ácido sulfúrico ($2\text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$) e a intensidade da reação foi determinada no comprimento de onda $492\ \text{nm}$ 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 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 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).

4.13 ANÁLISE DA CARGA PARASITOLÓGICA TECIDUAL

Para determinação da carga parasitária, as larvas foram recuperadas do fígado, pulmões e intestino delgado. Os tecidos foram coletados, picotados extensivamente com tesoura e colocados em aparato de Baermann-Moraes modificado, onde permaneceu durante no mínimo 4 horas na presença de PBS 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 xg em T.A. Os sobrenadantes foram reduzidos a aproximadamente 2 mL e acrescentados 10 mL de solução tamponada de formaldeído a 4 %. Nova etapa de centrifugação foi realizada, os volumes os sobrenadantes foram reduzidos para 2 mL, homogeneizados e armazenados para posterior contagem em microscópio óptico, do número total de larvas recuperadas.

4.14 AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO PULMONAR: ESPIROMETRIA, COLETA DO PULMÃO PARA HISTOPATOLOGIA

A avaliação da função e fisiologia pulmonar em camundongos infectados e reinfectedos foi realizada por espirometria no Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG. Basicamente, os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de cetamina e xilazina (8,5 mg / kg de xilazina e 130 mg / kg de cetamina) para a manutenção da respiração espontânea. Após anestesiados, os camundongos foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia e uma pequena incisão foi feita para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, USA).

Este aparelho laboratorial, especificamente projetado para uso em camundongos, tem apenas um volume de cânula (espaço de morte) de 0,8 mL e fornece semi-automaticamente três manobras diferentes: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência respiratória média de 160 inspirações/minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (VANOIRBEEK et al., 2010). Para determinar a capacidade residual funcional (FRC), a ventilação foi parada ao final da expiração com um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a conseqüente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC (Lei de Boyle).

Durante a respiração mecânica, na função RC foram detectadas a complacência dinâmica (Cdyn) e resistência (RI). Para medir a capacidade vital forçada (FVC) e a capacidade inspiratória (IC), foi realizada a manobra de pressão-volume quasi-estática, que infla os pulmões para uma pressão

padrão de +30 cm H₂O e depois exala lentamente até uma pressão negativa de -30 cm de H₂O. A complacência quasi-estática (de 0 a +10 cm H₂O) foi calculada com esta manobra considerando o volume/pressão da expiração. Nas manobras rápidas de fluxo-volume, os pulmões foram inflados até +30 cm H₂O (TLC) e, imediatamente, a pressão foi diminuída para -30 cm H₂O até atingir a sua capacidade residual. O volume expiratório forçado (FEV) foi registrado durante esta manobra.

Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

Após a realização da avaliação da função pulmonar por meio da espirometria, os animais foram eutanasiados por hipovolemia, como descrito anteriormente e, o tecido pulmonar coletado para posteriores análises.

4.15 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS HEPÁTICO E PULMONAR

Para a análise histológica do fígado e pulmão, os órgãos foram removidos no quarto e oitavo dia pós-infecção e foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth, Brasil) em PBS por 72 horas. Posteriormente, os tecidos foram processados em álcool e xilol, incorporados em parafina, em seguida foram obtidos cortes de 4 µm de espessura com os quais foram montadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E).

A gravidade da lesão hepática foi avaliada pelo cálculo de todas as áreas de inflamação e necrose por análise morfométrica. As lesões hepáticas foram avaliadas através de um microscópio óptico Carl Zeiss Axiolab com a objetiva de aumento 10x e as imagens foram capturadas utilizando uma microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tóquio, Japão). A área de lesões foi medida em µm² usando o software KS300 acoplado ao analisador de imagem Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha). Todos os slides foram digitalizados pelo scanner Canon Lide 110 com resolução de 300 dpi. Os pixels de cada secção histológica foram totalmente rastreados, com subsequente criação de uma imagem binária e cálculo da área total do corte. A área menor área de corte foi utilizada como padrão mínimo de tecido a ser analisado estatisticamente (COSTA et al., 2007).

Para a análise histológica dos pulmões, os órgãos foram removidos no oitavo dia pós-infecção sendo que o lóbulo esquerdo foi fixado em solução tampão de formaldeído a 10% (Synth, Brasil) em PBS por 72 horas. Posteriormente, os tecidos foram processados em álcool e xilol, incorporados em parafina, em seguida foram obtidos cortes de 4 µm de espessura com os quais foram montadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E) intensidade da inflamação pulmonar e da hemorragia e Tricrômico de Gômori para quantificação morfométrica da fibrose. Os tecidos foram analisados utilizando o software KS400 acoplado a um analisador de imagem Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).

Para avaliar a intensidade da inflamação pulmonar e da hemorragia, foi calculado o grau de espessamento dos septos interalveolares e para calcular a área de fibrose foi calculada a área marcada

pelo Tricrômico de Gômori. Quarenta imagens aleatórias foram capturadas com a objetiva de aumento 20x, compreendendo uma área de $3,2 \times 10^6 \text{ mm}^2$ de pulmão analisado. Usando o software KS300, todos os pixels do tecido pulmonar na imagem real foram selecionados para criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em mm^2 do septo interalveolar e fibrose (RODRIGUES-MACHADO et al., 2010; PRATA et al., 2016).

Imagens representativas dos pulmões de camundongos BALB/c e C57BL/6j não infectados, controles dos experimentos apresentados no capítulo 2 estão disponíveis em anexo na seção 12.2.

4.16 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS E TECIDUAIS

Para a avaliação do perfil de citocinas no tecido pulmonar, 100 mg de tecido pulmonar foram homogeneizados em 1.000 μL de PBS tamponado com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO_4) suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinin A) e 0,05% de Tween 20. Os homogenatos foram centrifugados a 8.000 $\times g$, durante 10 minutos em 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas.

A produção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF foi avaliada por citometria de fluxo (Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array, BD Biosciences, USA) utilizando um FACScan (BD Biosciences, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante. As citocinas IL-5 e IL-13 foram dosadas utilizando kit de ELISA sanduíche (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm. Densidades ópticas (OD) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg / mL) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de OD em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL).

4.17 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE EOSINÓFILOS E NEUTRÓFILOS NO TECIDO PULMONAR

A avaliação da ativação de eosinófilos e de neutrófilos foi feita pela determinação dos níveis das peroxidases provenientes destas células imunes (peroxidase eosinofílica-EPO e Mieloperoxidase de neutrófilos-MPO, respectivamente). A quantificação de EPO e MPO foi realizada nos homogenatos de tecido pulmonar e foram medidos de acordo com um método descrito por Strath e modificado por Silveira (STRATH et al., 1985; SILVEIRA et al., 2002). Após a homogeneização dos tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA), o homogenato tecidual foi centrifugado a 1.500 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C e o sedimento resultante foi utilizado para determinar a atividade de EPO e MPO.

4.17.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EPO

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 μL de PBS e 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e depois congelado e descongelado três vezes utilizando nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado (1.500 $\times g$, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante foi distribuído numa microplaca de 96 poços (75 μL / poço) (Corning, EUA) seguido pela adição de 75 μL de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM H_2O_2 em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0). Após incubação durante 30 minutos em T.A., a reação foi interrompida pela adição de 50 μL de ácido sulfúrico (2M H_2SO_4) e a absorbância foi determinada a 492 nm.

4.17.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MPO

Para o ensaio MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200 μL de solução tampão 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M Na_3PO_4 , 0,015 M Na_2EDTA , pH 4,7) seguido de centrifugação (1500 $\times g$, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado, em seguida adicionado ao sedimento 800 μL de solução tampão 2 (0,05 M NaPO_4 , brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%), a mistura foi homogeneizada e depois congelada e descongelada três vezes utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (1500 $\times g$, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25 μL da solução foram distribuídos em cada poço em microplacas de 96 poços (Corning, EUA) seguido pela adição de 25 μL de substrato TMB (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina + dimetilsulfóxido 1,6 mM) e 100 μL de 0,5M H_2O_2 . Após incubação de cinco minutos em T.A., a reação foi interrompida a pela adição de 100 μL de ácido sulfúrico (2M H_2SO_4). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (MolecularDevices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc., EUA). O teste de Grubb foi utilizado para detectar os possíveis *outliers* nas amostras. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados.

Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para análises de variâncias entre três ou mais grupos, com apenas uma variável qualitativa, os testes One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (dados paramétricos), ou os testes de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns (dados não-paramétricos). Para análises de variâncias três ou mais grupos, com duas ou mais variáveis qualitativas, foram

utilizados os testes de Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Para verificar e quantificar a existência de relação entre variáveis foi aplicado o teste de correlação linear de Pearson (dados paramétricos), ou o teste de correlação em postos de Spearman (dados não paramétricos). Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

5. CAPÍTULO 01:

MÚLTIPLAS EXPOSIÇÕES AO *ASCARIS SUUM* INDUZ LESÃO TECIDUAL E UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA MISTA TH2/TH17

Publicado: *Nogueira DS et al (2016) Multiple Exposures to Ascaris suum Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. PLoS Negl Trop Dis 10(1): e0004382. (Anexo 2)*

5.1 RESULTADOS

5.1.1 A REINFECÇÃO POR *A. SUUM* ESTÁ ASSOCIADA A UMA REDUÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A MIGRAÇÃO LARVAL PELOS PULMÕES

Tendo como base estudos anteriores, o primeiro capítulo desse trabalho, primeiramente, visou investigar se múltiplas exposições ao *A. suum* influenciam no número de larvas recuperadas do fígado, pulmões e intestino delgado. Por meio da infecção de camundongos BALB/c, foi verificado que embora não haja diferença no número de larvas recuperadas no fígado dos animais primo e reinfectados após quatro dias de infecção (Figura 9A) e nos pulmões no sexto dia pós-infecção (Figura 9B), o grupo reinfectado apresentou uma redução significativa no número de larvas recuperadas dos pulmões e das vias aéreas quando comparado ao grupo primoinfectado no oitavo dia pós-infecção (Figura 9C e 9D). Não houve diferença no número de larvas recuperadas no intestino de animais primoinfectados e reinfectados no 12º dias pós-infecção (Figura 9E).

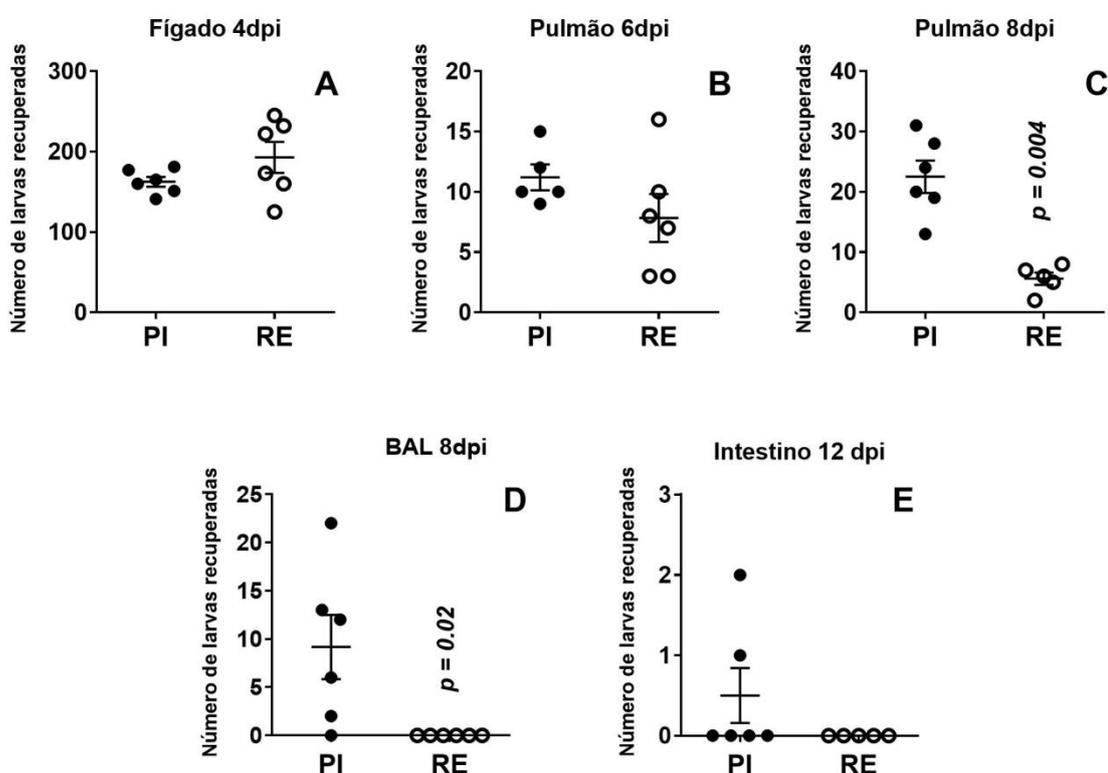


Figura 9: Número de larvas recuperadas dos órgãos de camundongos BALB/c selvagens. A) Fígado no quarto dia pós-infecção. B) Pulmões no sexto dia pós-infecção. C) Pulmões no oitavo dia pós-infecção. D) Vias aéreas no oitavo dia pós-infecção. E) intestino delgado no 12º dia pós-infecção. Círculos fechados representam animais do grupo primoinfectado (PI); Círculos abertos representam animais do grupo reinfectado (RE). O teste Mann-Whitney U foi usado para calcular as diferenças entre os grupos e essas são representadas nos gráficos pelos valores de p .

5.1.2 A REINFECÇÃO POR *A. suum* INDUZ UMA INTENSA INFLAMAÇÃO TECIDUAL QUE PODE ESTAR ASSOCIADA AO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA NOS PULMÕES, MAS CONSEQUENTEMENTE PREJUDICA A FUNÇÃO PULMONAR

Uma vez comprovado que exposições múltiplas ao *A. suum* induzem proteção, uma vez que foi evidenciada uma significativa redução da carga parasitária nos pulmões, o padrão de lesões foi avaliado por meio da análise histopatológica e, embora não houvesse diferença no número de larvas recuperadas do fígado no quarto dia pós-infecção entre animais dos grupos primoinfectado e reinfectado, o último apresentou maior área de lesão causada pela migração de larvas e inflamação, quando comparado ao grupo primoinfectado (Figura 10G). Na análise microscópica do parênquima hepático, as áreas com necrose de hepatócitos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear - composto principalmente de eosinófilos e neutrófilos - foram observados no grupo primoinfectado (Figura 10C e 10D); contudo, esses achados foram ainda mais acentuados no grupo reinfectado, no qual granulomas também estavam presentes (Figura 10E e 10F).

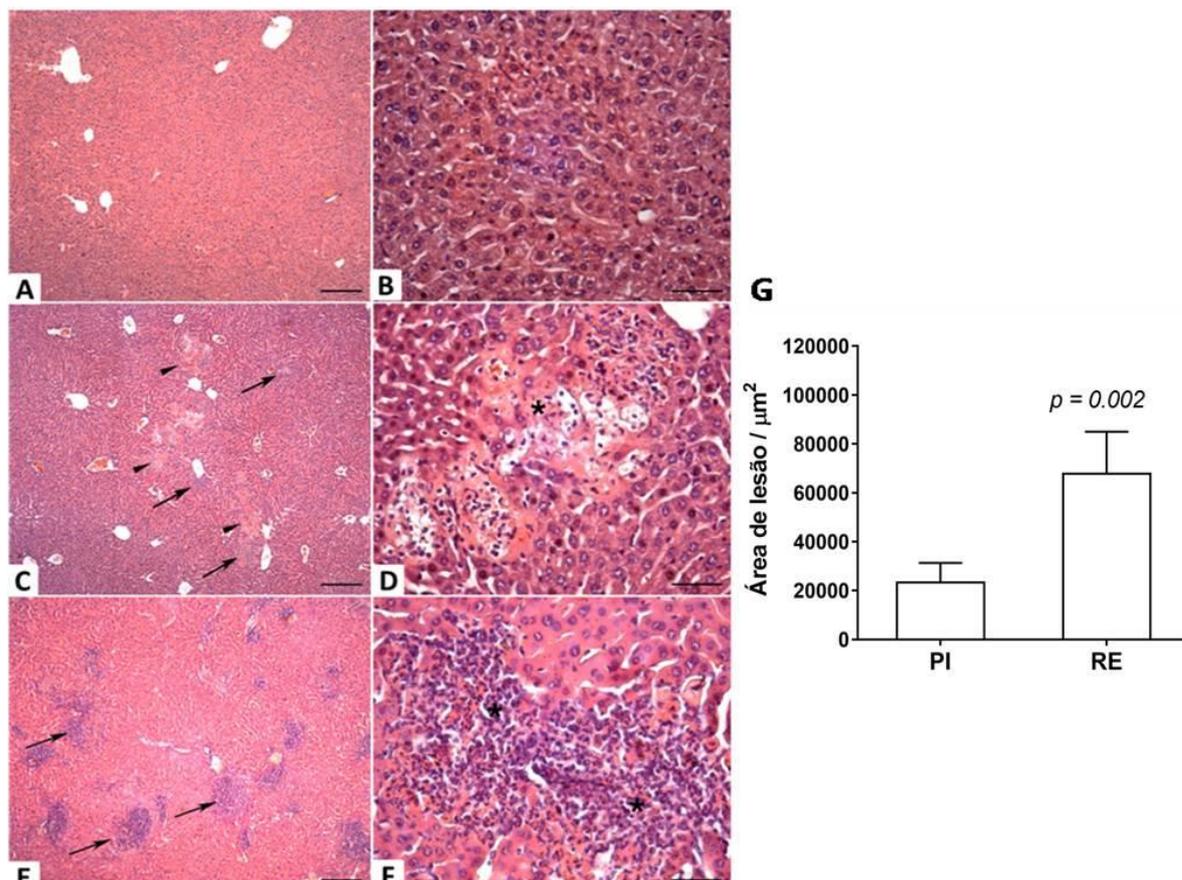


Figura 10: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval no fígado no quarto dia pós-infecção e área de lesão tecidual. A e B) Camundongo não infectado. C e D) Camundongo primoinfectado com presença de necrose (pontas de setas) e infiltrado inflamatório (setas). E e F) Camundongo reinfectado com presença de intenso infiltrado inflamatório (setas) e áreas de necrose (*). Barra de escala da menor ampliação = 50 µm. Barra de escala da maior ampliação = 200 µm. G) Área de lesão causada pela migração larval. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos que é representada pelo valor de p no gráfico.

Após o pico da migração hepática no quarto dia pós-infecção, a avaliação no pico de migração das larvas no tecido pulmonar revelou que os animais de ambos os grupos infectados apresentaram lesões microscópicas no parênquima pulmonar. Tais lesões foram caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório, constituído principalmente de leucócitos polimorfonucleares, sobretudo de eosinófilos, e pelo espessamento dos septos interalveolares quando comparados aos animais não infectados (Figura 11A-11F). Apesar da redução significativa da carga parasitária no grupo reinfectado, a área de lesão pulmonar foi consideravelmente maior nos animais desse grupo quando comparado ao primoinfectado (Figura 11G). Notou-se também que o espessamento dos septos foi menos pronunciado nos animais do grupo primoinfectado (Figura 11C e 11D) em comparação ao grupo reinfectado (Figura 11E e 11F), sugerindo que múltiplas exposições levam a lesão pulmonar crônica associada com o remodelamento tecidual, enquanto que a primoinfecção foi associada à lesão aguda, com o rompimento de vasos e hemorragia, provocados pela migração de maior número de larvas.

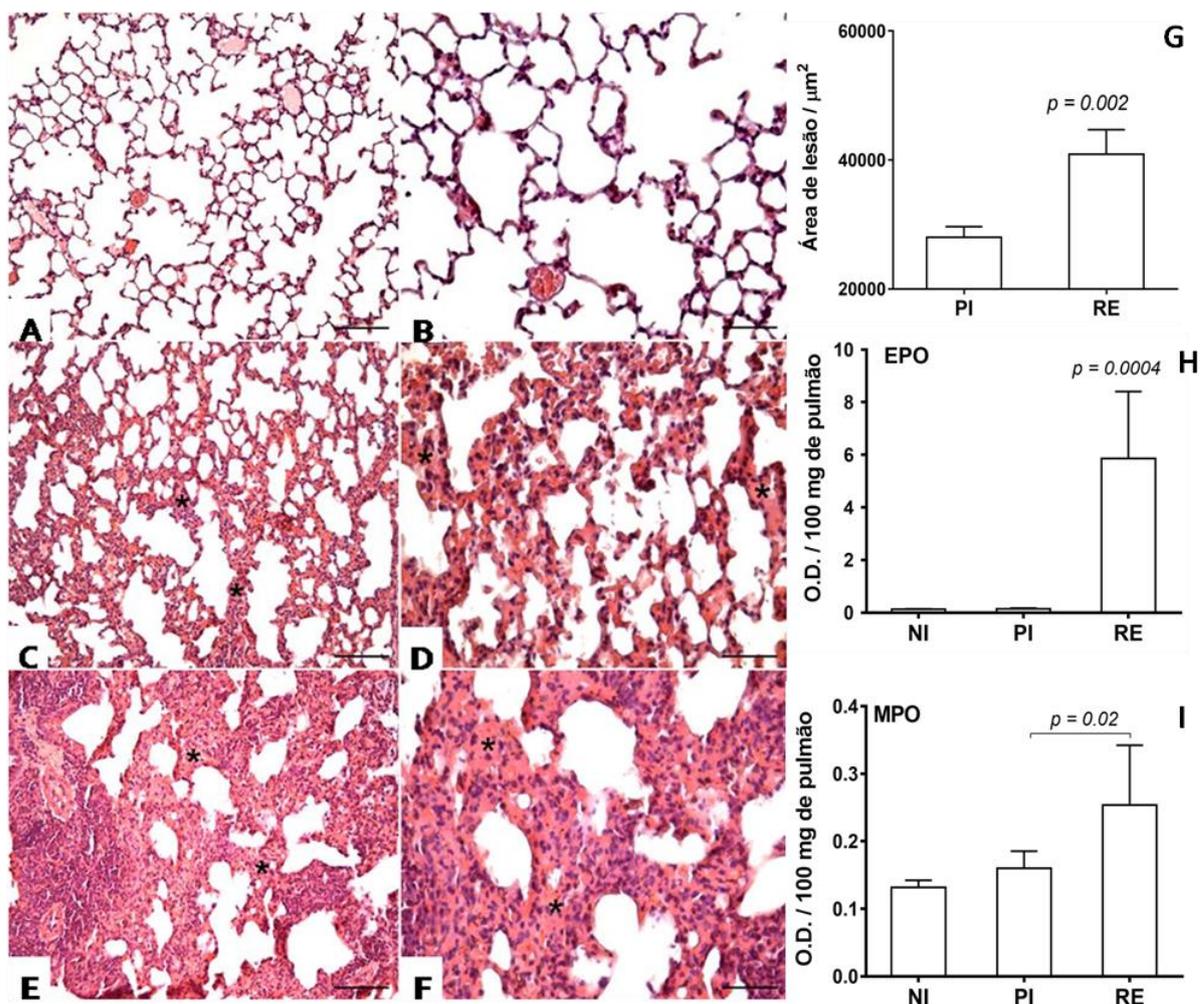


Figura 11: Imagens representativas das lesões histopatológicas, área da lesão e atividade de EPO e MPO no oitavo dia pós-infecção. A e B) Camundongo não infectado. C e D) Camundongo primoinfectado com leve espessamento de septos às custas de infiltrados inflamatórios, hiperemia e hemorragia (*). E e F) Camundongo reinfectado com infiltrado inflamatório, hiperemia intensa e hemorragia, causando espessamento extenso do septo (*). Barra de escala da menor ampliação = 50 µm. Barra de escala da maior ampliação = 100 µm. G) Área da lesão causada pela migração larval e inflamação no pulmão. O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. H-I) Níveis da atividade de MPO e EPO no pulmão oitavo dia pós- infecção. H) Níveis da atividade EPO no pulmão. I) Níveis da atividade MPO no pulmão. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os valores de p nos gráficos representam as diferenças significativas.

Tendo verificado a presença do infiltrado inflamatório misto, com predominância de polimorfonucleares, o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado pela dosagem da atividade de EPO e MPO, que indicou uma maior atividade dessas células nos animais reinfectados no oitavo dia pós-infecção (Figura 11H e 11I). Em conjunto, esses dados indicam que a reinfeção por *A. suum* induz uma resposta imune crônica e robusta na fase pulmonar, relacionada ao aumento dos danos teciduais e proteção contra progressão do ciclo parasitário.

Seguindo com a avaliação das modificações fisiológicas na função pulmonar foram analisadas por meio da técnica de espirometria forçada em respirador mecânico no oitavo dia pós-infecção (Figura 12). O teste pulmonar detecta diferentes tipos de parâmetros fisiológicos em pulmões de camundongos:

(i) avaliação da perda de volume pulmonar em função da lesão tecidual, causada principalmente por edema e aumento espessura das vias aéreas, é demonstrado pela Capacidade Vital Forçada (Figura 12A) e Capacidade Inspiratória (Figura 12B). (ii) avaliação das propriedades elásticas do tecido pulmonar, trata-se da capacidade do pulmão de se esticar e expandir mensurada pela complacência ($\text{Complacência} = \Delta\text{Volume}/\Delta\text{Pressão}$), que é avaliada como Complacência Pulmonar Estática (Cchord) (variação no volume para qualquer pressão aplicada dado o ponto de uma curva de 0 a +10 cm H₂O) (Figura 12C) e Complacência Pulmonar Dinâmica (Cdyn), que é a complacência do pulmão a qualquer momento durante o movimento real do ar (Figura 12D); (iii) Volume Expiratório Forçado a 100 msec (FEV100), que é o volume exalado durante os primeiros 100 milissegundos de uma manobra expiratória forçada iniciada a partir do nível de capacidade pulmonar total (é o índice padrão para avaliar e quantificar o fluxo de ar para os pulmões); e (iv) Resistência Pulmonar (RI), que é a resistência do trato respiratório ao movimento do fluxo de ar durante a inspiração e expiração normais, onde $RI = [(\text{Pressão Atmosférica} - \text{Pressão Alveolar})/V]$ (Figura 12F).

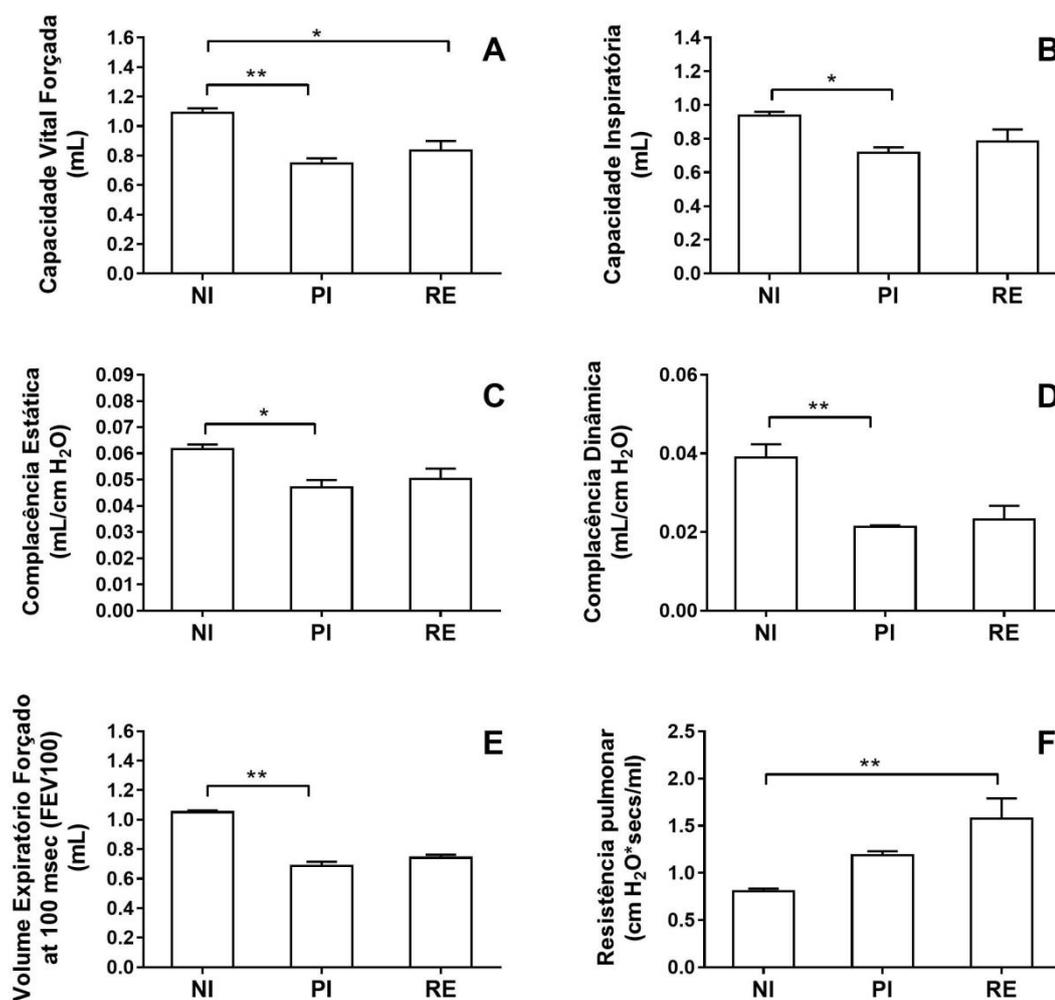


Figura 12: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c no oitavo dia pós-infecção de *A. suum*. Espirometria forçada foi realizada para investigar a lesão por modificações nas funções pulmonares. Os parâmetros avaliados foram Capacidade Vital Forçada (A), Capacidade Inspiratória (B), Complacência estática (C), Complacência Dinâmica Forçada (D), Volume Expiratório a 100 msec (E) e Resistência Pulmonar (F). O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos, onde * p < 0,05; ** p < 0,01.

Através da utilização de Manobra Pulmonar Forçada, observamos que primoinfecção e reinfecção de *Ascaris* em camundongos causaram perda de área respiratória induzida, provavelmente, devido ao edema, o espessamento de septos pulmonares e a hemorragia, conforme indicado pela redução significativa da capacidade vital forçada (Figura 12A) e a redução da capacidade inspiratória nos animais primoinfectados (Figura 12B). No diz respeito à avaliação da elasticidade pulmonar pela complacência pulmonar e pela análise de resistência, observou-se que os animais primoinfectados apresentaram menor complacência estática (Figura 12C) e complacência dinâmica (Figura 12D). Além disso, os camundongos primoinfectados apresentaram alterações no fluxo respiratório no oitavo dia pós-infecção com decréscimo do volume expiratório forçado (FEV100) quando comparados aos camundongos não infectados (Figura 12E). Foi detectada também, uma elevação da resistência pulmonar em camundongos reinfectados (Figura 12F), indicando perda de elasticidade pulmonar nesse

grupo. Juntos, nossos dados mostram que os animais infectados apresentaram alteração no fluxo de ar nas vias aéreas (Figura 12C), perda da área respiratória (Figura 12A e 12B) e redução da elasticidade do tecido (Figura 12D-12F) induzida pela migração das larvas nas vias aéreas e subsequente lesão tecidual. Em última análise, esses resultados sugerem que as funções pulmonares alteradas em ambos os grupos, podem devido aos diferentes tipos de lesão pulmonar, contudo, com perda de função mais acentuada nos camundongos que apresentaram maior lesão aguda, ou seja, no grupo primoinfectado.

Ainda com enfoque na inflamação pulmonar, as análises do BAL de camundongos no oitavo dia pós-infecção revelaram a presença de hemorragia das vias aéreas nos animais dos grupos primoinfectados e reinfectedos quando comparado aos animais não infectados. A presença de sangramento foi maior nos animais primoinfectados quando comparados aos animais reinfectedos, resultado consistente com os níveis de hemoglobina significativamente maiores no BAL destes animais (Figura 13A), tal achado foi associado à maior migração de larvas nas vias aéreas dos animais deste grupo, uma vez que durante a migração, as larvas rompem capilares pulmonares (Figura 13B). Seguindo com as análises do BAL, os níveis de proteína total foram maiores no grupo primoinfectado (Figura 13C), o que também pode estar relacionado à maior migração e a hemorragia das vias aéreas. Em contraste, o BAL de animais reinfectedos apresentou um aumento substancial no número de leucócitos totais (Figura 13D). A avaliação da contagem diferencial de células reforçou a noção de que a reinfecção induz uma inflamação pulmonar crônica observada pelo aumento do número de granulócitos nas vias aéreas e também o aumento significativo de células da imunidade adaptativa como fagócitos e linfócitos, quando comparados com os demais grupos (Figura 13E-13H). Nossos dados sugerem que uma única infecção induz dano tecidual agudo, seguido de hemorragia e exsudação relacionado à maior migração de larvas nas vias aéreas, enquanto que a reinfecção pode provocar uma resposta imunológica pulmonar contra *Ascaris suum* resultando em um número reduzido de larvas nas vias aéreas.

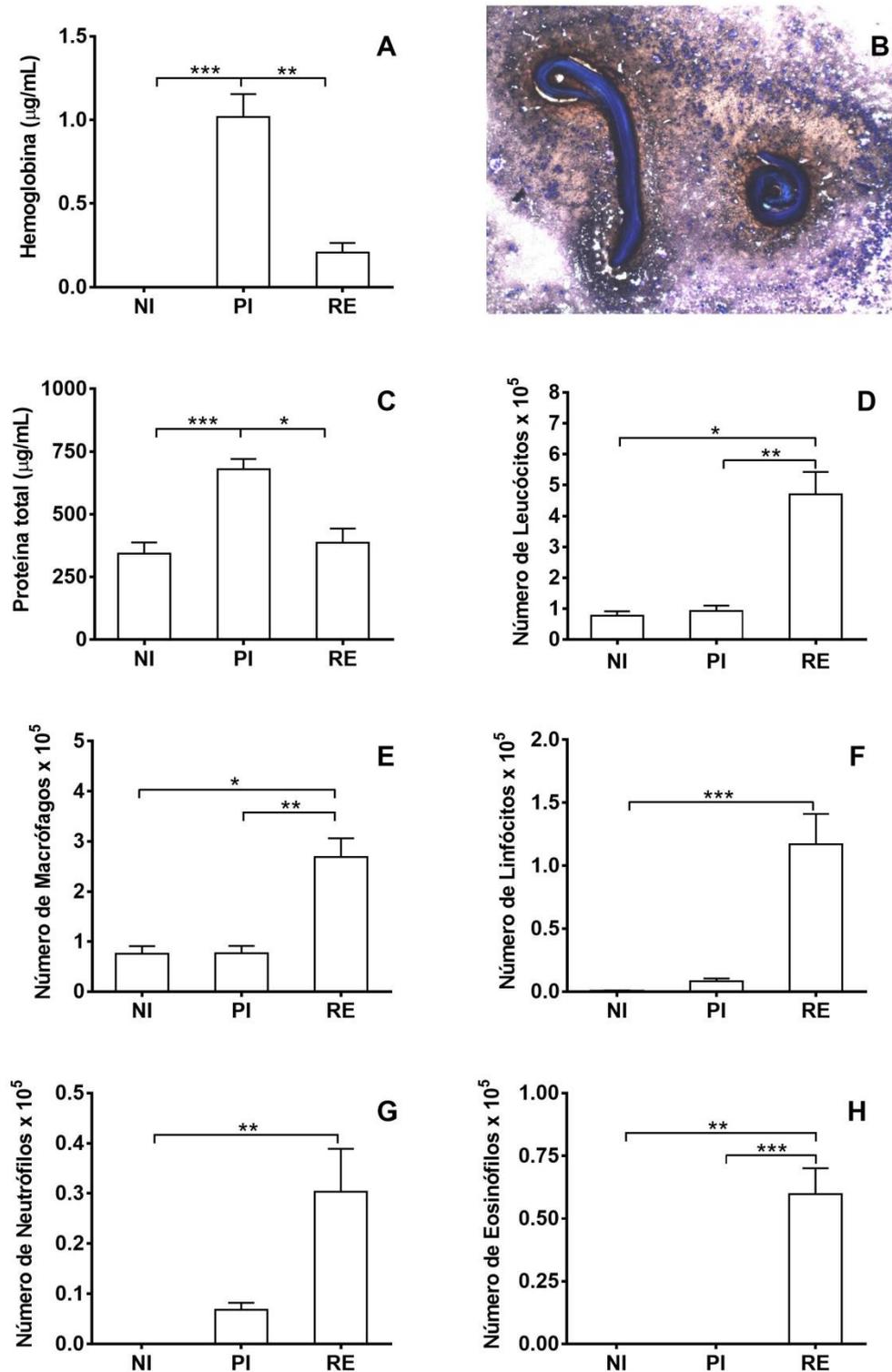


Figura 13: Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de hemoglobina no BAL. B) Larvas de *A. suum* rodeadas por leucócitos no BAL. C) Níveis totais de proteína no BAL. D) Contagens totais de leucócitos no BAL. E) Contagens de macrófagos no BAL. F) Contagens de linfócitos no BAL. G) Contagens de neutrófilos no BAL. H) Contagens eosinófilos no BAL. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.1.3 A REINFECÇÃO COM *A. SUUM* PROVOCA UM AUMENTO DO NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS CIRCULANTES E DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH2/TH17 SISTÊMICAS NA ASCARIDIOSE LARVAL

Para a elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na proteção na reinfecção, foi coletado sangue periférico dos animais não infectados, primoinfectados e reinfectados nos dias zero, quatro, oito e 12 pós-infecção e o perfil de citocinas sistêmicas foi avaliado. As diferenças no tempo de infecção (zero, quatro, oito e 12 dias pós- infecção), o tipo de infecção (infecção única ou múltipla) e a interação entre esses dois fatores foram avaliados em todos os grupos. Ambos os fatores (tempo e tipo de infecção) contribuíram para as diferenças observadas na contagem de monócitos e eosinófilos circulantes, que foram significativamente aumentados nos grupos reinfectados de acordo com a progressão da infecção até o oitavo dia de infecção (pico da migração larval nos pulmões).

Assim como observado no BAL (Figura 13), foi detectado um maior número de leucócitos no sangue periférico (Figura 14). Quanto ao número de linfócitos circulantes, foram significativamente aumentados nos animais reinfectados quando comparados com os animais primoinfectados e não infectados no quarto dia pós-infecção (Figura 14A), enquanto que os monócitos no quarto e oitavo dias (Figura 14B). Quanto ao número de neutrófilos circulantes, foi significativamente elevado nos animais reinfectados no quarto dia pós-infecção (Figura 14C), já as contagens de eosinófilos foram aumentadas no 12º dia pós-infecção no grupo primoinfectado e em todos os dias avaliados nos animais do grupo reinfectado (Figura 14D).

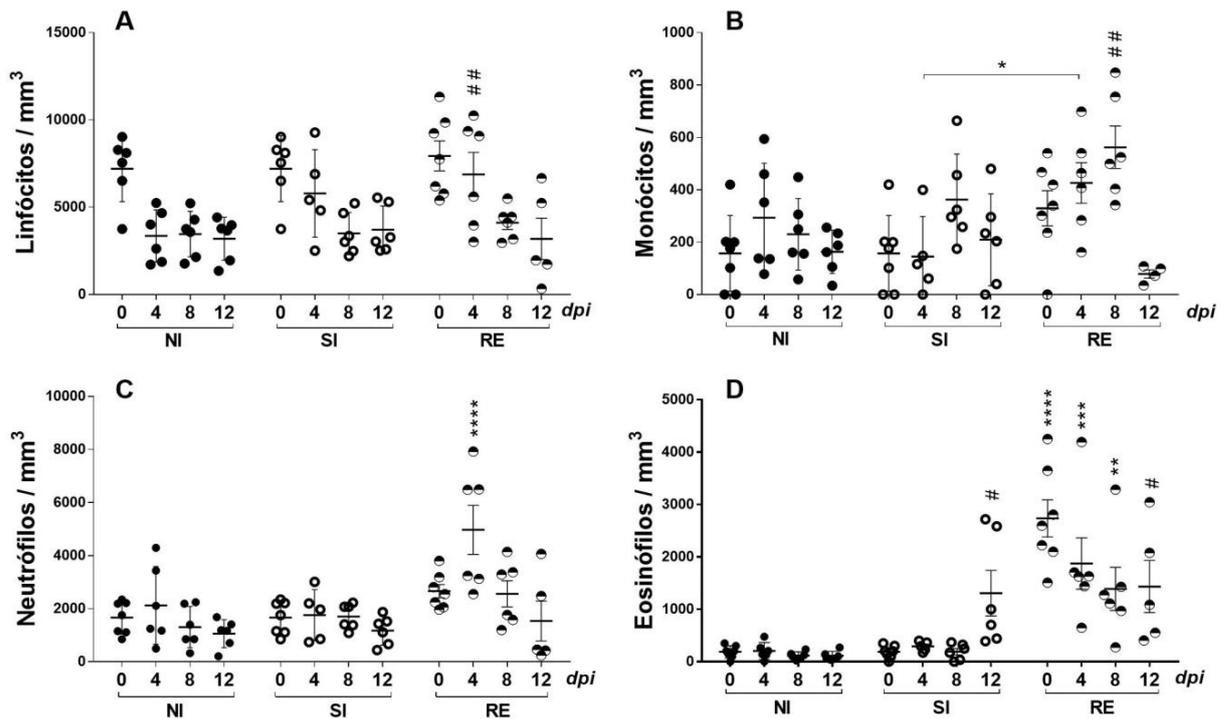


Figura 14: Contagem de células mononucleares e de granulócitos no sangue periférico em diferentes tempos após a infecção experimental por *A. suum*. A) Contagem de linfócitos. B) Contagem de monócitos. C) Contagem de neutrófilos. D) Contagem de eosinófilos. Círculos fechados representam o grupo não infectado; Círculos abertos representam o grupo primoinfectado; E círculos divididos representam o grupo reinfectado. O teste Two-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e foram representados (*) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam as diferenças entre todos os grupos no respectivo tempo; E # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ representam as diferenças do grupo não infectado.

Em relação ao perfil de citocinas sistêmicas durante a reinfeção (Figura 15), a produção de citocinas Th2 foi detectada somente após uma terceira exposição ao parasito, com produção significativa de IL-4 no tempo zero e IL-5 no quarto e oitavo dias pós-infecção (Figura 15A e 15B, respectivamente). Níveis mais elevados de IL-10 foram detectados no tempo -14 (após a segunda infecção por *A. suum*) e foram mantidos até ao final do estudo (Figura 15C). A produção de citocinas inflamatórias também foi observada, IL-6 foi significativamente maior a partir do quarto dia pós-infecção no grupo reinfectado (Figura 15D). De maneira interessante, os níveis de IL-17A de camundongos reinfectados apresentaram níveis mais elevados quando comparados com animais primoinfectados e não infectados (Figura 15E). Por fim, enquanto a produção de IFN- γ foi significativamente mais elevada no grupo reinfectado apenas no estágio tardio da terceira infecção (12 dias) quando comparada com animais primoinfectados e não infectados (Figura 15F), a produção de TNF seguiu a de IL-17A, onde os animais reinfectados apresentaram maior produção de citocinas a partir do quarto dia após a terceira exposição as larvas do parasito (Figura 15G). A produção de IL-2 também foi maior no grupo reinfectado em comparação com o grupo primoinfectado e não infectado nos tempos -14 e zero (Figura 15H).

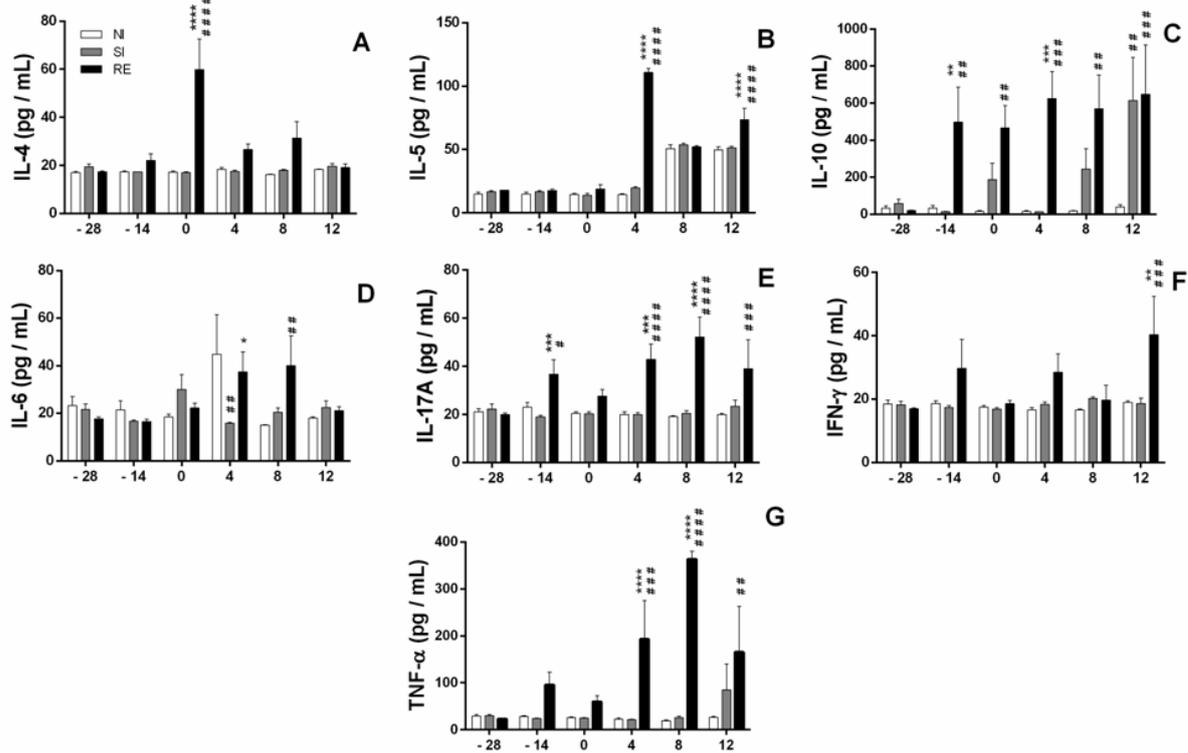


Figura 15: Perfil de produção de citocinas sistêmicas desde o primeiro dia até 12 dias após a terceira infecção. A) IL-4. B) IL-5. C) IL-10. D) IL-6. E) IL-17A. F) IFN- γ . G) TNF- α . H) Utilizou-se teste de Two-way ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e foram representados por (*) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; E **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação com o grupo primoinfectado no mesmo tempo de infecção; E # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ representam as diferenças em comparação com o grupo não infectado.

Os resultados obtidos neste capítulo possibilitaram verificar, principalmente, uma importante redução da carga parasitária em nível pulmonar, associada à inflamação do parênquima e das vias aéreas, que foi caracterizada pelo acentuado infiltrado inflamatório, somado ao aumento da atividade de neutrófilos e eosinófilos. Com isso, foi evidenciando que na ascarirose larval após múltiplas exposições, o pulmão funciona como um importante sítio inflamatório e de controle da carga parasitária. Com base nesses resultados, nos capítulos seguintes buscou-se esclarecer ainda mais a contribuição da inflamação pulmonar no controle da migração larval, bem como a participação de mediadores da resposta imune no controle da carga parasitária e da fisiopatologia pulmonar característica da ascarirose larval.

6. CAPÍTULO 02:

ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE TH1, TH2 E TH17 NA FISIOPATOLOGIA PULMONAR DA ASCARIDIOSE LARVAL APÓS SIMPLES E MÚLTIPLAS EXPOSIÇÕES

6.1 RESULTADOS

De uma forma geral, a resposta imunológica mais descrita para infecções helmínticas é a do tipo Th2, contudo, o primeiro capítulo desse trabalho trouxe evidências que na ascaridiose larval existe um perfil misto de resposta imune Th2/Th17 após múltiplas exposições, capaz de controlar a carga parasitária. Por outro lado, foi evidenciado também que a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões induz resposta imune inata, caracterizada pelo aumento da infiltração de neutrófilos e eosinófilos no tecido pulmonar. Desse modo, esse capítulo pretende levantar questões sobre a importância da participação dos tipos de resposta Th1, Th2 e Th17 no controle da infecção e na fisiopatologia pulmonar da ascaridiose.

6.1.1 NA REINFECÇÃO POR *A. SUUM*, A PROTEÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA SE MANTÉM EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES NA RESPOSTA TH1, CONTUDO A AUSÊNCIA DE IFN- γ INDUZ UM AUMENTO DA RESPOSTA TH17 E UMA ACENTUADA PERDA DE FUNÇÃO PULMONAR

Para o estudo mais aprofundado da resposta do tipo Th1 na ascaridiose larval, camundongos deficientes na produção de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) foram primoinfectados e reinfectedos e, posteriormente, submetidos a avaliações imunoparasitológicas e fisiopatológicas. Inicialmente, a avaliação da carga parasitária revelou que a citocina IFN- γ não contribui diretamente no controle da ascaridiose larval, uma vez que camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram o mesmo número total de larvas nos compartimentos pulmonares (tecidos e vias aéreas), quando comparados aos da estirpe selvagem C57BL/6j com os mesmos tratamentos (Figura 16A, 16B e 16C).

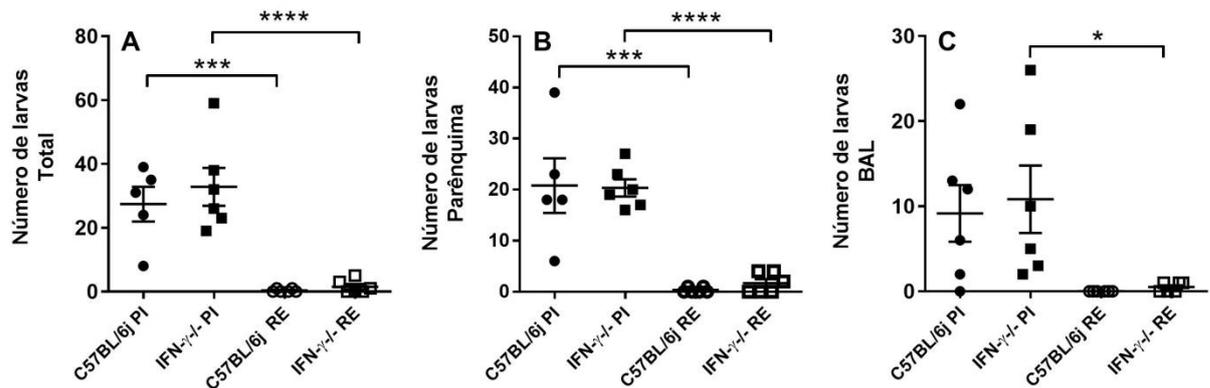


Figura 16: Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de larvas. B) Número de larvas no parênquima pulmonar. C) Número de larvas nas vias aéreas. Os testes One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representados por (*) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Apesar de não haver alteração no padrão de proteção da carga parasitária, a avaliação pulmonar por meio da análise histopatológica semiquantitativa, possibilitou constatar um aumento geral da inflamação pulmonar em camundongos reinfectedados (Figura 17). Contudo, camundongos dos grupos C57BL/6j PI, IFN- $\gamma^{-/-}$ PI, C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ RE exibiram microscopicamente lesões no parênquima pulmonar, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares, provocadas por edema e hemorragia associados ao infiltrado inflamatório misto, com a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e escassos eosinófilos (Figura 18). Quanto ao infiltrado inflamatório, apresentou distribuição predominantemente, peribrônquica e perivascular. Esses achados foram mais intensos, comprometendo maior área do parênquima pulmonar nos camundongos reinfectedados tanto do grupo C57BL/6j RE quanto do IFN- $\gamma^{-/-}$ RE, quando comparados aos dos grupos C57BL/6j PI e IFN- $\gamma^{-/-}$ PI (Figura 18), sendo que nos camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE, também foi possível identificar com frequência a presença BALT (tecido linfóide associado ao brônquio).

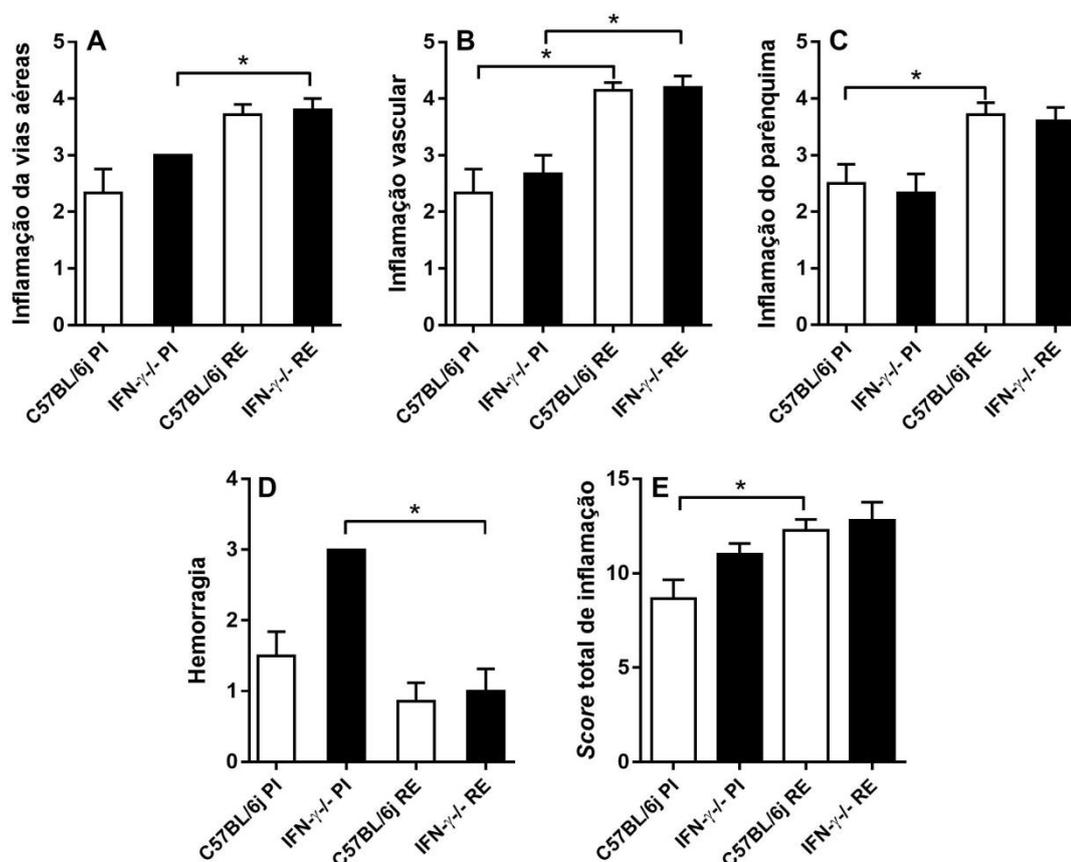


Figura 17: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) Score total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos, onde * $p < 0,05$.

Por outro lado, os camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ PI exibiram maiores zonas hemorrágicas no parênquima quando comparados aos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE, que exibiram apenas hemorragia discreta (Figura 18F e 18H). Notou-se também que alguns vasos presentes no parênquima pulmonar dos camundongos de todos os apresentam edema perivascular, edema da túnica adventícia e espessamento da túnica média ocasionado por hipertrofia e hiperplasia de leiomiócitos, com conseqüente redução da luz vascular. Contudo, esses achados foram mais evidentes, comprometendo um maior número de vasos no parênquima pulmonar nos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ RE (Figura 18G e 18H).

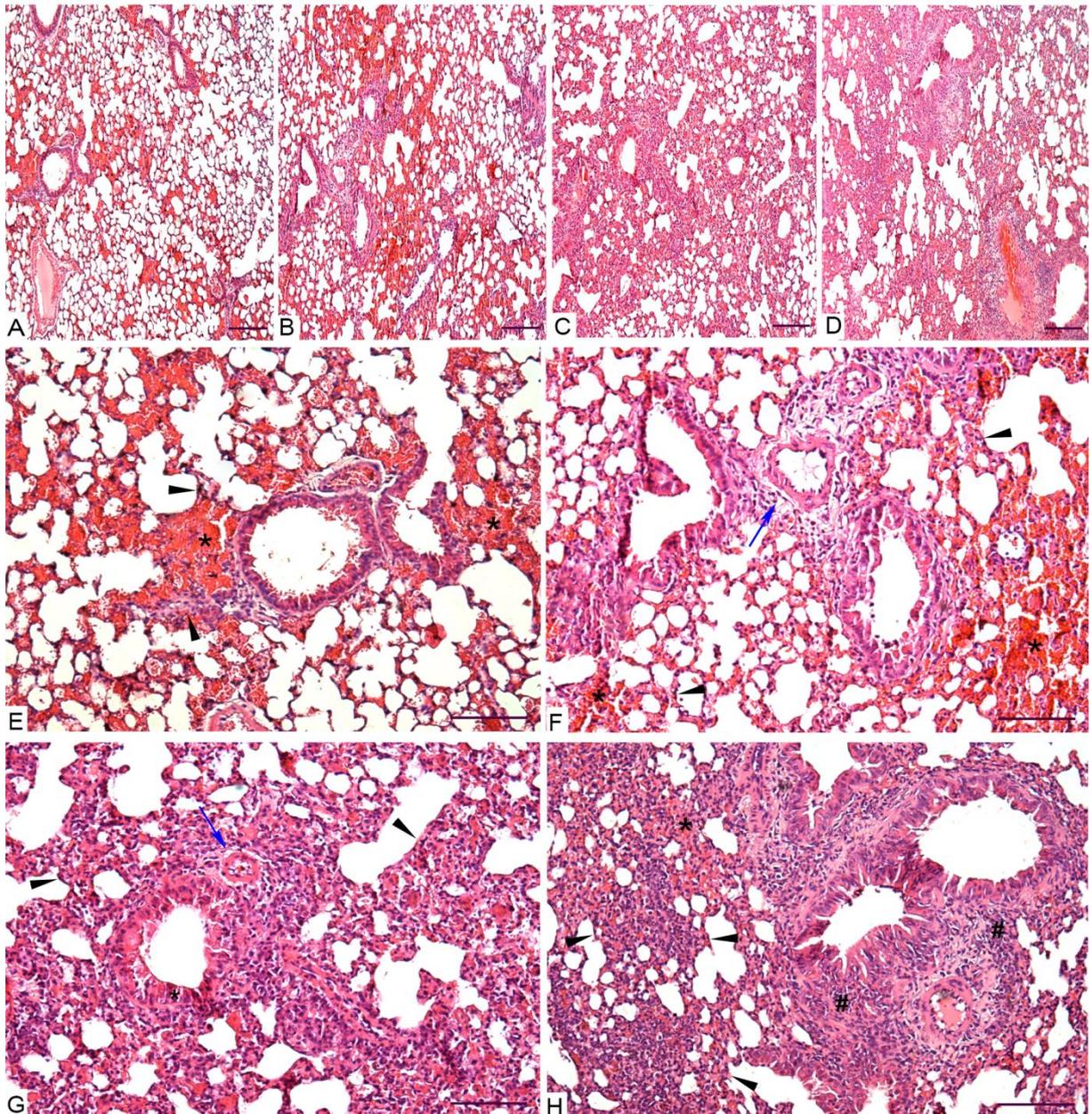


Figura 18: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica representativa do grupo C57BL/6j PI. B) Imagem panorâmica representativa do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ PI. C) Imagem panorâmica representativa do grupo C57BL/6j RE. D) Imagem panorâmica representativa do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE. E) Imagem em maior aumento representativa do grupo C57BL/6j PI com leve espessamento de septos interalveolares. F) Imagem em maior aumento representativa do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ PI com leve espessamento de septos interalveolares e presença de larva no interior de um bronquíolo. G) Imagem em maior aumento representativa do grupo C57BL/6j RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. H) Imagem em maior aumento representativa do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. Alterações histopatológicas são representadas por símbolos nas imagens, sendo que * indica áreas de hemorragia, # indica infiltrado inflamatório (G), cabeças de setas indicam o espessamento de septos interalveolares e, seta azul indica edema perivascular. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 50 μ m.

Além das análises histopatológicas, a capacidade pulmonar foi analisada por meio da espirometria forçada em respirador mecânico, que forneceu informações sobre o funcionamento

pulmonar nos diferentes modelos. Foi verificado que as lesões do parênquima pulmonar provocadas pela migração larval, processo inflamatório e resolução das lesões provocaram prejuízos ao funcionamento pulmonar, com um aumento na resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas nos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ RE, mais exacerbada nos IFN- $\gamma^{-/-}$ RE (Figura 19A). Corroborando com esse achado, foi verificada a diminuição na complacência dinâmica em todos dos grupos que receberam infecção, quando comparados com os respectivos não infectados. A diminuição na complacência dinâmica foi mais acentuada nos camundongos dos grupos IFN- $\gamma^{-/-}$ PI e C57BL/6j RE em relação aos do grupo C57BL/6j PI (Figura 19B). Foi avaliado também o volume expiratório forçado em 100ms (FEV100), que é um importante indicador de aumento da resistência das vias aéreas, onde foi verificado uma diminuição desse parâmetro nos camundongos dos grupos IFN- $\gamma^{-/-}$ PI, C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ RE (Figura 19C).

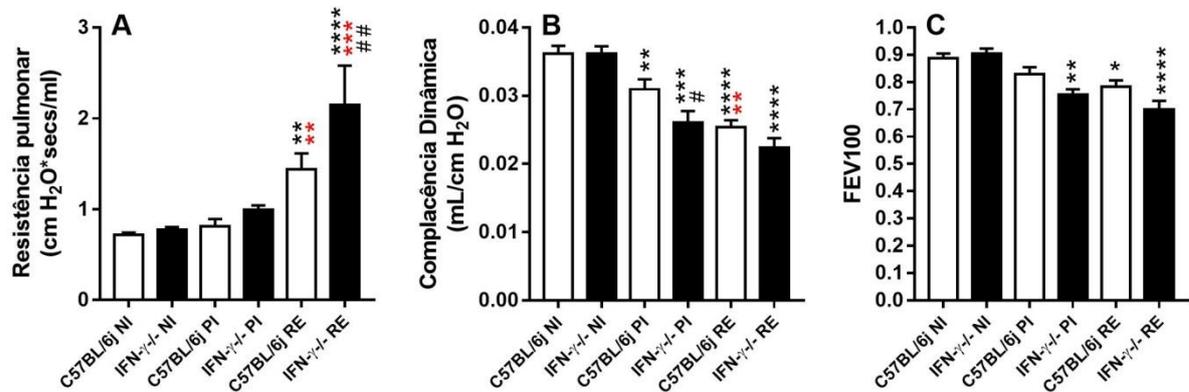


Figura 19: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57BL/6j primoinfectados e reinfectedados no oitavo dia pós-infecção por *A suum*. A) Resistência Pulmonar. B) Complacência Dinâmica. C) FEV100. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e quando significativos foram representadas pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representam diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ representam diferença entre grupos que receberam o mesmo tratamento, de estirpes diferentes.

No que se refere às características do infiltrado inflamatório do tecido pulmonar, a dosagem da atividade de EPO e MPO possibilitou constatar que, camundongos primoinfectados e reinfectedados de ambas as estirpes não apresentaram alterações nos níveis da atividade de EPO quando comparados aos grupos não infectados (Figura 20A). Contudo, houve um expressivo aumento da atividade de MPO em camundongos do grupo C57BL/6j RE quando comparados aos demais grupos. Os camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE apresentaram um aumento significativo na atividade de MPO apenas quando comparados aos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ NI (Figura 20B). Assim, a deficiência em IFN- γ nos animais reinfectedados, induziu uma importante diminuição na produção de MPO quando comparados com animais selvagens do grupo C57BL/6j RE.

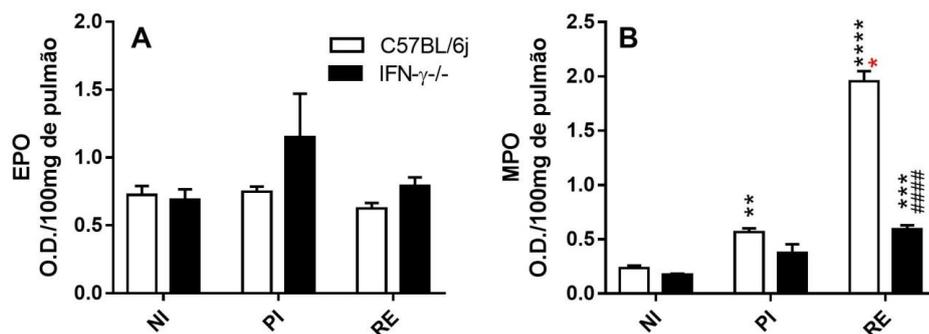


Figura 20: Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos dos grupos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectedados. A) atividade de EPO. B) atividade de MPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde, ** < 0,01, *** < 0,001 e **** p < 0,0001 para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * p < 0,05 para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ##### p < 0,0001 para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Ainda no que se refere à inflamação pulmonar, a avaliação da celularidade no BAL permitiu verificar o aumento no número total de leucócitos e macrófagos nas vias aéreas de camundongos dos grupos reinfectedados (Figura 21A e B). Quanto ao número de linfócitos, apresentou aumento significativo apenas em camundongos do grupo C57BL/6j RE em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 21C). Um achado interessante foi a ausência de neutrófilos em camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE quando comparados aos do grupo C57BL/6j RE (Figura 21D), corroborando os achados de MPO apresentados na figura anterior (Figura 20B). Quanto ao número de eosinófilos, foi significativamente aumentado nos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ RE apenas em relação aos respectivos grupos não infectados (Figura 21E). Portanto, os dados referentes aos eosinófilos e neutrófilos nas vias aéreas e a sua atividade no tecido, sugerem que ambos os tipos celulares não contribuíram para o controle da carga parasitária no modelo IFN^{-/-} versus C57BL/6j após múltiplas exposições.

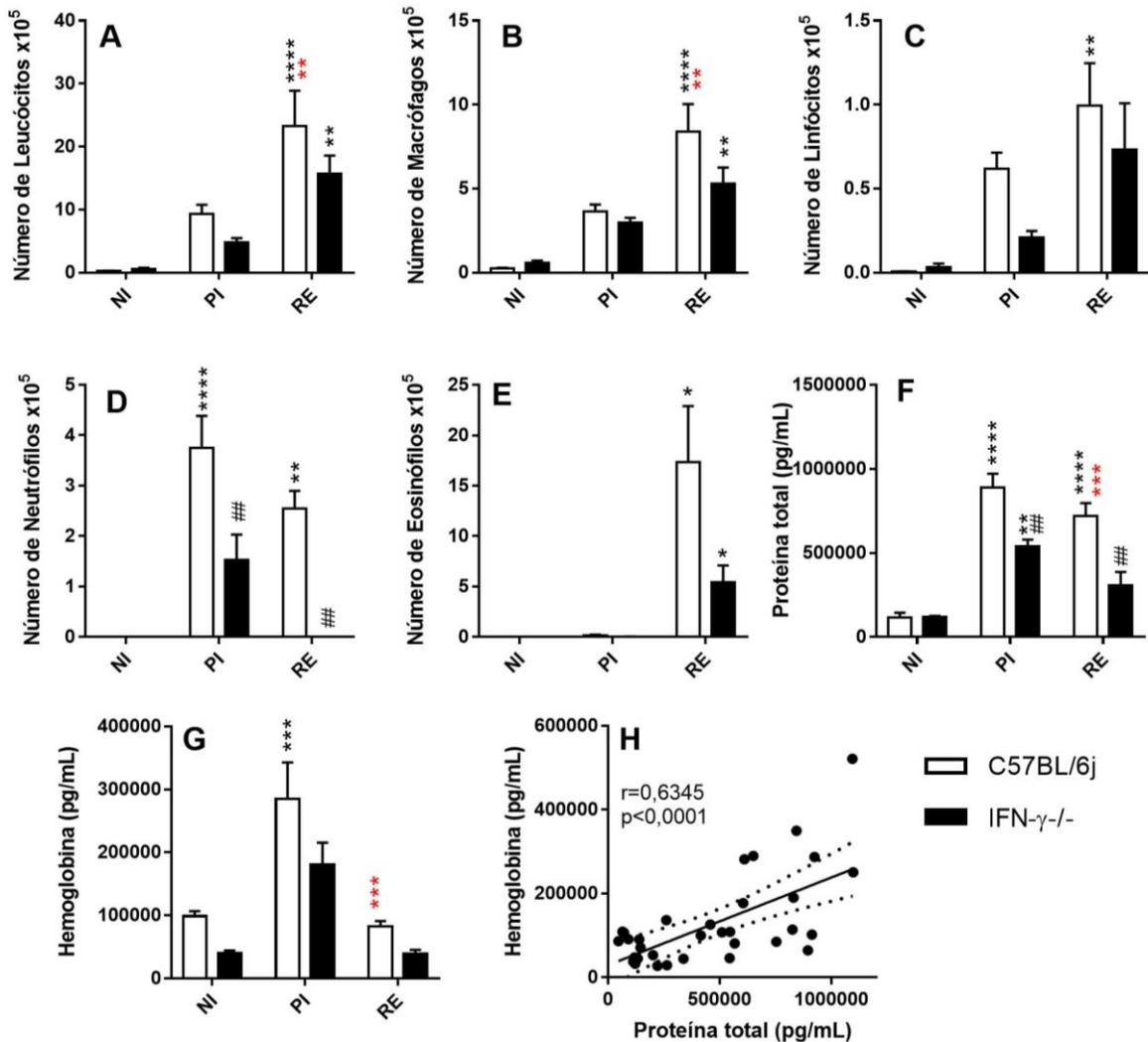


Figura 21: BAL de camundongos dos grupos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfectados no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de leucócitos. B) Número de macrófagos. C) Número de linfócitos. D) Número de neutrófilos. E) Número de eosinófilos. F) Níveis de proteína total. G) Níveis de hemoglobina. Os testes One-Way Anova (A, B, C, D, F e G) e Kruskal-Wallis (E), seguidos dos testes de comparação múltipla de Tukey e de Dunn, respectivamente, foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe e; ## $p < 0,01$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento. H) Correlação entre níveis de hemoglobina X níveis de proteína total, testados pelo teste de correlação de Pearson, sendo que os valores de p e r estão representados no gráfico.

A análise do BAL também possibilitou verificar uma maior exsudação de proteína em camundongos do grupo C57BL/6j PI em relação aos demais grupos, contudo foi notado um aumento significativo no BAL de camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IFN- $\gamma^{-/-}$ PI em relação aos respectivos grupos não infectados (Figura 21F). E, apesar de haver uma correlação positiva entre exsudação de proteína com a hemorragia (Figura 21H), houve um aumento expressivo da hemoglobina apenas no grupo C57BL/6j PI (Figura 21G).

Já para a avaliação de perfil de citocinas sistêmicas, os níveis de citocinas séricas foram quantificados, onde foi possível verificar um aumento na citocina IL-6 em camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE em relação aos camundongos do grupo não infectado da mesma estirpe (Figura 22C). E de maneira interessante, evidenciou também que um aumento expressivo na citocina IL-17A em camundongos do grupo IFN- $\gamma^{-/-}$ RE, o que sugere que na ausência da citocina IFN- γ , a resposta Th17 é acentuada em modelo de múltiplas exposições ao *A. suum* (Figura 22D). A citocina IL-2 esteve aumentada em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ RE em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 22F).

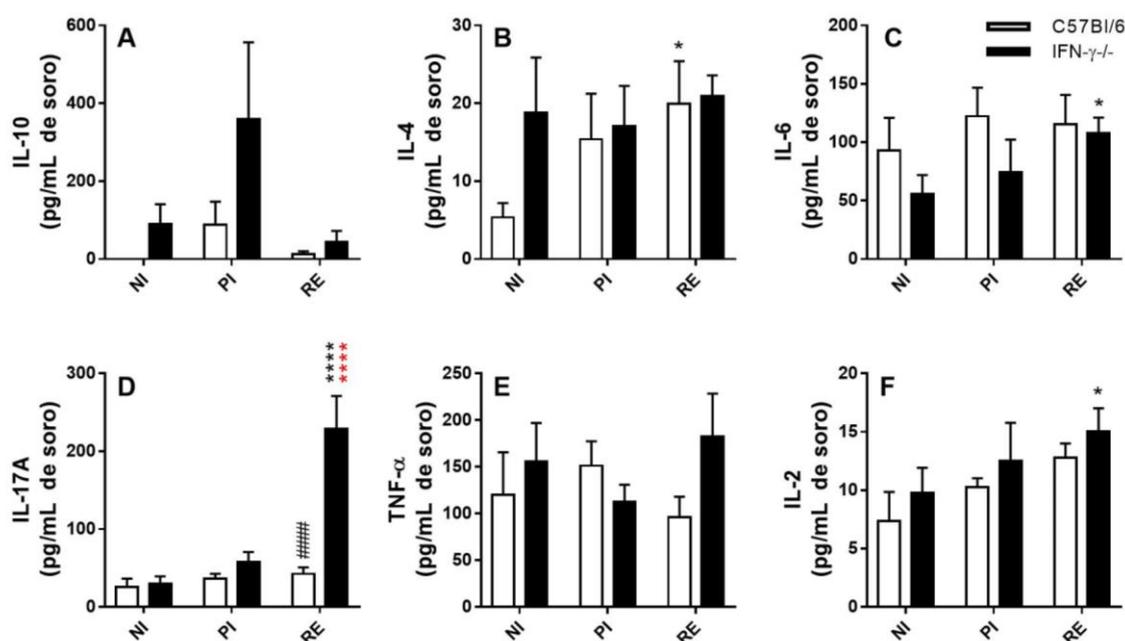


Figura 22: Citocinas séricas dosadas em camundongos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfetados no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IL-4. C) Níveis de IL-6. D) Níveis de IL-17A. E) Níveis de TNF- α . F) Níveis de IL-2. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ##### $p < 0,0001$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Portanto, os achados utilizando camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ sugerem que os mecanismos envolvidos na proteção da carga parasitária após múltiplas exposições independem da resposta Th1 isoladamente, e da atividade tecidual de neutrófilos e eosinófilos. Contudo, a ausência de IFN- γ determinou a acentuada perda da função pulmonar em camundongos reinfetados. Provavelmente, devido ao aumento exacerbado dos níveis da citocina IL-17A, avaliada sistemicamente, que sugere o aumento da inflamação provocada pela resposta Th17.

6.1.2 A DEFICIÊNCIA NA RESPOSTA Th17 CONTRIBUI PARA A REDUÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA, CONTUDO, COM AUMENTO DE IFN- γ SISTÊMICO E DA INFLAMAÇÃO TECIDUAL, CONTUDO, SEM PERDA DA FUNÇÃO PULMONAR

Para a avaliação da participação da resposta Th17 na ascarirose larval após simples e múltiplas exposições, primeiramente foi realizada a infecção experimental de camundongos deficientes no receptor IL-17RA (IL-17RA^{-/-}) e realizada a avaliação da carga parasitária. Tal avaliação permitiu constatar que a resposta Th17 parece ter um importante papel para o estabelecimento da infecção, uma vez que a carga parasitária nos pulmões (total, parênquima e vias aéreas) de camundongos IL-17RA^{-/-} diminuiu em relação aos C57BL/6j selvagens, tanto primoinfectados quanto reinfectedos (Figura 23A, B e C).

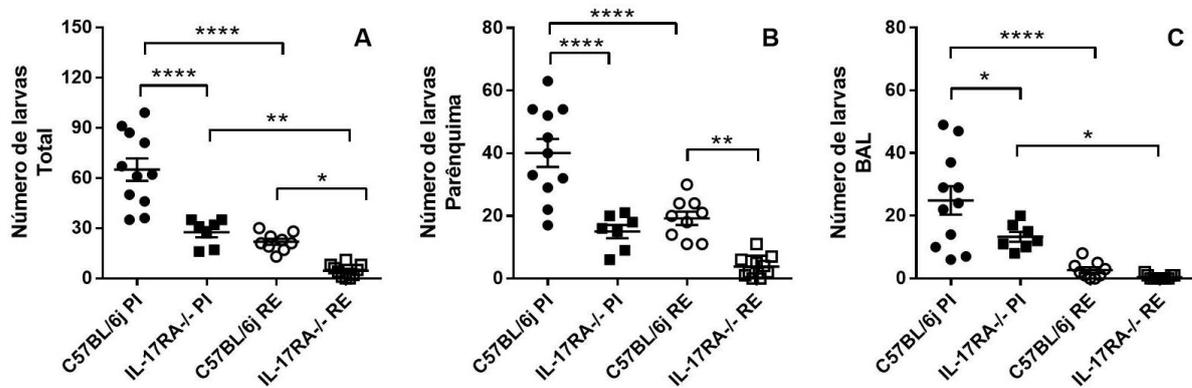


Figura 23: Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL/6j selvagens e IL-17RA^{-/-} primoinfectados e reinfectedos no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de larvas. B) Número de larvas no parênquima pulmonar. C) Número de larvas nas vias aéreas. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

E, a fim de compreender o impacto da deficiência na resposta Th17 na inflamação tecidual, inicialmente, a avaliação por meio da análise histopatológica semiquantitativa, possibilitou constatar que os camundongos primoinfectados e reinfectedos de ambas as estirpes apresentaram lesões microscópicas no parênquima pulmonar. Quanto ao infiltrado inflamatório foi misto caracterizado por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e escassos eosinófilos. Também foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular. Esses achados foram mais intensos e comprometeram uma maior área do parênquima pulmonar dos camundongos dos grupos C57BL/6j RE, IL17RA^{-/-} PI e IL17RA^{-/-} RE, quando comparados aos dos grupos C57BL/6j PI (Figura 24).

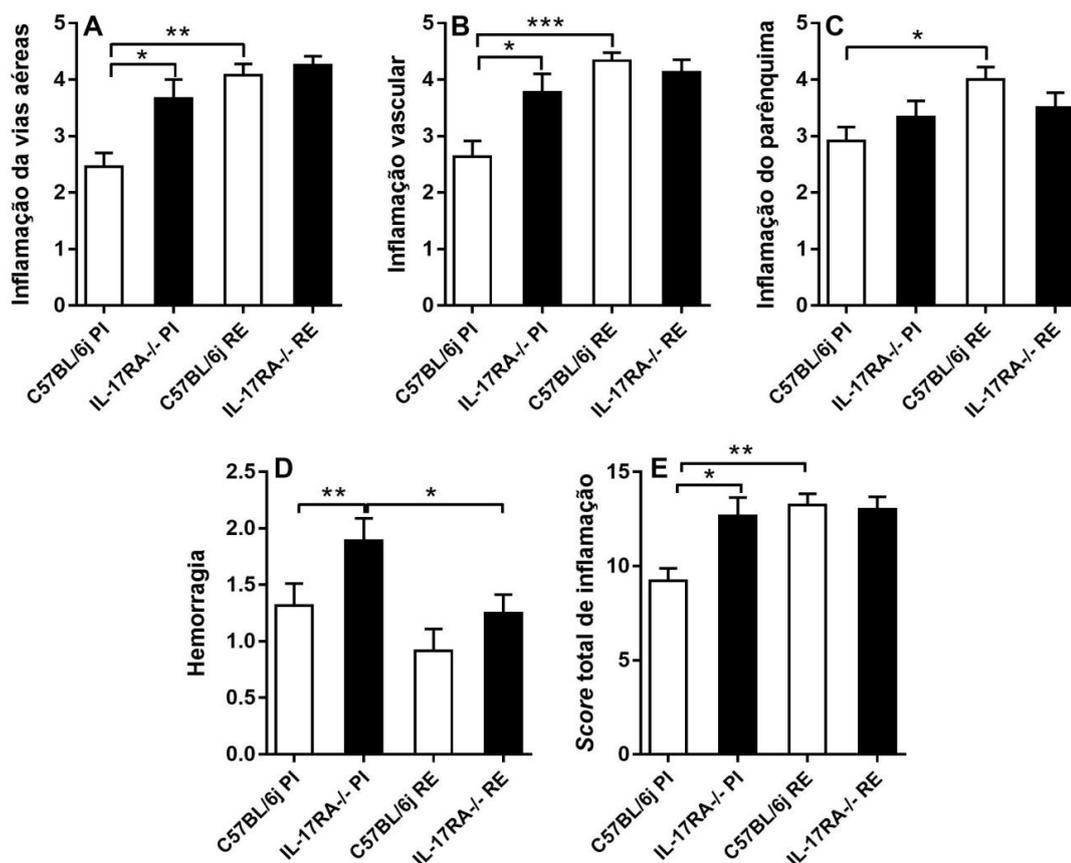


Figura 24: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) Score total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A análise semiquantitativa também possibilitou observar presença de hemorragia, vasos hiperêmicos e edema perivascular em todos os grupos, sendo a presença de edema perivascular mais intenso nos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IL17RA^{-/-} RE (Figura 24D e B). Foi verificado que alguns vasos presentes no parênquima pulmonar dos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IL17RA^{-/-} RE, além do edema perivascular, apresentaram edema da túnica adventícia e espessamento da túnica média ocasionado por hipertrofia e hiperplasia de leiomiócitos ocasionando a redução da luz vascular (Figura 25).

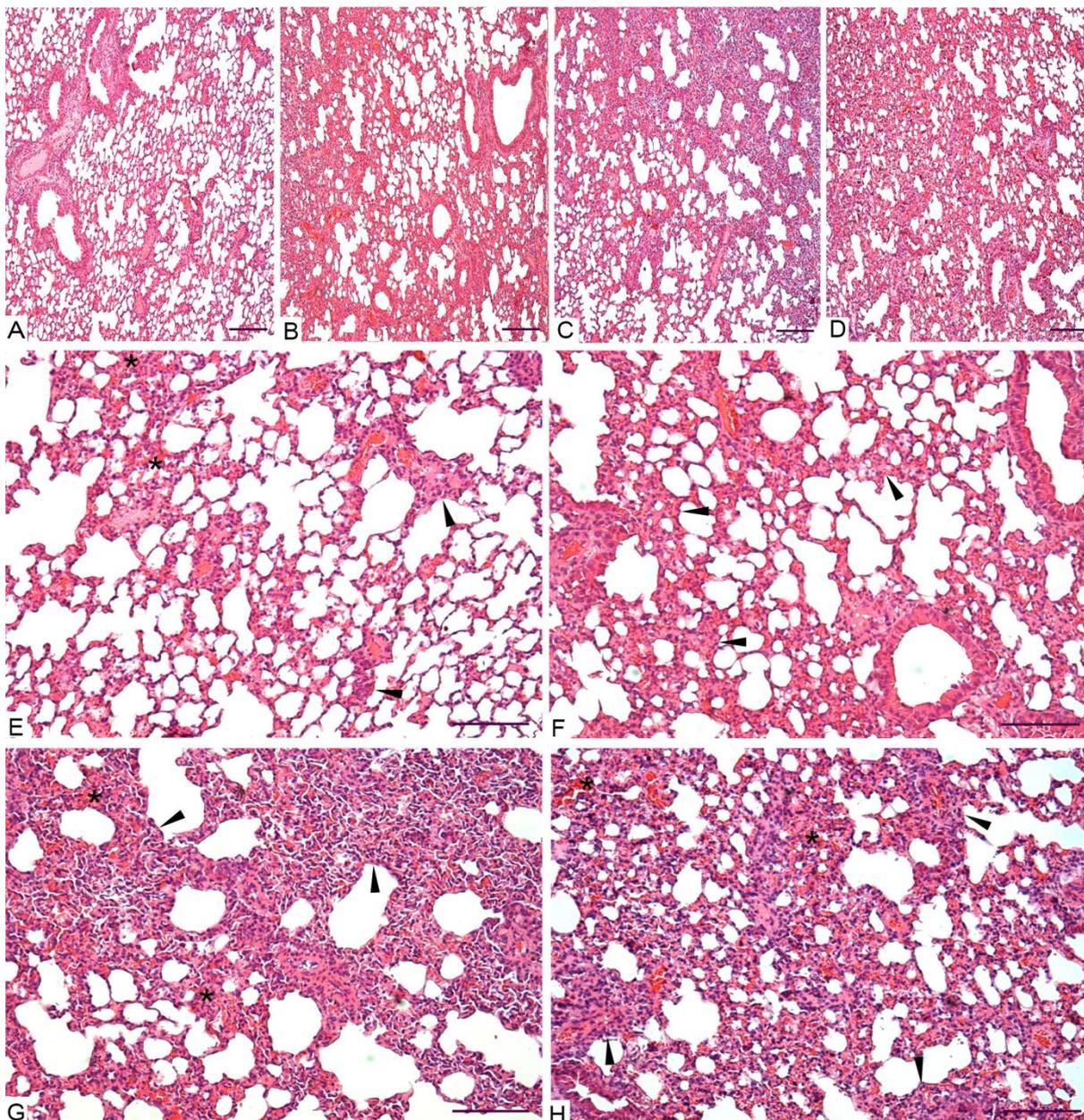


Figura 25: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval. A) Imagem panorâmica representativa do grupo C57BL/6j PI. B) Imagem panorâmica representativa do grupo IL-17RA^{-/-} PI. C) Imagem panorâmica representativa do grupo C57BL/6j RE. D) Imagem panorâmica representativa do grupo IL-17RA^{-/-} RE. E) Imagem em maior aumento representativa do grupo C57BL/6j PI com leve espessamento de septos interalveolares. F) Imagem em maior aumento representativa do grupo IL-17RA^{-/-} PI com leve espessamento de septos interalveolares e presença de larva no interior de um bronquíolo. G) Imagem em maior aumento representativa do grupo C57BL/6j RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. H) Imagem em maior aumento representativa do grupo IL-17RA^{-/-} RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. As alterações histopatológicas são representadas por símbolos nas imagens, sendo que * indica áreas de hemorragia, cabeças de setas indicam o espessamento de septos interalveolares. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 50 μ m.

Para complementar a avaliação da função pulmonar, além das análises histopatológicas, a capacidade fisiológica pulmonar foi analisada por meio da espirometria forçada em respirador

mecânico. Essas análises, revelaram que as lesões do parênquima pulmonar provocadas pela migração larval, processo inflamatório e resolução das lesões provocaram alterações no funcionamento pulmonar. Nesse modelo, as lesões provocaram um aumento na resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas apenas nos camundongos do grupo C57BL/6j RE (Figura 26A). Corroborando com esse achado, foi verificada uma diminuição na complacência dinâmica apenas nos camundongos do grupo C57BL/6j RE (Figura 26B). Foi verificada também a diminuição do volume expiratório forçado em 100ms (FEV100) nos camundongos dos grupos IL-17RA^{-/-} PI, C57BL/6j RE e IL17RA^{-/-} RE (Figura 26C).

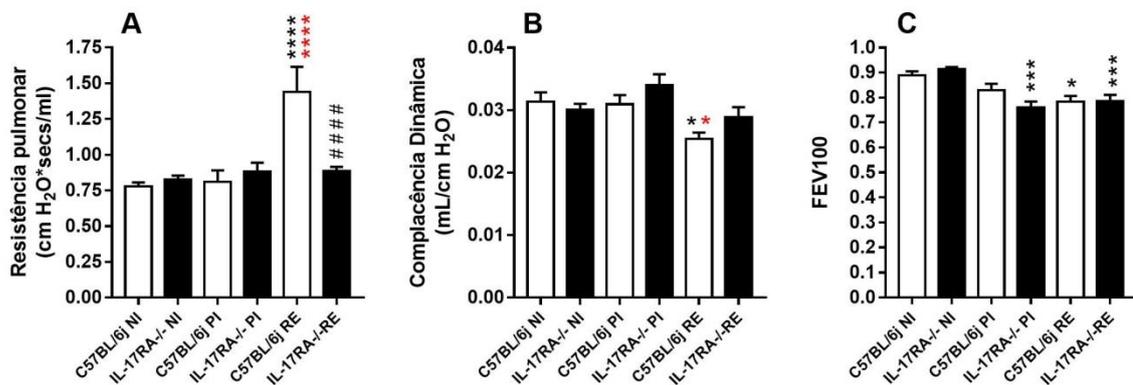


Figura 26: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos IL-17RA^{-/-} e C57BL/6j primoinfectados e reinfectados no oitavo dia pós-infecção por *A suum*. A) Resistência Pulmonar; B) Complacência Dinâmica; C) FEV100. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e quando significativos foram representadas pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ representam diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, #### $p < 0,0001$ representam diferença entre grupos que receberam o mesmo tratamento, de estirpes diferentes.

No que se refere às características do infiltrado inflamatório, as dosagens da atividade de EPO e MPO possibilitaram constatar que, camundongos primoinfectados e reinfectados de ambas as linhagens não apresentaram aumento da atividade de EPO. Os camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} RE apresentaram diminuição na atividade de EPO em relação aos não infectados da mesma linhagem (Figura 27A). Houve um expressivo aumento da atividade de MPO em camundongos C57BL/6j RE quando comparado aos demais grupos e, foi verificado um aumento significativo nos camundongos do grupo C57BL/6j PI (Figura 27B).

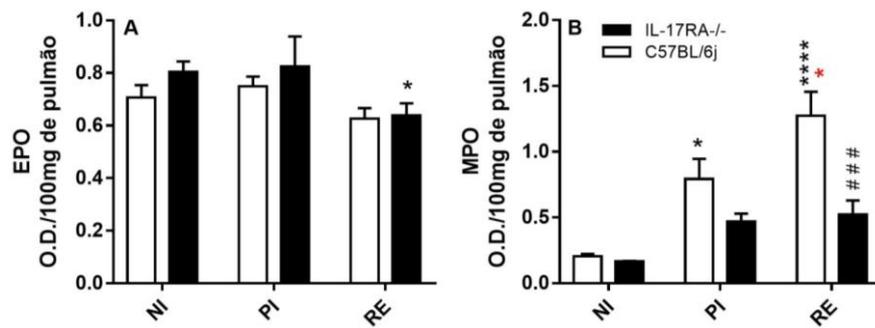


Figura 27: Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos dos grupos C57BL/6j e IL-17RA^{-/-} primoinfectados e reinfectados. A) Níveis de atividade de EPO. B) Níveis de atividade de MPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde, * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ### $p < 0,0001$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Ainda no que se refere à inflamação pulmonar, a avaliação da celularidade no BAL permitiu verificar o aumento significativo número total de leucócitos nas vias aéreas de camundongos reinfectados em relação aos respectivos grupos não infectados (Figura 28A e B). Quanto ao número de linfócitos, apresentou aumento significativo apenas em camundongos do grupo C57BL/6j RE em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 28C). O número de neutrófilos foi significativamente aumentado nos camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} RE quando comparados aos não infectados da mesma estirpe e aos camundongos do grupo C57BL/6j RE (Figura 28D). Quanto ao número de eosinófilos, foi significativamente aumentado nos camundongos dos grupos C57BL/6j RE e IL-17RA^{-/-} RE apenas em relação aos respectivos não infectados (Figura 28E). A análise do BAL também permitiu verificar uma maior exsudação de proteína em camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} PI em relação aos camundongos dos demais grupos. Foi verificado um aumento significativo nos níveis de proteínas nos camundongos dos grupos C57BL/6j PI, C57BL/6j RE e IL17RA^{-/-} RE em relação aos não infectados das respectivas estirpes (Figura 28F). E, como já foi demonstrado nesse trabalho, apesar haver uma correlação positiva entre exsudação de proteína com a hemorragia, nesse modelo houve um aumento significativo nos camundongos primoinfectados, contudo, mais expressivo nos camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} PI (Figura 28G e H).

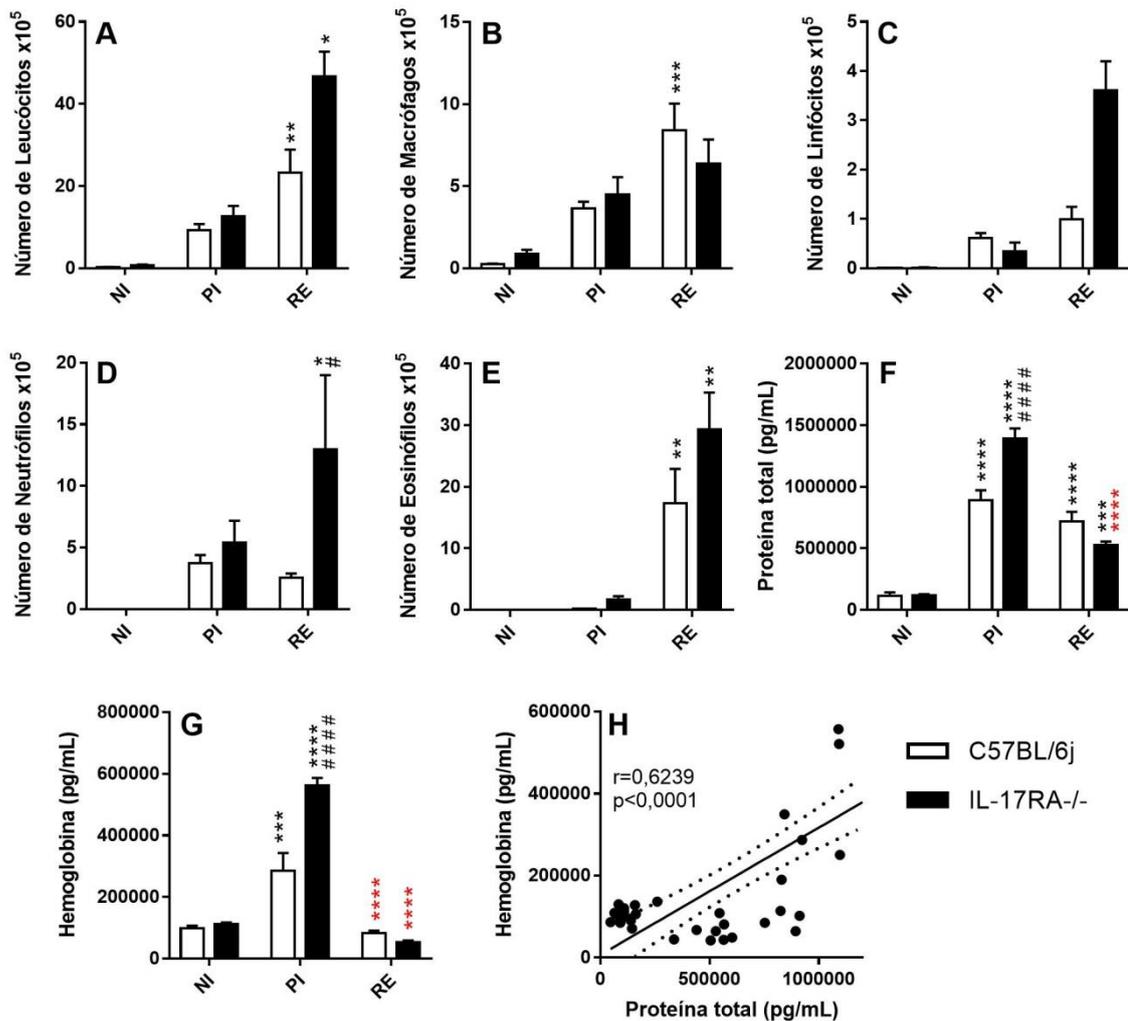


Figura 28: BAL de camundongos dos grupos C57BL/6j e IFN- $\gamma^{-/-}$ primoinfectados e reinfected no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de leucócitos. B) Número de macrófagos. C) Número de linfócitos. D) Número de neutrófilos. E) Número de eosinófilos. F) Níveis de proteína total. G) Níveis de hemoglobina. Os testes One-Way Anova (G) e Kruskal-Wallis (A, B, C, D, E e F), seguidos dos testes de comparação múltipla de Tukey e de Dunn, respectivamente, foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma linhagem; **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma linhagem e; # $p < 0,05$ e ##### $p < 0,0001$ para diferenças entre grupos de linhagens diferentes que receberam o mesmo tratamento. H) Correlação entre níveis de hemoglobina X níveis de proteína total, testados pelo teste de correlação de Pearson, sendo que os valores de p e r estão representados no gráfico.

A avaliação da resposta imune sistêmica, por meio da dosagem de citocinas no soro, evidenciou um expressivo aumento de IL-10 em camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} RE quando comparado aos do grupo C57BL/6j RE e aos demais grupos de IL-17RA^{-/-}. Além disso, camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} apresentaram a citocina IL-10 aumentada em todos os grupos quando comparados aos camundongos do grupo C57BL/6j (Figura 29A). Quanto aos níveis de IL-4, foram aumentados nos camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} NI em relação aos do grupo C57BL/6j NI (Figura 29B). A citocina IL-6 foi significativamente aumentada nos camundongos dos grupos IL-17RA^{-/-} PI e IL-17RA^{-/-} RE em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 29C). Quanto aos níveis de IL-17A, foram

significativamente aumentados em todos os grupos da estirpe IL-17RA^{-/-} (Figura 29D). Foi verificado um aumento nos níveis de IFN- γ nos camundongos dos grupos IL-17RA^{-/-} NI e IL-17RA^{-/-} PI em relação aos selvagens; já nos camundongos C57BL/6j, foi aumentado nos reinfectedos em relação aos demais grupos da mesma estirpe (Figura 29E). Não foram detectados aumentos significativos dos níveis de TNF (Figura 29F). E por fim, os níveis de IL-2 foram significativamente aumentados em camundongos do grupo IL-17RA^{-/-} NI em relação aos do grupo C57BL/6j NI e, nos do grupo C57BL/6j RE em relação aos demais grupos da mesma linhagem (Figura 29G).

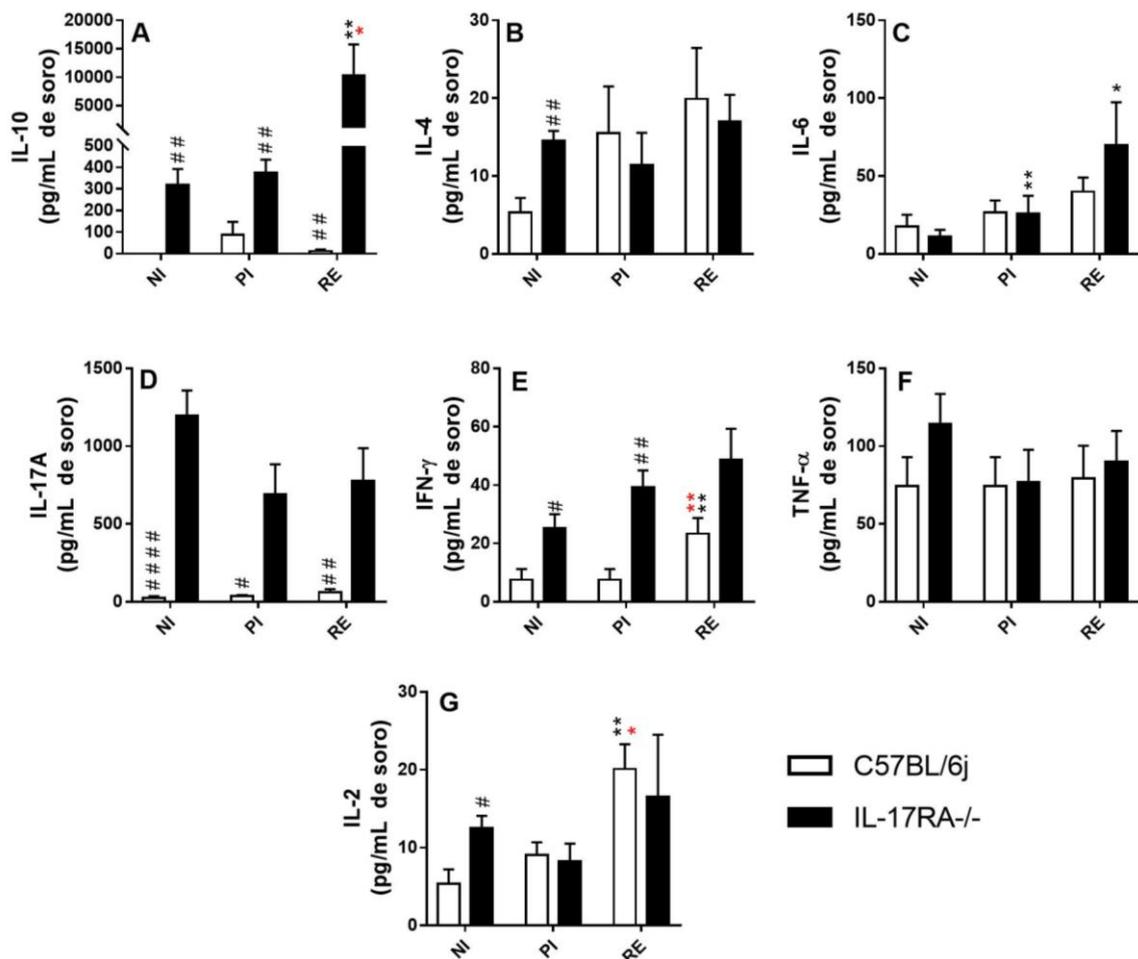


Figura 29: Citocinas séricas dosadas em camundongos C57BL/6j e IL-17RA^{-/-} primoinfectados e reinfectedos no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IL-4. C) Níveis de IL-6. D) Níveis de IL-17A. E) Níveis de IFN- γ . F) Níveis de TNF. G) Níveis de IL-2. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma linhagem; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma linhagem; e, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,0001$ para diferenças entre grupos de linhagens diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Em síntese, a utilização da estirpe de camundongos deficientes no receptor IL-17RA, sugere que a modulação negativa da resposta Th17, propicia um microambiente tecidual favorável ao controle da migração larval, independente da atividade de EPO e MPO, e induz um aumento considerável de

citocinas inflamatórias e regulatórias como, por exemplo, IFN- γ e IL-10, respectivamente. Por outro lado, mesmo diante de uma inflamação tecidual, os camundongos da estirpe IL-17RA^{-/-} não apresentaram perda acentuada na função pulmonar, provavelmente devido a menor produção de mediadores pró-fibróticos provenientes das respostas Th2/Th17.

6.1.3 A DEFICIÊNCIA NA SINALIZAÇÃO IL-33/ST2 PARECE GERAR UM AUMENTO NA INFLAMAÇÃO TH1/TH17, COM CONSEQUENTE REDUÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E PERDA DA FUNÇÃO PULMONAR

Para o estudo mais aprofundado da resposta do tipo Th2 na ascariíose larval, camundongos deficientes na sinalização IL-33/ST2 (ST2^{-/-}) foram submetidos aos mesmos protocolos de infecção e reinfecção padronizados neste trabalho. Inicialmente, a análise de carga parasitária pela quantificação do número total de larvas recuperadas nos pulmões, foi constatada uma redução significativa do número de larvas nos camundongos dos grupos BALB/c RE e ST2^{-/-} RE, com percentual de redução da carga de 99,54% e 91,04%, respectivamente, quando comparadas aos camundongos dos grupos BALB/c PI e ST2^{-/-} PI (Figura 30A). Em relação ao número de larvas recuperadas do parênquima pulmonar, foi verificada uma redução da carga parasitária significativa apenas em camundongos do grupo BALB/c RE quando comparados aos do grupo BALB/c PI, com percentual de redução de 99,51% (Figura 30B). Em relação ao número de larvas recuperadas das vias aéreas, foi verificada uma redução significativa nos camundongos dos grupos BALB/c RE e ST2^{-/-} RE, com percentual de redução da carga de 99,67% e 99%, respectivamente quando comparadas aos dos grupos BALB/c PI e ST2^{-/-} PI (Figura 30C). Tais achados sugerem que, no modelo de múltiplas exposições, a resposta desencadeada pelo eixo IL-33/ST2 contribui para a proteção da carga parasitária total, com maior importância no que diz respeito ao número de larvas migrando no parênquima pulmonar.

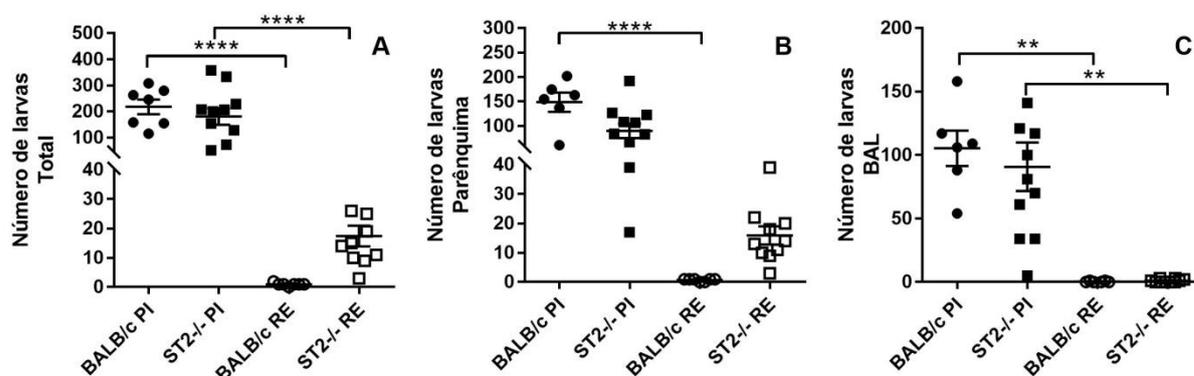


Figura 30: Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos dos grupos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfecados no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de larvas. B) Número de larvas recuperadas do parênquima pulmonar. C) Número de larvas recuperadas das vias aéreas. O teste One-way Anova seguido do teste de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelo símbolo (*) nos gráficos. Onde ** p < 0,01 e **** p < 0,0001.

No que se refere à inflamação tecidual provocada pela migração larval e a resposta imune associada, tem sido verificado ao longo desse estudo que é recorrente e mais acentuada em camundongos reinfected. No caso do modelo ST2^{-/-} foi verificado por meio da análise semiquantitativa da inflamação, um maior score de inflamação das vias aéreas nos camundongos do grupo ST2^{-/-} RE quando comparados aos do grupo ST2^{-/-} PI (Figura 31A). Quanto à inflamação vascular, foi mais acentuada em ambos os grupos reinfected, quando comparados aos respectivos primoinfectados (Figura 31B). Contudo, pela avaliação do score total foi verificado que os camundongos do grupo ST2^{-/-} RE apresentaram maior inflamação tecidual (Figura 31E). E, no que se refere à hemorragia, foi significativamente aumentada em camundongos do grupo ST2^{-/-} PI, quando comparada aos do grupo ST2^{-/-} RE (Figura 31D).

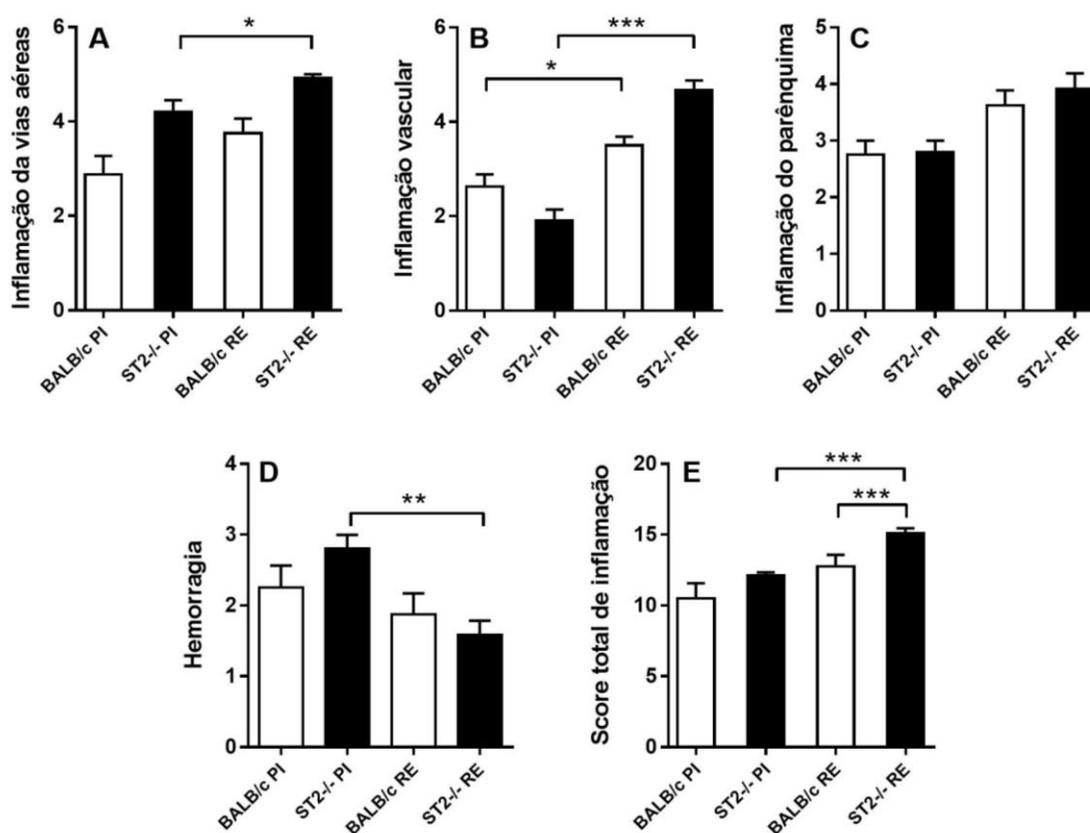


Figura 31: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfected no oitavo dia pós-infecção. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) Score total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média ± SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. Onde ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

Quando observado os pulmões dos camundongos dos grupos ST2^{-/-} PI e ST2^{-/-} RE, foi verificado que estes exibiram lesões microscópicas no parênquima caracterizadas pelo espessamento dos septos interalveolares. Nesses animais foi verificada a presença de infiltrado inflamatório misto formado por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e escassos eosinófilos. Além disso, o infiltrado

inflamatório peribrônquico e perivascular foi mais exuberante nos camundongos do grupo ST2^{-/-} RE quando comparados aos do grupo ST2^{-/-} PI, sobretudo com a formação de BALT, assim como nos camundongos do grupo BALB/c RE (Figura 32).

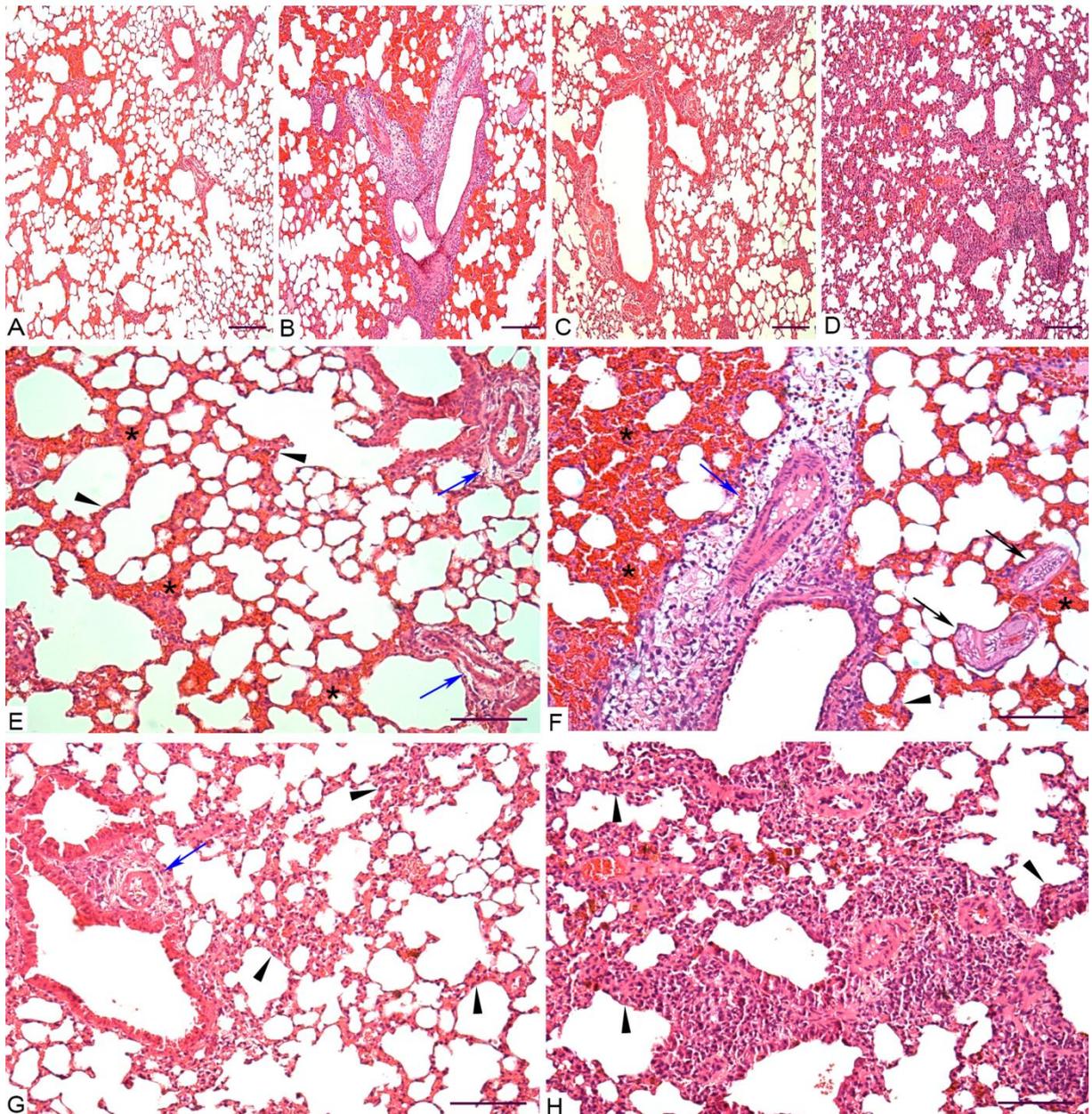


Figura 32: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão. A) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c PI. B) Imagem panorâmica representativa do grupo ST2^{-/-} PI. C) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c RE. D) Imagem panorâmica representativa do grupo ST2^{-/-} RE. E) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c PI com leve espessamento de septos interalveolares. F) Imagem em maior aumento representativa do grupo ST2^{-/-} PI com ligeiro espessamento de septos interalveolares e presença de larva no interior de um bronquíolo. G) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. H) Imagem em maior aumento representativa do grupo ST2^{-/-} RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. Alterações histopatológicas são representadas por símbolos nas imagens, sendo que * indica áreas de hemorragia, cabeças de setas indicam o espessamento de septos interalveolares e, seta azul indica edema perivascular. Barra de escala da menor ampliação = 100 µm. Barra de escala da maior ampliação = 50 µm.

Ainda foi possível observar, a presença de zonas hemorrágicas no parênquima pulmonar e alguns vasos exibiram edema perivascular, edema da túnica adventícia e espessamento da túnica

média às custas de hipertrofia e hiperplasia de leiomiócitos, ocasionando redução da luz vascular. Esses achados, com exceção das zonas hemorrágicas que foram mais exuberantes nos camundongos do grupo ST2^{-/-} PI, foram mais intensos, comprometendo maior área do parênquima pulmonar nos camundongos do grupo ST2^{-/-} RE quando comparados aos dos grupos ST2^{-/-} PI e BALB/c RE (Figura 32). Ainda relacionada à hemorragia, foi possível identificar no parênquima pulmonar dos camundongos do grupo ST2^{-/-} RE, a presença de hemosiderina no interior de macrófagos e no interstício, tal achado sugere que camundongos desse grupo estão em processo de resolução de hemorragia (Figura 32). Por fim, foi possível observar nos camundongos do grupo BALB/c PI e ST2^{-/-} PI a presença constante de larvas no parênquima pulmonar. O mesmo não foi observado nos camundongos BALB/c RE e ST2^{-/-} RE (Figura 32).

No modelo ST2^{-/-}, as análises da capacidade pulmonar por meio da espirometria forçada em respirador mecânico, revelaram que as lesões do parênquima pulmonar provocaram alterações no funcionamento pulmonar. Notou-se, nesse modelo, que a migração larval, bem como as lesões provocadas por ela, associada ao processo inflamatório e resolução, provocaram um aumento na resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas nos camundongos do grupo BALB/c PI e BALB/c RE (Figura 33A). Corroborando com esse achado, foi verificada uma diminuição na complacência dinâmica nos camundongos dos grupos ST2^{-/-} PI, BALB/c RE e, mais acentuada nos do grupo BALB/c PI (Figura 33B). Foi verificada também a diminuição do volume expiratório forçado em 100ms (FEV100) nos camundongos BALB/c PI. Curiosamente, houve um aumento nesse indicador nos camundongos dos grupos BALB/c RE e ST2^{-/-} RE quando comparados aos respectivos grupos não infectados (Figura 33C).

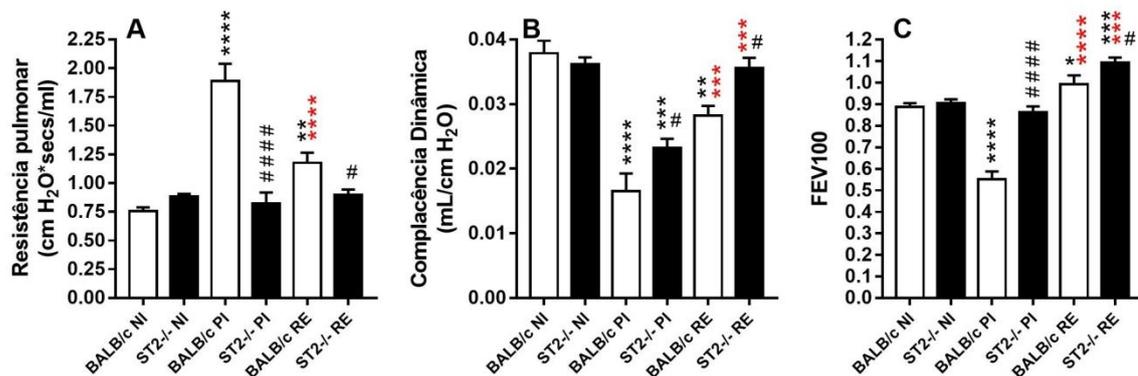


Figura 33: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfectados no oitavo dia pós-infecção por *A suum*. A) Resistência Pulmonar. B) Complacência Dinâmica. C) FEV100. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM e quando significativos foram representadas pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 representam diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 representam diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # p < 0,05 e ##### p < 0,0001 representam diferença entre grupos que receberam o mesmo tratamento, de estirpes diferentes.

Ao avaliar as características do infiltrado inflamatório pela dosagem da atividade de EPO e MPO, foi verificado um expressivo aumento da atividade de EPO em camundongos do grupo ST2^{-/-} PI em relação aos demais grupos (Figura 34A). A atividade de EPO também foi aumentada nos camundongos do grupo ST2^{-/-} RE quando comparada a dos grupos BALB/c RE e ST2^{-/-} NI e, nos camundongos do grupo BALB/c RE foi aumentada quando comparada a dos demais grupos da mesma estirpe (Figura 34A). Quanto à atividade de MPO, não foram detectadas alterações nos camundongos dos grupos ST2^{-/-} (Figura 34B).

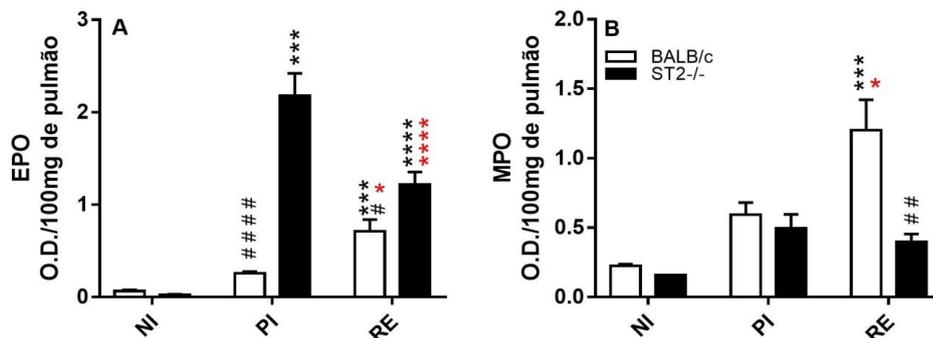


Figura 34: Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfectados. A) Níveis da atividade de EPO. B) Níveis da atividade de MPO. Os testes One-Way Anova (A) e Kruskal-Wallis (B), seguidos dos testes de comparação múltipla de Tukey e de Dunn, respectivamente, foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde, *** $<$ 0,001 e **** $p <$ 0,0001 para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p <$ 0,05 e **** $p <$ 0,0001 para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ## $p <$ 0,01 para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Ainda no que se refere à inflamação pulmonar, a avaliação da celularidade no BAL permitiu verificar que camundongos do grupo ST2^{-/-} RE apresentaram um aumento no número total de leucócitos, contudo, inferior ao observado em camundongos do grupo BALB/c RE (Figura 35A). Ao avaliar os subtipos celulares, foi verificado um aumento significativo no número de macrófagos tanto em camundongos do grupo BALB/c RE quanto ST2^{-/-} RE (Figura 35B). Quanto aos linfócitos, apesar de aumentados nas vias aéreas de camundongos do grupo ST2^{-/-} RE em relação aos demais grupos da mesma estirpe, o aumento não foi tão expressivo quanto o observado no grupo BALB/c RE (Figura 35C). O número de neutrófilos foi significativamente aumentado nos camundongos dos grupos BALB/c PI, ST2^{-/-} PI e BALB/c RE (Figura 35D). Já os eosinófilos foram expressivamente aumentados nos camundongos do grupo BALB/c RE quando comparados aos demais grupos, enquanto que os camundongos do grupo ST2^{-/-} RE apresentaram aumento apenas em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 35E).

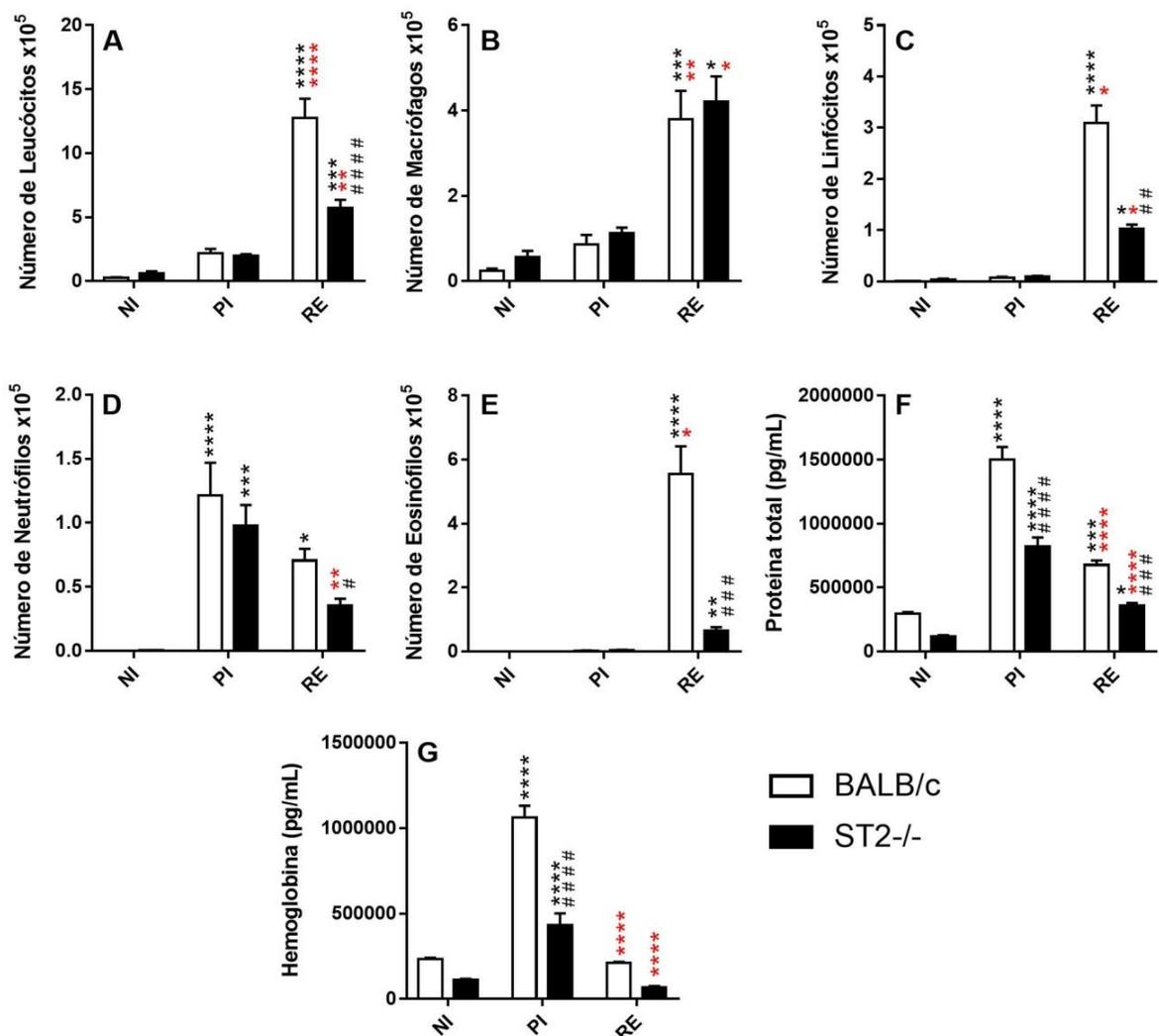


Figura 35: BAL de camundongos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfectedos no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de leucócitos. B) Número de macrófagos. C) Número de linfócitos. D) Número de neutrófilos. E) Número de eosinófilos. F) Níveis de proteína total. G) Níveis de hemoglobina. Os testes One-Way Anova (A, D, F e G) e Kruskal-Wallis (B, C e E), seguidos dos testes de comparação múltipla de Tukey e de Dunn, respectivamente, foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe e; ## $p < 0,01$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Ao analisar o sobrenadante do BAL foi verificado um expressivo aumento de proteína total em camundongos do grupo BALB/c PI, quando comparados aos demais grupos. Contudo, foi verificado um aumento significativo nos camundongos do grupo ST2^{-/-} PI em relação aos demais grupos da mesma estirpe e, nos dos grupos BALB/c RE e ST2^{-/-} RE em relação aos respectivos não infectados (Figura 35F). Quanto aos níveis de hemoglobina no BAL, foi aumentado em camundongos do grupo BALB/c PI, quando comparados aos demais grupos e, nos do grupo ST2^{-/-} PI em relação aos demais grupos da mesma estirpe (Figura 35G).

A avaliação da resposta imune sistêmica foi realizada por meio da dosagem de citocinas séricas. Essa avaliação evidenciou um aumento na produção de IL-10 em camundongos do grupo ST2^{-/-}

^{-/-} NI quando comparados aos do grupo BALB/c NI. O aumento de IL-10 em camundongos BALB/c foi verificado apenas em reinfetados (Figura 36A). Quanto aos níveis de IFN- γ foram significativamente aumentados em camundongos do grupo ST2^{-/-} RE quando comparados aos demais grupos (Figura 36B). O aumento nos níveis de IL-6 foi verificado em camundongos dos grupos BALB/c PI e BALB/c RE (Figura 36C). Quanto aos níveis de IL-17A foram aumentados em ambos os grupos reinfetados (Figura 36D). Por fim, os níveis de TNF foram aumentados apenas nos camundongos ST2^{-/-} NI em relação aos dos demais grupos (Figura 36E).

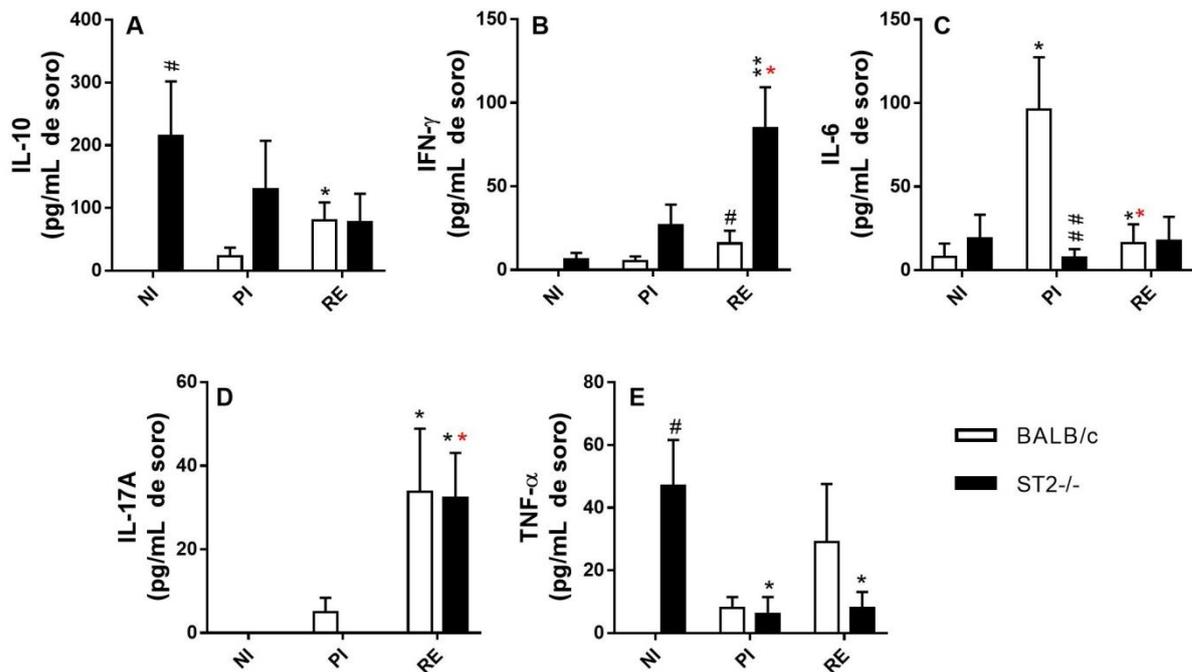


Figura 36: Citocinas séricas dosadas em camundongos BALB/c e ST2^{-/-} primoinfectados e reinfetados no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IFN- γ . C) Níveis de IL-6. D) Níveis de IL-17A. E) Níveis de TNF. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * p < 0,05, ** p < 0,01 para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * p < 0,05 para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # p < 0,05, ## p < 0,01 e para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Portanto, o estudo da resposta Th2 utilizando o modelo ST2^{-/-}, demonstrou que a deficiência na sinalização IL-33/ST2 leva ao aumento das respostas do tipo Th1 e Th17, evidenciado pelo aumento das citocinas IFN- γ e IL-17A em camundongos reinfetados. Foi detectado o aumento da atividade do EPO, inclusive em camundongos primoinfectados. Contudo, o controle da carga parasitária foi verificado apenas após múltiplas exposições. A deficiência em ST2^{-/-} foi associada também a melhora da capacidade pulmonar após a reinfecção. Tais achados, sugerem que a resposta desencadeada pela sinalização IL-33/ST2 contribui para a fisiopatologia pulmonar da ascaridiose.

6.1.4 A REGULAÇÃO POSITIVA DA RESPOSTA Th2, POR MEIO DA CITOCINA IL-4, ESTÁ ASSOCIADA AO CONTROLE DA MIGRAÇÃO LARVAL NA ASCARIDIOSE PRIMÁRIA, CONTUDO, A PROTEÇÃO OBSERVADA NA REINFECÇÃO PARECE SER INDEPENDENTE DE IL-4

Visando aprofundar a avaliação da participação da resposta do tipo Th2 na ascaridiose larval, camundongos da estirpe IL-4^{-/-} foram primoinfectados e reinfetados e, comparados a estirpe selvagem BALB/c. Inicialmente, por meio da avaliação da carga parasitária no tecido pulmonar, foi evidenciado que a citocina IL-4 contribui para o controle do número de larvas após uma infecção primária. Contudo, ao avaliar a carga parasitária de camundongos reinfetados, de maneira intrigante, foi evidenciado que a ausência dessa citocina não impactou no controle do número de larvas, o que sugere que a proteção observada após múltiplas exposições é independente da resposta gerada pela citocina IL-4 (Figura 37).

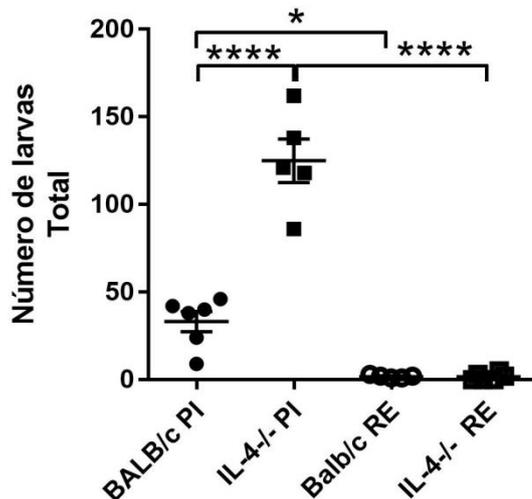


Figura 37: Número de larvas recuperadas dos pulmões de camundongos BALB/c e IL-4^{-/-} no oitavo dia pós-infecção. O teste One-way Anova seguido do teste de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos e os resultados são representados pelos símbolos (*) no gráfico, onde, * < 0,05 e **** < 0,0001.

Apesar da menor carga parasitária observada, a avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar (Figura 38) demonstrou que camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE apresentaram maior score de inflamação das vias aéreas (Figura 38A), vascular (Figura 38B) e do parênquima pulmonar (Figura 38C) quando comparados com camundongos IL-4^{-/-} PI, culminando no maior score total de inflamação tecidual (Figura 38D). Em relação aos camundongos do grupo BALB/c RE, apresentaram maior inflamação vascular, quando comparados aos BALB/c PI (Figura 38B).

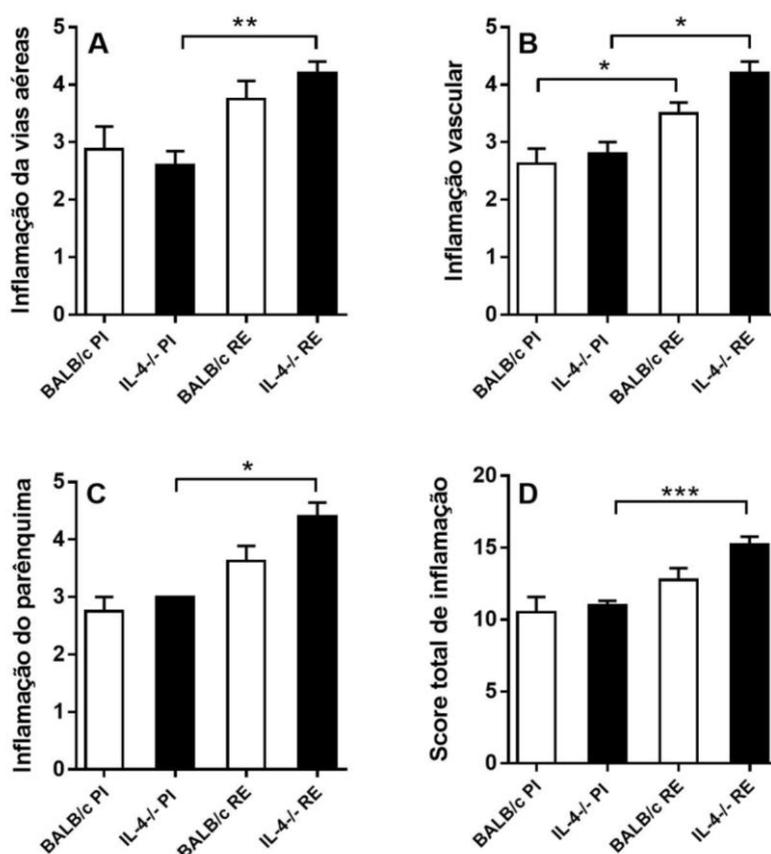


Figura 38: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Score total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

De maneira mais detalhada, foi possível constatar que camundongos primoinfectados e reinfectados de ambas as estirpes apresentaram lesões microscópicas do parênquima, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares, provocadas por hemorragia, hiperemia vascular, edema perivascular e inflamação do parênquima pulmonar. Além disso, foi possível verificar a presença de zonas hemorrágicas em todos os grupos, bem como, edema perivascular, sendo que estes foram mais frequentes e exuberantes no parênquima pulmonar dos camundongos do grupo IL4^{-/-} RE quando comparados aos do grupo IL4^{-/-} PI, o que contribuiu para redução da luz vascular. Por meio dessa análise também foi possível identificar a presença de larvas no parênquima pulmonar dos camundongos dos grupos BALB/c PI e IL4^{-/-} PI. O mesmo não foi observado no parênquima pulmonar de camundongos do grupo BALB/c RE e IL4^{-/-} RE. E, quanto ao infiltrado inflamatório, foi mais exuberante em camundongos reinfectados, o que comprometeu uma maior área do seu parênquima pulmonar. Contudo, enquanto os camundongos do grupo BALB/c RE apresentaram infiltrado inflamatório misto, com predominância de neutrófilos, eosinófilos e a formação de BALT, nos camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE, o infiltrado foi misto caracterizado pela presença de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e escassos eosinófilos, com a presença marcante granulomas (Figura 39).

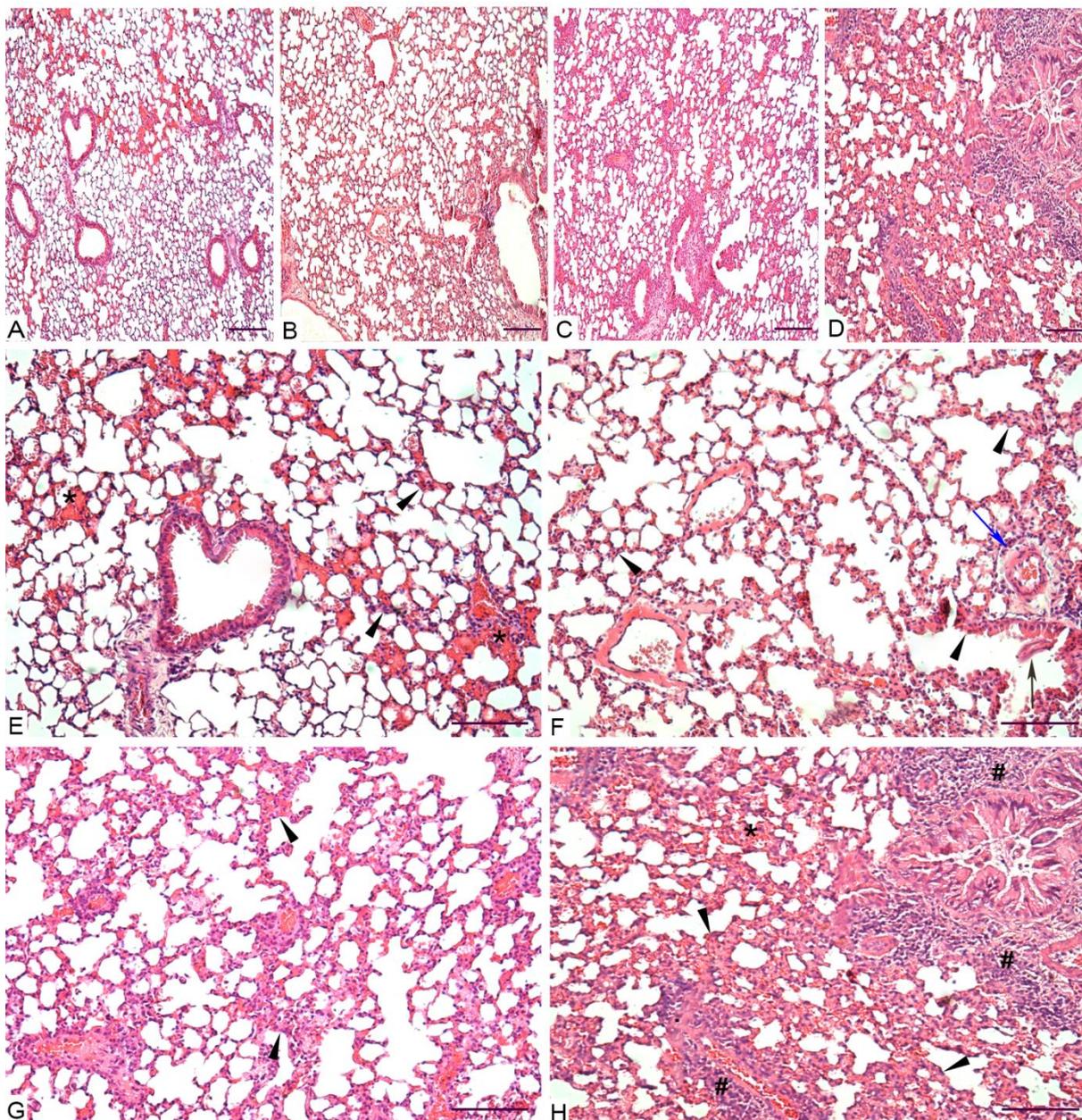


Figura 39: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval. A) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c PI. B) Imagem panorâmica representativa do grupo de IL-4^{-/-} PI. C) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c RE. D) Imagem panorâmica representativa do grupo IL-4^{-/-} RE. E) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c PI com ligeiro espessamento de septos interalveolares; F) Imagem em maior aumento representativa do grupo IL-4^{-/-} PI com leve espessamento de septos interalveolares e presença de larva no interior de um bronquíolo; G) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. H) Imagem em maior aumento representativa do grupo IL-4^{-/-} RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. Alterações histopatológicas são representadas por símbolos nas imagens, sendo que * indica áreas de hemorragia, # indica infiltrado inflamatório, cabeças de setas indicam o espessamento de septos interalveolares, seta preta indica presença de larva e, seta azul indica edema perivascular. Barra de escala da menor ampliação = 100 µm. Barra de escala da maior ampliação = 50 µm.

Para avaliar as características da inflamação do tecido pulmonar, foi realizada a avaliação do acúmulo de neutrófilos e eosinófilos, por meio da dosagem da atividade de MPO e EPO,

respectivamente e, a análise do perfil de citocinas no tecido pulmonar desses animais. Primeiramente, foi evidenciado um aumento significativo na atividade de EPO em camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE quando comparados aos do grupo IL-4^{-/-} NI, não apresentando diferenças significativas em relação aos do grupo IL-4^{-/-} PI e, de maneira interessante, a atividade de EPO nos camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE apresentou os mesmos níveis que nos do grupo BALB/c RE (Figura 40A). Quanto aos níveis de MPO foram aumentados apenas nos camundongos do grupo BALB/c RE (Figura 40B).

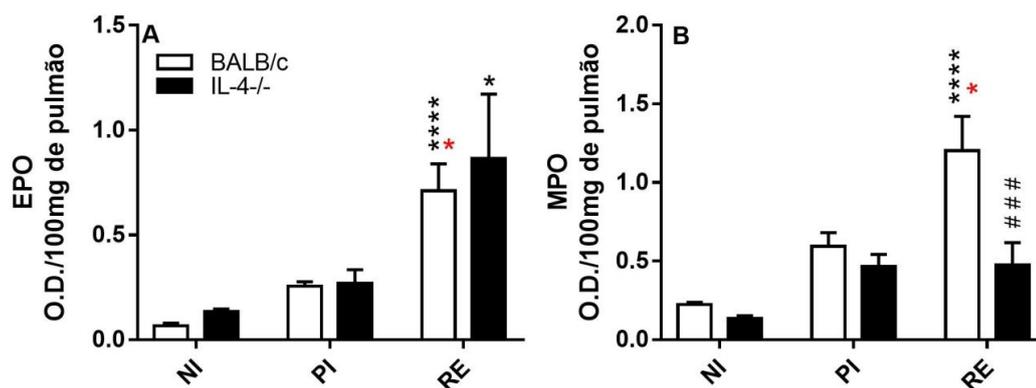


Figura 40: Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e IL-4^{-/-} primoinfectados e reinfetados. A) Níveis da atividade de EPO. B) Níveis da atividade de MPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde, * < 0,05 e **** p < 0,0001 para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe * p < 0,05 para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ### p < 0,001 para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Quanto ao perfil de citocinas teciduais, camundongos do grupo IL-4^{-/-} PI apresentaram um significativo aumento de IL-2, quando comparados aos dos grupos BALB/c PI e IL-4^{-/-} RE (Figura 41A). A produção de IL-10, foi significativamente aumentada apenas em camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE (Figura 41B). Ademais, foi verificado um aumento expressivo da citocina IL-6 nos camundongos do grupo BALB/c PI em relação aos demais grupos, contudo essa citocinas também esteve aumentada nos camundongos do grupo IL-4^{-/-} PI em relação aos do grupo IL-4^{-/-} RE e, nos grupos BALB/c RE e IL-4^{-/-} RE em relação aos respectivos não infetados (Figura 41C). Quanto aos níveis de IL-17A, foram aumentados em todos os grupos primoinfectados e reinfetados (Figura 41D), assim como de IFN- γ (Figura 41E). Por fim, as análises dos níveis de TNF evidenciaram um aumento significativo dessa citocina nos camundongos dos grupos BALB/c PI, IL-4^{-/-} PI e BALB/c RE (Figura 41E).

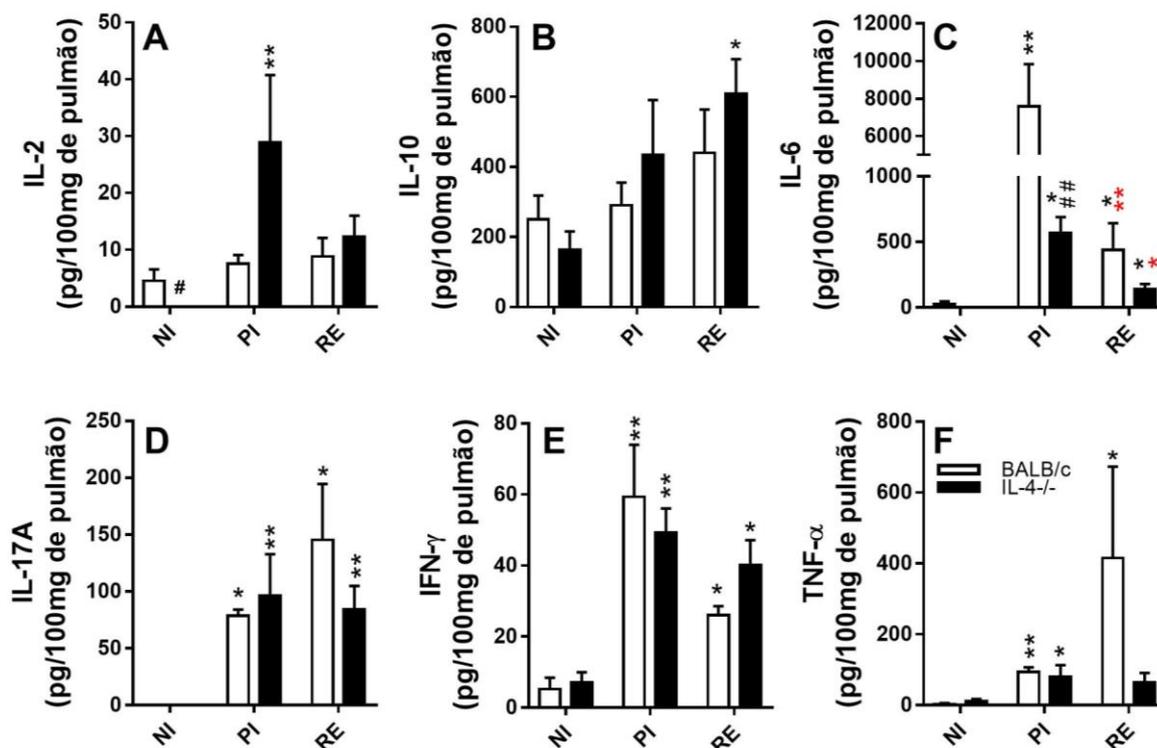


Figura 41: Citocinas dosadas no tecido pulmonar no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-2. B) Níveis de IL-10. C) Níveis de IL-6. D) Níveis de IL-17A. E) Níveis de IFN- γ . F) Níveis de TNF. Os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Já a avaliação da resposta imune sistêmica foi realizada por meio da quantificação de citocinas séricas e da avaliação do perfil de leucócitos circulantes em diferentes tempos de infecção. Quanto ao número de monócitos circulantes, foi inicialmente aumentado nos camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE no tempo -14, ou seja, 14 dias após a primeira exposição ao parasito (Figura 42A). Quanto aos linfócitos, esteve significativamente aumentado no tempo -14 em camundongos do grupo BALB/c RE, nos tempos seguintes o número desse tipo celular caiu em todos os grupos (Figura 42B). Quanto aos neutrófilos, houve um expressivo aumento no oitavo dia pós-infecção em camundongos primoinfectados de ambas as estirpes (Figura 42C). Já o número de eosinófilos, foi aumentado no tempo -14 em camundongos reinfectados de ambas as estirpes e decresceu nos tempos 0 e 8 dias pós-infecção (Figura 42D), provavelmente devido ao recrutamento dessas células ao sítio da infecção.

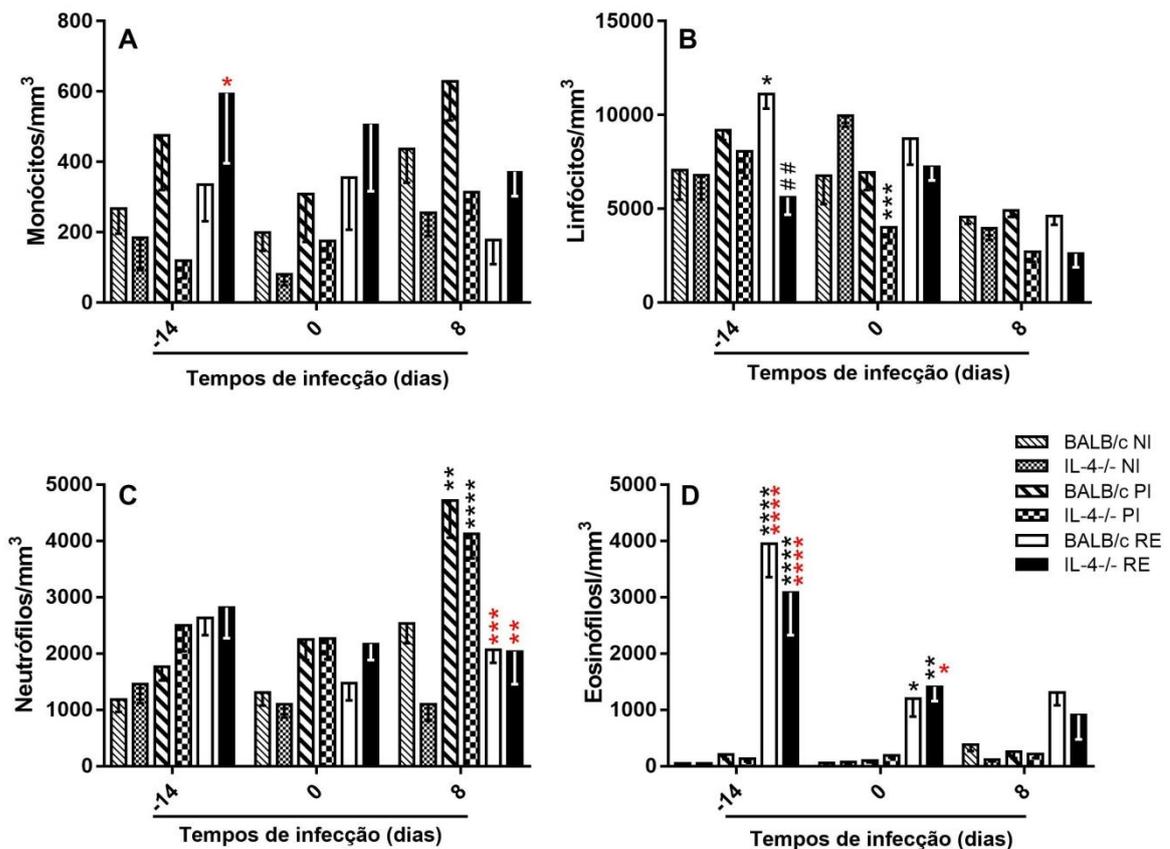


Figura 42: Contagem de células mononucleares e de granulócitos no sangue periférico em diferentes tempos após a infecção experimental por *A. suum*. A) Contagem de linfócitos. B) Contagem de monócitos. C) Contagem de neutrófilos. D) Contagem de eosinófilos. O teste Two-way ANOVA seguido de comparação múltipla de Tukey foi usado para comparar as variâncias entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam as diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam as diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, ## $p < 0,01$ representam as diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

No que tange as citocinas séricas detectadas no oitavo dia pós-infecção, não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 entre os camundongos dos grupos IL-4^{-/-} e BALB/c (Figura 43A). Os níveis de IL-6, apresentaram aumento significativo nos camundongos do grupo BALB/c PI quando comparados aos dos grupos IL-4^{-/-} PI e BALB/c NI (Figuras 43B). Quanto aos níveis de IFN- γ , foram significativamente aumentados nos camundongos do grupo IL-4^{-/-} NI quando comparados aos do grupo BALB/c NI e, nos camundongos do grupo BALB/c RE em relação aos não infectados da mesma estirpe (Figura 43C). Em relação aos níveis de TNF, apresentaram aumento significativo em camundongos do grupo IL-4^{-/-} PI quando comparados aos dos grupos IL-4^{-/-} NI e BALB/c PI, e ainda mais aumentados nos IL-4^{-/-} RE do grupo (Figura 43D), tal achado sugere que a atividade de TNF foi antecipada nos camundongos IL-4^{-/-}.

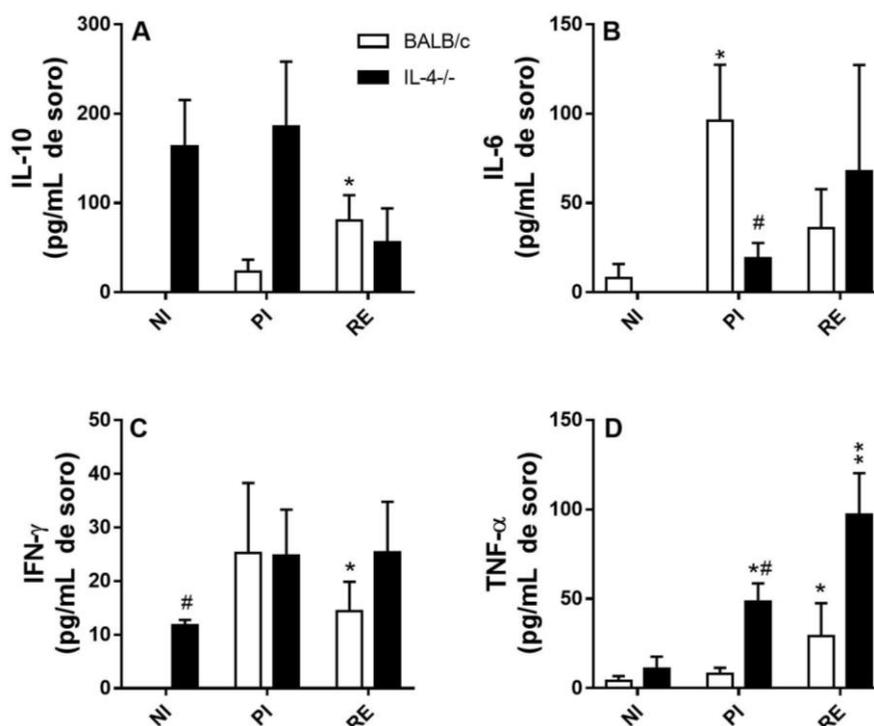


Figura 43: Citocinas séricas no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-10. B) Níveis IL-6. C) Níveis de IFN- γ . D) Níveis de TNF- α . E) Níveis de TNF. Os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; e, # $p < 0,05$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Diante do exposto, o estudo da participação da IL-4 na ascariíose larval evidenciou que essa citocina é de extrema importância na resposta inicial contra larvas de *A. suum*, contudo, após múltiplas exposições, a proteção observada se dá independente da resposta induzida por essa citocina. Além disso, foi evidenciado que camundongos do grupo IL-4^{-/-} RE apresentaram os mesmos níveis de atividade de EPO no tecido pulmonar que do grupo BALB/c RE e, somado a isso, alto número de eosinófilos circulantes nos tempos -14 e zero, reforçam que os eosinófilos são de extrema importância no controle da carga parasitária na ascariíose larval após múltiplas exposições.

Portanto, ao longo desse capítulo, foi possível constatar que camundongos deficientes na resposta Th1, apresentaram um aumento do perfil Th17, sem alterações na atividade de EPO tecidual e apresentaram redução da carga parasitária após múltiplas exposições. Quando na deficiência da resposta Th17, há o aumento da resposta do tipo Th1, caracterizada pelo aumento de IFN- γ . Foi possível verificar também, a diminuição da atividade de EPO tecidual, contudo com o aumento da inflamação tecidual e consequente redução da carga parasitária, após múltiplas exposições. Já frente à deficiência na sinalização IL-33/ST2 foi verificado um aumento da inflamação Th1/Th17, caracterizada pelo aumento de IFN- γ , IL-6 e IL-17A. Por outro lado, a redução no número de eosinófilos e da atividade de EPO tecidual pode ter impactado na redução da carga parasitária, menos acentuada após múltiplas exposições em camundongos deficientes. Desse modo, de maneira geral, a deficiência em Th2 contribuiu para o aumento da inflamação Th1/Th17, impactando na redução da carga

parasitária após múltiplas exposições. Ademais, foi possível constatar que, apesar das lesões agudas serem de extrema importância na fisiopatologia da ascarirose larval, as respostas pró-fibróticas podem contribuir para a perda da função pulmonar em camundongos reinfectedos.

7. CAPÍTULO 03:

O PAPEL DOS EOSINÓFILOS NA FISIOPATOLOGIA PULMONAR DA ASCARIDIOSE LARVAL APÓS MÚLTIPLAS EXPOSIÇÕES

7.1 RESULTADOS

Considerando os importantes resultados obtidos nos capítulos anteriores, como a proteção da carga parasitária e o aumento do número e da atividade dos eosinófilos nos pulmões, este capítulo foca na participação dos eosinófilos na imunopatologia da ascaridiose larval, passando pela avaliação da relação entre os receptores TLR2 e TLR4 *versus* produção de SIgA na mucosa pulmonar.

7.1.1 O CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA NA ASCARIDIOSE LARVAL É DEPENDENTE DE TLR2 E TLR4 QUE, CONTRIBUEM PARA O AUMENTO DO NÚMERO DE EOSINÓFILOS E DA PRODUÇÃO SIgA NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS

Inicialmente, a participação dos TLR2/4 na imunopatologia da ascaridiose larval foi avaliada por meio da infecção de camundongos das estirpes C57BL/6j selvagem, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}, seguida pela quantificação da carga parasitária pulmonar no oitavo dia pós-infecção (Figura 44). A partir dessa avaliação pode-se verificar que a carga foi maior em camundongos dos grupos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} em comparação com os do grupo C57BL/6j, sobretudo em relação as larvas recuperadas do parênquima pulmonar. No que se refere ao número de larvas recuperadas das vias aéreas, camundongos do grupo TLR4^{-/-} apresentaram a carga mais acentuada, o que sugere que esse receptor, bem como a resposta mediada por ele, são de extrema importância no controle da infecção, impactando inclusive no número de larvas a completar o ciclo de vida no intestino (Figura 44A).

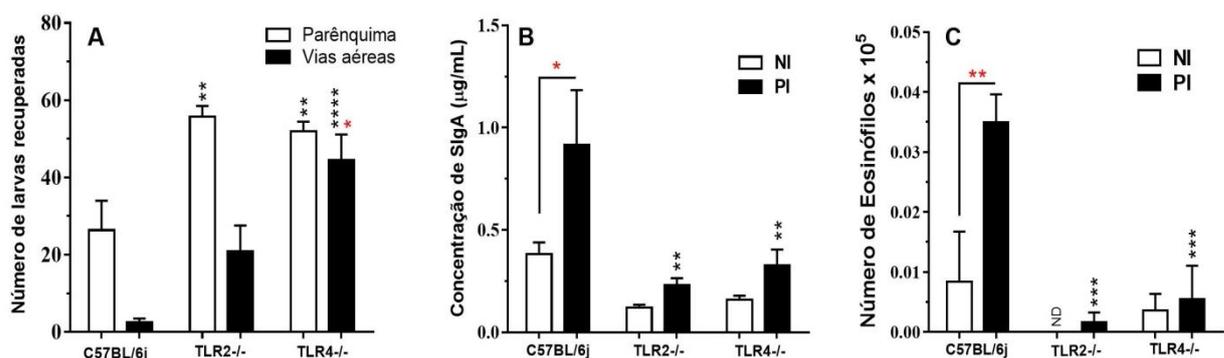


Figura 44: Impacto dos receptores do tipo Toll na carga parasitária da ascaridiose larval experimental no oitavo dia pós infecção. A) Número de larvas recuperadas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas em camundongos dos grupos C57BL/6j, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}; Diferenças entre os grupos foram representadas por (*) e **) no gráfico, sendo ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo C57BL/6 e * para diferença em relação ao grupo TLR2^{-/-}. B) Concentração de SIgA-total no BAL de camundongos; C) Número de eosinófilos nas vias aéreas. As diferenças estatísticas nos gráficos B e C são representadas pelo símbolo (*), sendo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para diferenças em relação aos grupos não infectados da mesma estirpe, e * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe. O teste Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos e os resultados são apresentados como a média \pm SEM.

Em segunda análise, para avaliar o impacto da ausência dos receptores TLR2 e TLR4 na inflamação pulmonar, a celularidade no BAL foi quantificada, contudo com foco número de eosinófilos. Essa análise evidenciou o aumento do número de eosinófilos em camundongos do grupo C57BL/6j quando comparados aos não infectados da mesma estirpe. E, além disso, foi evidenciado que o aumento do número de eosinófilos nos animais primoinfectados foi dependente da presença dos receptores TLR2 e TLR4 (Figura 44C).

Por fim, tendo evidenciado o papel dos TLR no controle da carga parasitária e no número de eosinófilos, buscou-se elucidar se os níveis de SIgA na mucosa pulmonar também seriam influenciados, para isso, o SIgA-total foi dosado no BAL dos camundongos C57BL/6j, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}. Essa análise indicou que há um aumento na produção do anticorpo no oitavo dia pós-infecção apenas nos camundongos do grupo C57BL/6j infectado quando comparada ao grupo não infectado da mesma estirpe (Figura 44B). Verificou-se, além disso, que camundongos do grupo C57BL/6j infectado apresentaram maiores níveis de SIgA no BAL quando comparados aos dos grupos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} infectados, sendo que nesses animais a produção do anticorpo manteve os níveis basais, indicando que sua produção na mucosa pulmonar depende dos receptores TLR avaliados.

Portanto, os receptores TLR2 e TLR4 impactam diretamente no número de eosinófilos e na produção de SIgA pela mucosa pulmonar, sendo de extrema importância no controle da carga parasitária no pulmão de camundongos primoinfectados.

7.1.2 EOSINÓFILOS CONTRIBUEM PARA PRODUÇÃO DE SIgA NA MUCOSA PULMONAR

Tem sido demonstrado ao longo desse estudo que, tanto o número de eosinófilos quanto os níveis de SIgA são aumentados após infecções por *A. suum* em modelo murino, nesse contexto, evidências da relação entre os eosinófilos e a produção de SIgA e, do impacto de ambos no controle da carga parasitária contribuem para elucidação da resposta imune na ascaridiose larval. Desse modo, por meio da infecção de camundongos BALB/c selvagens e, posterior análise da migração larval e da produção do SIgA em diferentes tempos, foi possível constatar um aumento progressivo nos níveis do anticorpo no BAL até o oitavo dia pós-infecção que, se manteve elevado até o último tempo avaliado (12° dpi) (Figura 45A). Com foco mais específico no oitavo dia pós-infecção, pico da migração larval pelo pulmão, e pico de SIgA no BAL, foi possível constatar que, a produção de SIgA-total foi positivamente correlacionada com o número de eosinófilos presentes nas vias aéreas dos camundongos (Figura 45B). E, além disso, o aumento da produção de SIgA apresentou correlação positiva com a carga parasitária (Figura 45C). Esses achados, indicam que a produção de SIgA é aumentada na presença dos eosinófilos e estimulada pela presença das larvas de *A. suum* pelos pulmões do hospedeiro.

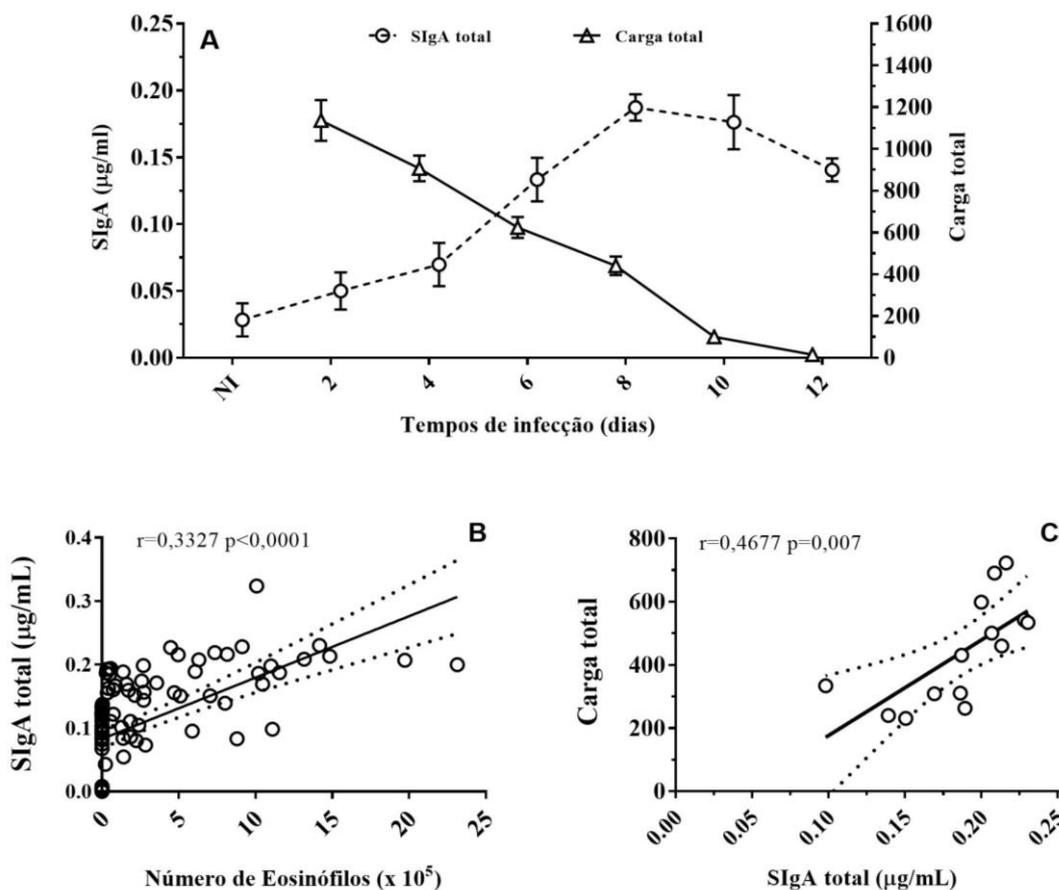


Figura 45: Cinética de migração das larvas pelos órgãos e da produção de SIgA-total na mucosa pulmonar. A) Cinética da produção de SIgA total no BAL *versus* número total de larvas recuperadas. B) Correlação entre SIgA total no BAL *versus* número de eosinófilos no BAL. C) Correlação entre o número de larvas e a produção de SIgA. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar as variáveis e os valores de r e p são apresentados nos gráficos.

7.1.3 O CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA NA ASCARIDIOSE APÓS MÚLTIPLAS EXPOSIÇÕES É PARCIALMENTE DEPENDENTE DE EOSINÓFILOS

Utilizando o modelo de múltiplas exposições, foi observado que a proteção da migração larval (Figura 9) está associada ao aumento do número e atividade de eosinófilos circulantes e teciduais (Figura 13 e 14), e no modelo de exposição simples, o aumento de SIgA na mucosa pulmonar (Figura 45), e que o número de eosinófilos foi correlacionado com a produção de SIgA na mucosa pulmonar (Figura 45), dependente da sinalização via receptores TLR2 e TLR4, que contribui para a resposta protetora na ascaridiose.

Diante desses achados, para o estudo mais aprofundado da participação dos eosinófilos na ascaridiose larval, com enfoque em múltiplas exposições, camundongos $GATA1^{-/-}$, deficientes na diferenciação de eosinófilos, e camundongos BALB/c selvagens foram infectados e reinfectados para a avaliação imunoparasitológica e fisiopatológica. Inicialmente, verificamos que a carga parasitária em camundongos do grupo BALB/c RE apresentou importante redução em todos os compartimentos

avaliados (Figura 46). Além disso, foi evidenciado, em experimentos independentes, que a deficiência em eosinófilos dos camundongos $GATA1^{-/-}$, tanto no grupo primoinfectado quanto reinfectedo, determinou a maior carga parasitária total quando comparada aos camundongos BALB/c de estirpe selvagem (Figura 46A). Já pela avaliação da carga parasitária nos diferentes compartimentos pulmonares (Figura 46B e C), foi possível constatar que mais larvas migraram para as vias aéreas de camundongos $GATA1^{-/-}$ RE quando comparada aos BALB/c RE, sugerindo uma maior capacidade do parasito em completar o ciclo em animais deficientes em eosinófilos (Figura 46C). Desse modo, pela avaliação da carga parasitária, foi possível evidenciar que a proteção verificada após múltiplas exposições é parcialmente dependente de eosinófilos, contudo, sua ausência gera um importante impacto na carga, tanto em animais primoinfectados quanto reinfectedos em nível pulmonar.

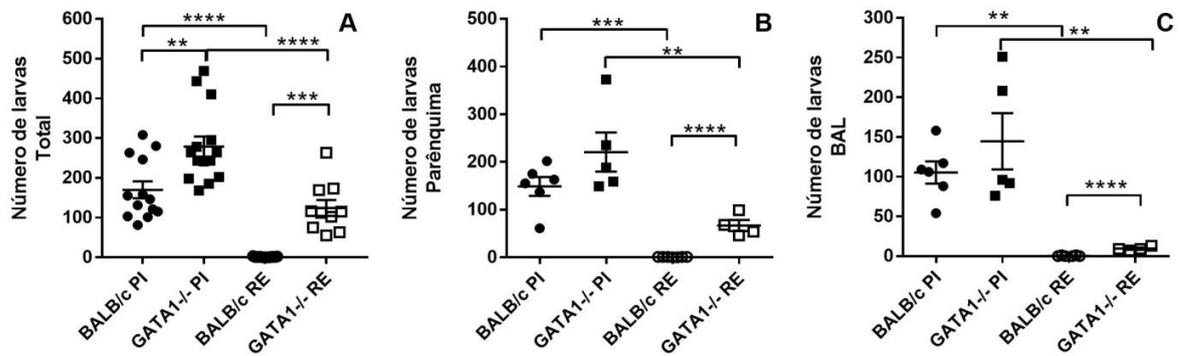


Figura 46: Número de larvas recuperadas dos pulmões dos camundongos BALB/c e $GATA1^{-/-}$ e no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de larvas. B) Número de larvas no parênquima pulmonar. C) Número de larvas nas vias aéreas. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos, onde ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

7.1.4 A INFLAMAÇÃO TECIDUAL EM CAMUNDONGOS SELVAGENS É DO TIPO MISTA, COM ACÚMULOS DE NEUTRÓFILOS E EOSINÓFILOS NO TECIDO PULMONAR E A FORMAÇÃO DE BALT

Tendo em vista que os eosinófilos são células com múltiplas funções, dependendo do órgão e do microambiente inflamatório em que se encontram, aspectos da imunopatologia pulmonar da ascaridose larval foram avaliados. Pela avaliação morfológica das lesões pulmonares ficou evidenciado, primeiramente, que camundongos dos grupos reinfectedos apresentaram maior área de lesão e fibrose quando comparados com os respectivos grupos primoinfectados (Figura 47A e 47B, respectivamente). Por outro lado, foi evidenciado que a área de lesão não diferiu entre os grupos que receberam o mesmo tratamento, ou seja, camundongos dos grupos BALB/c PI e $GATA1^{-/-}$ PI apresentaram a mesma quantidade de lesão, assim como os camundongos dos grupos BALB/c RE e $GATA1^{-/-}$ RE (Figura 47A). Todavia, vale ressaltar que apesar da área de lesão ser a mesma entre os grupos citados, as características das lesões diferiram entre os grupos. A avaliação da área de fibrose

evidenciou essa diferença, uma vez que camundongos do grupo BALB/c RE que apresentaram a mesma área de lesão que os de grupo GATA1^{-/-} RE, exibiram uma área de fibrose pulmonar significativamente maior (Figura 47B). Por fim, as avaliações morfométricas evidenciaram que, apesar de a área de lesão não refletir os achados relacionados de fibrose pulmonar, existe uma correlação positiva entre a área de lesão e a área de fibrose pulmonar no modelo de ascaridiose larval (Figura 47C).

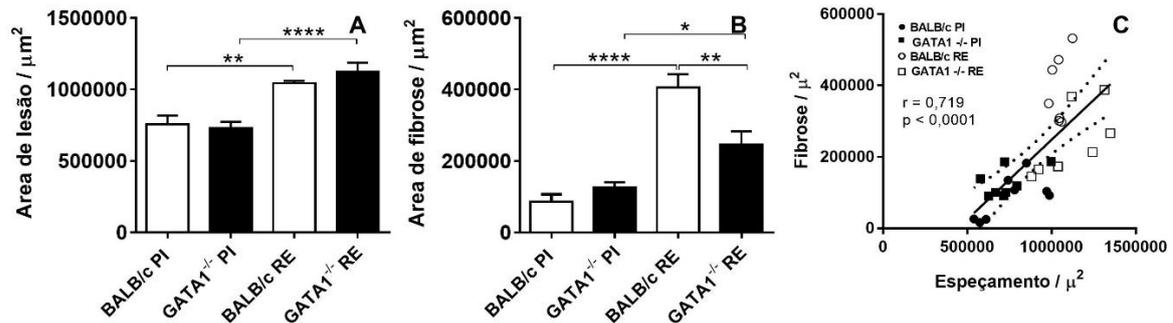


Figura 47: Análise morfométrica das lesões provocadas pela migração das larvas de *A. suum*, inflamação e reparo tecidual, em camundongos dos grupos BALB/c e GATA1^{-/-} primoinfectados e reinfectedados. A) Área da lesão causada pela migração larval e inflamação no pulmão. B) Área de fibroplasia/fibrose causada pelo reparo tecidual do pulmão. C) Correlação entre as áreas de lesão e áreas de fibrose. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelo símbolo (*) nos gráficos. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ (A e B); e o teste de correlação de Pearson foi usado para avaliar a correlação entre as duas variáveis (C).

Ainda no que tange as avaliações histopatológicas pulmonares, de maneira mais detalhada, foi possível constatar que camundongos dos grupos primoinfectados e reinfectedados de ambas as estirpes apresentaram lesões microscópicas do parênquima caracterizadas por espeçamento dos septos interalveolares, às custas de hemorragia, hiperemia vascular, edema perivascular e inflamação do parênquima pulmonar (Figura 48). Contudo, esses achados foram mais exuberantes nos camundongos dos grupos BALB/c RE e GATA1^{-/-} RE, corroborando os achados da avaliação morfométrica da área de lesão (Figura 48C e D). Quanto a hemorragia, foi maior nos camundongos dos grupos BALB/c PI, GATA1^{-/-} PI (Figura 48E e F), seguido do GATA1^{-/-} RE (Figura 48H), provavelmente em decorrência da maior migração larval pelos pulmões desses animais. Quanto ao infiltrado inflamatório, foi mais proeminente em camundongos dos grupos BALB/c RE (Figura 48C e G) e GATA^{-/-} RE (Figura 48D e H), porém com características diferentes, sendo que os dos grupos BALB/c PI e BALB/c RE apresentaram infiltrado inflamatório misto, com predominância de neutrófilos, eosinófilos e a formação de BALT nos reinfectedados; e, camundongos do grupos GATA1^{-/-} PI e GATA1^{-/-} RE apresentaram infiltrado inflamatório misto caracterizado pela presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, não foi observado a formação de BALT.

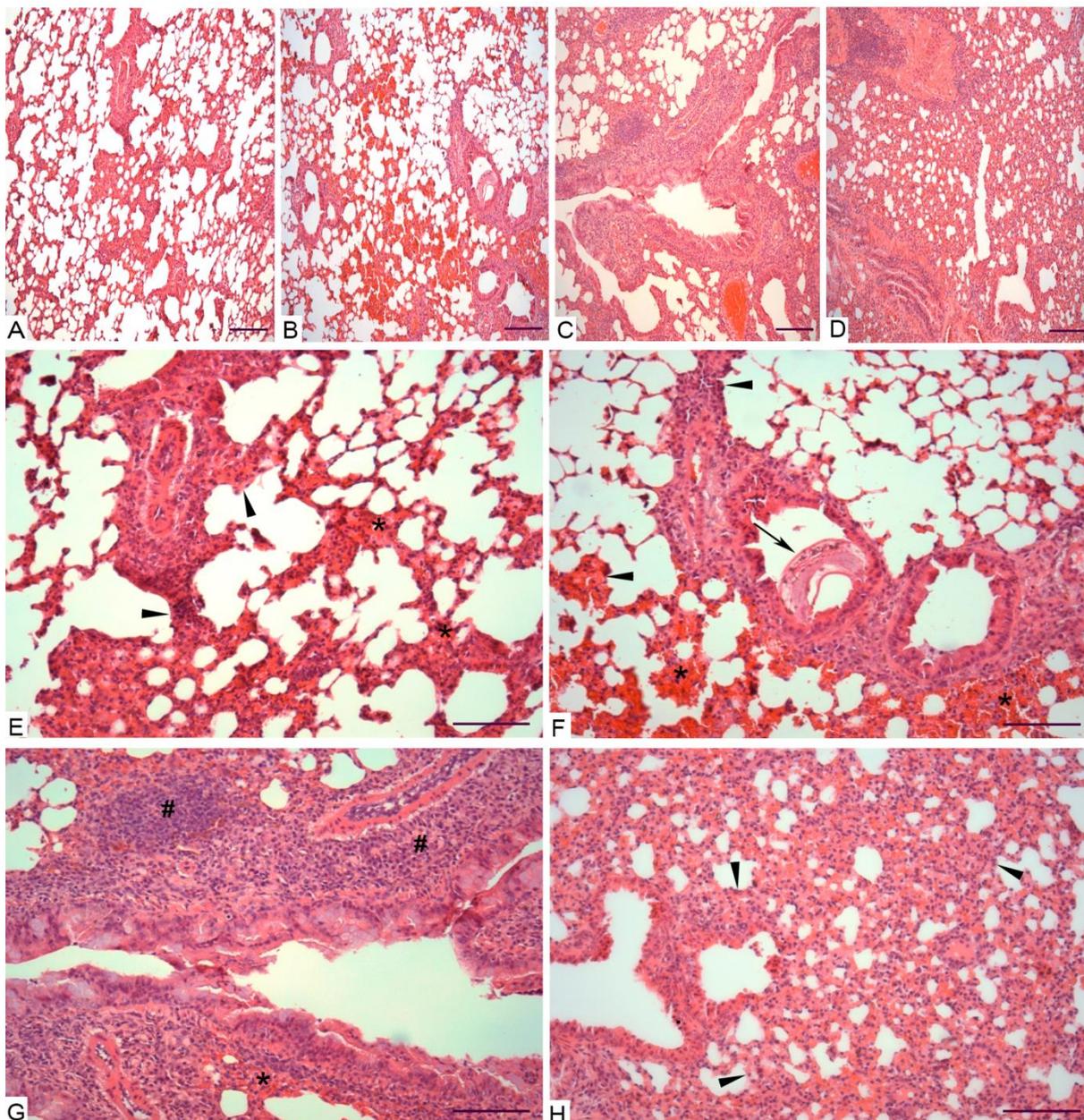


Figura 48: Imagens representativas das lesões histopatológicas causadas pela migração larval nos pulmões no oitavo dia pós-infecção e área da lesão causada pela migração larval. A) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c PI. B) Imagem panorâmica representativa do grupo GATA1^{-/-} PI. C) Imagem panorâmica representativa do grupo BALB/c RE. D) Imagem panorâmica representativa do grupo GATA1^{-/-} RE. E) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c PI com leve espessamento de septos interalveolares. F) Imagem em maior aumento representativa do grupo GATA1^{-/-} PI com leve espessamento de septos interalveolares e presença de larva no interior de um bronquíolo. G) Imagem em maior aumento representativa do grupo BALB/c RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. H) Imagem em maior aumento representativa do grupo GATA1^{-/-} RE com acentuado espessamento de septos interalveolares. Alterações histopatológicas são representadas por símbolos nas imagens, sendo que * indica áreas de hemorragia, # indica infiltrado inflamatório e BALT (G), cabeças de setas indicam o espessamento de septos interalveolares e, seta indica presença de larva no interior de bronquíolo. Barra de escala da menor ampliação = 100 µm. Barra de escala da maior ampliação = 50 µm.

Ao longo do estudo da ascaridiose larval em modelo experimental murino, a inflamação tanto do parênquima pulmonar quanto das vias aéreas, parece ser fundamental no controle da carga

parasitária após múltiplas exposições. Desse modo, o estudo da participação de leucócitos e de mediadores da resposta imune é fundamental para o melhor entendimento da fisiopatologia da ascaridiose, bem como do processo de resolução das lesões causadas pela migração larval e, sobretudo dos mecanismos envolvidos na proteção após múltiplas exposições. Nesse sentido, tendo em vista as diferentes características do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, o acúmulo de neutrófilos e eosinófilos foi quantificado pela dosagem da atividade EPO e MPO nesse tecido (Figura 49). Quanto à quantificação da atividade de EPO, foi evidenciado um expressivo aumento nos camundongos do grupo BALB/c RE quando comparados aos demais grupos da mesma estirpe, assim como aos camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE (Figura 49A). Já em relação à quantificação da atividade de MPO, foi evidenciado que camundongos do grupo BALB/c RE apresentaram um expressivo aumento da atividade dessa peroxidase (Figura 49B), corroborando os achados histopatológicos referentes ao infiltrado inflamatório, sobretudo nos camundongos BALB/c RE.

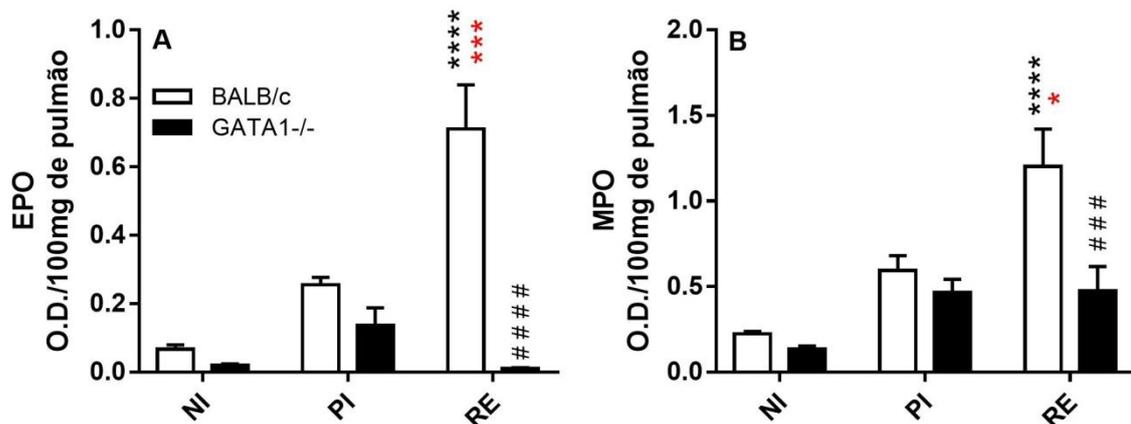


Figura 49: Níveis da atividade de EPO e MPO no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1^{-/-} primoinfectados e reinfectados. A) Níveis da atividade de EPO; B) Níveis da atividade de MPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde, **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Para avaliar o perfil e inflamação do tecido pulmonar, citocinas do tipo Th1/Th2/Th17 foram dosadas no tecido pulmonar no oitavo dia pós-infecção (Figura 50), onde foi possível verificar o aumento significativo de IL-4 nos camundongos dos grupos BALB/c PI e BALB/c RE quando comparados aos não infectados da mesma estirpe (Figura 51B). Quanto as citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 foi aumentada em camundongos dos grupos BALB/c e GATA1^{-/-}, primoinfectados e reinfectados, quando comparados aos respectivos grupos não infectados, contudo, esse aumento foi mais acentuado nos camundongos dos grupos BALB/c PI e GATA1^{-/-} PI quando comparados aos dos grupos BALB/c RE e GATA1^{-/-} RE, respectivamente (Figura 50C). Foi evidenciado também, um aumento da citocina IL-17A em camundongos dos grupos BALB/c e GATA1^{-/-}, primoinfectados e reinfectados, quando comparados aos respectivos grupos não infectados (Figura 50D). A citocina IFN- γ apresentou-se

significativamente aumentada nos camundongos dos grupos BALB/c PI e BALB/c RE, quando comparados aos não infectados da mesma estirpe (Figura 50E). Quanto a citocina TNF foi aumentada em camundongos dos grupos BALB/c e GATA1^{-/-}, primoinfectados e reinfectados, quando comparados aos respectivos não infectados (Figura 50G). Já os níveis de IL-2 foram significativamente aumentados nos camundongos do grupo GATA1^{-/-} PI; nos camundongos BALB/c, foram observados os mesmos níveis nos camundongos não infectados, primoinfectados e reinfectados, no oitavo dia pós-infecção (Figura 50H).

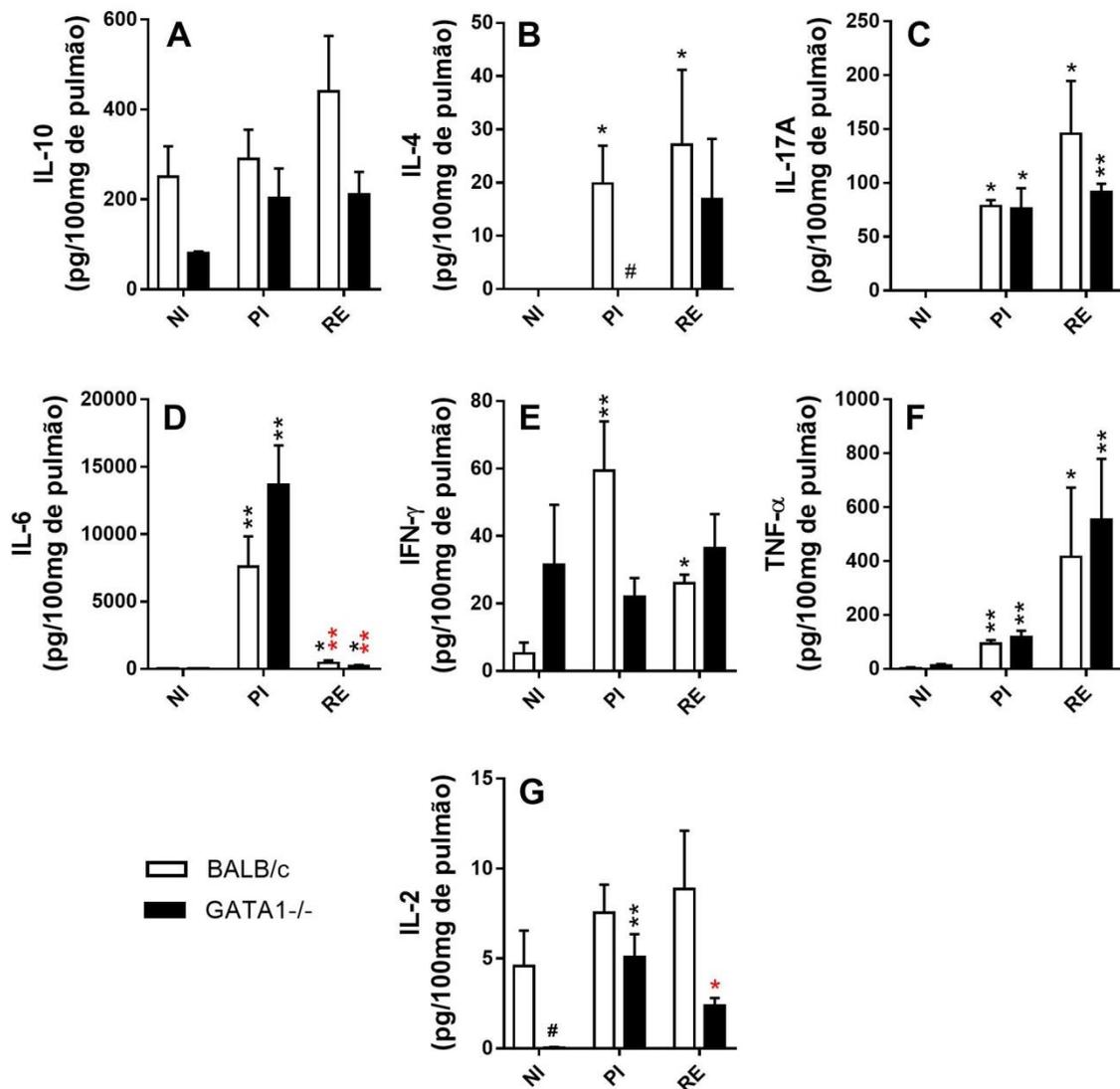


Figura 50: Citocinas teciduais dosadas no pulmão no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IL-4. C) Níveis de IL-17A. D) Níveis de IL-6. E) Níveis de IFN- γ . F) Níveis de TNF. G) Níveis de IL-2. O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * p < 0,05 e ** p < 0,01 para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * p < 0,05 e ** para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # p < 0,05 para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Ainda no que tange a inflamação pulmonar, a quantificação das células presentes nas vias aéreas por meio da contagem da celularidade no BAL (Figura 51), demonstrou que camundongos dos grupos BALB/c RE e GATA1^{-/-} RE apresentaram um significativo aumento no número total de leucócitos, macrófagos e neutrófilos, quando comparados aos dos grupos BALB/c PI, GATA1^{-/-} PI e os respectivos não infectados (Figura 51A, B e D). O aumento do número de linfócitos foi mais relevante entre os camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE (Figura 51C), e como esperado, não foram detectados eosinófilos nesses animais, enquanto que nos camundongos do grupo BALB/c RE houve um aumento expressivo desse tipo celular (Figura 51E). A avaliação do BAL também possibilitou verificar o aumento dos níveis de proteína total (Figura 51G) e hemoglobina (Figura 51F) nos pulmões dos grupos primoinfectados e reinfectados de ambas as linhagens, contudo mais acentuado no grupo GATA1^{-/-} PI. Além disso, foi verificado que há uma correlação positiva entre os níveis de proteína e de hemoglobina nas vias aéreas (Figura 51H).

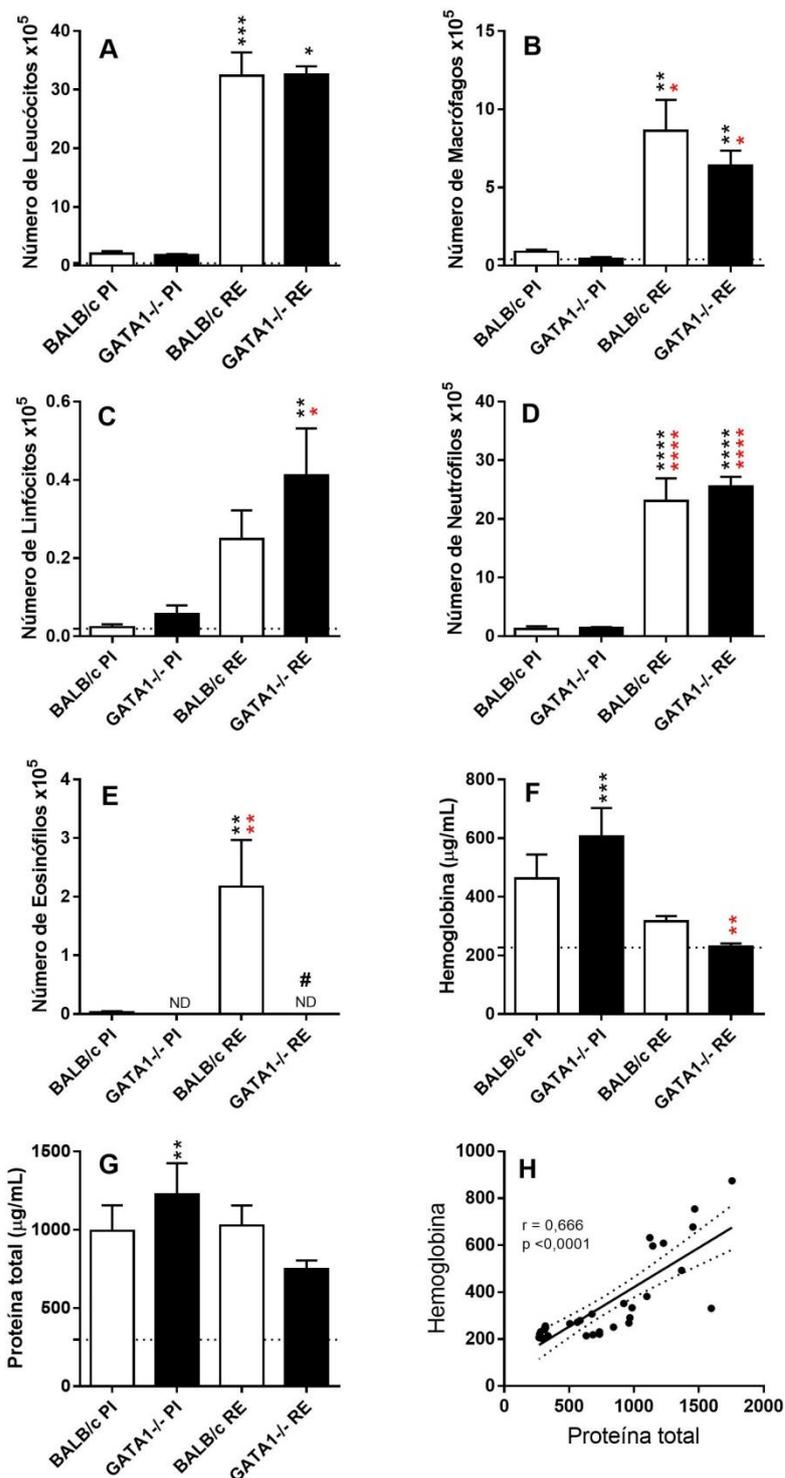


Figura 51: BAL de camundongos BALB/c e GATA1^{-/-} primoinfectados e reinfectedos no oitavo dia pós-infecção. A) Número total de leucócitos. B) Número de macrófagos. C) Número de linfócitos. D) Número de neutrófilos. E) Número de eosinófilos. F) Níveis de hemoglobina. G) Níveis de proteína total. Os testes One-Way Anova (B, C, D, E e G) e Kruskal-Wallis (A e F), seguidos dos testes de comparação múltipla de Tukey e de Dunn, respectivamente, foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média ± SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe e; # $p < 0,05$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento. Os grupos não infectados são representados pela linha pontilhada nos gráficos.

Além disso, ao aprofundar no estudo da inflamação pulmonar, com enfoque na participação dos eosinófilos em modelo de ascaridiose, por meio da infecção de camundongos deficientes no fator de transcrição GATA1, concluiu-se que o aumento dos níveis de SIgA na mucosa pulmonar é dependente da presença dos eosinófilos, uma vez que seus níveis permaneceram baixos em camundongos deficientes, mesmo após a reinfecção (Figura 52A). Além disso, utilizando antígenos específicos provenientes de larvas e vermes adultos, concluiu-se que o SIgA foi específico para antígenos de *A. suum* (Figura 52B e C).

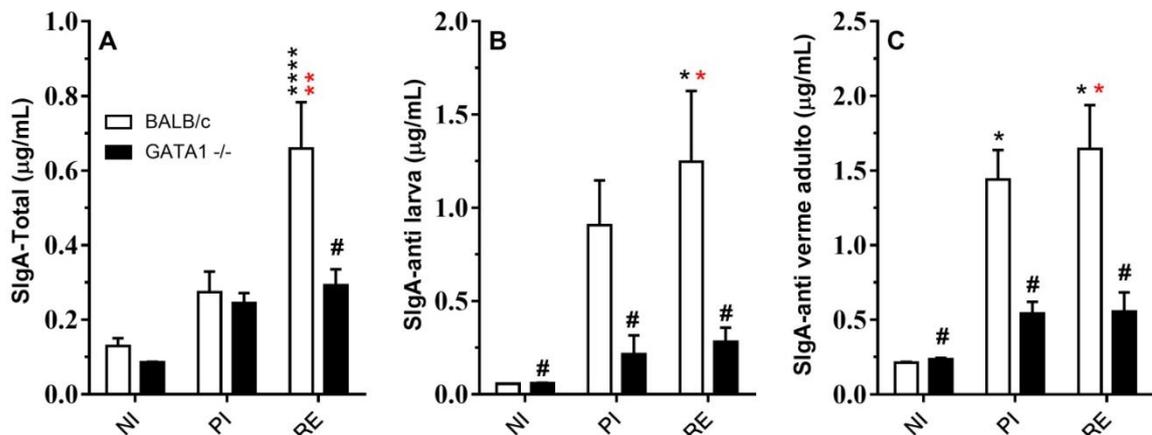


Figura 52: Níveis de SIgA no BAL no oitavo dia pós-infecção. A) Níveis de SIgA-total; B) Níveis de SIgA específicos para antígeno de larva. C) Níveis de SIgA específicos para antígeno de verme adulto. O teste de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de comparação múltipla de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ para diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e ** para diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e, # $p < 0,05$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

7.1.5 A PRESENÇA DE EOSINÓFILOS FOI ASSOCIADA AO AUMENTO DA FIBROSE TECIDUAL, CONTUDO COM MELHORA DA FUNÇÃO PULMONAR

Além de informações referentes a inflamação, a análise histopatológica do parênquima pulmonar também permitiu avaliar em cortes corados com Tricrômico de Gômori, a intensidade e topografia da fibroplasia e fibrose induzidas pela migração das larvas de *A. suum* (Figura 53). Notou-se que camundongos dos grupos BALB/c PI, GATA1^{-/-} PI e GATA1^{-/-} RE, exibiram fibroplasia em alguns septos alveolares, brônquios, bronquíolos e vasos do parênquima pulmonar contribuindo para o espessamento do septo alveolar (Figura 53A, B e D). Os camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE apresentaram maiores áreas com fibroplasia quando comparados aos do grupo GATA1^{-/-} PI (Figura 53B e D). De maneira interessante, assim como constatado pela análise morfométrica (Figura 47B), verificou-se que os camundongos do grupo BALB/c RE exibiram grandes áreas de fibrose consolidada,

ocasionando grande espessamento dos septos alveolares e comprometendo maior número de brônquios, bronquíolos e vasos (Figura 53C).

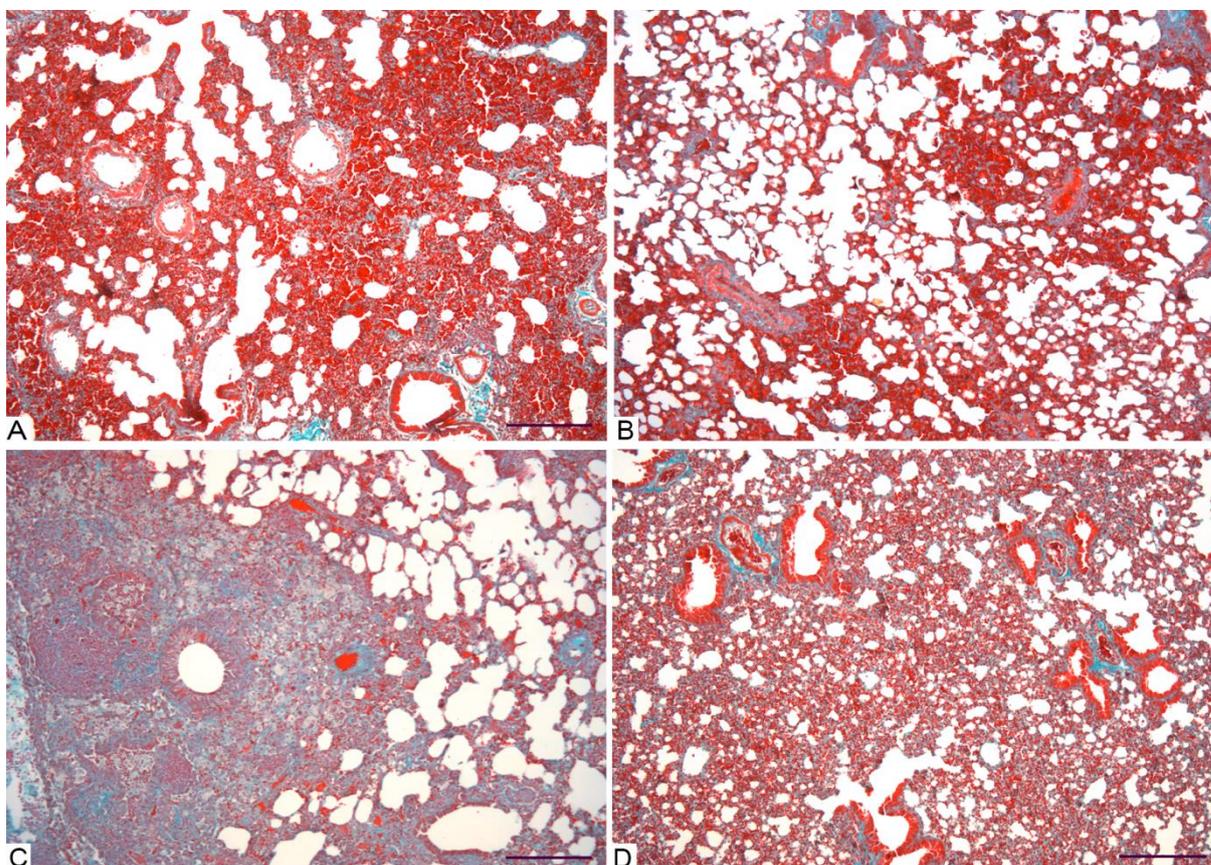


Figura 53: Imagens representativas de pulmão de camundongos BALB/c e GATA1^{-/-} primoinfectados e reinfectedados, corados com Tricrômico de Gômori para a visualização e análise de fibroplasia/fibrose, marcadas em verde azulado, no oitavo dia de infecção. A) Imagem representativa do grupo BALB/c PI. B) Imagem representativa do grupo GATA1^{-/-} PI. C) Imagem representativa do grupo BALB/c RE. D) Imagem representativa do grupo GATA1^{-/-} RE.

Em conjunto, os achados histopatológicos corroboraram as análises morfométricas, tanto referentes as características das lesões avaliadas nos cortes corados em HE, quanto nas análises referentes a fibroplasia/fibrose avaliados em cortes corados com Tricrômico de Gômori. Tais lesões do parênquima pulmonar provocadas pela migração larval, processo inflamatório, resolução das lesões e fibrose provocaram alterações no funcionamento pulmonar, que foram avaliadas por meio da espirometria forçada em respirador mecânico. Essas análises forneceram importantes informações sobre o papel dos eosinófilos na fase pulmonar da ascaridiose larval. Notou-se nesse modelo que a migração larval, bem como as lesões provocadas por ela, associada ao processo inflamatório e a fibrose, provocaram um aumento na resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas nos animais primoinfectados e reinfectedados, contudo, mais exacerbada nos camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE (Figura 54A). Corroborando com esse achado, camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE apresentaram diminuição da complacência, semelhante aos dos grupos BALB/c PI e GATA1^{-/-} PI (Figura 54B). Por

outro lado, camundongos do grupo BALB/c RE apresentaram melhora tanto da resistência pulmonar quanto da capacidade elástica do pulmão (complacência dinâmica) (Figura 54B). Conseqüentemente, o aumento da resistência ao fluxo de ar e a diminuição da complacência resultaram na diminuição o volume pulmonar em todos os grupos avaliados, contudo mais acentuada nos camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE (Figura 54C).

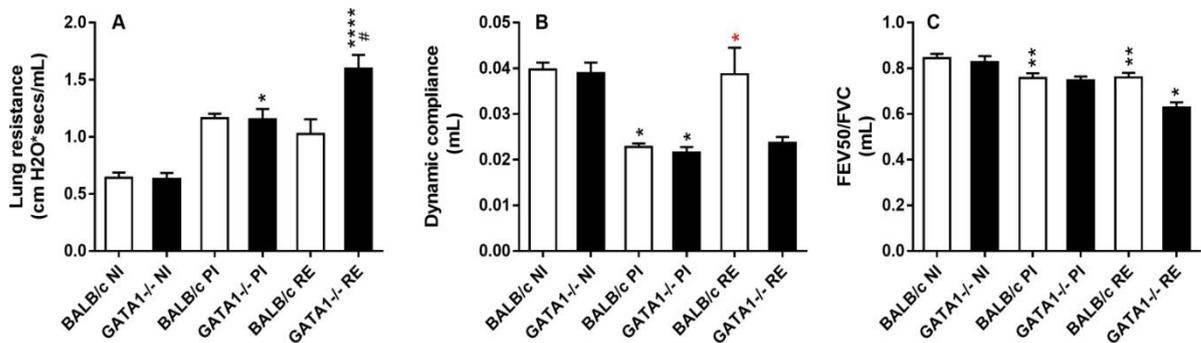
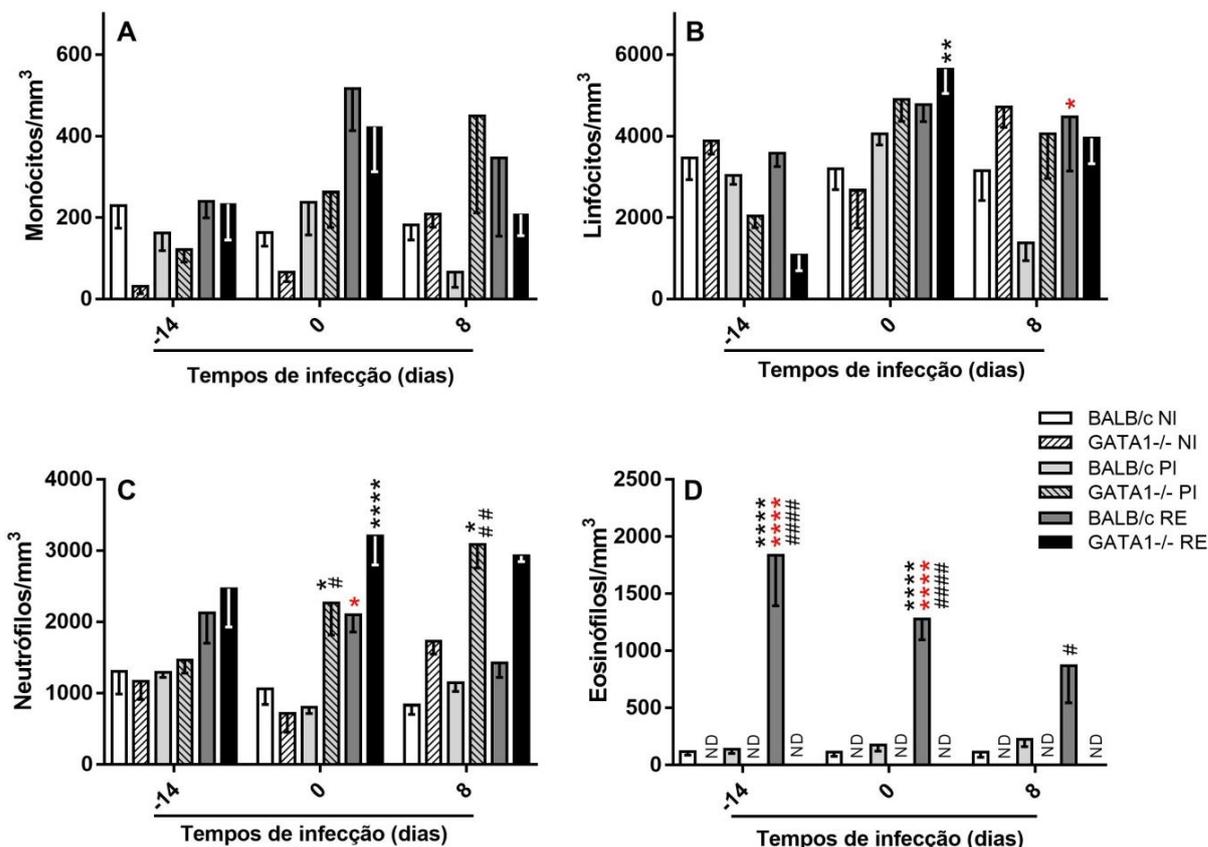


Figura 54: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1^{-/-} primoinfectados e reinfetados no oitavo dia pós-infecção de *A suum*. A) Resistência Pulmonar. B) Complacência Dinâmica. C) FEV50/FVC. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ representam diferenças em relação ao grupo não infectado da mesma estirpe; * $p < 0,05$ representa diferenças em relação ao grupo primoinfectado da mesma estirpe; e # representa diferença entre grupos que receberam o mesmo tratamento, de estirpes linhagens diferentes.

7.1.6 A ASCARIDIOSE LARVAL EM PROVOCA UM AUMENTO DO NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS CIRCULANTES E DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DE PERFIL TH2/TH17 SISTÊMICAS APÓS A MÚLTIPLAS EXPOSIÇÕES

Após verificar a importante contribuição dos eosinófilos no controle da carga parasitária, na inflamação tecidual e fisiologia pulmonar, sobretudo no modelo de reinfecção, buscamos elucidar a participação desse subtipo celular na resposta imune sistêmica da ascaridiose. Nesse sentido, o sangue periférico foi analisado quanto ao perfil de citocinas sistêmicas e o perfil de leucócitos circulantes (Figura 55). Pela contagem diferencial dos leucócitos no sangue periférico, verificamos que após duas infecções, há um aumento significativo no número de linfócitos em camundongos do grupo GATA1^{-/-} RE quando comparados aos dos grupos GATA1^{-/-} NI, GATA1^{-/-} PI e BALB/c RE (Figura 55B). Quanto ao número de neutrófilos (Figura 55C), foi verificado um aumento importante nos camundongos dos grupos GATA1^{-/-} PI e GATA1^{-/-} RE em relação aos do grupo GATA1^{-/-} NI nos tempos zero e oito dias. Além disso, o aumento no número desse subtipo celular em camundongos do grupo GATA1^{-/-} PI foi significativamente maior quando comparado aos do grupo BALB/c PI, nos tempos zero e oito dias. Por fim, a avaliação do número de neutrófilos permitiu verificar um aumento significativo nos camundongos do grupo BALB/c RE quando comparado aos do grupo BALB/c PI no tempo zero. Quanto aos de eosinófilos, não foram detectados em camundongos GATA1^{-/-} (Figura 55D), e, assim como foi

demonstrado no primeiro capítulo desse trabalho, há um aumento significativo nos camundongos do grupo BALB/c RE após a primeira infecção.



Quando ao perfil de citocinas sistêmicas, foi verificado um aumento significativo de IL-10 nos camundongos do grupo GATA1^{-/-} PI quando comparados aos dos grupos BALB/c PI e GATA1^{-/-} RE. Os camundongos dos grupos BALB/c RE e GATA1^{-/-} RE apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 em relação aos respectivos não infectados (Figura 56A). Não foram detectados aumentos nos níveis de IL-4 em camundongos BALB/c, contudo, foi verificado que essa citocina foi diminuída após a infecção em camundongos GATA1^{-/-} (Figura 56B). Quanto as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 foi aumentada em camundongos dos grupos BALB/c PI, GATA1^{-/-} PI e GATA1^{-/-} RE quando comparadas aos não infectados das mesmas estirpes (Figura 56C); os níveis de IL-17A, assim como de TNF foram aumentados nos camundongos dos grupos BALB/c RE e GATA1^{-/-} RE (Figura 56D e F). Por fim, os

níveis de IFN- γ foram aumentados em camundongos do grupo BALB/c RE, quando comparados aos do grupo BALB/c NI (Figura 56F).

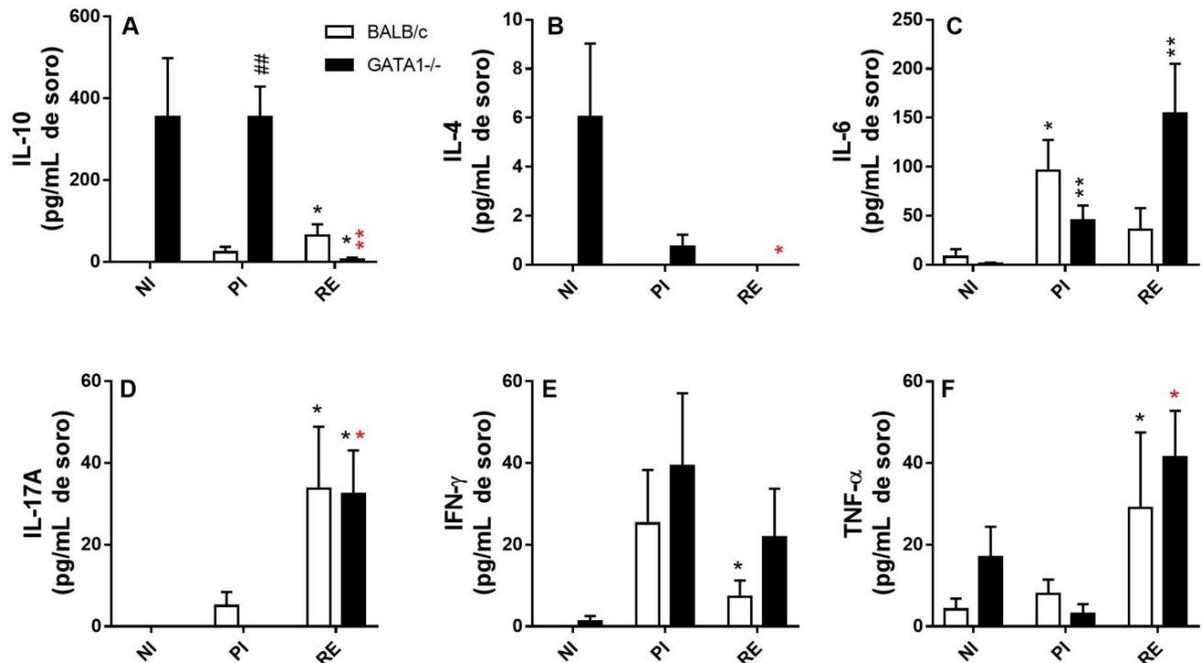


Figura 56: Citocinas séricas dosadas no oitavo dia pós-infecção em camundongos BALB/c e GATA1-/. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IL-4. C) Níveis de IL-6. D) Níveis de IL-17A E) Níveis de IFN- γ . F) Níveis de TNF. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) e (#) nos gráficos. Onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo não infectados da mesma estirpe; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças em relação ao grupo primoinfectados da mesma estirpe; e, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ para diferenças entre grupos de estirpes diferentes que receberam o mesmo tratamento.

Com base no exposto nesse capítulo, sugerimos que durante a ascarirose larval pulmonar, o aumento do número de eosinófilos é dependente da sinalização de TLR2 e TLR4, e que esse subtipo celular induz ao aumento dos níveis de SIgA, principalmente em camundongos reinfetados que, como demonstrado, apresentaram maiores níveis desse anticorpo nas vias aéreas e, conseqüentemente, menor carga parasitária nos pulmões. Além disso, a presença de eosinófilos após múltiplas exposições contribuiu para o remodelamento tecidual de maneira benéfica, com melhora da capacidade respiratória dos animais, mesmo diante do aumento da fibrose tecidual. Provavelmente, devido à gravidade das lesões teciduais observadas em camundongos com grande número de larvas migrando pelos órgãos. Por fim, o estudo da participação dos eosinófilos na ascarirose larval evidenciou que existe uma associação entre a resposta imune inata e adaptativa no pulmão, que por fim contribui para a redução do número de larvas após múltiplas exposições.

8 DISCUSSÃO

Diferentes aspectos imunobiológicos da ascaridiose larval primária, em modelo experimental, foram caracterizados recentemente, com importante destaque nas alterações imunopatológicas desencadeadas pela migração das larvas no tecido pulmonar (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Contudo, levando em consideração a importância epidemiológica da ascaridiose, bem como, as elevadas taxas de reinfecção em áreas endêmicas de baixo desenvolvimento socioeconômico, fez-se necessário o maior aprofundamento no estudo da ascaridiose, sobretudo com um enfoque imunobiológico da resposta do hospedeiro após múltiplas exposições.

A ascaridiose larval começa após as larvas de *Ascaris* sp., recém eclodidas no intestino do hospedeiro, penetrarem na mucosa intestinal e através da circulação sanguínea, atingem o fígado, pulmões, vias aéreas, fazendo a migração hepato-traqueal e, finalmente, retornando ao intestino delgado, onde amadurecem como vermes adultos, levando ao estabelecimento de uma infecção crônica e duradoura (BRADLEY; JACKSON, 2004).

No presente trabalho, os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos da ascaridiose larval em modelo murino foram avaliados, comparando infecções simples e múltiplas com enfoque nos possíveis mecanismos responsáveis pela proteção (pela redução da carga parasitária) da migração das larvas de *A. suum*. Este estudo demonstrou que após múltiplas exposições ao *A. suum*, houve redução da carga parasitária em nível pulmonar no oitavo dia pós-infecção, o mesmo achado foi demonstrado por McCraw (1975) em estudo realizado com bezerros, em que uma diminuição no número de larvas foi observada após uma segunda exposição ao parasito e, corroboram ainda com outros estudos utilizando em modelo animal que tem demonstraram que a exposição prévia a helmintos pode contribuir no controle da carga parasitária após múltiplas exposições ao *A. suum* (MCCRAW, 1975), ao *Strongyloides ratti* (DAWKINS; GROVE, 2010), ao *Neodiplostomum seoulensis* (YU et al., 1995; FINKELMAN; URBAN, 2001), ao *Clonorchis sinensis* (SOHN et al., 2006) e ao *S. stercoralis* (SCHOPF et. al, 2002).

Recentemente, foi demonstrado que o controle da carga parasitária pode ser desempenhado pelos eosinófilos, uma vez que esses defendem a mucosa intestinal contra as larvas *A. suum* (MASURE et al., 2013a). No entanto, os mecanismos de proteção desenvolvidos pelo hospedeiro durante a migração hepato-traqueal de larvas de *A. suum* não foram totalmente elucidados. Lewis e colaboradores (2007) e Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013), demonstraram que os pulmões são um importante sítio inflamatório na ascaridiose larval primária. Nesse trabalho, foi evidenciado que a resposta imune pulmonar possui um papel crucial também na reinfecção, reduzindo o número de larvas migratórias de maneira consistente nos pulmões, ao mesmo tempo que foi verificada o aumento do número de eosinófilos circulantes e da atividade dos eosinófilos no tecido pulmonar, sugerindo um importante papel dos eosinófilos no controle da infecção por *A. suum* (MASURE et al., 2013b). Contudo, enquanto Schilter e colaboradores (2010) demonstraram que a atividade aumentada de eosinófilos em camundongos reinfetados com o helminto *S. stercoralis* não foi diretamente associada à morte das larvas. A presença de eosinófilos pode ser também implicada no reparo e remodelamento dos tecidos devido à extensa lesão mecânica e hemorragia associadas à migração de larvas, que levam a um

quadro de edema perivascular, inflamação do parênquima pulmonar e alterações fisiológicas do tecido, que neste trabalho foram detectadas por espirometria. Destaca-se ainda que, a reinfecção induziu maior área de lesão pulmonar quando comparada com primoinfecção, sugerindo também que exposições múltiplas podem levar à lesão repetida do tecido e à inflamação crônica, causando perda progressiva da função respiratória.

Foi evidenciado também, que após múltiplas exposições ao *A. suum* houve o aumento da celularidade nas vias aéreas, caracterizado pelo aumento de linfócitos e macrófagos, além de uma inflamação pulmonar eosinofílica e neutrofílica. Somado à isso, houve a indução de uma resposta periférica mista Th2/Th17 definida por elevados níveis sistêmicos de IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TNF e IL-17A em comparação com animais primoinfectados, como observado também em infecção por *Toxocara canis* (RESENDE, et al. 2015). Já animais reinfectedos exibiram eosinofilia periférica em todos os tempos de infecção avaliados (0, 4, 8 e 12 dpi), e um aumento significativo do número e atividade dos eosinófilos no pulmão e BAL durante o pico de migração larval por estes órgãos. A ativação dos eosinófilos foi avaliada pelo aumento considerável da enzima peroxidase eosinofílica (EPO), um dos principais componentes dos grânulos catiônicos destas células, bem como um importante marcador de ativação e degranulação dos eosinófilos.

O padrão de resposta imune de animais reinfectedos, nos quais foram verificadas significativa inflamação e diminuição da carga parasitária, sugere um possível efeito benéfico da inflamação para a proteção contra helmintos durante a migração pulmonar. Essa contribuição da resposta inflamatória no controle da carga parasitária, tem sido evidenciada em modelos de susceptibilidade e resistência à primoinfecção por *A. suum* (LEWIS et al., 2007; DOLD et al., 2010). A inflamação hepática foi associada ao controle da infecção observada em animais resistentes à infecção por *A. suum* (DOLD et al., 2010). Já a inflamação pulmonar, foi considerada importante para o controle da infecção por *A. suum*, mas diretamente associada a reparação tecidual induzida pela migração larval (LEWIS et al., 2007). Foi demonstrado por Gazzinelli-Guimarães (2014), que a inflamação pulmonar em infecção primária por *A. suum* resultou em elevados níveis teciduais de TNF- α , que se correlacionou fortemente com o estabelecimento de um infiltrado inflamatório eosinofílico no pulmão, associado com a redução da carga parasitária. O TNF- α , também pode ser implicado, entre outras funções fisiológicas importantes, no remodelamento tecidual (OSTA; BENEDETTI; MIOSSEC, 2014). De maneira interessante, alguns estudos anteriores demonstraram que o TNF- α desempenha um papel fundamental na expulsão do helminto *T. muris* enquanto trabalha de forma sinérgica com uma resposta Th2, especialmente com IL-13, contribuindo para o remodelamento tecidual (ARTIS et al., 1999; HAYES; BANCROFT; GRENCIS, 2007).

De modo geral, estudos anteriores demonstraram que a proteção contra a reinfecção por helmintos é mediada pela resposta imune Th2, e a suscetibilidade é associada a uma resposta imune Th1 (GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003; HAYES; BANCROFT; GRENCIS, 2007). Os dados deste trabalho, inicialmente, demonstraram que camundongos reinfectedos apresentaram aumento da produção de IL-17A, IL-6, TNF- α , IL-4 e IL-5, sugerindo um padrão de resposta misto Th2/Th17, que foi também observado em outros estudos com helmintos (COOPER et al., 2000; COOPER et al., 2004; GEIGER et al., 2007; GEIGER et al., 2011; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013) e também distúrbios

alérgicos que provoca reação pulmonar semelhante às infecções por *Ascaris*, como rinite e asma (COSMI et al., 2010).

Foi observado que a produção de IL-10 em camundongos reinfectedados se mostrou aumentada, como demonstrado anteriormente durante as infecções por *T. muris* e *S. mansoni* (SCHOPF et al., 2002), no entanto, possivelmente relacionada à um mecanismo de regulação das respostas inflamatórias Th1/Th17 (SCHOPF et al., 2002; BRADLEY; JACKSON, 2004; WILSON et al., 2011). De fato, o aumento dos níveis de IL-17A após múltiplas exposições ao *A. suum* pode refletir à inflamação intensa e crônica, semelhante ao observado em modelo de fibrose pulmonar (WILSON et al., 2010). Entre os mecanismos pleiotrópicos de ação, esta citocina atua no recrutamento de neutrófilos e ajuda na eliminação de bactérias associadas à superfície do parasito e na fagocitose de detritos celulares presentes nas áreas de necrose (CHEN et al., 2012). Além disso, IL-17A foi associada as reações inflamatórias e fibrosantes granulomatosas em animais infectados com *S. japonicum* (CHEN et al., 2013) e animais com distúrbios pulmonares associado à exposição contínua ao *Aspergillus fumigatus* (MURDOCK et al., 2011). Vale ressaltar que os animais reinfectedados selvagens exibiram níveis significativamente maiores de IL-4 até estágio inicial (quarto dia) da última infecção. Como a expressão aumentada de receptores para IL-4 induz a expressão de IL-10 (CHEN et al., 2012), a combinação dessas duas citocinas foi crucial para o controle do dano causado pela migração de larvas de *Nippostrongylus braziliensis* através dos órgãos do hospedeiro. Assim, a IL-10 pode controlar a inflamação exacerbada, uma vez que a IL-4 pode mediar a cicatrização do tecido promovendo a resposta de macrófagos alternativamente ativados (M2) e eosinófilos (SCHOPF et al., 2002; BRADLEY; JACKSON, 2005; CHEN et al., 2012; WILSON; WYNN, 2009). Além disso, apesar de estudos anteriores demonstrarem que IL-4 e IL-10 têm efeitos inibitórios sobre a IL-17A (SCHILTER et al., 2010; GEIGER et al., 2011), o mesmo não foi verificado neste trabalho, onde mesmo nos camundongos IL-17RA^{-/-} apresentaram o aumento das três citocinas.

A coexistência das respostas Th2/Th17 em camundongos reinfectedados, que apresentaram níveis aumentados de IL-4 e IL-17A após cada infecção, também pode estar associada as lesões teciduais e a fibrose pulmonar, como foi demonstrado por Wilson e colaboradores (2010) e Newcomb e colaboradores (2012). Além disso, as respostas Th2/Th17 podem reduzir a carga larval após exposições múltiplas, desempenhando assim um duplo papel, diretamente nos leucócitos para induzir resposta específica ao *A. suum* e, induzindo o espessamento tecidual e fibrose que frustram a migração larval. Conforme observado na análise histopatológica, a exposição repetida ao parasito pode causar grande área de dano no fígado e nos pulmões com aumento simultâneo da resposta inflamatória do hospedeiro por eosinófitos e neutrófilos e, portanto, uma necessidade de regulação da resposta imune. Curiosamente, camundongos primoinfectados selvagens apresentaram níveis mais elevados de hemoglobina e proteínas no BAL, mesmo quando esses animais tinham menor dano no tecido pulmonar. Possivelmente, durante a primeira infecção, um maior número de larvas de *Ascaris* migra através dos pulmões e das vias aéreas, consequentemente, há maior destruição dos vasos sanguíneos, causando danos nos tecidos, exsudação e extravasamento sangue e de proteínas no BAL, caracterizando a lesão aguda da ascaridiose larval.

As alterações verificadas na fisiologia pulmonar, como perda de volume pulmonar, fluxo das vias aéreas e elasticidade, foram observadas como consequência da lesão parenquimatosa intensa e do edema. Após múltiplas exposições, a persistência da modulação fisiológica e a lesão parenquimatosa pulmonar crônica, associada à eosinofilia intensa, foram consistentes com a ascaridiose humana associada à síndrome de Loeffler/pneumonite eosinofílica (NUTMAN, 2007; KUNST et al., 2010). Nossos dados sugerem que o desenvolvimento da fibrose pulmonar é um efeito cumulativo da ascaridiose larval, e que associada à persistência de eosinófilos no tecido levam a uma doença pulmonar restritiva. Somado a isso, a lesão aguda no parênquima pulmonar e o remodelamento do tecido pela fibrogênese pode levar ao aumento da resistência pulmonar, detectado em infecções simples e múltiplas, como consequência da cicatrização de tecido induzida pela resposta imune Th2/Th17 que são pró-fibrogênicas.

De fato, ao avaliar o perfil da resposta imune na ascaridiose larval por meio da infecção de camundongos deficientes, foi verificado que, apesar da inflamação pulmonar ser capaz de controlar a migração larval, as respostas Th2 e Th17 produzem lesões extensas do parênquima pulmonar que levam à perda da função provocadas pela fibrose pulmonar, comprovadas no modelo de ascaridiose larval. Convém ressaltar que, apesar de pouco explorada em modelo de ascaridiose, a fibrose pulmonar é uma doença grave e irreversível, que leva ao mau funcionamento do órgão e, nos casos mais graves, leva a morte por insuficiência respiratória (WYNN, 2011).

Os dados apresentados neste trabalho, evidenciaram a perda acentuada da função pulmonar em camundongos IFN- γ ^{-/-}, o que sugere o aumento da fibrose tecidual, uma vez que a IFN- γ é antifibrogênica (WYNN, 2004). Um dos mecanismos regulatórios da fibrose tecidual por meio da resposta Th1 é pela polarização de macrófagos ativados pela via clássica (M1), esses expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias que bloqueiam a deposição de matriz extracelular e a formação da fibrose (GORDON, 2003; BISWAS; MANTOVANI, 2010). Esses achados foram corroborados pelos resultados obtidos por meio da infecção de camundongos IL-17RA^{-/-}, onde foi evidenciado o aumento de IFN- γ e consequente melhora da função pulmonar, provavelmente, devido a menor fibrose pulmonar. Estudos anteriores evidenciaram que a modulação da fibrose é um processo complexo e dependente de múltiplos fatores. Kolb e colaboradores (2001), demonstraram que a lesão aguda mediada por IL-1 β e TNF, é rapidamente convertida em fibrótica, inclusive com a participação de IL-17A. Já Wilson e colaboradores (2010), demonstraram que a fibrose pulmonar induzida por bleomicina é dependente da sinalização IL-17A e TGF- β 1, sugerindo ainda uma codependência na resposta das duas citocinas.

A citocina TGF- β 1 também é indispensável no reparo tecidual e fibrose pulmonar mediada pela resposta do tipo Th2 (WYNN, 2004). Contudo, é interessante ressaltar que a resposta Th2 é induzida, inicialmente, por citocinas como IL-21, linfopoetina estromal tímica (TSLP) e IL-33, produzidas por células T em resposta aos danos epiteliais (LIEW et al, 2010; TRAVERS; ROTHENBERG, 2015). Neste trabalho, a deficiência na sinalização IL-33/ST2 foi avaliada por meio da infecção de camundongos ST2^{-/-}, onde ficou evidenciado uma importante redução na carga parasitária, mesmo diante da resposta Th2 deficiente. Esse achado foi associado à inflamação sistêmica e tecidual Th1/Th17, contudo, com perda da função respiratória.

A resposta do tipo Th2, marcada pela produção das citocinas IL-4, IL5 e IL-13 também é responsável pela diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (M2), que expressam arginase 1 e TGF- β 1, que promovem a fibrose, a regulação da proliferação, recrutamento e ativação de fibroblastos (GORDON, 2003; BISWAS; MANTOVANI, 2010). Dong e colaboradores (2014), sugeriram também que as proteases provenientes de neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de fibrose tecidual. TSLP e IL-33 foram associados também ao recrutamento e ativação dos eosinófilos, que são células extremamente importantes em diversos processos biológicos (TRAVERS; ROTHENBERG, 2015).

Os eosinófilos expressam em sua superfície os mais diversos receptores, que se ligam a citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, complemento, imunoglobulinas, entre outros, apresentando dessa forma múltiplas funções na manutenção do equilíbrio fisiológico (RAVIN; LOY, 2015). Dentre a gama de receptores destacam-se os TLR (1, 2, 4, 5, 6, 7 e 9), capazes de reconhecer padrões (PAMPs) de diversos micro-organismos, como bactérias, fungos, vírus e helmintos e, de reconhecer padrões associados a danos celulares e necrose (DAMPs), contribuindo também para a manutenção da homeostase tecidual (SHAMRI et al., 2011; KITA, 2011; RAVIN; LOY, 2015).

Nesse trabalho, inicialmente utilizando camundongos selvagens, foi evidenciado o aumento no número e na atividade de eosinófilos em camundongos com menos carga parasitária. Para aprofundar o estudo desse tipo celular, camundongos deficientes nos receptores TLR2 e TLR4 foram utilizados com o intuito de entender melhor processo de ativação dos eosinófilos. Além disso, para compreender a contribuição e importância dessas células, foram utilizados camundongos deficientes no fator de transcrição GATA1^{-/-}, deficientes na diferenciação de eosinófilos. Desse modo, foi evidenciado que a resposta mediada por eosinófilos na ascariíose larval é dependente da presença dos receptores TLR2 e TLR4. Além disso, ambos os receptores foram implicados na produção de SIgA, que como demonstrado, tem sua produção específica estimulada pela migração de larvas de *A. suum*.

Foi relatado previamente que existe uma relação entre os eosinófilos e a produção de SIgA, como no estudo com o parasito *Teladorsagia circumcincta* (HENDERSON; STEAR, 2006), que demonstrou que a cinética de SIgA e de eosinófilos foi semelhante, e que a interação entre os dois componentes da resposta imune contribui para a redução do tamanho dos parasitos. O efeito da ausência de eosinófilos na produção de SIgA também foi demonstrado utilizando camundongos GATA1^{-/-}, em que Chu e colaboradores (2014) e Jung e colaboradores (2015), evidenciaram a redução da produção do anticorpo na mucosa intestinal na ausência desse tipo celular. Um dos mecanismos de ação dos eosinófilos na manutenção dos níveis de SIgA foi demonstrado por Chu e colaboradores (2011), que é pela secreção fatores de sobrevivência de plasmócitos como APRIL e IL-6 na medula óssea, sem os quais essas células morreriam rapidamente. No mesmo estudo, os autores verificaram, utilizando camundongos deficientes em eosinófilos, que esses leucócitos contribuem para a manutenção da sobrevivência de plasmócitos tanto diante de uma resposta Th1 quanto Th2 (CHU et al., 2011). Outro mecanismo é a estimulação da mudança de classe para IgA, induzida por TGF- β produzido por eosinófilos (CHU et al., 2014).

Além do efeito dos eosinófilos sobre a produção de SIgA, é importante ressaltar o papel da IgA em eosinófilos. Eosinófilos expressam receptores do tipo Fc (Fc α R) em sua superfície, capazes de

reconhecem IgA (MONTEIRO et al., 1993). Motegi e Kita (1998), demonstraram que tanto IgA sérica quanto SIgA se ligam aos Fc α R da superfície dos eosinófilos e, estimulam a produção de superóxido e induz a desgranulação. Desse modo, sugerimos que durante a ascariíose larval pulmonar, o aumento do número de eosinófilos reconhece PAMPs na superfície das larvas, por meio dos receptores do tipo TLR2 e TLR4, e que a partir daí esse subtipo celular induz o aumento dos níveis de SIgA, principalmente em camundongos reinfetados que, como demonstrado, apresentam maior número de eosinófilos e níveis de SIgA, e conseqüentemente apresentam maior carga parasitária em nível pulmonar, provavelmente em função da ação sinérgica de SIgA e eosinófilos. Desse modo, foi evidenciado até aqui que os eosinófilos exercem um importante papel, contribuindo tanto para o controle da carga parasitária quanto na fisiopatologia pulmonar decorrente da migração larval e do remodelamento tecidual. Em estudos anteriores, os eosinófilos foram associados ao controle da carga parasitária em infecções helmínticas, como demonstrado por McCraw utilizando *A. suum* (1975) em que o aumento da eosinofilia coincidiu com a diminuição da carga parasitária após uma segunda infecção em bezerros. Em modelo murino, Sasaki e colaboradores (1995), utilizando o helminto *Angiostrongylus cantonensis*, demonstraram que o tratamento com anti-IL-5 contribuiu para o aumento do número de larvas em diferentes órgãos. Rotman e colaboradores (1996) utilizando *S. stercoralis*, demonstraram que o tratamento com anti-IL-5 contribuiu para o aumento do número de larvas, contudo, a diminuição do número de eosinófilos não limitou a proteção após exposições secundárias. Já O'Connell e colaboradores (2011), demonstraram que larvas de *S. stercoralis* tem a sobrevivência aumentada em camundongos deficientes em EPO.

Utilizando o modelo de múltiplas exposições ao *A. suum*, foi possível constatar que a proteção, em relação à carga parasitária, foi parcialmente dependente dos eosinófilos, com isso, camundongos deficientes apresentaram maior número de larvas e, conseqüentemente, mais lesões agudas no parênquima pulmonar, provocadas pela migração larval. Os dados obtidos nesse estudo, corroboraram os achados de Enobe e colaboradores (2006) e Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013), e sugerem que a inflamação pulmonar em camundongos BALB/c, contribui para controlar as larvas de *Ascaris* neste órgão em infecções primárias. Esse achado foi ainda mais expressivo após múltiplas exposições, com o robusto aumento de células inflamatórias tanto infiltradas no tecido, quanto nas vias aéreas. Contudo, a deficiência em eosinófilos impactou na atividade de MPO no tecido mesmo diante do aumento dos níveis da citocina IL-6 tecidual. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a atividade de MPO foi associada a morte de larvas de *Trichinella spiralis* e *S. stercoralis*, respectivamente, assim como a atividade de EPO (BUYS; WEVER; RUITENBERG, 1984; O'CONNELL et al., 2011). Apesar da menor atividade de MPO em camundongos reinfetados deficientes, os neutrófilos foram aumentados no BAL. Desse modo, esse estudo sugere que MPO não contribui diretamente para a morte de larvas de *A. suum*, evidenciado no segundo capítulo, onde camundongos protegidos não apresentaram aumento da atividade de MPO.

Além das ações já citadas, os eosinófilos são capazes de sintetizar, armazenar e secretar diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , RANTES, eotaxinas, MIP-1 α , TGF- α e β (KITA; GLEICH, 1996; MACKENZIE et al., 2001; SHI, 2004; ROTHENBERG; HOGAN, 2006; AKUTHOTA et al., 2008; DAVOINE; LACY, 2014;

RAVIN; LOY, 2015). Além disso, os eosinófilos são eficazes na apresentação de antígenos (PADIGEL et al., 2006; AKUTHOTA et al., 2008). Desse modo, apesar de ser mais bem descrita a participação dos eosinófilos na ativação de linfócitos Th2, eles também produzem citocinas que atuam na polarização, mediação e atração de linfócitos Th1 (AKUTHOTA et al., 2008; RAVIN; LOY, 2015) e podem contribuir para a supressão do fenótipo Th17 (JACOBSEN et al., 2011). Ao avaliar o perfil de citocinas teciduais, foi verificada uma diminuição na produção de IL-4 em camundongos GATA1^{-/-} PI, indicando uma dependência de eosinófilos para a produção dessa citocina na fase inicial da ascaridiose. Tal achado é similar ao verificado por Jacobsen e colaboradores (2015) que, evidenciaram o papel imunomodulador de eosinófilos em modelo de inflamação pulmonar mediada por alérgeno, verificado também em outros modelos de inflamação (GOH et al., 2013; HEREDIA et al., 2013; JACOBSEN et al., 2014; QIU et al., 2014).

Segundo Isobe, Kato e Arita (2012), os eosinófilos são recrutados para os sítios de inflamação e, contribuem para a resolução de lesões. Foram associados também a regeneração hepática por Goh e colaboradores (2013), Swartz e colaboradores (2006) demonstraram que em infecção por *S. mansoni*, os eosinófilos participam da formação de granulomas e, além disso, Wu e colaboradores (2011) demonstraram que eosinófilos promovem macrófagos alternativamente ativados (M2), indicando desse modo a importância desse tipo celular no reparo de danos e resolução da inflamação aguda (ISOBE; KATO; ARITA, 2012). A deficiência em eosinófilos implicou na maior carga parasitária e nas lesões agudas que caracterizam a migração das larvas, na menor capacidade de reparar o tecido lesado, provavelmente associado a deficiência na produção de mediadores de fibrose como TGF- β e IL-13, provocando perda da função pulmonar (Figura 57).

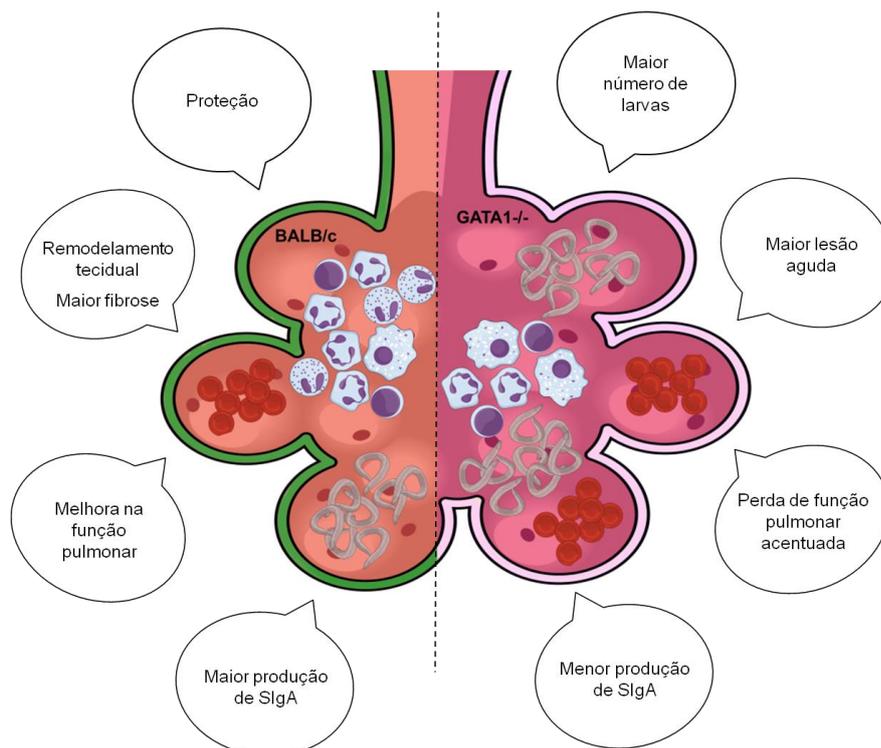


Figura 57: Representação esquemática de um alvéolo de camundongos BALB/c e GATA1^{-/-}, indicando os principais resultados da ascaridiose larval pulmonar em modelo de deficiência em eosinófilos. Fonte: Própria.

Em conjunto, nossos dados indicam que, após a ascaridiose larval múltipla, o hospedeiro é capaz de montar uma resposta protetora contra a reinfecção. Tal descoberta pode explicar a distribuição epidemiológica mundial de *Ascaris*, dado que a maioria dos indivíduos infectados em áreas de alta endemicidade, sofrem apenas baixa carga parasitária. Além disso, este estudo sugere as intensas respostas inflamatórias sistêmicas e pulmonares que ocorrem após exposições repetidas podem ser fundamentais para a indução de proteção. No entanto, no mesmo cenário, a intensa inflamação das vias aéreas e pulmões, desencadeadas para controlar a migração larval pode ser responsável pelo mau funcionamento respiratório, em um hospedeiro que foi exposto a múltiplas vezes ao parasito.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados, nosso estudo sugere que, após múltiplas exposições ao parasito, o hospedeiro é capaz de montar uma resposta imune protetora contra a infecção. Sugere ainda, que a intensa resposta inflamatória sistêmica, das vias aéreas e dos pulmões que é desencadeada para controlar a migração larval pode estar associada com a patogênese pulmonar da ascaridiose e ser responsável pelo comprometimento do funcionamento respiratório, levando a um quadro histopatológico semelhante à asma, como observado nos animais reinfectedos com parasito. Esta hipótese ajuda a explicar, por exemplo, a pneumonia eosinofílica sazonal e a asma que ocorrem entre os árabes sauditas naturalmente expostos ao *Ascaris* (GELPI; MUSTAFA, 1967), bem como em crianças sul-africanas (JOUBERT; KLERK; MALAN, 1979; ADERELE; ODUWOLE, 1982) e em modelos de infecções experimentais em humanos (dados não publicados).

Foi evidenciado que a inflamação pulmonar mista é de extrema importância para o controle da migração larval, contudo, no que se refere as respostas Th2/Th17, estão associadas ao maior comprometimento da função pulmonar.

Os mecanismos envolvidos na redução da carga parasitária após múltiplas exposições independem da resposta Th1, da atividade tecidual de neutrófilos e eosinófilos isoladamente. Contudo, a ausência de IFN- γ determinou a acentuada perda da função pulmonar em camundongos reinfectedos.

A modulação negativa da resposta Th17, propicia um microambiente tecidual favorável ao controle da migração larval, independente da atividade de EPO e MPO, e induz um aumento considerável de citocinas inflamatórias e regulatórias como, por exemplo, IFN- γ e IL-10, respectivamente. Por outro lado, mesmo diante de uma inflamação tecidual acentuada, a deficiência na resposta Th17 foi positiva, uma vez que não houve perda acentuada na função pulmonar, provavelmente devido a menor produção de mediadores pró-fibróticos provenientes das respostas Th2/Th17.

Por outro lado, no que se refere à resposta Th2, a deficiência na sinalização IL-33/ST2 leva ao aumento das respostas do tipo Th1 e Th17, evidenciado pelo aumento das citocinas IFN- γ e IL-17A em camundongos reinfectedos. Foi detectado o aumento da atividade do EPO, inclusive em camundongos primoinfectedos. Contudo, o controle da carga parasitária foi verificado apenas após múltiplas exposições. A deficiência em ST2 foi associada também à melhora da capacidade pulmonar após a reinfecção.

Já a citocina IL-4 é de extrema importância na resposta inicial contra larvas de *A. suum*, contudo, após múltiplas exposições, a proteção observada se dá independente da resposta induzida por essa citocina.

Além disso, este trabalho trouxe evidências contundentes da contribuição dos eosinófilos na ascaridiose em modelo de múltiplas exposições. Foi evidenciado que os eosinófilos são indispensáveis para o aumento da produção de SIgA, avaliado na mucosa pulmonar e, essas células dependem da sinalização mediante a ativação de TLR2 e TLR4 para induzir a produção de SIgA e controlar a carga

parasitária. Ficou comprovado que os eosinófilos contribuem para a fibrose do parênquima pulmonar em resposta às lesões teciduais provocadas por *A. suum*.

Extrapolando para o atual cenário da ascariose humana, os dados desse trabalho podem explicar ainda, a distribuição epidemiológica de *Ascaris* sp. dado que a maioria dos indivíduos infectados em áreas de alta endemicidade, onde são expostos múltiplas vezes ao parasito, apresentam baixa carga parasitária.

10 CONCLUSÕES

O estudo da ascaridiose experimental possibilitou o maior aprofundamento do conhecimento da relação *Ascaris*-hospedeiro. Por meio do uso de modelo murino, inicialmente, nosso grupo descreveu aspectos da resposta imune frente a exposição primária, onde evidenciou uma importante participação da inflamação pulmonar em resposta à infecção. A partir daí, buscou-se aprimorar o modelo experimental de modo que se aproxime das infecções naturais, tais quais ocorrem em áreas endêmicas, em que os hospedeiros estão frequentemente expostos aos ovos do parasito.

Este trabalho teve como hipótese norteadora inicial, que larvas de *A. suum* são capazes de induzir uma resposta imune protetora após múltiplas exposições. Corfirmada pelos resultados apresentados, verificamos que a migração larval induz inflamação tecidual intensa com conseqüente redução da carga parasitária. Tais achados foram de extrema importância, uma vez que levantaram o interesse pela investigação dos mecanismos envolvidos na proteção frente às múltiplas exposições. E, a partir daí, evidenciou-se que a inflamação pulmonar inespecífica contribui para a proteção e que, além disso, os eosinófilos participam de maneira extremamente importante na mediação da proteção nesse modelo.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERELE, W. I.; ODUWOLE, O. *Ascaris* and bronchial asthma in children. **African journal of medicine and medical sciences**. v. 11, p. 161-6, 1982.

AHMED, A. et al. Soil-transmitted helminthiasis: a critical but neglected factor influencing school participation of Aboriginal children in rural Malaysia. **Parasitol**. v. 139, n. 6, p. 802-8, 2012.

AHMED, M. M. et al. Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. **J Health Res Rev**. v. 2, p. 37-8, 2015.

AKUTHOTA, P. et al. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. **Clin Exp Allergy**. v. 38, p. 1254-63, 2008.

ANDERSON, T. J. C. et al. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitol**. v. 107, p. 319-34, 1993.

ANDERSON, T. J. C.; JAENIKE J. Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. **Parasitol**. v. 115, p. 325-42, 1997.

ANDERSON, T. J. C. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **TRENDS Parasitol**. v. 17, n. 4, p. 183-88, 2001.

ARTIS, D. et al. Tumor necrosis factor- α is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. **J Exp Med**. v. 190, p. 953-62, 1999.

ARTIS, D.; GRENCIS, R. K., The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. **Mucosal Immunol**. v.1, n. 4, p. 252-64, 2008.

ASIF, M. et al. Biliary ascariasis - Atypical infestation of *Ascaris lumbricoides*. **Int J Surg Pakistan**. v. 19, n 3, p. 123-24, 2014.

AZHAR, M. et al. Case report: Hepatobiliary ascariasis complicated by pancreatitis. **J Ayub Med Coll Abbottabad**. v. 27, n. 2, p. 479-81, 2015.

BAILEY, J. K.; WARNER, P. Respiratory arrest from *Ascaris lumbricoides*. **Pediatrics**. v. 126, n. 3, p. 712-15, 2010.

BARBOSA, F. S. **Potencial zoonótico da ascaridiose humana e suína: aspectos moleculares, morfológicos, genéticos e filogenéticos das espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum***. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

BARRETO, M. L. et al. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ Health Perspect**. v. 118, n. 11, p. 1637-42, 2010.

BARTOŠOVÁ, L. et al. Paleoparasitological findings in medieval and early modern archaeological deposits from Hradební Street, Chrudim, Czech Republic. **IANSA**. v. 2, n. 1, p. 27-38, 2011.

BETSON, M. et al. Molecular epidemiology of Ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 210, p. 932-94, 2014.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**. v. 11, p. 889-96, 2010.

BOES, J. et al. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. **Parasit**. v. 117, n. 6, p. 589-96, 1998.

BRADLEY, J. E.; JACKSON, J. A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunol**. v. 26, p. 429-41, 2004.

BRENDAL, R. P. et al. Zoonotic Ascariasis, United Kingdom. **Emerging Infect Dis**. v. 17, n. 10, p. 1964-66, 2011.

BROOKER, S. et al. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. **East Afr Med J**. v. 77, p. 157-61, 2000.

BROOKER, S. et al. Spatial analysis of the distribution of intestinal nematode infections in Uganda. **Epidemiol Infect**. v. 132, n. 6, p. 1065-71, 2004.

BROOKER, S. et al. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. **Int J Parasitol**. v. 36, p. 1143-1151, 2006.

BROOKER, S. J. et al. Plasmodium-helminth coinfection and its sources of heterogeneity across East Africa. **J Infect Dis**. v. 205, n. 5, p. 841-52, 2012.

BUYS, J.; WEVER, R.; RUITENBERG, E. J. Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the in vitro killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. **Immunology**. v. 51, n. 3, p. 601-7, 1984.

CABRERA-BARROSO, J. L. et al. Evaluación inmunológica de extractos de *Ascaris lumbricoides* para las inmunoglobulinas IgA en el suero de individuos infectados. **Gen**. v. 68, n. 2, p. 48-52, 2014.

CAMPOS, M. R. et al. Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Rev Saúde Públ**. v. 36, n. 1, p. 69-74, 2002.

CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M., Innate control of B cell responses. **Trends Immunol**. v. 32, n. 5, p. 202-11, 2011.

CHAMMARTIN, F. et al. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. **Parasit Vectors**. v. 25, n. 6, p. 152, 2013.

CHAMMARTIN, F. et al. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasites Vect.** v. 7, p. 440, 2014.

CHAUHAN, V. et al. Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. **Indian J Med Microbiol.** v. 33, p. 427-9, 2015.

CHAVES, A. et al. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-katz e Faust modificado. **Rev Saúde Públ.** v. 13, p. 348-52, 1979.

CHEN, F. et al. An essential role for Th2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. **Nat. Med.** v.18, 260-6 2012.

CHEN, D. et al. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. **Immunology.** v. 139, n. 4, p. 523-32, 2013.

CHU, V T. et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. **Nat Immunol.** v. 12, n. 2, p.151-9, 2011.

CHU, V. T. et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-a-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. **Immunity.** v. 40, n. 582-93, 2014.

COOPER, P. J. et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 182, n. 4, p. 1207-13, 2000.

COOPER, P. J. et al. Atopic phenotype is an important determinant of immunoglobulin E-mediated inflammation and expression of T helper cell type 2 cytokines to *Ascaris* antigens in children exposed to ascariasis. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 190, n. 7, p. 1338-46, 2004.

COSMI, L. et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. **J Allergy Clin Immunol.** v. 125, p. 222-30, 2010.

COSTA, C. A. et al. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. **Parasite.** v. 14, n. 4, p. 329-34, 2007.

DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. **Front Immunol.** v. 5, p. 570, 2014.

DAWKINS, H. J; GROVE, D. I. Immunisation of mice against *Strongyloides ratti*. **Z Parasitenkd.** v. 66, p. 327-33, 1982.

DAWSON, H. D. et al. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. **Infection and Immunity.** v. 73, n. 2, p. 1116-28, 2005.

DEY, R. K. et al. Right-sided scrotal ascariasis. **Trop Parasitol.** v. 2, n. 1, p. 80-1, 2012.

DOLD, C. et al. Genetic influence on the kinetics and associated pathology of the early stage (intestinal-hepatic) migration of *Ascaris suum* in mice. **Parasitology**. v. 137, p. 173-85, 2010.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes and Infection**. v. 13, n. 7, p. 632-637, 2011a.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. **Microbes Infect**. v. 13, n. 7, p. 624-31, 2011b.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature reviews – immunology**. v. 8, n. 5, p 337-48, 2008.

DONG, L. et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**. v. 134, n. 6, p. 1422-32 e11, 2014

DAWKINS, H. J.; GROVE, D. I. Immunisation of mice against *Strongyloides ratti*. **Z Parasitenkd**. v. 66, p. 327-33, 1982.

ELLIS, M. K. et al. Familial aggregation of human susceptibility to co- and multiple helminth infections in a population from the Poyang Lake region, China. **Int J Parasitol**. v. 37, p. 1153-61, 2007.

ENOBE, C. S. et al. Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. **Parasite Immunol**. v. 28, n. 9, p. 453-61, 2006.

FAVORETTO, B. C. et al. TLR2- and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*. **Mol Immunol**. v. 58, p. 17-26, 2014.

FINKELMAN, F. D.; URBAN JR, J. F. The other side of the coin: the protective role of the TH 2 cytokines. **J Allergy Clin Immunol**. v. 107, p. 772–80, 2001.

FORTES, B. P. M. D. et al. Modelagem geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Cad. Saúde Pública**. v. 20, n. 3, p. 727-34, 2004.

GÁLVEZ, R. A. et al. An ELISA test with *Ascaris suum* pseudocelomic fluid antigens for pulmonary experimental ascariasis diagnosis. **Reviolest**. v. 2, n. 2, p. e34, 2014.

GALVIN, T. J. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. **J. Parasitol**. v. 54, p. 1085-91, 1968.

GALZERANO, A. et al. *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. **Eastern Mediterranean Health J**. v. 16, n. 3, p. 350-1, 2010.

GAUSE, W. C.; URBAN JR, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends Immunol**. v. 24, p. 269–77, 2003.

- GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H. et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris sp.* infection in mice. **Int J Parasit.** v. 43, p. 697-706, 2013.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H. et al. Concomitant helminth infection downmodulates the Vaccinia virus-specific immune response and potentiates virus-associated pathology. . **Int J Parasit.** v. 47, p. 1-10, 2016.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, PH. Novas abordagens sobre a imunobiologia da Ascariíose larval. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- GEIGER, S. M. et al. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunol.** v. 24, p. 499-509, 2002.
- GEIGER, S. M. et al. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. **Parasite immunology.** v. 29, n. 7, p. 347-58, 2007.
- GEIGER, S. M. et al. *Necator americanus* and helminth co-infections: further down-modulation of hookworm-specific type 1 immune responses. **PLoS neglected tropical diseases.** v. 5, n. 9, p. e1280, 2011.
- GELPI, A. P.; MUSTAFA, A. Seasonal pneumonitis with eosinophilia. A study of larval ascariasis in Saudi Arabs. **The American journal of tropical medicine and hygiene.** v. 16, p. 646-57, 1967.
- GOH, Y. P. et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 110, p. 9914-19, 2013.
- GONZÁLEZ-MIGUEL, J. et al Immunoproteomic approach for identification of *Ascaris suum* proteins recognized by pigs with porcine ascariasis. **Vet. Parasitol.** v. 203, n. 3-4, p. 343-8, 2014.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v. 3, p. 23-35, 2003.
- GREEN, N. M. Protease Inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. **Biochemical J.** v. 16, p. 416-9, 1957.
- GUABIRABA, R. et al. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. **Inflamm Res.** v. 62, n. 8, p. 811–21, 2013.
- HAYES, K. S.; BANCROFT, A. J.; GRENCIS, R. K. The role of TNF-alpha in *Trichuris muris* infection I: influence of TNF-alpha receptor usage, gender and IL-13. **Parasite Immunol.** v. 29, p. 575-82, 2007.
- HENDERSON, N. G.; STEAR, M. J. Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 112, n. 1-2, p. 62-6, 2006.

- HEREDIA, J. E. et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. **Cell**. v. 153, p. 376-88, 2013.
- HERRERA, I. A.; MENESES, L. T. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. **Cuadernos del Hospital de Clínicas**. v. 50, n. 2, 69-73, 2005.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The Sedimentation-Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health**. v. 9, p. 281-98, 1934.
- HOLLAND, C. V.; BEHNKE, J. M.; DOLD, C. Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. *In: Ascaris the neglected parasite*. Ed. Elsevier. Amsterdam. c. 5, p. 107-125, 2013.
- HOTEZ, P. J. et al. The Giant Anteater in the Room: Brazil's Neglected Tropical Diseases Problem. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, n. 1, p. e177, 2008.
- HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 7, p. e2865, 2010.
- HWANG, J. Y.; RANDALL, T. D.; SILVA-SANCHEZ, A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. **Front Immunol**. v. 7, p. 258, 2016.
- ISOBE, Y.; KATO, T.; ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. **Front Immunol**. v. 3, p. 270, 2012.
- JACKSON, J. A. et al. T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 190, n. 10, p. 1804-11, 2004.
- JACOBSEN, E. A. et al. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. **J Immunol**. v. 187, p. 6059-68, 2011.
- JACOBSEN, E. A.; Lee, N. A.; Lee, J. J. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. **Clin Exp Allergy**. v. 44, p. 1119-36, 2014.
- JACOBSEN, E. A. et al. Differential activation of airway eosinophils induces IL-13-mediated allergic Th2 pulmonary responses in mice. **Allergy**. v. 70, p. 1148-59, 2015.
- JARDIM-BOTELHO, A. et al. Intestinal helminths and cognitive performance in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. v. 13, n. 8, p. 994-1004, 2008.
- JOUBERT, J. R.; KLERK, H. C.; MALAN, C. *Ascaris lumbricoides* and allergic asthma: A new perspective. **South African medical journal**. v. 56, p. 599-602, 1979.
- JUNG, Y. et al. IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. **Mucosal Immunol**. v. 8, n. 4, p. 930-42, 2015.

KAUFMANN, S. H.; KUCHROO, V. K. Th17 cells. **Microbes and infection**. v. 11, n. 5, p. 579-83, 2009.

KENNEDY, M. W. Ascariasis. *In*: **Encyclopedia of Immunology**. p. 226765, 1998.

KENNEDY, M. W. et al. Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. **Clin Exp Immunol**. v. 67, p. 20-30, 1987.

KHUROO, M. S. Ascariasis. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 25, n. 3, p. 553-77, 1996.

KITA, H.; GLEICH, G. J. Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. **The Journal of experimental medicine**. v. 183, p. 2421-26, 1996.

KITA, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunol Rev**. v. 242, n. 1, p. 161-77, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**. v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KNOPP, S. et al. 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**. v. 2, p. e331, 2008.

KUNST, H. et al. Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician. **Thorax**. 2010.

LELES, D et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **ParasiteVec**. v. 5, n. 42, 2012.

LELES, D. et al. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris sp.* from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Columbian South America times. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 103, n. 1, p. 106-8, 2008.

LEWIS, R. et al. The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. **Parasit**. v. 132, p. 289-300, 2006.

LEWIS, R. et al. The migration of *Ascaris suum* larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/ Ca mice. **Parasitology**. v. 134, p. 1301-14, 2007.

LIEW, Y. F.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**. v. 10, p. 103-10, 2010.

LIND, P. et al. Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. II: Specific IgA, IgG, and IgM antibodies determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitol Res**. v. 79, p. 240-4, 1993.

LIU, G. H. et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. **Gene**. v. 492, p. 110-6, 2012.

LOUW, J. H. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. **Brit J Surg**. v. 53, n. 6, p. 510-22, 1966.

LUSTIGMAN, S. et al. A Research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n. 4, p. e1582, 2012.

MACKENZIE, J. R. et al. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. **The Journal of Immunology**. v. 167, p. 3146-55, 2001.

MAGALHÃES, K. et al. Schistosomal derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll like receptor-2-dependent mechanisms. **J Infect Dis**. v. 202, n. 9, p. 1369-79, 2010.

MAIZELS, R. M; BALIC, A. Resistance to helminth infection: the case for interleukin-5-dependent mechanisms. **J. Infect. Dis**. v.190, p. 427-29, 2004.

MAIZELS, R. M; HEWITSON, J. P.; SMITH, K. A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. **Curr. Opin. Immunol**. v. 24, p. 459-66, 2012.

MARTIN, J. et al. The prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in Moslem children from northern Bangladesh. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 77, n. 5, p. 702-6, 1983.

MASSARA, C. L.; COSTA, H. M. A.; CARVALHO, O. S. Contribuição para o estudo do *Ascaris lumbricoides* em laboratório. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 23, n. 1, p. 43-7, 1990.

MASURE, D. et al. The intestinal expulsion of the roundworm *Ascaris suum* is associated with eosinophils, intra-epithelial t cells and decreased intestinal transit time. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, n. 12, p. e2588, 2013a.

MASURE, D. et al. A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris suum* Larvae. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, n. 3, p. e2138, 2013b.

MCCONCHIE, B. W. et al. *Ascaris suum*-derived products suppress mucosal allergic inflammation in an interleukin-10-independent manner via interference with Dendritic Cell function. **Infect. Immun**. v. 74, n. 12, p. 6632-41, 2006.

MCCRAW, B. M. The Development of *Ascaris suum* in Calves. **Can J Comp Med**. v. 39, p. 354-7, 1975.

MCSHARRY, C. et al. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. **Infect. Immun**. v. 67, p. 484-9, 1999.

MILLER, L. A. et al. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013. **Emerging Infect Dis.** v. 21, n. 2, p. 332-4, 2015.

MOLLER, M. et al. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms. **Human Molecular Genetics.** v. 16, n. 15, p. 1828-36, 2007.

MONTEIRO, R. C. et al. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. **J. Clin. Invest.** v. 92, p. 1681. 1993.

MOTEGI, Y.; KITA, H. Interaction with Secretory Component Stimulates Effector Functions of Human Eosinophils But Not of Neutrophils. **J Immunol.** v. 161, p. 4340-46; 1998.

MORAES, T. J.; ZURAWSKA, J. H.; DOWNEY, G. P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Curr Opin Hematol.** v. 13, n. 1, p. 21-7, 2006.

MORANO, J.; MORANO, J. F. B.. Ascariidose vesicular. **RECCS.** p. 12-3, 1988.

MÜLLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v. 62, n. 12, p. 1297-307, 2005.

MURDOCK, B. J. et al. Coevolution of Th1, TH2, and Th17 responses during repeated pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus conidia*. **Infect Immun.** v. 79, n. 1, p. 125-35, 2011.

MWENDA, A. S.; ILKUL, J. H. Obstructive ileal ascariasis. **New Engl J Med.** v. 368, n. 10, p. 943, 2013.

NEJSUM, P. et al. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. **J Helminthol.** v. 86, p. 148-55, 2012.

NEWCOMB, D. C. et al. IL-13 regulates Th17 secretion of IL-17A in an IL-10-dependent manner. **J Immunol.** v. 188, p. 1027-35, 2012.

NOGUEIRA, D. S. et al. Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed TH2/TH17 immune response in mice. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n. 1, p. e0004382, 2016.

NUTMAN, T. B. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. **Immunol Allergy Clin North Am.** v. 27, n. 3, p. 529-49, 2007.

O'CONNELL, A. E. et al., Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infect Immun.** v. 79, n. 7, p. 2770-8. 2011.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science.** v. 327, p. 1098-102, 2010.

OH, C. S. et al. Paleoparasitological report on *Ascaris* aDNA from an ancient East Asian sample. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 2, p. 225-8, 2010.

O'SHIRO, T. O. et al. 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**. v. 84, p.138-44, 2006.

OSTA, B.; BENEDETTI G, MIOSSEC P. Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis. **Front Immunol**. v. 5, p. 48, 2014.

PADIGEL, U. M. et al. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infect Immun**. v. 74, n. 6, p. 3232-38, 2006.

PATERSON, J. C. M. et al. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. **Infect Immun**. v. 70, n. 11, p. 6058-67, 2002.

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**. v. 10, n. 9, 1757-64. 2008.

PINEDA, M. R. B.; RAMOS, J. D. A. *Ascaris suum* infective eggs up regulate IL-4, 5 and 10 in BALB/c mice. **Philippine Sci Let**. v. 5, n. 2, p. 139-49, 2012.

PRATA, L. O. et al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Exp Biol Med (Maywood)**. p. 1-14, 2016.

PULLAN, R. L.; BROOKER, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**. v. 5, n. 81, 2012.

PULLAN, R. L. et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**. v. 7, n 37, 2014.

QIU, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**. v. 157, p. 1292-308, 2014.

RANGEL-MORENO, J.; et al. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. **Nat Immunol**. v. 12, n. 7, p. 639-46, 2011.

RAVIN, K. A.; LOY, M. The Eosinophil in Infection. **Clinic Rev Allerg Immunol**. v. 50, n. 2, p. 214-27, 2016.

REINA, OM et al. Effects of chronic ascariasis and trichuriasis on cytokine production and gene expression in human blood: A cross-sectional study. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5, n. 6, p. e1157, 2011.

RESENDE, et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. **Parasites & Vectors**. v. 8, p. 354, 2015.

RODRIGUES-MACHADO, MG et al. Effects of sepsis-induced acute lung injury on glycogen content in different tissues. **Experimental Lung Research**. v. 36, p. 302-06, 2010.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Immunology**. v. 24, p. 147, 2006.

ROTMAN, H. L. et al. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. **Experimental parasitology**. v. 82, p. 267-78, 1996.

SAKAGUCHI S. et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**. v. 133, p. 775-87, 2008.

SABOYÁ, M. I. et al. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. **Pan American Health Organization: Washington D.C.** 2011.

SANJEEV, S. M.; LUM, L. C. Biliary ascariasis from a rural setting: A case study. **Med & Health**. v. 7, n. 2, p. 102-6, 2012.

SANTINI, M. et al. Relapsing pneumothorax due to *Ascaris lumbricoides* larvae. **Monaldi Arch Chest Dis**. v. 54, p. 328e9, 1999.

SARINAS, P. S.; CHITKARA, R. K. Ascariasis and hookworm. **Semin Respir Infect**. v. 12, p. 31. 1997.

SASAKI, O. et al. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. **Parasite immunology**. v. 15, p. 349-54, 1993.

SCHILTER, H. C. et al. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunol**. v. 32, p. 184-92, 2010.

SCHOPF, L. R. et al. IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. **J Immunol**. v. 168, p. 2383-92, 2002.

SHAMRI, R.; XENAKIS, J. J.; SPENCER, L. A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. **Cell Tissue Res**. v. 343, n. 1, p. 57-83, 2011.

SHANG, L. et al. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. **Gastroenterology**. v. 135, n. 2, p. 529-38. 2008.

SHAPIRO, A. E. et al. Epidemiology of helminth infections and their relationship with clinical malaria in southwest Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 99, p. 18-24, 2005.

SILVA, N. R. et al. Morbidity and mortality due to ascariasis: re-estimation and sensitivity analysis of global numbers at risk. **Trop Med InternHealth**. v. 2, n. 6, p. 519-28, 1997a.

- SILVA, N. R. et al. Morbidity and mortality due to *Ascaris*-induced intestinal obstruction. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 91, p 31-6, 1997b.
- SILVA, N. R. et al. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol.** v. 19, n. 12, p. 547-551, 2003.
- SILVEIRA, M. R. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyper responsiveness in rats. **Infect Immun.** v. 70, p. 6263-72, 2002.
- SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Journal of leukocyte biology.** v. 76, p. 520-7, 2004.
- SOHN, W. M. et al. Susceptibility of experimental animals to reinfection with *Clonorchis sinensis*. **Korean J Parasitol.** v. 44, 163-6, 2006.
- SOUZA, V. M. O. et al. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine.** v. 28, p. 92-100, 2004.
- SPRENT, J. F. A. On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I distribution of larvae in tissues. **J Infect Dis.** v. 90, p. 165-76, 1952.
- STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M. Differentiation and function of Th17 cells. **Current Opinion in Immunology.** v. 19, p. 281-6, 2007.
- STRATH, M. et al. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Met.** v. 83, p. 209-15, 1985.
- SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood.** v. 108, p. 2420-27, 2006.
- TAKATA, I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **Kitasato Arch. Exp. Med.** v. 23, p. 151, 1951.
- TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. 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.
- TRAVERS, J. B. S.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils in mucosal immune responses. **Mucosal Immunol.** v. 8, n. 3, p. 464-75, 2015.
- TURNER, J. D. et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 188, n. 11, p. 1768-75, 2003.
- UMETSU, S. et al. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. **World J Gastroenterol.** v. 20, n. 38, p. 14058-62, 2014.

VANOIRBEEK, J. A. et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 42, n. 1, p. 96-104, 2010.

WALKER, M. et al. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: New epidemiological insights. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5, n. 4, p. e1047, 2011.

WALKER, M.; HALL, A.; BASÁÑEZ, M. G. Trickle or clumped infection process? A stochastic model for the infection process of the parasitic roundworm of humans, *Ascaris lumbricoides*. **International journal for parasitology.** v. 40, n. 12, p. 1381-88, 2010.

WANG, J. et al. Biliary ascariasis in a bile duct stones-removed female patient. **World J Gastroenterol.** v. 19, n. 36, p. 6122-24, 2013.

WILEY, J. A. et al. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. **PLoS One.** v. 4, n. 9, p. e7142, 2009.

WILSON, M. S.; WYNN, T. A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. **Mucosal Immunol.** v. 2, n. 2, p. 103-21, 2009.

WILSON, M. S. et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **J Exp Med.** v. 207, n. 3, p. 535-52, 2010.

WILSON, M. S. et al. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathog.** v. 7, p. e1002171, 2011.

WONG, C. K.; et al. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 37, n. 1, p. 85-96. 2007.

World Health Organization. World Health Organization Report Series. **Prevention and control of intestinal parasitic infections.** Geneva: World Health Organization, 1987.

World Health Organization. **Report of the WHO informal consultation on monitoring of drug efficacy in the control of schistosomiasis and intestinal nematodes.** Geneva: World Health Organization, 1998.

World Health Organization. World Health Organization Report. **Annex Table 2: deaths by cause, sex, and mortality stratum in WHO regions and annex Table 3: burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions.** Geneva: World Health Organization; p. 186-193, 2002.

World Health Organization. World Health Organization Technical Report Series. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis.** Geneva: World Health Organization, 63p., 2002b.

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

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**. v. 332, p. 243-47, 2011.

WYNN, T. A.. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nat. Rev. Immunol.** v. 4, p. 583-94, 2004.

WYNN, T. A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. **J. Exp. Med.** v. 208, n. 7, p. 1339-50, 2011.

YU, J. R. et al. The effect of reinfection with *Neodiplostomum seoulensis* on the histopathology and activities of brush border membrane bound enzymes in the rat small intestine. **Korean J Parasitol.** v. 33, p. 37–43, 1995.

ZIEGELBAUER, K. et al. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. **PLoS Med.** v. 9, n. 1, p. e1001162, 2012.

12 ANEXOS**12.1 TERMOS DE APROVAÇÃO CEUA/UFMG PARA O ESTUDO DA ASCARIDIOSE EXPERIMENTAL**

 UFMG	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p style="text-align: center;">CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Senhor(a) Professor(a) Ricardo Toshio Fujiwara,</p>	
<p>Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação da resposta imunológica na ascaridíase experimental, submetido a esta comissão pelo protocolo 45, a CEUA decidiu aprovar a sua solicitação.</p>	
<p>Justificativa: Aprovado na reunião do dia 11/04/2012</p>	
<p>Para acessar ao seu projeto clique no link: http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ Belo Horizonte, 12/04/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p style="text-align: right;">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</p>	



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

Senhor(a) Professor(a) Ricardo Toshio Fujiwara,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto **DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DE Ascaris sp.**, submetido a esta comissão pelo protocolo 54, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 11/04/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 12/04/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<http://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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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 espira-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

12.2 FOTOMICROGRAFIA DE PULMÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/C NÃO INFECTADOS

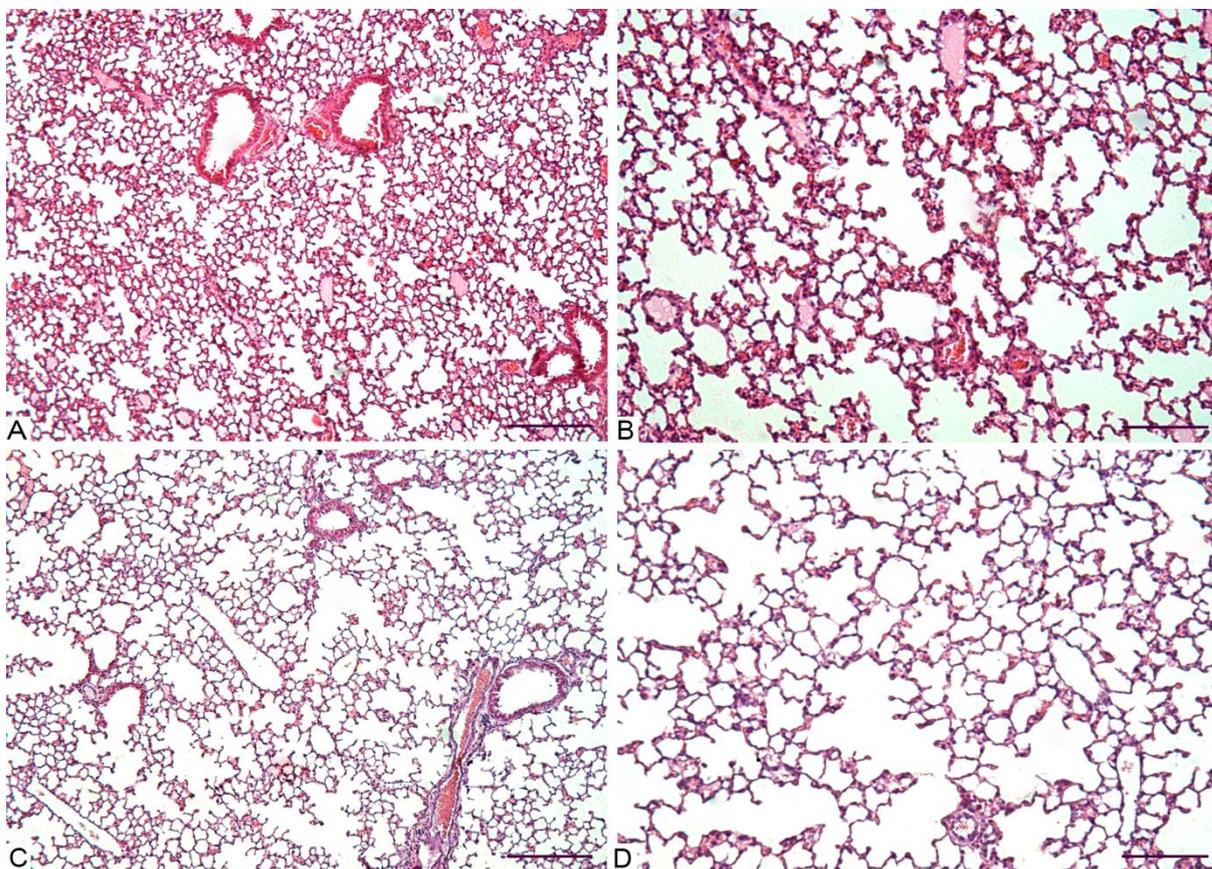


Figura 18: Pulmão de camundongos BALB/c e C57BL/6 não infectados. A) BALB/c NI imagem panorâmica do parênquima pulmonar, barra = 100 μ m; B) BALB/c NI: imagem de maior aumento do parênquima pulmonar, barra = 50 μ m; C) C57BL/6j NI imagem panorâmica do parênquima pulmonar, barra = 100 μ m; D) C57BL/6j NI: imagem de maior aumento do parênquima pulmonar, barra = 50 μ m;

12.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

12.3.1 MULTIPLE EXPOSURES TO *ASCARIS SUUM* INDUCE TISSUE INJURY AND MIXED TH2/TH17 IMMUNE RESPONSE IN MICE

12.3.2 NEW INSIGHTS INTO THE IMMUNOPATHOLOGY OF EARLY *TOXOCARA CANIS* INFECTION IN MICE

12.3.3 CONCOMITANT HELMINTH INFECTION DOWNMODULATES THE *VACCINIA* VIRUS-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE AND POTENTIATES VIRUS-ASSOCIATED PATHOLOGY