

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

**Thaís Leal Silva**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Toxocara canis***

Belo Horizonte

2021

**THAÍS LEAL SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Toxocara canis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Área de concentração: Imunologia das doenças infecciosas e tropicais.

Orientadora: Dra. Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte

2021

Silva, Thaís Leal.  
SI586c Caracterização da resposta imunológica na infecção experimental por *Toxocara canis* [manuscrito]. / Thaís Leal Silva. - - Belo Horizonte: 2021.  
180f.: il.  
Orientador (a): Lillian Lacerda Bueno.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Toxocaríase. 2. Alergia e Imunologia. 3. Interleukin-33. 4. Eosinófilos. 5. Interleucina-17. 6. Receptores de Interleucina-17. 7. Dissertação Acadêmica. I. Bueno, Lillian Lacerda. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 521



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

### ATA DE DEFESA DE TESE

Às 09:00 horas do dia 30 de agosto de 2021, no Canal do CETES no YouTube - Plataforma LifeSize, realizou-se a sessão pública para a 200ª defesa de tese de **THAÍS LEAL SILVA**, número de registro 2017714776, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube a professora **LILIAN LACERDA BUENO**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDUARDO JOSÉ LOPES TORRES (UERJ)**, **PROF. HENRIQUE TOMAZ GONZAGA (UFU)**, **PROF. PAULO MARCOS DA MATTA GUEDES (UFRN)**, **PROF. RICARDO GONÇALVES (UFMG)**, **PROFA. LILIAN LACERDA BUENO - ORIENTADORA (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: "*Caracterização da resposta imunológica na infecção experimental por Toxocara canis*". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo José Lopes Torres, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Tomaz Gonzaga, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Marcos da Matta Guedes, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Lacerda Bueno, Professora do Magistério Superior**, em 02/09/2021, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 02/09/2021, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITORA:** Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

**VICE-REITOR:** Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

**PRO-REITOR DE POS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Fábio Alves da Silva Júnior

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA:** Prof. Dr. Mário Fernando Montenegro Campos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Prof. Dr. Humberto José Alves

**VICE-DIRETORA:** Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

**COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Eli Iola Gurgel Andrade

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**Área de Concentração:** Imunologia das doenças infecciosas e tropicais

**COORDENADOR:** Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

**SUBCOORDENADOR:** Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr

Representante Discente: João Augusto Oliveira da Silva

## **Thaís Leal Silva**

---

Esta tese foi desenvolvida nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). No Instituto de Ciências Biológicas (ICB) nos Laboratórios de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia, Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Laboratório de Protozooses e Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral. A pesquisa esteve sob a orientação da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno.

### **Colaboradores:**

#### **Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG**

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

#### **Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG**

Prof. Dr. Remo Castro Russo

#### **Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG**

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid

### **Apoio Financeiro:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. ALGO (Bolsa de doutorado # 169041/2017-4); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brasil (Grant# CBB APQ-00766-18); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant# 421392/2018-5 e Grant# 302491/2017-1).

*Dedico este trabalho aos meus pais Geraldo Carlos da Silva e Eliana Luiza Leal Silva, que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos e por me ensinarem que o estudo e a dedicação é o melhor caminho para a conquista dos nossos objetivos.*

*À minha irmã Anna Carolina Leal Silva e ao meu namorado Victor Pádua Monteiro Mendanha e Silva pelo apoio incondicional e emocional para que eu pudesse chegar ao fim desta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por não me desamparar em nenhum momento, por me dar forças para continuar todos os dias e por todas as oportunidades que colocou em meu caminho.

Ao meu pai, Geraldo Carlos da Silva, que sempre foi meu exemplo de dedicação, perseverança, responsabilidade e de trabalho árduo. Que sempre me apoiou em todas as decisões, e que nos momentos difíceis sempre esteve de braços abertos para me acolher.

À minha mãe, Eliana Luiza Leal Silva, pelo seu exemplo de amor, afeto, superação e união. Obrigada por acreditar em mim nos momentos em que eu não acreditei, pelo seu colo nos momentos difíceis e por sempre dizer que eu iria conseguir chegar até o final.

À minha irmã, Anna Carolina Leal Silva, por me ajudar a viver a vida de forma mais leve, por sua companhia e amor.

Ao meu namorado, Victor Pádua Monteiro Mendanha e Silva pelo amor, companheirismo, afeto e apoio todos os dias, mesmo naqueles em que eu estava insuportável. Obrigada por ter compartilhado e acreditado nos meus sonhos, por sempre me ouvir e aguentar minhas crises de ansiedade durante esse período de trabalho e por se fazer sempre presente.

Aos meus avós (*in memoriam*) e meus familiares por todo amor, apoio e pelos momentos de alegria.

Às minhas companheiras de doutorado Flaviane e Camila que são amigas que levarei por toda a vida. Por compartilharem os momentos de desespero, alegria e por todas as risadas. Obrigada por cada momento compartilhado, por estarem ao meu lado durante todos os árduos experimentos, pela preocupação, por saber que sempre posso contar com vocês e serem parte essencial desse trabalho. Sem vocês nada disso seria possível!

Aos membros dos grupos Ascaris, Plastoxcas e do LIGP, em especial a Luiza Padrão, Isabella, Ana Cristina, Denise, Fabrício, Lucas, Chiara, Pablo, Jorge, Luisa Magalhães por todo o aprendizado e trabalho em equipe. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os integrantes que estão e que passaram pelo LIGP durante esses meus quatro anos. Aprendi muito com vocês.

À Michele e Vanessa (vizinha) que trabalham no LIGP e que organizam e gerenciam o laboratório de forma espetacular. Obrigada pelo empenho, dedicação,

acolhimento, carinho, pela ajuda na resolução de problemas e por se tornarem amigas que quero ter sempre comigo.

À minha orientadora Lilian Lacerda Bueno por esses quatro anos de muito aprendizado, por me acolher no laboratório mesmo sem me conhecer, por confiar a mim um projeto tão grandioso e fantástico e assim, me fez amar ainda mais a Imunoparasitologia.

Aos professores do LIGP Ricardo Fujiwara e Daniella Bartholomeu, e aos professores colaboradores Remo Russo, Marcelo Caliari e Milele Rachid por toda ajuda e aprendizado.

A Silvana e aos veterinários do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, pela disponibilidade, parceria e colaboração para a coleta dos vermes.

À Luciene secretária do programa, pela paciência, disponibilidade e por toda a ajuda.

Aos meus professores e coordenadores da pós-graduação por compartilharem todo o seu conhecimento e serem essenciais para minha formação como docente e pesquisadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e também ao CNPq pela oportunidade de poder realizar o Doutorado.

Aos animais que fizeram parte dessa pesquisa.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente, o meu muito obrigado. Vocês fizeram parte desta realização!

*“A vida é fruto da decisão de cada momento. Talvez seja por isso, que a ideia de plantio seja tão reveladora sobre a arte de viver. Viver é plantar. É atitude de constante semeadura, de deixar cair na terra de nossa existência as mais diversas formas de sementes.*

*Cada escolha, por menor que seja, é uma forma de semente que lançamos sobre o canteiro que somos. Um dia, tudo o que agora silenciosamente plantamos, ou deixamos plantar em nós, será plantação que poderá ser vista de longe...”*

*PADRE FÁBIO DE MELO*

## RESUMO

---

A toxocarose é uma zoonose, que tem como principal agente etiológico o *Toxocara canis*. É uma doença negligenciada, cosmopolita e que possui soroprevalência de 19% em todo o mundo. Os humanos são infectados pela ingestão acidental de ovos contendo larvas infectantes de *T. canis*, que, ao chegarem ao intestino, eclodem, penetram na mucosa e migram para vários tecidos, como fígado, pulmões e cérebro. De forma geral a resposta contra helmintos segue o padrão Th2, mas são poucos os estudos que esclarecem o padrão de resposta imunológica e fisiopatológica desencadeada pelo hospedeiro na toxocarose. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos envolvidos na infecção por *Toxocara canis* em modelo experimental murino, investigando a via IL-33/ST2, a presença de eosinófilos e a via IL-17/IL-17RA. Para isso, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para ST2, GATA1, IL-17RA e os respectivos selvagens (BALB/c e C57BL/6) infectados por gavagem com 1000 ovos embrionados de *T. canis* sendo realizada a avaliação parasitológica, imunológica e fisiopatológica com 0 dias pós-infecção (dpi) (controle), 3dpi, 14dpi e 63dpi. Os resultados demonstraram que os camundongos ST2<sup>-/-</sup> e GATA1<sup>-/-</sup> durante a infecção por *T. canis* reduziram a carga parasitária hepática, pulmonar e cerebral e diminuíram a formação de granulomas associado a menores danos teciduais. Por outro lado, os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> apresentaram aumento na carga parasitária pulmonar, reduziram a frequência de neutrófilos produtores de IL-17 no lavado broncoalveolar e diminuíram o número de granulomas nos pulmões. Assim, observamos que as vias IL-33/ST2 e a presença de eosinófilos induzem susceptibilidade à infecção por *T. canis* e aumentam o número de granulomas, enquanto a via IL-17/IL-17RA está associada a resistência à migração larval, porém induzem maior formação de granulomas que podem resultar em dano tecidual.

**Palavras-chave:** Toxocarose, imunologia, fisiopatologia, IL-33/ST2, eosinófilos, IL-17RA

## ABSTRACT

---

Toxocariasis is a zoonosis, whose main etiological agent is *Toxocara canis*. It is a neglected, cosmopolitan disease that has a 19% seroprevalence worldwide. Humans become infected by accidental ingestion of eggs containing *T. canis* infective larvae, which upon reaching the intestine, hatch, penetrate the mucosa and migrate to various tissues such as liver, lungs and brain. In general, the response against helminths follows the Th2 pattern, but there are few studies that clarify the pattern of immune and pathophysiological response triggered by the host in toxocarosis. This study aimed to evaluate the immunological and pathophysiological mechanisms involved in *T. canis* infection in a murine experimental model, investigating the IL-33/ST2, IL-17/IL-17RA pathway and the presence of eosinophils. For this purpose, mice genetically deficient for ST2, GATA1, IL-17RA and the respective wild ones (BALB/c and C57BL/6) infected by gavage with 1000 embryonated eggs of *T. canis* were used, and the parasitological, immunological and pathophysiological evaluation was performed with 0 days post-infection (dpi) (control), 3dpi, 14dpi and 63dpi. The results demonstrated that ST2<sup>-/-</sup> and GATA1<sup>-/-</sup> mice during *T. canis* infection reduced the hepatic, pulmonary and cerebral parasite load and decreased the formation of granulomas associated with less tissue damage. On the other hand, IL-17RA<sup>-/-</sup> mice showed an increase in the pulmonary parasite load, reduced the frequency of IL-17-producing neutrophils in the bronchoalveolar lavage, and decreased the number of granulomas in the lungs. Thus, we observed that the IL-33/ST2 pathways and the presence of eosinophils induce susceptibility to infection by *T. canis* and increase the number of granulomas, while the IL-17/IL-17RA pathway is associated with resistance to larval migration, however induce greater formation of granulomas that can result in tissue damage.

**Keywords:** Toxocariasis, immunology, pathophysiology, IL-33/ST2, eosinophils, IL-17RA.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Estimativa de soroprevalência da Toxocarose (%) em humanos em todo o mundo.....	27
<b>Figura 2:</b> Determinantes epidemiológicos e fatores de risco da toxocarose humana.....	28
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i> .....	31
<b>Figura 4:</b> Modelo clássico de resposta imunológica Th2.....	37
<b>Figura 5:</b> Divisão dos grupos experimentais para caracterizar a cinética da infecção e estabelecimento do pico de recuperação das larvas nos tecidos.....	49
<b>Figura 6:</b> Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta Th2 na infecção por <i>T. canis</i> .....	50
<b>Figura 7:</b> Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta eosinofílica na infecção por <i>T. canis</i> .....	51
<b>Figura 8:</b> Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta Th17 na infecção por <i>T. canis</i> .....	52
<b>Figura 9.</b> Estratégia de análise da citometria de BAL.....	59
<b>Figura 10.</b> Estratégia de análise da citometria do sangue periférico para identificação de linfócitos.....	60
<b>Figura 11.</b> Estratégia de análise para identificação de monócitos no sangue periférico...61	
<b>Figura 12.</b> Recuperação das larvas de <i>Toxocara canis</i> em diferentes tecidos de camundongos BALB/c ao longo do tempo.....	69
<b>Figura 13.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	70
<b>Figura 14.</b> Avaliação de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE contra antígenos de larvas de <i>T. canis</i> em camundongos.....	72
<b>Figura 15.</b> Alterações hepáticas em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	72
<b>Figura 16.</b> Histopatologia hepática em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	74
<b>Figura 17.</b> Perfil das citocinas presentes no tecido pulmonar durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	76
<b>Figura 18.</b> Quantificação de larvas recuperadas nos pulmões e inflamação nas vias aéreas.....	78

<b>Figura 19.</b> Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	79
<b>Figura 20.</b> Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	81
<b>Figura 21.</b> Análise da função respiratória de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	82
<b>Figura 22.</b> Número de larvas recuperadas e inflamação tecidual no cérebro durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	83
<b>Figura 23.</b> Histopatologia do tecido cerebral de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	84
<b>Figura 24.</b> Influência da via IL-33/ST2 na infecção por <i>T. canis</i> .....	85
<b>Figura 25.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	87
<b>Figura 26.</b> Avaliação de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 contra antígenos de larvas de <i>T. canis</i> em camundongos.....	88
<b>Figura 27.</b> Alterações hepáticas em camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	89
<b>Figura 28.</b> Histopatologia hepática em camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	91
<b>Figura 29.</b> Quantificação de larvas recuperadas nos pulmões e da inflamação nas vias aéreas.....	92
<b>Figura 30.</b> Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	93
<b>Figura 31.</b> Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	96
<b>Figura 32.</b> Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no parênquima pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	97
<b>Figura 33.</b> Número de larvas recuperadas e inflamação tecidual no cérebro durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	98
<b>Figura 34.</b> Histopatologia do tecido cerebral de camundongos BALB/c e GATA1 <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	99
<b>Figura 35.</b> Influência do fator de transcrição GATA1 na infecção por <i>T. canis</i> .....	101
<b>Figura 36.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	103

<b>Figura 37.</b> Recuperação total de larvas no fígado, pulmão e cérebro de camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	104
<b>Figura 38.</b> Análise do sangue periférico por citometria de monócitos em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	105
<b>Figura 39.</b> Análise dos <i>clusters</i> de monócitos no sangue periférico por citometria em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	107
<b>Figura 40.</b> Análise dos <i>clusters</i> de neutrófilos e eosinófilos no sangue periférico por citometria em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	109
<b>Figura 41.</b> Análise de linfócitos TCD4 e TCD8 por citometria de fluxo em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	112
<b>Figura 42.</b> Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	113
<b>Figura 43.</b> Análise do BAL por citometria dos macrófagos alveolares nos camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	115
<b>Figura 44.</b> Análise do BAL por citometria de eosinófilos, CD4 <sup>+</sup> e neutrófilos nos camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	117
<b>Figura 45.</b> Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados por <i>T. canis</i> .....	119
<b>Figura 46.</b> Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> .....	121
<b>Figura 47.</b> Análise da função respiratória de camundongos C57BL/6 e IL-17RA <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. canis</i> com 3dpi.....	122
<b>Figura 48.</b> Influência do receptor IL-17RA na infecção por <i>T. canis</i> .....	123
<b>Figura 49.</b> Influência da via IL-33/ST2, eosinófilos e IL-17/IL-17RA na infecção por <i>T. canis</i> .....	136

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Painel de citometria com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no BAL.....	58
<b>Tabela 2:</b> Painel de citometria com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no sangue periférico para marcação de linfócitos.....	58
<b>Tabela 3:</b> Painel de citometria com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no sangue periférico para marcação de monócitos.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- ALT - Alanina aminotransferase
- ANOVA - Análise de Variância
- AST - Aspartato aminotransferase
- B.O.D. - Estufa de demanda biológica de oxigênio
- BAL - Lavado broncoalveolar
- BALT - Tecido Linfoide Associado ao Brônquio
- BSA - Albumina de soro bovino
- Cchord - Complacência quasi-estática
- CCZ - Centro de Controle de Zoonoses
- CDC - Centro para Controle e Prevenção de Doenças
- Cdyn - Complacência dinâmica
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animal
- ConA - Concanavalina A
- D.O. - Densidade óptica
- DAMPs - Padrões moleculares associados a danos
- DC - Célula Dendrítica
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPI - Dias pós-infecção
- ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EPO - Peroxidase de eosinófilos
- ES - Antígenos de excreção e secreção
- FEV - Volume expiratório forçado
- FVC - Capacidade vital forçada
- GATA1<sup>-/-</sup> - Camundongos *geneticamente deficientes* para o fator de transcrição GATA1
- HBSS - Solução Balanceada de Hank's
- HE - Hematoxilina e eosina
- IC - Capacidade inspiratória
- ICB - Instituto de Ciências Biológicas
- IDH - Índice de desenvolvimento humano
- IFN- $\gamma$  - Interferon gama
- Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IL-17RA<sup>-/-</sup> - Camundongos geneticamente deficientes para o receptor de IL-17RA

ILC2 - Células linfoides inatas do tipo 2

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LIGP - Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos

LMV - Larva *migrans* visceral

MPO - Mieloperoxidase de neutrófilos

NAG - N-acetilglicosaminidase de macrófagos

NKT - Células T natural killer

NT - Neurotoxocarose

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEG - Polietilenoglicol

RANTES - Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RC - Resistência e conformidade

RI - Resistência respiratória

RNA - Ácido ribonucleico

SEM - Erro padrão da média

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

Soroprevalência-T - Soroprevalencia positiva para toxocarose

sST2 - Proteína ST2 solúvel

ST2<sup>-/-</sup> - Camundongos geneticamente deficientes para receptor ST2

ST2L - Proteína ST2 ligada a membrana

ST2V - Proteína ST2 variante

T.A. - Temperatura ambiente

TC - Toxocarose oculta ou comum

TGF-β - Fator de crescimento transformador beta

Th - Células T auxiliares

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TO - Toxocarose ocular

Treg - Células T reguladoras

tSNE - t-Distributed Stochastic Neighbor

TV - Volume corrente

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

---

<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
2.1 Aspectos gerais da Toxocarose e epidemiologia.....	26
2.2 Morfologia e Ciclo biológico.....	28
2.3 Patogênese e sintomatologia.....	31
2.4 Diagnóstico.....	33
2.5 Tratamento.....	34
2.6 Resposta imunológica na infecção por <i>Toxocara canis</i> .....	35
2.6.1 Receptor ST2 e IL-33.....	39
2.6.2 Fator de transcrição GATA1.....	40
2.6.3 Receptor de IL-17.....	42
2.7 Modelos experimentais.....	43
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
4.1 Envio do projeto para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	48
4.2 Animais.....	48
4.3 Infecção Experimental por <i>Toxocara canis</i> .....	48
4.4 Delineamentos experimentais.....	49
4.4.1 Cinética da infecção.....	49
4.4.2 Avaliação da via IL-33/ST2 na infecção por <i>T. canis</i> .....	50
4.4.3 Avaliação dos eosinófilos na infecção por <i>T. canis</i> .....	51
4.4.4 Avaliação do IL-17R na infecção por <i>T. canis</i> .....	52
4.5 Análise do perfil leucocitário.....	53
4.6 Quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> .....	54
4.7 Ensaio bioquímico: Avaliação da função hepática pela atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	54
4.8 Obtenção, processamento e análise do BAL.....	54
4.9 Avaliação da resposta imunológica.....	55
4.9.1 Dosagem de citocinas teciduais.....	55
4.9.2 Quantificação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral.....	56

4.9.3 Extração de antígeno e ELISA para detecção de produção de IgG específico e suas subclasses.....	57
4.9.4 Citometria de fluxo.....	58
4.9.4.1 Citometria de fluxo do BAL.....	62
4.9.4.2 Citometria de fluxo do sangue periférico.....	63
4.10 Histopatologia.....	64
4.11 Avaliação da função pulmonar: espirometria.....	66
4.12 Análise Estatística.....	67
<b>5. RESULTADOS CAPÍTULO 1.....</b>	<b>69</b>
5.1 A fase de migração larval hepato-pulmonar ocorre com 1dpi e 3dpi e a neurotrópica a partir de 14dpi.....	70
5.2 Ausência da via IL-33/ST2 reduz a eosinofilia e aumenta a concentração de anticorpos.....	71
5.3 A ausência do receptor ST2 contribui para a redução da carga parasitária no fígado e dano tecidual.....	73
5.4 O perfil de citocinas pulmonares apresenta uma resposta imunológica Th1/Th17 em camundongos ST2 <sup>-/-</sup> durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	76
5.5 Camundongos ST2 <sup>-/-</sup> apresentam redução da inflamação e da disfunção pulmonar durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	78
5.6 A ausência da via IL-33/ST2 atenuou a disfunção pulmonar durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	82
5.7 A falta da via IL-33/ST2 está relacionada à redução da carga parasitária e da atividade eosinofílica no cérebro.....	83
<b>6. RESULTADOS CAPÍTULO 2.....</b>	<b>87</b>
6.1 A ausência de eosinófilos aumenta o número de leucócitos no sangue periférico, mas não influencia na resposta humoral.....	88
6.2 A ausência de eosinófilos no tecido hepático reduz a atividade neutrofílica e a presença de granulomas.....	90
6.3 Os camundongos GATA1 <sup>-/-</sup> apresentam aumento da atividade neutrofílica e redução da carga parasitária na fase aguda e redução da inflamação pulmonar na fase crônica da infecção por <i>T. canis</i> .....	92
6.4 O perfil de citocinas pulmonares apresenta uma resposta imunológica Th1/Th2 em camundongos GATA1 <sup>-/-</sup> durante a infecção por <i>T. canis</i> .....	97
6.5 A ausência de eosinófilos reduz a carga parasitária cerebral e aumenta a atividade de neutrófilos na fase crônica da infecção.....	99
<b>7. RESULTADOS CAPÍTULO 3.....</b>	<b>103</b>

7.1 A ausência do receptor IL-17RA induz leucocitose e aumenta a carga parasitária pulmonar na fase aguda da infecção por <i>T. canis</i> .....	104
7.2 As células da imunidade inata aumentam a expressão de IL-17, IL-4, TNF- $\alpha$ durante a infecção por <i>T. canis</i> e a presença do receptor de IL-17 aumenta a expressão dos marcadores de ativação CD69 nos linfócitos TCD4 no sangue.....	105
7.3 A ausência do receptor de IL-17A sustenta uma resposta pulmonar Th1 no parênquima pulmonar na fase aguda da infecção por <i>T. canis</i> .....	113
7.4 A infecção por <i>T. canis</i> induz alta expressão de IL-17 pelos linfócitos TCD4 <sup>+</sup> e neutrófilos no BAL .....	115
7.5 A resposta Th17 aumenta o número de granulomas, mas não altera a fisiologia pulmonar durante a fase aguda da infecção por <i>T. canis</i> .....	119
<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>139</b>
<b>11. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO I - Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>154</b>
<b>ANEXO II - Artigo publicado: Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during <i>Toxocara canis</i> infection in mice.....</b>	<b>155</b>

---

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

O trabalho intitulado “Caracterização da resposta imunológica na infecção experimental por *Toxocara canis*” foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), sob a coordenação da Prof. Dra. Lilian Lacerda Bueno dentro da linha de pesquisa Imunologia das doenças infecciosas e tropicais do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

A escolha desse tema pelo fato da toxocarose ser uma doença negligenciada, cosmopolita, pouco estudada e com métodos de prevenção, tratamento e diagnósticos precários. Dessa forma, os estudos imunológicos e fisiopatológicos ampliam o conhecimento básico da doença em hospedeiros acidentais e se tornam essenciais para o desenvolvimento de futuros métodos preventivos, de tratamento e diagnóstico. Outro fator para a escolha do tema foi devido ao LIGP já trabalhar com este parasito, possuindo metodologias pré-estabelecidas em modelo animal, ter parcerias nos Departamentos de Fisiologia e Patologia da UFMG que possibilitaram o estudo fisiopatológico da doença e dispor de camundongos geneticamente deficientes para receptores imunológicos e fatores de transcrição.

O estudo foi realizado em modelo experimental, camundongos selvagens BALB/c e C57BL/6 e geneticamente deficientes para o receptor ST2, fator de transcrição GATA1 ou receptor de IL-17R. O camundongo assim como o homem, é um hospedeiro acidental do parasito, e possui similaridade no que se refere a migração parasitária, resposta imunológica desencadeada pela presença do parasito e alterações histopatológicas.

Ao longo dos quatro anos de dedicação ao doutorado, foi realizada colaboração em projetos com *Plasmodium* e *Ascaris*, bem como as participações com apresentação prévia dos resultados da pesquisa em seminários, simpósios e congressos nacionais, assim como a submissão do artigo “*Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during Toxocara canis infection in mice*” anexado ao final deste documento. Parte desta pesquisa também foi premiada em primeiro lugar em apresentação de pôster de PhD no *The 5th International Annual Meeting of The Postgraduate Program in health Sciences: Infections Diseases and Tropical Medicine* e em primeiro lugar em apresentação oral no eixo de helmintologia no Congresso Brasileiro de Parasitologia de 2021.

A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e

de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

---

A toxocarose é uma doença negligenciada, que apesar de não ser uma endemia de notificação obrigatória, representa um problema de saúde pública, com alta prevalência e ampla distribuição mundial, sendo predominante em países em desenvolvimento (CHEN et al., 2018; HOLLAND; HAMILTON, 2013). As infecções produzidas por nematoides estão associadas à uma baixa mortalidade e uma alta morbidade. A falta de saneamento básico e a ausência de controle anti-helmíntico em animais de estimação contribuem para a exposição dos seres humanos a estes parasitos (DESPOMMIER, 2003; MACPHERSON, 2013).

Em 2019, foi estimado que 1,4 bilhões de pessoas no mundo (19%) estão expostas ao *Toxocara*. A maior soroprevalência associada a baixa renda, menor índice de desenvolvimento humano (IDH), umidade e temperatura mais alta. Nas Américas estima-se que a soroprevalência seja de 22,8% e no Brasil de 27,6% (ROSTAMI et al., 2019a). Porém é importante enfatizar que os estudos epidemiológicos a respeito da toxocarose ainda são limitados, principalmente devido ao baixo número de estudos publicados e variabilidade da sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para diagnóstico da doença (ROSTAMI et al., 2019a, 2019b).

Dentre as várias espécies de *Toxocara*, o *T. canis* é o principal agente etiológico no desenvolvimento da toxocarose humana, e é transmitido pela ingestão acidental de ovos embrionados. As lesões causadas pelas larvas L3 ocorrem pela migração das larvas que causam lesões mecânicas, e quando há comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, há sintomas brandos como náuseas, febre e dor abdominal até lesões mais graves, como comprometimento hepático, pulmonar, ocular e do sistema nervoso central (SNC) (MACPHERSON, 2013; MOREIRA et al., 2014).

A toxocarose pode se manifestar em diversos órgãos, as denominações clínicas são feitas de acordo com o local acometido, como larva migrans visceral (LMV) quando atinge vísceras como fígado e pulmão; toxocarose ocular (TO), que atinge os olhos; neurotoxocarose (NT), que atinge o SNC; e toxocarose oculta ou comum (TC) quando possui sintomas inespecíficos (MA et al., 2018).

Em geral, as infecções crônicas ocasionadas por nematoides induzem uma resposta imunológica do tipo T helper 2 (Th2), com participação primordial de citocinas. As interleucinas 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 estão envolvidas na ativação de mastócitos, eosinófilos, macrófagos e na secreção de níveis elevados de imunoglobulina E (IgE)

(GURRAM; ZHU, 2019). Na toxocarose, a liberação de metabólicos antigênicos, denominados antígenos de excreção-secreção (antígenos TES) presentes no parasito são vistos como os principais ativadores da resposta imune no hospedeiro locais e sistêmicas (GIACOMIN et al., 2008; MAIZELS, 2013). Durante a infecção com *T. canis* em camundongos foi constatada a presença de inflamação pulmonar persistente, eosinofilia, hipergamaglobulinemia das classes IgM, IgG e IgE, hiper-reatividade das vias aéreas, produção de citocinas do tipo Th2, além de moléculas relacionadas à ativação de padrão de resposta Th1, tais como o óxido nítrico que está associado a efeitos deletérios no sistema vascular pulmonar (ARANZAMENDI; SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC; PINELLI, 2013; DESPOMMIER, 2003; ESPINOZA et al., 2002). Estudos realizados em camundongos BALB/c também observaram que o *T. canis* induz uma mistura de respostas inflamatórias Th17 e Th2, durante a migração das larvas, com predominância dessa última (RESENDE et al., 2015).

Apesar de nos últimos anos o interesse pelo estudo da toxocarose ter se ampliado, a literatura ainda é escassa, principalmente no que se refere aos aspectos imunológicos desencadeados pela infecção. Como consequência, o papel das respostas imunológicas inata e adquirida na doença permanece pouco elucidado, e ainda não se conhece o motivo pela qual a imunidade do hospedeiro não consegue eliminar completamente todos os parasitos do tecido. Assim, pesquisas relacionadas a infecção por *T. canis* no contexto da resposta imunológica e fisiopatológica do hospedeiro merecem serem revisados e ampliados, podendo possibilitar o entendimento do tipo de resposta imune necessária para o controle da infecção e da migração larval, bem como, os mecanismos utilizados pelo parasito para evadir da resposta imunológica desencadeada pela interação parasito/hospedeiro.

Esta tese soma-se a outras pesquisas básicas que visam ampliar o entendimento da toxocarose e desta forma, auxiliar em medidas que possam resultar no desenvolvimento de novas formas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. Para essa finalidade, foram realizados experimentos com camundongos selvagens e geneticamente deficientes para o receptor ST2, fator de transcrição GATA1 e receptor de IL-17A, avaliando parâmetros imunológicos e fisiopatológicos desencadeados no hospedeiro, durante a migração das larvas nas fases aguda e crônica da infecção.

***REVISÃO DE LITERATURA***

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Aspectos gerais da toxocarose e epidemiologia

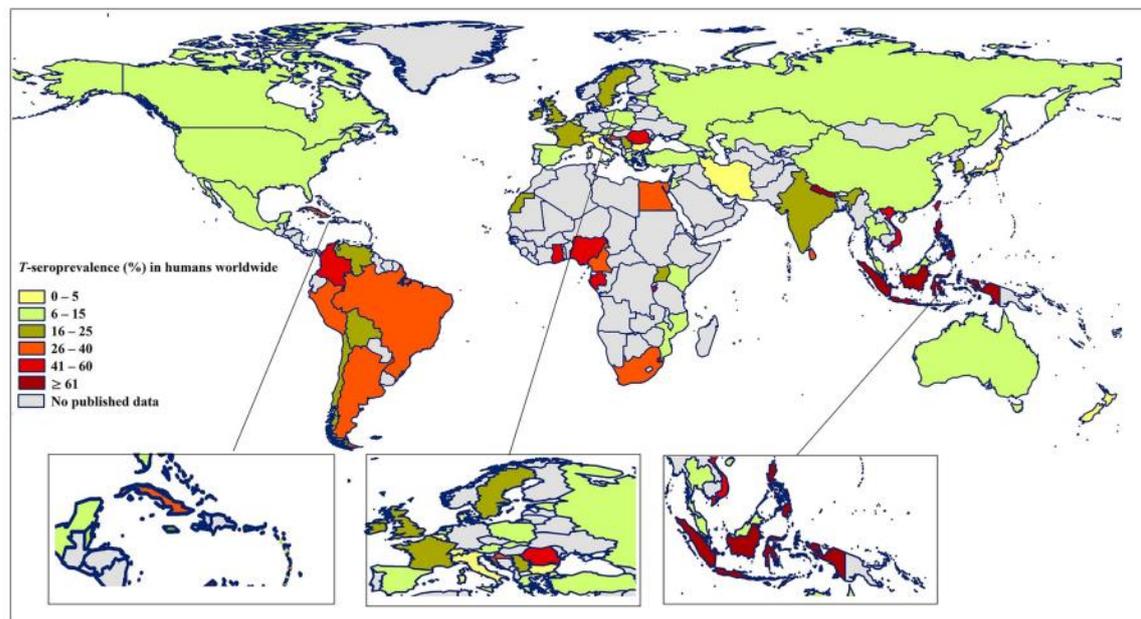
A toxocarose é uma zoonose causada por nematoides do gênero *Toxocara*, que inclui mais de 21 espécies, dentre essas duas possuem grande importância para a saúde pública por causar doença grave em humanos, *Toxocara canis* Werner (1782) e o *Toxocara cati* Schrank (1788), têm como hospedeiros definitivos naturais o cão e o gato respectivamente, este último menos frequente em humanos (CHEN et al., 2018; FAN et al., 2015).

Os humanos se infectam acidentalmente ao ingerir ovos embrionados contendo larvas L3, que penetram nas paredes do intestino e, por meio do sistema circulatório, atingem vários tecidos por todo o corpo, incluindo pulmões, fígado, cérebro e olhos, causando morbidade significativa (LEE et al., 2014). Embora os primeiros relatos de toxocarose humana tenham ocorrido na década de 1950, pouco se sabe sobre a doença, estando listada entre as cinco infecções parasitárias mais negligenciadas de acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Este fato está associado a pouca atenção dada à sua prevenção, tratamento, vigilância e também por ser uma doença não notificável (HOLLAND, 2017; MA et al., 2018; WILDER, 1950).

Nos humanos a doença se manifesta de acordo com a forma clínica, que irá depender da intensidade da infecção, localização das larvas, idade do hospedeiro e histórico de reinfecção, entre outros fatores do parasito e do hospedeiro. Os sintomas podem ser: tosse, respiração ofegante, mialgia ou manifestações cutâneas; neurológicos, levando a quadros de meningite, encefalite, vasculite cerebral ou mielite; oculares, em que pode ocorrer deficiência visual unioocular, acompanhada por endoftalmite crônica, retinite, granuloma e descolamento da retina; oculta foram na qual os sintomas são inespecíficos como febre, anorexia, dor de cabeça, náusea, dor abdominal, vômito, letargia, sonolência, fraqueza, prurido, erupção cutânea, disfunção pulmonar; e ainda há casos assintomáticos (MA et al., 2018; MAZUR-MELEWSKA et al., 2020).

A toxocarose é considerada cosmopolita e a estimativa de soroprevalência positiva para toxocarose (soroprevalência-T) em todo o mundo é de 19% (Figura 1). As regiões com níveis mais altos de resposta sorológica são a África com 37,7%, o sudeste da Ásia com 34,1%, o sudeste do Pacífico com 24,2%, as Américas com 22,8% e as regiões da Europa com 10,5%. No Brasil, a estimativa é de 27,6% (ROSTAMI et al., 2019a). Porém

é importante ressaltar que na toxocarose, há uma série de fatores que podem influenciar nos dados epidemiológicos, como a escassez de dados em decorrência de falta de políticas públicas que incentivem estes estudos, falta de padronização dos sinais e sintomas clínicos e variações de sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos, que podem subestimar os resultados e dificultar a avaliação do significado da doença no contexto de saúde pública (HOLLAND, 2017; ROSTAMI et al., 2019a; SMITH et al., 2009).



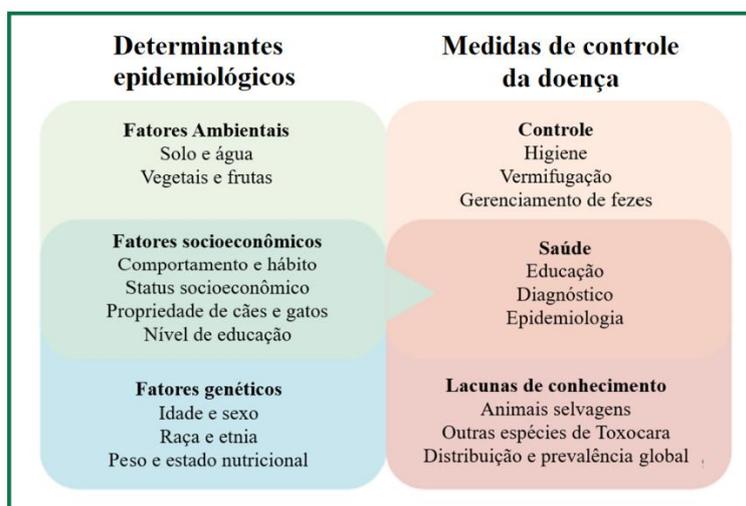
**Figura 1:** Estimativa de soroprevalência da Toxocarose (%) em humanos em todo o mundo (ROSTAMI et al., 2019a).

Alguns fatores são associados aos índices maiores de soroprevalência-T como renda mais baixa, menor IDH, latitude inferior, umidade temperatura mais alta e maiores níveis de precipitação ao longo das estações do ano. A soroprevalência-T também tem se mostrado maior no sexo masculino, em pessoas que moram em área rural, em idade jovem e em pessoas que possuem contato próximo com cães, gatos ou solo. Fatores como o consumo de carne crua e a ingestão de água não tratada também favorecem a soroprevalência T positiva (ROSTAMI et al., 2019a).

No Brasil, estudos verificaram que os solos de parques e praças públicas apresentam valores relevantes de contaminação por ovos de *Toxocara sp.*, tendo sido encontrada uma porcentagem 27,9% no Pará (ARIVALDO et al., 2015), 65,79 % no Acre (FERREIRA et al., 2018), 13,43% no Espírito Santo (MACIEL; ESTEVES; SOUZA, 2016), 43,7% em Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2013), 25% no Rio Grande do Sul (PRESTES et al., 2015) e 12,2% em Goiás (MONTEIRO et al., 2018). Alguns autores descrevem que

países em desenvolvimento há maior prevalência devido às más condições sanitárias, baixas taxas de tratamentos anti-helmínticos para cães e pelo livre acesso destes animais a parques públicos e caixas de areia, servindo como fonte de contaminação do solo, e consequentemente, apresentando risco de exposição humana a ovos embrionados (CHEN et al., 2018; HOTEZ; WILKINS, 2009; MCGUINNESS; LEDER, 2014; RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010).

A ampla distribuição geográfica de *T. canis* e suas múltiplas rotas de infecção (contato humano-cão, transmissão neonatal em cães e transmissão por alimentos) têm aumentado o interesse público a respeito da doença, porém, às políticas públicas de conscientização da comunidade sobre a toxocarose ainda é inadequada. Medidas de saneamento básico, tratamento de cães com anti-helmínticos, ampliação dos estudos epidemiológicos e o aprimoramento da educação são essenciais para melhorar o entendimento do público sobre a toxocarose e fortalecer as medidas de prevenção e controle da doença (Figura 2) (MA et al., 2018).



**Figura 2:** Determinantes epidemiológicos e fatores de risco da toxocarose humana. A disseminação da doença pode ser ocasionada por vários fatores, como contaminação ambiental com ovos e falta de medidas socioecológicas. A manifestação da doença pode estar relacionada a fatores genéticos e medidas de saúde pública que incluem estudos epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento, que devem melhorar a base de conhecimento e o controle da toxocarose humana (adaptado de ROSTAMI et al., 2019b e MA et.al, 2018).

## 2.2 Morfologia e Ciclo biológico

Os agentes etiológicos da toxocarose humana são helmintos pertencentes ao Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Família Toxocaridae e gênero

*Toxocara* (NCBI:TXID6265, 2019). As espécies de maior relevância clínica são o *T. cati* e o *T. canis*, sendo este último considerado o agente etiológico mais importante (POULSEN et al., 2015) e por conseguinte alvo do nosso estudo.

O *Toxocara* possui três fases evolutivas: ovo, larva e adulto dioico. Os ovos de *T. canis* possuem em média 87 micrômetros de comprimento por 75 micrômetros de largura e possuem a forma esférica. O ovo ainda se caracteriza por possuir cor acastanhada e uma casca externa trilaminar com três camadas, a superfície externa apresenta uma camada albuminosa espessa, há uma camada com presença de quitina proteínas, e uma interna composta por proteoglicanos. Logo abaixo dessa camada trilaminar, há uma matriz extraembrionária que é preenchida com fluido e proteínas. Abaixo da matriz extraembrionária, separada da casca externa trilaminar do ovo, há uma camada rica em lipídios, que constitui a barreira osmótica para o embrião em desenvolvimento (STEIN, 2018; UGA et al., 2000). Os ovos de *Toxocara* são muito resistentes a baixas temperaturas, e seu embrionamento pode demorar de 4 a 6 semanas, dependendo das condições ambientais.

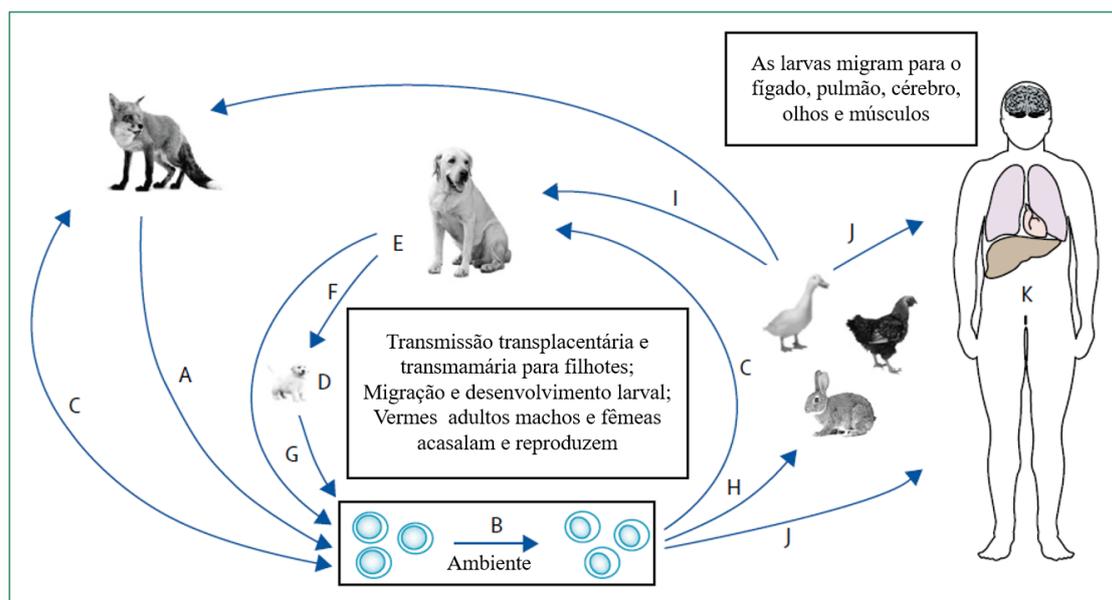
As larvas L3 de *T. canis* medem aproximadamente de 0,41 a 0,89 milímetros de comprimento e passam por quatro mudas de desenvolvimento, sendo que entre os estádios L1 a L3 o desenvolvimento ocorre no interior dos ovos, ainda no meio ambiente; e muda para o estágio L4, ocorre dentro do hospedeiro definitivo, após passar pelas vias aéreas. (DESPOMMIER, 2003; UGA et al., 2000; WEBSTER, 1958; ZIBAEI et al., 2010). Os vermes adultos são cilíndricos e, na sua extremidade anterior, há a alae cervical, que faz com que a extremidade anterior do verme se assemelhe a uma ponta de flecha. As fêmeas medem de 10 a 11 centímetros de comprimento e os machos de 7 a 8 centímetros, possuindo espículos na extremidade posterior utilizados para a cópula. Os vermes adultos vivem no intestino do cão por aproximadamente quatro meses (GLICKMAN; SCHANTZ, 1981; HADI, 2019).

O ciclo do *T. canis* se inicia quando ovos do parasito são liberados nas fezes de cães hospedeiros (Figura 3). Estes ovos contêm larvas L1 que em condições ideais de calor e umidade, sofrem muda para o estágio L2 e em seguida para o estágio infectante L3. O período de desenvolvimento e embrionamento dos ovos pode demorar de 2 a 5 semanas. Os cães ingerem os ovos embrionados e, após eclodir no duodeno, as larvas L3 penetram a parede intestinal, migram via sistema linfático e circulatório para o fígado (em até 24 horas) e pulmões (em até 72 horas). Ao chegar nas vias aéreas, as larvas atingem a traqueia, sofrem a última muda para o estágio L4 e, em seguida, são deglutidas passam

pelo esôfago e, chegam até o intestino delgado (em até 15 dias). Neste local, as larvas passam para o estágio adulto com capacidade de se reproduzirem (após 1 mês), e assim cada fêmea pode eliminar até 200 mil ovos por dia (CDC, 2013; DESPOMMIER, 2003; MA et al., 2018; SCHNIEDER; LAABS; WELZ, 2011; WEBSTER, 1958).

Os cães também podem se infectar pela via transplacentária e transmamária. Algumas larvas de *T. canis*, durante a migração, podem encistar nos tecidos, se tornar ativas no último trimestre de gestação e, transmitidas para os filhotes via placenta (cerca de 99%) e via lactação (cerca de 1%), os vermes adultos quando estabelecidos no intestino delgado dos filhotes são uma fonte importante de disseminação de ovos (MA et al., 2018). Outra via de infecção para os cães é por meio de hospedeiros paratênicos (ratos, camundongos e coelhos), nesses hospedeiros a infecção ocorre ao se alimentarem de ovos embrionados. Em seguida, as larvas eclodem dos ovos e penetram na parede intestinal, para depois migrarem para vários órgãos e tecidos, onde encistam. Quando cães se alimentam desses hospedeiros paratênicos infectados, o *T. canis* completa seu ciclo de vida, formando vermes adultos que se desenvolvem no intestino delgado (CDC, 2013; MA et al., 2018).

Os seres humanos são hospedeiros acidentais do *T. canis* ao ingerir ovos embrionados com larvas L3 ou consumir carne/vísceras mal passadas de hospedeiros paratênicos infectados. Após a ingestão, os ovos eclodem, as larvas penetram na parede intestinal e são transportadas pela circulação para vários tecidos (fígado, coração, pulmões, cérebro, músculo e olhos). As larvas não são capazes de se desenvolver nesses locais, porém podem causar reações locais e danos mecânicos que levam a toxocarose humana (CDC, 2013).



**Figura 3:** Ciclo de vida de *Toxocara canis*. O ciclo de vida de *T. canis* envolve canídeos (incluindo coiotes, cães, raposas e lobos) como hospedeiros definitivos. (A) Os ovos são liberados nas fezes do hospedeiro canídeo. (B) Os ovos embrionam no meio ambiente e tornam-se infectantes. (C) Após a ingestão por esse hospedeiro, larvas infectantes (L3) eclodem dos ovos e penetram a parede intestinal. (D) Em cães jovens (geralmente <12 semanas), as larvas migram pelo fígado e pulmões para as vias aéreas e depois são engolidas e seguem para o intestino delgado, onde as larvas do quarto estágio (L4) desenvolvem-se para vermes adultos (macho e fêmea), acasalam e se reproduzem. (E) Em alguns cães (geralmente > 12 semanas), pode ocorrer infecção oral, mas as larvas tendem a se encistar nos tecidos, onde tem o desenvolvimento interrompido. (F) Durante a gestação de cadelas, as larvas encistadas são ativadas, geralmente no último trimestre de gestação, e ocorre a transmissão transplacentária para os filhotes no útero (cerca de 99%) e transmissão transmamária para filhotes recém-nascidos (cerca de 1%). (G) Vermes adultos se estabelecem no intestino delgado dos filhotes e são uma das principais fontes de contaminação ambiental. (H) O *T. canis* também pode ser transmitido para hospedeiros acidentais (paratênicos) (por exemplo, camundongos, ratos e coelhos) através da ingestão de ovos infectantes; nesses hospedeiros, as larvas eclodem dos ovos e penetram na parede intestinal para migrar para vários órgãos e tecidos, onde encistam. (I) Quando um cão se alimenta desses hospedeiros paratênicos infectados, os vermes adultos se desenvolvem no intestino delgado, onde o ciclo de vida está concluído. (J) Os seres humanos são hospedeiros acidentais; eles podem ser infectados pela ingestão de larvas em hospedeiros paratênicos ou ovos infectantes presentes no solo, comida ou água contaminados. (K) Após ingestão, essas larvas são liberadas, invadem a parede intestinal para ser transportada pela circulação sanguínea para vários tecidos (por exemplo, fígado, pulmões, cérebro e músculos). Adaptado de (MA et al., 2018).

### 2.3 Patogênese e sintomatologia

A toxocarose humana pode se manifestar de diversas formas baseada na migração do parasito, e suas manifestações clínicas variam desde assintomática até formas graves da doença, por exemplo a cegueira. A gravidade da doença irá depender entre outros

fatores, da carga parasitária, da duração da migração larval, da idade e da imunidade dos indivíduos. Para facilitar o entendimento da doença, a toxocarose é classificada em quatro formas de acordo com os órgãos afetados: LMV, TC, TO e NT (CHEN et al., 2018; HOLLAND, 2017).

A LMV ocorre devido a migração sistêmica das larvas de *T. canis*, atingindo coração, pulmões, rins, músculos e, mais comumente o fígado. Ocorre frequentemente em crianças menores de 7 anos e, em menor número, em adultos, nesses últimos, está associado à ingestão de carnes de hospedeiros acidentais infectados (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010). Os aspectos clínicos relatados geralmente são: febre, sintomas respiratórios (tosse, dispneia e broncoespasmo), hepatomegalia, dor abdominal e diminuição do apetite. No fígado ocorre a formação de lesões granulomatosas com a presença de eosinófilos e células mononucleares e hepatite. Menos frequentemente, foram relatados casos de miocardite, artrite e nefrite (DESPOMMIER, 2003; MUSSO et al., 2007). Os achados laboratoriais incluem hipergamaglobulinemia, anemia, leucocitose com eosinofilia acentuada e sorologia positiva para *Toxocara* (CARVALHO; ROCHA, 2011; GLICKMAN; SCHANTZ; CYPESS, 1979).

O termo TC é utilizado para adultos com diagnóstico sorológico positivo para toxocarose e crianças assintomáticas ou que apresentam sintomas leves. Dentre os sintomas leves estão: a dor abdominal, febre, anorexia, náusea, cefaleia, tosse, que podem ser acompanhados de títulos elevados de anticorpos anti-*Toxocara*, eosinofilia e níveis elevados de IgE total (FAN et al., 2015).

A TO pode atingir pessoas de todas as faixas etárias, mas o predomínio é maior em crianças. Na maioria dos casos os danos à visão são unilaterais, apresentando sintomas como estrabismo, granuloma retiniano e diminuição da visão unilateral. Em alguns casos pode haver danos permanentes na retina e perda da visão. O diagnóstico é feito pela identificação de sinais clínicos no exame oftalmológico e os testes sorológicos positivos para detecção de anticorpos séricos contra os antígenos de *Toxocara* (AHN; RYOO; WOO, 2014).

Durante a migração, as larvas de *T. canis* podem atingir o cérebro, atravessando a barreira hematoencefálica, forma conhecida como NT. Estudos de autópsia já relatam a presença de larvas nas substâncias cinzenta e branca do cérebro, cerebelo e medula espinal. A maioria dos casos são assintomáticos, mas há relatos de algumas manifestações neurológicas como meningite, encefalite, mielite, vasculite cerebral, acometimento de nervos cranianos e envolvimento musculoesquelético. O diagnóstico de NT baseia-se na

presença de título elevado de anticorpos anti-*Toxocara* e presença de eosinofilia no soro ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) (SÁNCHEZ; GARCÍA; NICOLETTI, 2018).

## 2.4 Diagnóstico

A coproscopia costuma ser a técnica mais utilizada em humanos para a detecção de helmintos gastrointestinais, pois permite a detecção direta da infecção parasitária por meio da visualização dos ovos nas fezes. No entanto, na toxocarose humana isso não é possível, pois como hospedeiro acidental não há estabelecimento de verme adulto no intestino e, conseqüentemente, não elimina os ovos nas fezes, dessa forma o diagnóstico da toxocarose é baseado no histórico do paciente (contato com cães ou geofagia), sinais clínicos, exames laboratoriais (leucocitose com intensa eosinofilia e, hipergamaglobulinemia), técnicas de imagem (ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética), métodos sorológicos ou imunológicos e, em alguns casos, biópsias com subsequente exame histopatológico (EL-SAYED; RAMADAN, 2017; MOREIRA et al., 2014).

Um dos testes mais utilizados no diagnóstico da toxocarose são os ensaios imunoenzimáticos, por exemplo, os de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) geralmente combinados com *immunoblotting* para evitar resultados falso-positivos e avaliar a reatividade cruzada com outros parasitos, principalmente do filo Nematoda. Nos ensaios de ELISA, a eficácia do diagnóstico depende do tipo de preparo antigênico utilizado, entre eles antígenos brutos de larvas de *T. canis*, antígenos TES nativos ou recombinantes, antígenos de glicano ou antígenos TES desglicosilados, além do tipo de anticorpos buscado: IgG total, subclasse de IgG, IgM e IgA. Esses dois fatores são determinantes para ampliar a especificidade e sensibilidade desses testes, o que ainda é um problema nos ensaios sorológicos, sem contar que grande parte dos kits comerciais disponíveis no mercado são ensaios de IgG, que não distinguem a infecção ativa da exposição prévia (ELEFANT et al., 2016; MA et al., 2018; NOORDIN et al., 2020; ROLDÁN; ELEFANT; FERREIRA, 2015).

O diagnóstico da toxocarose também pode ser realizado a partir de ferramentas moleculares baseadas em amplificação do material genético do parasito. Na reação em cadeia da polimerase (PCR) são usados marcadores de genes de ácido ribonucleico (RNA) ribossômico nuclear ou genes mitocondriais selecionados, que auxiliam na identificação específica do parasito, porém, devido à falta de um kit comercial e ao alto

custo, tais testes geralmente são utilizados para pesquisas epidemiológicas e genéticas de base populacional e sistemáticas (MA et al., 2018; ROSTAMI et al., 2019b).

As maiores dificuldades de diagnóstico estão nas formas NT e LMO que além do teste imunológico utilizam técnicas de imagem. Para o diagnóstico de LMO, geralmente, são utilizados a pesquisa de anticorpos anti-*T. canis* em amostras de soro e humor vítreo, a tomografia de coerência óptica, a angiografia com fluoresceína, e o ultrassom ocular. No diagnóstico da NT são detectados anticorpos específicos e eosinófilos no líquido cefalorraquidiano. Na LMV, técnicas de ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética também são utilizadas para escanear lesões hepáticas (INCHAUSPE; ECHANDI; DODDS, 2018; MA et al., 2018).

## **2.5 Tratamento**

Os maiores problemas no tratamento da toxocarose estão na dificuldade dos medicamentos conseguirem atingir todos os tecidos que ocorre a migração larval e na verificação da efetividade do tratamento (MA et al., 2018). O tratamento da doença é necessário para minimizar os sintomas e para reduzir o número de larvas migratórias para o cérebro e os olhos, muitas vezes são realizados exames para verificar o quadro de eosinofilia e o exame sorológico para *T. canis*, na tentativa de avaliar a eficácia do tratamento (PAWLOWSKI, 2001).

Os medicamentos mais utilizados são o albendazol e o mebendazol, este último menos utilizado por não ser absorvido fora do trato gastrointestinal. O albendazol, ao ser ingerido, se torna amplamente distribuído pelos tecidos quando metabolizado, e estudos em camundongos observaram diminuição de larvas no fígado e no pulmão, após o tratamento, além da redução da migração de larvas para o cérebro (BARRERA et al., 2010; MA et al., 2018). Seu mecanismo de ação ocorre por meio de alterações degenerativas no retículo endoplasmático e mitocôndrias da camada germinativa do verme, que libera lisossomos e resultam na diminuição da produção de trifosfato de adenosina, que é a energia necessária para a sobrevivência dos helmintos. Com a diminuição da produção de energia, o parasito é imobilizado e, eventualmente, morre. Em humanos ainda não há um critério bem estabelecido a respeito da concentração e do número de doses do medicamento para o tratamento da toxocarose (BARRERA et al., 2010; EL-SAYED; RAMADAN, 2017).

A ivermectina é um anti-helmíntico de amplo espectro, muito utilizado para o tratamento dos cães com *T. canis*. Contudo, em seres humanos, os resultados não têm se mostrado promissores. A droga ao ser testada em 17 pacientes com TO, resultou somente na redução de 40% nas manifestações clínicas, mas não houve nenhuma redução significativa na contagem de eosinófilos no sangue. Portanto, novos estudos são necessários para a avaliação da ivermectina para terapia da toxocarose humana (MAGNAVAL, 1998; OTHMAN, 2012).

Além dos anti-helmínticos, a utilização de anti-inflamatórios é comum para reduzir os sintomas, principalmente os relacionados às respostas alérgicas. O uso de corticosteroides se mostrou eficaz em alguns casos para o tratamento da TO, porém em casos graves há a necessidade de cirurgia oftalmológica, (DESPOMMIER, 2003). Para o tratamento da NT, ainda não foram estabelecidas diretrizes específicas e, as recomendações atuais são baseadas na experiência clínica e em pequenos estudos. O albendazol têm sido o principal medicamento para o tratamento por atravessar a barreira hematoencefálica, sendo combinado com o uso de corticosteroides (MELIOU et al., 2020; OTHMAN, 2012). Estudos têm sido conduzidos a fim melhorar a distribuição de anti-helmínticos aos tecidos, particularmente no cérebro, usando compostos conjugados com polietilenoglicol (PEG) e encapsulados em lipossomas, porém mais ensaios clínicos são necessários para comprovar sua eficácia (HORIUCHI et al., 2005; LEONARDI et al., 2009; MA et al., 2018). Dessa forma, expandir nossa compreensão da biologia fundamental, particularmente o reconhecimento imunológico e a evasão de larvas de *T. canis*, deve ser uma prioridade e pode levar à descoberta de novas ferramentas de diagnóstico e métodos de intervenção para o controle e tratamento da doença (MA et al., 2018).

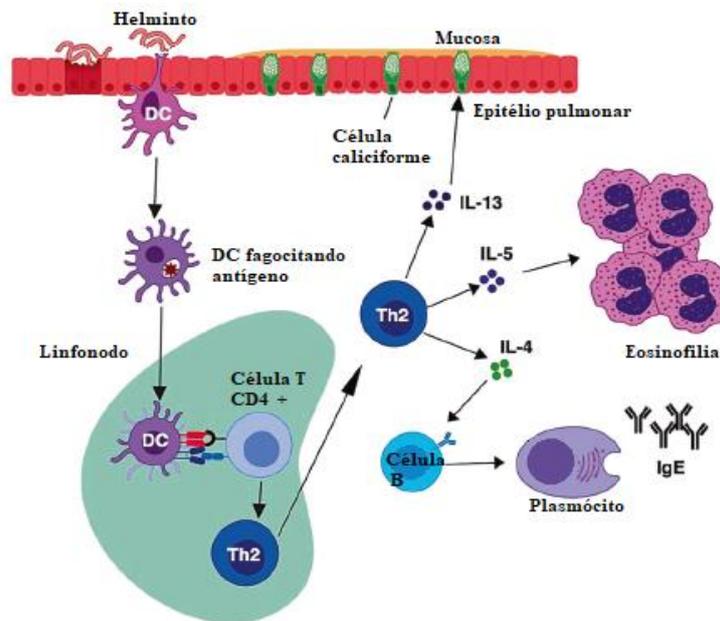
## **2.6 Resposta imunológica na infecção por *Toxocara canis***

Nas helmintíases, geralmente a resposta imunológica é iniciada através da detecção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Ao entrar em contato com as células do hospedeiro, os helmintos podem causar danos substanciais aos tecidos levando a produção de DAMPs e produzem PAMPs por meio da antigenicidade da própria cutícula e tegumento e dos produtos de secreção-excreção, à medida que migram através de diferentes órgãos, incluindo pulmões, intestinos, fígado e pele. As lesões produzidas pelos helmintos

resultam na iniciação de respostas imunológicas Th2 caracterizadas pela expansão da população e ativação de células imunes inatas, incluindo células dendríticas (DCs), basófilos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2). A ativação de células epiteliais resulta na liberação de citocinas, que tem papel de alarminas, como a interleucina-25 (IL-25) e IL-33. Esses eventos também levam à secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que promovem a polarização de macrófagos alternativamente ativados (M2) e a ativação de células Th2 (INCLAN-RICO; SIRACUSA, 2018; MAIZELS; SMITS; MCSORLEY, 2018; WEATHERHEAD et al., 2020). Durante a migração das larvas, algumas células da imunidade inata, como os macrófagos, desempenham um papel importante no reparo de tecidos danificados, já os eosinófilos são considerados importantes para a eliminação de alguns helmintos, pois aderem a sua superfície, e secretam grânulos com enzimas que podem destruí-los (ANTHONY et al., 2007; SHIN; LEE; MIN, 2009)

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são essenciais para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa e apresentam grande plasticidade, sendo capaz de se diferenciar em cinco tipos principais de células T auxiliares (Th): Th1, Th2, Th17, células T reguladoras (Treg), e Th folicular. O ambiente de citocinas durante ao qual estão expostas no momento da ativação e a ativação de fatores de transcrição específicos, controlam a diferenciação das células T CD4 *naïve*. Um conjunto distinto de citocinas promove os processos de diferenciação para cada linhagem: IL-12 e IFN- $\gamma$  para Th1; IL-4 para Th2; TGF- $\beta$  e IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 $\beta$  para Th17; TGF- $\beta$  e IL-2 para Treg e IL-21 e IL-6 para Th folicular. Ao serem ativadas, os linfócitos Th1 secretam principalmente as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ; os linfócitos Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; os linfócitos Th17 liberam principalmente as citocina IL-17 e IL-22; as células Treg secretam principalmente TGF- $\beta$ ; enquanto as células T foliculares produzem IL-21, que é crítica para a estimulação de células B. (SARAIVA; O'GARRA, 2010; ZHU; PAUL, 2010).

Nas infecções por helmintos é mais comum a diferenciação para a resposta Th2 (PAUL; ZHU, 2010). Após a ativação das células Th2, essa resposta é ampliada, aumentando a produção das citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e dos isotipos de anticorpos IgG1, IgG4 e IgE (ALLEN; MAIZELS, 2011; BROSSCHOT; REYNOLDS, 2018).



**Figura 4:** Modelo clássico de resposta imunológica do tipo 2. Durante a infecção por helmintos, um antígeno helmíntico é fagocitado por células dendríticas, que migram para o linfonodo, onde as células T CD4<sup>+</sup> naives reconhecem o antígeno processado apresentado pelo complexo peptídeo-MHC-II, juntamente com as moléculas de co-estimulação. Após o reconhecimento do antígeno apresentado pelas células dendríticas (DCs), as células T CD4<sup>+</sup> naives se diferenciam em células Th2 efectoras. As células Th2 migram para o local da inflamação e produzem citocinas Th2, como a IL-5, responsável pela eosinofilia, e a IL-13, que promove a produção de muco e a hiperplasia das células caliciformes. As células Th2 também produzem IL-4, que está envolvida na troca de classe de anticorpos e na produção de IgE. Adaptado de (GURRAM; ZHU, 2019).

Embora exista um padrão no desenvolvimento de resposta imunológica durante a infecção por helmintos, há algumas peculiaridades que devem ser bem observadas para melhor entendimento da formação da resposta imune. Em modelos experimentais murinos infectados com *Ascaris suum* foi observado predominância das respostas Th1 e Th2 na primo-infecção, enquanto que em reinfecções simultâneas foi verificado uma maior ativação de células Th2 e Th17, com aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TNF e IL-17 (MAGALHÃES et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2016). Nas infecções em humanos por *Trichuris trichiura* é verificado aumento de IgE e, embora não haja dados específicos de citocinas em indivíduos infectados somente com esse parasito, dados de populações infectadas com mais de uma espécie de nematoides gastrointestinais, incluindo *T. trichiura*, apoiam fortemente a hipótese de que essas infecções induzem resposta Th2 e Treg (ELSE et al., 2020). Na esquistossomose aguda é comum a produção TNF, IL-1 e IL-6 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Porém, durante a progressão natural da doença, a resposta Th2 é induzida pelo antígeno do ovo, regulando a produção e as funções efectoras desses mediadores inflamatórios, aumentando

a produção de citocinas como IL-13, IL-4, IL-5, sendo observado também o aumento de IL-10. (CHIARAMONTE et al., 2001; JESUS et al., 2002; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Durante as infecções por *T. canis* as principais características da resposta imunológica no hospedeiro são do tipo Th2, com quadros de eosinofilia e produção de anticorpos. Os antígenos ES do parasito normalmente estimulam a produção IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, e há aumento de eosinófilos e anticorpos do tipo IgE (MA et al., 2018). Na toxocarose é comum a presença de granulomas em lesões oculares e hepáticas (MAZUR-MELEWSKA et al., 2016; WOODHALL; FIORE, 2014). No período inicial da infecção por *T. canis*, o granuloma é composto principalmente por eosinófilos e, após algumas horas, esses eosinófilos perdem seus grânulos e se desintegram. Os resíduos celulares são absorvidos por macrófagos recém-chegados e, dessa forma se torna-se a célula mononuclear predominante. Com o passar das semanas, essas células formam um granuloma epitelióide encapsulado e fibrótico em torno da larva (KAYES; ADAMS OAKS, 1978)

Um estudo realizado na Polônia em crianças com sorologia positiva para *Toxocara* e com lesão hepática, foi demonstrado aumento das concentrações de leucócitos periféricos, eosinófilos, IgE, IL-4 e IL-10 (MAZUR-MELEWSKA et al., 2016). Em outro estudo realizado na Hungria, com soro de crianças infectadas por *Toxocara*, observou-se aumento nas concentrações de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-10 e foi verificado quadros de eosinofilia, (NAGY et al., 2012), evidenciando que durante a toxocarose humana há a presença de citocinas das repostas Th1, Th2 e Treg.

A infecção com *T. canis* em modelos murinos está relacionada à inflamação pulmonar persistente, eosinofilia, aumento dos níveis de IgE circulante, hiper-reatividade das vias aéreas e produção de citocinas do tipo Th2 (ARANZAMENDI; SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC; PINELLI, 2013). Pecinali et al., (2005) observaram no plasma e no lavado broncoalveolar (BAL) de animais infectados com *T. canis*, aumento das quimiocinas RANTES (Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) e eutaxina; e das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  na região do hipocampo, podendo estar relacionadas com o processo inflamatório encontrado na toxocarose cerebral durante a fase crônica da doença. Assim, observa-se que ainda é bastante controverso os estudos em relação aos aspectos imunológicos envolvidos na toxocarose.

### 2.6.1 Receptor ST2 e IL-33

O receptor ST2 foi identificado em 1989, ele é um membro da superfamília do receptor da IL-1 e participa de processos inflamatórios, estando associado a atividade de mastócitos e à produção de citocinas da resposta Th2 (KAKKAR; LEE, 2008). Em humanos, o gene que codifica o receptor ST2 produz três isoformas da proteína: uma forma ligada a membrana (ST2L), com domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático; uma forma solúvel (sST2) com um domínio extracelular idêntico ao ST2L; e um ST2 variante (ST2V) com isoforma semelhante a sST2, mas sem um domínio de imunoglobulina extracelular (TAGO et al., 2001). O ST2L é expresso em fibroblastos, mastócitos, eosinófilos, linfócitos Th2 e, células dendríticas e podem ser induzidos em macrófagos. O sST2 é expresso por mastócitos e fibroblastos e é induzido por citocinas como o TNF- $\alpha$  em células endoteliais. O mRNA de ST2V é encontrado principalmente em células do intestino (DE LA FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015; TAGO et al., 2001).

A linhagem de camundongos deficientes para o receptor ST2 é importantes para aprofundar os estudos a respeito de sua função imunológica. Esses animais foram desenvolvidos a partir da deleção de um gene que codifica a proteína T1/ST2. Esse processo de deleção foi realizado em células embrionárias e após selecionadas as células que possuíam o gene T1/ST2, elas foram microinjetadas em blastocistos de C57BL/6. Esses camundongos foram acasalados com camundongos C57BL/6 e o genótipo das células embrionárias foi transmitido ao longo das linhagens. Os homozigotos deficientes para o receptor ST2 foram então acasalados com animais BALB/c e após algumas gerações obteve-se animais mutantes homozigotos (ST2<sup>-/-</sup>) em *background* BALB/c. Camundongos ST2<sup>-/-</sup> demonstraram ter prejudicada sua capacidade de gerar as citocinas IL-4 e IL-5, mas não IFN- $\gamma$  e imunoglobulina, sendo a expressão do receptor ST2 necessária para o desenvolvimento adequado da resposta Th2 (TOWNSEND et al., 2000).

Em 2005, Schmitz et al., (2005) descreveram que a IL-33 é um ligante do receptor ST2. Diversas células teciduais e da imunidade inata expressam a IL-33, entre elas macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células epiteliais, estromais, musculares, fibroblastos, células gliais, osteoblastos e adipócitos (LE et al., 2013). A IL-33 ao se ligar ao receptor ST2L ativa fatores de transcrição e impulsiona a produção de citocinas de células Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-13 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008). Estudos também demonstram que a IL-33, em sinergia com IL-13, pode induzir

macrófagos a se diferenciar em macrófagos alternativamente ativados, chamados de M2 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009). O aumento da expressão da IL-33 foi associado a patogênese da asma por meio da expansão das células Th2, dermatite atópica e a anafilaxia, pela ativação de mastócitos. Contudo, por induzir a resposta do tipo 2, ela pode estar relacionada com atividade protetora na aterosclerose e contra infecções helmínticas, podendo ser um alvo para a intervenção terapêutica em várias doenças (LE et al., 2013; LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010; MILLER et al., 2008).

A ativação da via IL-33/ST2 tem sido estudada na infecção por nematódeos, sendo demonstrado que na infecção por *Strongyloides venezuelensis* ela é responsável por manter as respostas de hiperresponsividade das vias aéreas e da resposta Th2 nos pulmões (ARAUJO et al., 2016). YASUDA et al., (2012) também observaram que, na infecção por *S. venezuelensis*, a IL-33 pode participar na indução da inflamação eosinofílica pulmonar, podendo ter um papel na expulsão dos vermes nos pulmões. Outro estudo demonstrou que durante a infecção por *Trichuris muris* a ativação da via IL-33/ST2 foi importante para induzir a resposta imune adaptativa (HUMPHREYS et al., 2008). RESENDE et al., (2015) observaram em camundongos BALB/c infectados com *T. canis*, concentrações elevadas de IL-33 a partir do 5º dia pós-infecção. Entretanto, a importância da ativação da via IL-33/ST2 para o controle da carga parasitária ou da fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada.

## **2.6.2 Fator de transcrição GATA1**

A diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em células sanguíneas maduras ocorre por meio dos fatores de transcrição, que são responsáveis por regular a expressão de genes que codificam as proteínas e determinam a estrutura e a função de cada tipo de célula sanguínea (PEVNY et al., 1995). Dentre esses fatores de transcrição está a família GATA, composta por GATA-1, GATA-2 e GATA-3 que são fatores de transcrição hematopoiéticos essenciais, e os GATA-4, GATA-5 e GATA-6 que são reguladores do desenvolvimento de células do coração, pulmão e intestino. O fator de transcrição GATA-1 é expresso nas células das linhagens hematopoiéticas: eritrócitos, megacariócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos (TANG; LIU; LIANG, 2017).

Os eosinófilos, após serem produzidos na medula óssea a partir de células-tronco pluripotentes, se diferenciam em um precursor híbrido com propriedades compartilhadas de basófilos e eosinófilos. Por meio dos fatores de transcrição PU.1, C/EBP e GATA-1 e

se diferenciam em eosinófilos. Durante a diferenciação celular, os eosinófilos expressam níveis intermediários da proteína GATA-1, que possui um mecanismo de ação específico para essas células e a deleção desse fator de transcrição interrompe a maturação celular eosinofílica (ROTHENBERG; HOGAN, 2006; YU et al., 2002).

Para o estudo da função e patologias relacionadas aos eosinófilos foi desenvolvida uma linhagem de camundongos BALB/c denominada  $\Delta$ dblGATA. Os camundongos dessa linhagem apresentam deficiência completa e seletiva para diferenciação de eosinófilos. Os eosinófilos possuem um sítio palindrômico (ou duplo) de alta afinidade de GATA-1, localizado na região reguladora de genes, e a deleção deste sítio de ligação no promotor GATA-1 leva à perda seletiva de eosinófilos *in vivo*, enquanto as demais células da linhagem hematopoiética permanecem iguais (YU et al., 2002).

Os eosinófilos são leucócitos presentes nos tecidos e na corrente sanguínea dos vertebrados e estão envolvidos em diversos processos inflamatórios, como respostas alérgicas e em infecções helmínticas (KLION; NUTMAN, 2004). Em resposta a danos ou a alguns tipos de infecções, os eosinófilos são recrutados para os sítios de inflamação onde secretam citocinas como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, TGF, proteínas granulares tóxicas, mediadores lipídicos, além de serem capazes de induzir danos e disfunções teciduais (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

É comum a presença de eosinófilos em diversas infecções parasitárias, podendo ser os responsáveis pela eliminação de alguns helmintos, particularmente aqueles com estágios de migração nos tecidos. Em modelos murinos, foi demonstrado o papel protetor dos eosinófilos, evitando infecção secundária por *Trichinella spiralis* e em humanos com esquistossomose o aumento de eosinófilos, pós-tratamento com praziquantel foi correlacionados com resistência à reinfecção (HAGAN et al., 1985; HUANG et al., 2015; HUANG; APPLETON, 2016).

Na toxocarose é comum a presença de eosinofilia, tanto em humanos como em camundongos, porém estudos em modelos murinos demonstraram que os eosinófilos não são fundamentais no controle da infecção por *T. canis* (DENT et al., 1999). Além disso, estudos em camundongos geneticamente deficientes para IL-5, infectados com *T. canis*, e que conseqüentemente apresentaram menor quantidade de eosinófilos, mostraram que a ausência da IL-5 não alterou a carga parasitária, porém esses camundongos apresentaram redução de lesões pulmonares, quando comparados aos camundongos que tinham maior quantidade de IL-5. Assim, foi sugerido que os eosinófilos desempenham

um papel na patologia em camundongos infectados com *T. canis* (TAKAMOTO et al., 1997).

### 2.6.3 Receptor de IL-17

As células Th17 têm função pró-inflamatória e secretam as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, e fatores estimuladores de colônia de granulócitos envolvidos na produção das quimiocinas CXCL1, CXCL2 por fibroblastos, células linfoides, endoteliais e epiteliais que expressam os receptores correspondentes, como o receptor IL-17A (IL-17RA), resultando em infiltrados celulares inflamatórios ricos em neutrófilos (LARKIN et al., 2012).

A proteína IL-17 foi descoberta como um produto de células T em roedores e sua família é composta por seis membros: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, sendo os principais membros da família a IL-17A e IL-17F, que são produzidos por células Th17, células  $T\gamma\delta$ , neutrófilos e células natural killer (NK) (MIOSSEC; KOLLS, 2012; ROARK et al., 2008). As citocinas da família IL-17 medeiam os efeitos em nível molecular por meio da ligação aos seus receptores, conhecidos como receptores da família IL-17R (IL-17RA-IL-17RE), que possuem características estruturais únicas e desencadeiam eventos de sinalização que são distintos daqueles desencadeados por outros receptores de citocinas (GAFFEN, 2010). Para que o papel da resposta imunológica mediada pela citocina IL-17 pudesse ser mais amplamente conhecido foram desenvolvidos camundongos geneticamente deficientes para o receptor de IL-17RA. Estes animais foram modificados geneticamente a partir de um vetor direcionado a este receptor sendo inserido em células tronco embrionárias de camundongos selvagens, que após sucessivos cruzamentos com camundongos C57BL/6j deram origem aos camundongos geneticamente deficientes para o receptor IL-17RA (KUMAR et al., 2016).

Estudos observaram que a IL-17 desencadeia respostas inflamatórias contra bactérias extracelulares e fungos, além de auxiliar na proteção e regeneração da barreira da mucosa no epitélio intestinal. No entanto, esta citocina também está associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes como artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais e doenças alérgicas como a asma (KUMAR et al., 2016; LI et al., 2019; XU; CAO, 2010). Nas infecções helmínticas há relatos demonstrando a presença e o papel dessa citocina. Em infecções por *Schistosoma mansoni* foi visto que as células Th17 estão associadas à inflamação exacerbada induzida pelo ovo do parasito

(LARKIN et al., 2012; MBOW et al., 2013). Entretanto, NOGUEIRA et al., (2016) observaram que uma resposta imune sistêmica Th2/Th17 são essenciais para controle da migração larval na reinfecção por *Ascaris suum*. SUTHERLAND et al., (2014) também observaram que camundongos BALB/c infectados *Nippostrongylus brasiliensis* tiveram aumento na ativação de neutrófilos, devido a produção de IL-17A por células  $T\gamma\delta$ , contribuindo para a eliminação larval, contudo foi observado aumento de lesão pulmonar.

Na toxocarose, em estudos utilizando o modelo murino, não foi observado a presença de IL-17 em esplenócitos estimulados com mucinas recombinantes, sugerindo que a resposta Th1 e Th17 em camundongos infectados com *T. canis* pode ser inibida (DŁUGOSZ et al., 2015). Por outro lado, RESENDE et al., (2015) observaram que, com 14dpi, camundongos infectados com *T. canis* aumentaram a concentração de IL-17 sérica, sugerindo que a resposta Th17 pode ter importância ao longo da infecção. Assim, observa-se que o papel da resposta IL-17 pode apresentar um caráter controverso durante à infecção por toxocara.

## 2.7 Modelos experimentais

A utilização de modelos experimentais para o estudo de doenças humanas tem se tornado cada vez mais frequente, incluindo os estudos de doenças parasitárias. O modelo animal para avaliar a infecção causada por parasitos deve ser escolhido de acordo com alguns critérios como: o tipo de infecção a ser estudada, a hipótese a ser testada, se o modelo é capaz de reproduzir a infecção humana, características biológicas do próprio parasito e da interação parasita-hospedeiro. Os roedores (ratos e camundongos) são os animais mais utilizados para pesquisas, pois possuem as vantagens de ter baixo custo de manutenção, facilidade de manuseio, tempo curto de reprodução e alta capacidade reprodutiva, além de semelhanças genéticas e imunológicas com os humanos (BOES; HELWIGH, 2000; LERMAN et al., 2019).

A utilização de camundongos para o estudo de doenças ampliou com a engenharia genética, pois foi possível realizar técnicas de deleções de gene de todo o corpo do animal ou de células específicas, sendo criado os animais geneticamente deficientes, também chamados de camundongos deficientes (*knockout*). Com esses animais é possível realizar estudos mecanicistas e elucidar os mecanismos patológicos, imunológicos, moleculares e identificar alvos para terapia (LERMAN et al., 2019).

Os modelos experimentais para o estudo da toxocarose tem se mostrado fundamentais para o esclarecimento do curso da infecção e o desencadeamento de doença mediada pela resposta imunológica, e os camundongos têm sido amplamente utilizados para esta finalidade. A via de migração e as lesões produzidas pelas larvas de *T. canis* em humanos e camundongos tem se mostrado semelhante, além disso, os camundongos assim como os humanos, são hospedeiros acidentais verdadeiros do parasito. Os camundongos também toleram infecções maciças deste parasito por longos períodos sem sofrer alterações significativas, tornando estes hospedeiros adequados para maior conhecimento a respeito da fisiopatologia, imunologia e novas abordagens de controle da infecção.

## ***OBJETIVOS***

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos envolvidos na infecção por *Toxocara canis* em modelo experimental murino.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a carga parasitária e a histopatologia no fígado, pulmão e cérebro na fase aguda e crônica da infecção de camundongos geneticamente deficientes para receptores ST2 e fator de transcrição GATA1, infectados com *T. canis* e nas demais condições experimentais.
- Caracterizar o perfil leucocitário de camundongos geneticamente deficientes para receptor ST2 ou fator de transcrição GATA1, e em seus respectivos animais selvagens BALB/c estando infectados ou não com *T. canis*.
- Avaliar a função pulmonar e o perfil de leucócitos nas vias aéreas de camundongos geneticamente deficientes para receptor ST2 ou fator de transcrição GATA1, e em seus respectivos animais selvagens BALB/c estando infectados ou não com *T. canis*.
- Analisar o perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no tecido pulmonar e a atividade celular tecidual de macrófagos, neutrófilos em camundongos geneticamente deficientes para o receptor ST2 e fator de transcrição GATA1, e em seus respectivos animais selvagens BALB/c estando infectados ou não com *T. canis*.
- Avaliar, durante a fase aguda da infecção o perfil leucocitário, a carga parasitária, a fisiopatologia e a resposta imunológica pulmonar e sistêmica de camundongos geneticamente deficientes para o receptor IL-17RA e em seus respectivos animais selvagens C57BL/6 estando infectados com *T. canis*.

## ***METODOLOGIA***

## 4 METODOLOGIA

---

### 4.1 Envio do projeto para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Todo o experimento foi realizado de acordo com as normas e princípios éticos de boas práticas em experimentação animal. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme certificado pelo Protocolo de n°. 56/2018 disponível em anexo.

### 4.2 Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos adultos fêmeas com oito semanas de idade das linhagens BALB/c e C57BL/6 selvagens provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os camundongos geneticamente deficientes para receptor de ST2 (ST2<sup>-/-</sup>) foram cedidos pelo Dr. João Santana da Silva, Departamento de Imunologia/USP - Ribeirão Preto); e os camundongos geneticamente deficientes para o fator de transcrição GATA1 (GATA1<sup>-/-</sup>) foram cedidos pelo professor Dr. Remo Russo, Departamento de Fisiologia/UFMG). Os camundongos geneticamente deficientes para receptor de IL-17RA, foram adquiridos no Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em boas condições de higiene, temperatura ambiente, com luminosidade controlada (ciclo claro-escuro 12 horas) e receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

### 4.3 Infecção experimental por *Toxocara canis*

Os vermes adultos de *T. canis* foram coletados das fezes de filhotes de cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Belo Horizonte, tratados com anti-helmíntico Drontal Puppy® (cada 100mL contém: Febantel 1,50gg e Pamoato de pirantel 1,44 g) na dosagem de 1mL para cada Kg de peso do animal, em colaboração com as autoridades e os veterinários locais.

Os vermes foram lavados três vezes em solução contendo tampão de fosfato-salino (PBS- pH 7,2). Foram separados os machos das fêmeas, e estas últimas foram dissecadas em placa de Petri. O verme foi aberto com bisturi (lâmina de aço n° 22), o útero removido e macerado em crisol de porcelana com PBS e filtrado em tamis Tyler 100 (0,15 mm). Em seguida, foi adicionado à solução com os ovos, ácido sulfúrico a 0,2 M, e a solução foi distribuída em garrafas de cultura (75cm<sup>2</sup> em volume total de 160 mL e com tampa ventilada com filtro de 0,22µm e superfície interna não tratada). As culturas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) por 40-60 dias à 28°C e agitadas diariamente.

Após o período de incubação, os ovos embrionados foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL, centrifugados a 800 G por 10 minutos a 22°C. O sobrenadante foi descartado e, no sedimento contendo os ovos, foi adicionado hipoclorito de sódio 5% na proporção de 1:2, incubados em estufa climatizada (Water – Jacketed Incubator, ThermoScientific®) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora e 40 minutos para ocorrer o rompimento da camada exterior do ovo e, conseqüentemente, facilitar a eclosão das larvas, após a inoculação dos ovos.

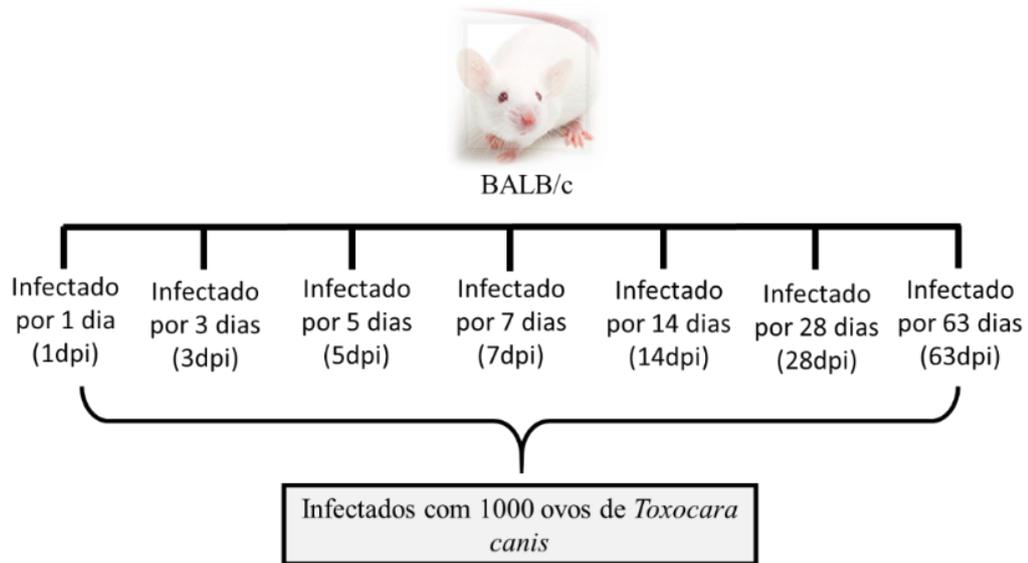
Antes da inoculação, os ovos embrionados foram lavados com água filtrada para remoção do hipoclorito com pelo menos três ciclos centrifugações que foram realizadas por 10 minutos, a 800 G, com temperatura de 22°C. Após a última centrifugação, o sedimento com os ovos foi ressuspendido em água filtrada 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 a diluição necessária para obter uma suspensão contendo 1000 ovos embrionados em 220 µL. Os camundongos foram inoculados via intragástrica e depois com 100 µL de água filtrada para remover os ovos remanescentes da seringa e agulha de gavage.

#### **4.4 Delineamentos experimentais**

##### **4.4.1 Cinética da infecção**

O primeiro capítulo deste trabalho visou caracterizar e descrever os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos associados a resposta Th2 por meio da via IL-33/ST2 na infecção por *T. canis*.

Para a caracterização da infecção por *T. canis* e estabelecimento dos dias em que há o pico de recuperação de larvas no fígado, pulmões, cérebro e olhos, 6 camundongos adultos selvagens BALB/c foram eutanasiados com 1, 3, 5, 7, 14, 28 e 63 dias pós-infecção (dpi) (Figura 5).



**Figura 5:** Divisão dos grupos experimentais para caracterizar a cinética da infecção e estabelecimento do pico de recuperação das larvas nos tecidos

#### 4.4.2 Avaliação da via IL-33/ST2 na infecção por *T. canis*

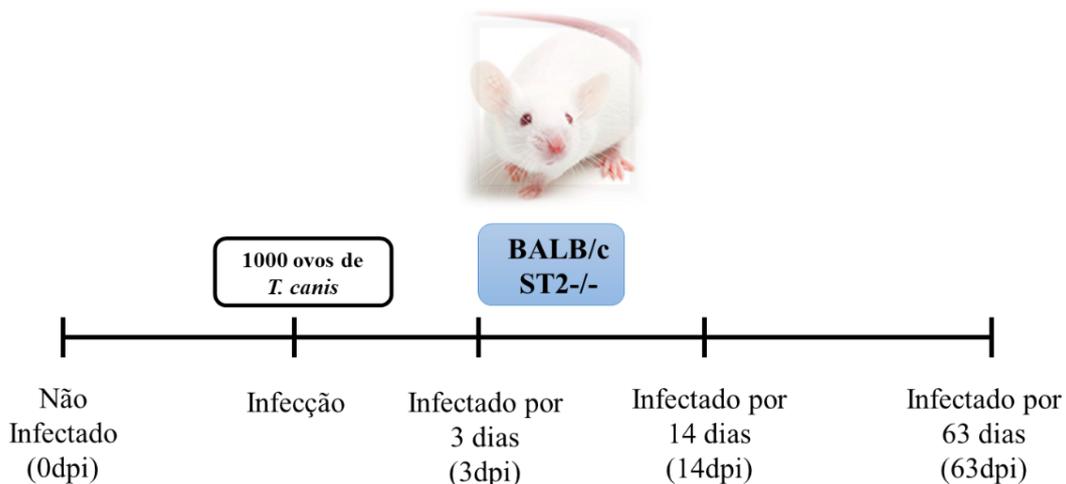
Para o estudo da importância da via IL-33/ST2 na infecção por *T. canis* foram utilizados camundongos ST2<sup>-/-</sup>, e sua respectiva estirpe selvagem, BALB/c para eutanásia em 3 dpi (fase aguda hepato-pulmonar), 14 dpi (início da fase neurotrópica) e 63 dpi (fase crônica neurotrópica), conforme estabelecido pelo experimento de cinética de migração larval. Além disso, também foram utilizados camundongos não infectados por *T. canis* (0 dpi) para compor os grupos controles.

Para cada dpi foram utilizados 13 animais, sendo 7 para análise histológica e citocinas e 6 para as demais análises. Todos os experimentos com camundongos *knockout* foram pareados com sua respectiva estirpe selvagens (Figura 6).

Dessa forma, os grupos experimentais referentes ao enfoque da resposta Th2 se apresentaram da seguinte forma:

- **BALB/c 0dpi:** camundongos BALB/c não infectados por *T. canis*.
- **ST2<sup>-/-</sup> 0dpi:** camundongos ST2<sup>-/-</sup> não infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 3dpi:** camundongos BALB/c 3 dias infectados por *T. canis*.

- **ST2<sup>-/-</sup> 3dpi**: camundongos ST2<sup>-/-</sup> 3 dias infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 14dpi**: camundongos BALB/c 14 dias infectados por *T. canis*.
- **ST2<sup>-/-</sup> 14dpi**: camundongos ST2<sup>-/-</sup> 14 dias infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 63dpi**: camundongos BALB/c 63 dias infectados por *T. canis*.
- **ST2<sup>-/-</sup> 63dpi**: camundongos ST2<sup>-/-</sup> 63 dias infectados por *T. canis*.



**Figura 6:** Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta Th2 na infecção por *T. canis*

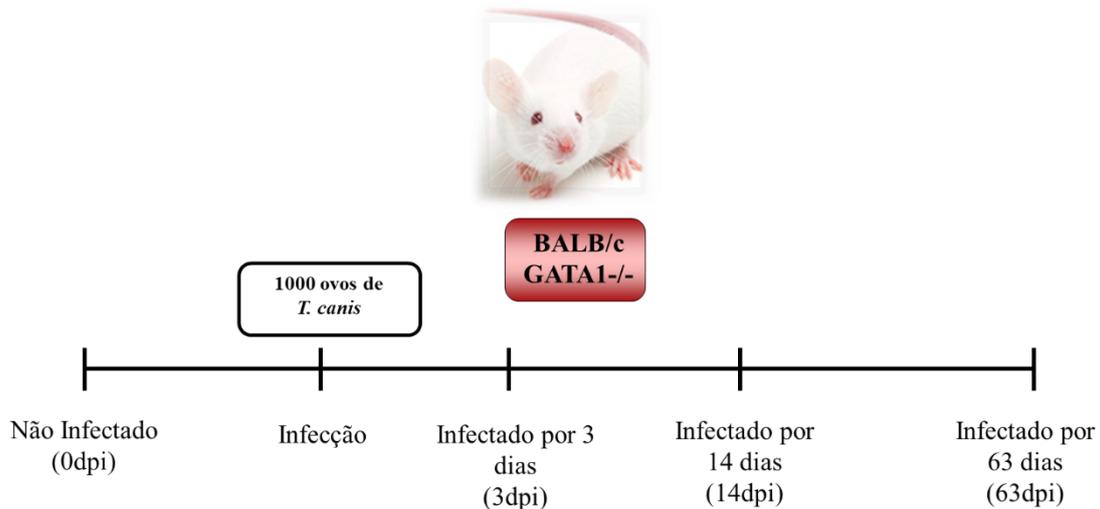
#### 4.4.3 Avaliação dos eosinófilos na infecção por *T. canis*

O segundo capítulo deste trabalho visou avaliar o papel dos eosinófilos na fisiopatologia da infecção por *T. canis*. Para cada dpi foram utilizados 13 animais, sendo 7 para análise histológica e citocinas e 6 para as demais análises, sendo utilizados camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos devido à mutação no fator de transcrição GATA 1 e sua respectiva estirpe selvagem BALB/c (Figura 7).

Dessa forma, os grupos experimentais referentes ao enfoque na resposta de eosinófilos se apresentaram da seguinte forma:

- **BALB/c 0dpi**: camundongos BALB/c não infectados por *T. canis*.
- **GATA1<sup>-/-</sup> 0dpi**: camundongos GATA1<sup>-/-</sup> não infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 3dpi**: camundongos BALB/c 3 dias infectados por *T. canis*.
- **GATA1<sup>-/-</sup> 3dpi**: camundongos GATA1<sup>-/-</sup> 3 dias infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 14dpi**: camundongos BALB/c 14 dias infectados por *T. canis*.

- **GATA1<sup>-/-</sup> 14dpi**: camundongos GATA1<sup>-/-</sup> 14 dias infectados por *T. canis*.
- **BALB/c 63dpi**: camundongos BALB/c 63 dias infectados por *T. canis*.
- **GATA1<sup>-/-</sup> 63dpi**: camundongos GATA1<sup>-/-</sup> 63 dias infectados por *T. canis*.



**Figura 7:** Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta eosinofílica na infecção por *T. canis*

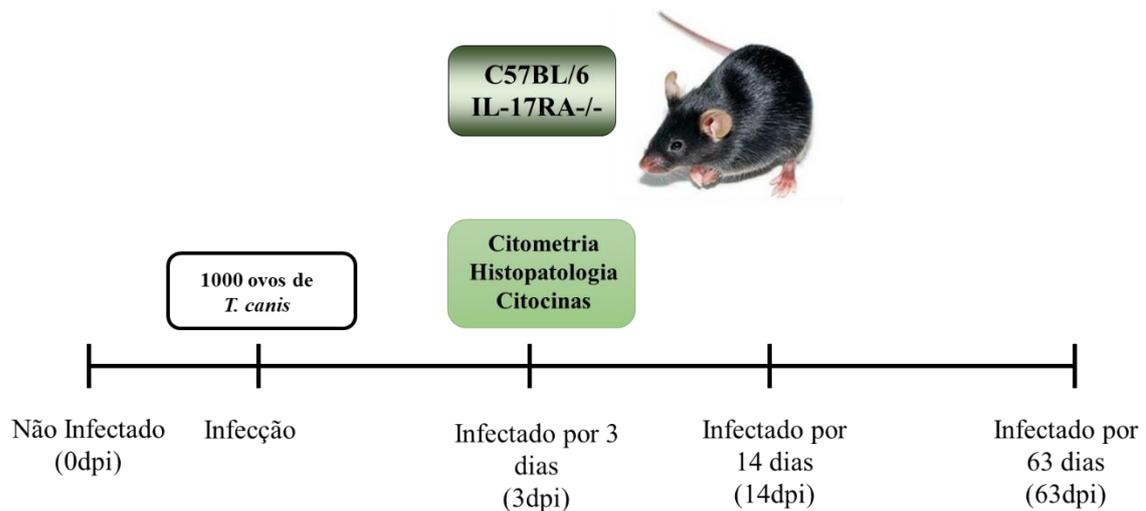
#### 4.4.4 Avaliação do IL-17R na infecção por *T. canis*

O terceiro capítulo deste trabalho teve como objetivo avaliar a resposta Th17 durante a migração larval, focando na resposta imunológica na fase aguda da infecção por *T. canis*. Para os experimentos, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para o receptor de IL-17RA (IL-17RA<sup>-/-</sup>) e sua respectiva estirpe selvagem C57BL/c, sendo utilizados 50 animais de cada linhagem para a execução de todas as metodologias, distribuídos da seguinte forma: 6 animais para cada dpi para avaliar a carga parasitária, o BAL e o perfil leucocitário (0dpi, 3dpi, 14dpi e 63dpi), 6 animais para citometria (0dpi e 3dpi) e 7 animais para histopatologia e citocinas (0dpi e 3dpi) (Figura 8).

Dessa forma, os grupos experimentais para avaliar a resposta Th17 se apresentaram da seguinte forma:

- **C57BL/6 0dpi**: camundongos C57BL/6 não infectados por *T. canis*.
- **IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi**: camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não infectados por *T. canis*.
- **C57BL/6 3dpi**: camundongos C57BL/6 3 dias infectados por *T. canis*.

- **IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi:** camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 3 dias infectados por *T. canis*.
- **C57BL/6 14dpi:** camundongos C57BL/6 14 dias infectados por *T. canis*.
- **IL-17RA<sup>-/-</sup> 14dpi:** camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 14 dias infectados por *T. canis*.
- **C57BL/6 63dpi:** camundongos C57BL/6 63 dias infectados por *T. canis*.
- **IL-17RA<sup>-/-</sup> 63dpi:** camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 63 dias infectados por *T. canis*.



**Figura 8:** Divisão dos grupos experimentais para avaliar a resposta Th17 na infecção por *T. canis*

#### 4.5 Análise do perfil leucocitário

Todos os animais foram mortos por dose letal de anestésico (cetamina 225 mg/Kg e xilazina 27 mg/Kg) via intraperitoneal. Foram coletados, aproximadamente, 500 µL de sangue por punção cardíaca e em seguida foram transferidos para tubos contendo o anticoagulante (Vacuplast®) para análise leucocitária. Posteriormente, foi realizada a centrifugação dos tubos para a coleta do plasma, armazenado a -80°C para análises posteriores.

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. 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 em microscópio óptico. O número absoluto de cada população celular foi calculado utilizando a contagem global de leucócitos.

#### **4.6 Quantificação das larvas de *Toxocara canis***

A quantificação das larvas nos animais infectados foi realizada pela recuperação das larvas de *T. canis* nos tecidos hepático, pulmonar, cerebral e ocular (este último somente na cinética de BALB/c). Após a eutanásia, os tecidos foram coletados, picotados extensivamente com tesoura, colocados em aparato de Baermann-Moraes adaptado com PBS e incubados por 4 horas a 37°C (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Após a incubação, o sedimento foi coletado com auxílio de pipetas Pasteur, transferido para Falcon de 15 mL e centrifugado por 10 minutos a 800 G em temperatura ambiente (T.A). Os sobrenadantes foram ressuspensos em solução tamponada de formaldeído a 10%, homogeneizados e armazenados para posterior contagem em microscopia de luz.

#### **4.7 Ensaio bioquímico: Avaliação da função hepática pela atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)**

Como parâmetro clínico de avaliação de lesão hepatocelular foi determinada a concentração em U/L de AST e ALT plasmática através da adaptação do kit comercial AST Bioclin (Bioclin Quibasa®, Brasil) e ALT Bioclin (Bioclin Quibasa®, Brasil). O volume de plasma empregado foi 10 µL para cada ensaio.

#### **4.8 Obtenção, processamento e análise do BAL**

Após a eutanásia, foi realizada em cada animal a dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia, para introdução de um cateter (Safety Catheter® 18G x 1¾”, Termo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1 mL de PBS gelado a 4°C, em um volume final de 2 mL. Em seguida, o conteúdo do BAL foi submetido à centrifugação a 300 G, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado a -80°C para a quantificação de proteína total e hemoglobina.

Posteriormente, o sedimento do BAL resultante do processamento foi suspenso em 100 µL de PBS. Uma alíquota foi removida para realização da contagem global de células,

sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter  $5 \times 10^4$  células/mL. O volume ajustado foi, então, centrifugado por 5 minutos, a 135 G e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge®). Lâminas obtidas após a 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, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado.

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicíntrico usando kit comercial (Pierce®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando albumina de soro bovino (BSA) e os valores de densidade óptica (D.O.) das amostras foram interpolados para se determinar a concentração de proteínas. Os resultados foram expressos por  $\mu\text{g}$  de proteína total por mL de BAL.

A concentração de hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico pelo método cianometahemoglobina adaptado do kit comercial (Bioclin Quibasa®, Brasil). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O padrão de hemoglobina (Bioclin Quibasa®, Brasil) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de D.O. das amostras para se determinar a concentração. O teor de hemoglobina foi expresso em g de hemoglobina por dL de BAL.

## **4.9 Avaliação da resposta imunológica**

### **4.9.1 Dosagem de citocinas teciduais**

Para a avaliação do perfil de citocinas no tecido pulmonar, 100 mg de pulmão foram homogeneizados (TissueLyser LT® - Qiagen, Hilden, Alemanha) em 1000  $\mu\text{L}$  de PBS tamponado com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de  $\text{NaPO}_4$ ), suplementado com 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases (0,01 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina A). Os homogenatos foram centrifugados a 800 G, durante 10 minutos em 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas. A produção de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12/IL23p40, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  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 foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/mL) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de D.O. em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL).

#### **4.9.2 Quantificação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral**

A avaliação da atividade de N-acetilgliconaminidase (NAG), mieloperoxidase de neutrófilo (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) foi realizada nos homogenatos do fígado, pulmão e cérebro e foram mensuradas de acordo com o método descrito por Strath et al., (1985), modificado por Silveira et al., (2002). Após a homogeneização do tecido (TissueLyser LT® - Qiagen, Hilden, Alemanha), o homogenato foi centrifugado a 1500 G durante 10 minutos a 4 °C e o sedimento resultante foi examinado para determinar a atividade de EPO, MPO e NAG.

Para o ensaio de atividade da NAG, o sedimento foi homogeneizado em 800 µL de NaCl 0,9% Triton 100 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida centrifugadas a 3000 rpm, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio, sendo que a reação foi iniciada com a adição de 100 µl do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co®, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,5) e incubação a 37 °C por 10 minutos. A reação foi terminada pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,8 M (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405 nm.

Para o ensaio de MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200 µL de solução tampão 1 (NaCl 0,1M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02M, Na<sub>2</sub> EDTA 0,015M, pH 4,7) seguido de centrifugação (10000 rpm, 10 minutos a 4°C,). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado ao sedimento 800 µL de solução tampão 2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%). As amostras foram homogeneizadas e depois submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (10000 rpm, 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25 µL das amostras foram distribuídas em placas com 96 poços (Corning®, EUA).

Posteriormente foi adicionado 25 µL de substrato TMB 1,6mM (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina diluído em dimetilsulfóxido - DMSO) seguida pela incubação por cinco minutos à 37°C. Após esse período foi adicionado 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,002% e após incubação por 5 minutos à 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 µL de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co®, EUA), em seguida as amostras foram homogeneizadas e foram realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado (10000 rpm, 10 minutos a 4°C,) e o sobrenadante foi distribuído (75 µL/poço) em microplaca de 96 poços (Corning®, EUA), seguida da adição de 75 µL de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0,075 M em tampão Tris-HCl, pH 8,0). Após a incubação, durante 30 minutos à T.A., a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorbância foi determinada a 492 nm.

#### **4.9.3 Produção de antígeno e ELISA indireto para detecção de IgG específico e suas subclasses**

Para a produção do antígeno bruto de larva L3, os ovos em cultura passaram pelo procedimento de preparação de ovos para inoculação, conforme descrito no item 4.3. Após a última centrifugação, o sedimento com os ovos foi ressuspenso em PBS e centrifugado a 800 G, por 10 minutos à T.A. O sobrenadante foi descartado, adicionada solução salina de HBSS (Solução Balanceada de Hank's) em pH 2,0 e incubado por 30 minutos em estufa CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esse período foi adicionada a solução salina HBSS em pH 7,4. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 800 G, por 10 minutos à T.A, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspenso em meio RPMI. As amostras foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços, por um período de 72 horas, para que ocorresse a eclosão das larvas.

Após a eclosão, as larvas foram coletadas, transferidas para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugadas a 800 G por 10 minutos em T.A. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 10 mL de PBS. Foi realizada uma nova centrifugação e o sobrenadante novamente descartado. O *pellet* foi mais uma vez ressuspenso em 5 mL

de PBS e foi processado com o auxílio de um sonificador a 60 Watts por 10 ciclos de 1 minuto, com intervalo de 30 segundos cada. Após a sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 800 G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante então foi coletado e as proteínas quantificadas pelo kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando o plasma de animais BALB/c, ST2<sup>-/-</sup> e GATA1<sup>-/-</sup> infectados (14dpi e 63dpi) e não infectados (0dpi) com *T. canis*. Placas de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 10µg (100µL/poço) de antígeno bruto de larvas L3 e incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 8 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20) e bloqueadas com 250µL de PBS acrescido de 3% de BSA, durante 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. Em seguida, foi adicionado o plasma (100µL/poço) dos animais na diluição 1:1000 em PBS com BSA 3% e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 8 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e foi adicionado (100µL/poço) o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, na diluição 1:2000 em PBS-BSA 3%. Após a incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas novamente e foi adicionado 100µL da solução reveladora (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%). As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo de luz, por 20 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância foi lida em leitor de ELISA a 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. O ensaio de ELISA para IgE (realizado nos animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>), IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, foi o mesmo descrito acima, exceto para as diluições de plasma que foram 1:10, 1:200, 1:100, 1:100 e 1200 respectivamente, e os anticorpos secundários de camundongo anti-IgE, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3, que foram diluídos em PBS-BSA 3% em 1:1000, exceto anti-IgG2a que foi diluído 1:500.

#### 4.9.4 Citometria de fluxo

Foi realizada a análise por citometria de fluxo do BAL e do sangue periférico dos camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> não infectados (0dpi) e infectados com 3dpi a fim de caracterizar a população celular e observar as citocinas secretadas por cada tipo celular. Foram realizados os painéis com os seguintes marcadores da Bioscience® (Tabelas 1-3):

**Tabela 1:** Painel de citometria de fluxo com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no BAL.

<b>Painel no BAL</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD4</b>	Fitc	H129.19	1:100
<b>IL-4</b>	PE	11B11	1:50
<b>Siglec F</b>	PeTxRed	E50-2440	1:400
<b>CD45</b>	PeCy7	30-F11	1:800
<b>CD11c</b>	APC	N418	1:800
<b>IL-17</b>	APCCy7	TC11-18H10	1:50
<b>Viabilidade</b>	AF700	-	1:1000
<b>HLA-DR</b>	BV480	M5/114.15.2	1:50
<b>IL-10</b>	BV421	JES5-16E3	1:50
<b>Ly6G</b>	BV570	1A8	1:200

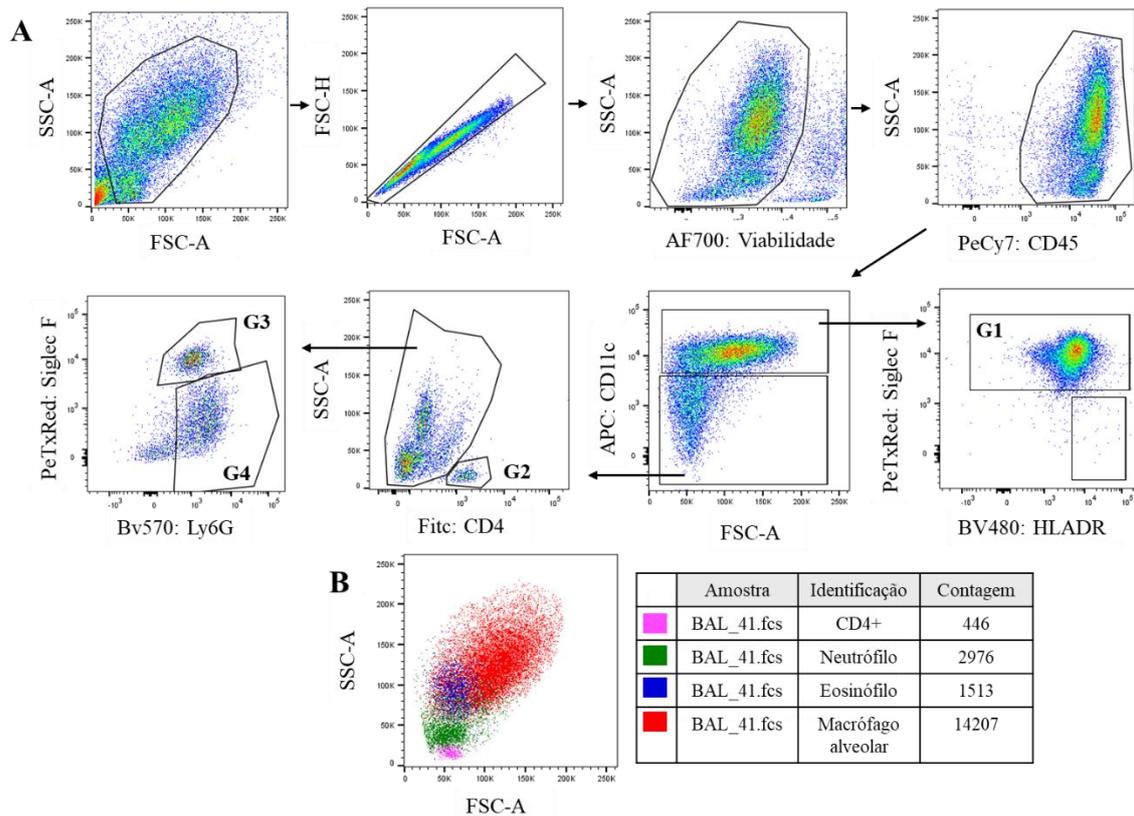
**Tabela 2:** Painel de citometria de fluxo com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no sangue periférico para marcação de linfócitos.

<b>Painel no sangue periférico de linfócitos</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD69</b>	Fitc	H1.2F3	1:500
<b>IL-4</b>	PE	11B11	1:50
<b>Siglec F</b>	PeTxRed	E50-2440	400
<b>CD4</b>	PeCy5	RM4-5	1:800
<b>CD27</b>	PeCy7	LG3A10	1:200
<b>CD8</b>	APC	53-6.7	1:800
<b>IL-17</b>	APCCy7	TC11-18H10	1:50
<b>Viabilidade</b>	AF700	-	1:1000
<b>HLADR</b>	BV480	M5/114.15.2	1:50
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	BV421	MP6-XT22	1:200
<b>Ly6G</b>	BV570	1A8	1:200

**Tabela 3:** Painel de citometria de fluxo com marcadores, fluorocromos e diluições utilizado no sangue periférico para marcação de monócitos.

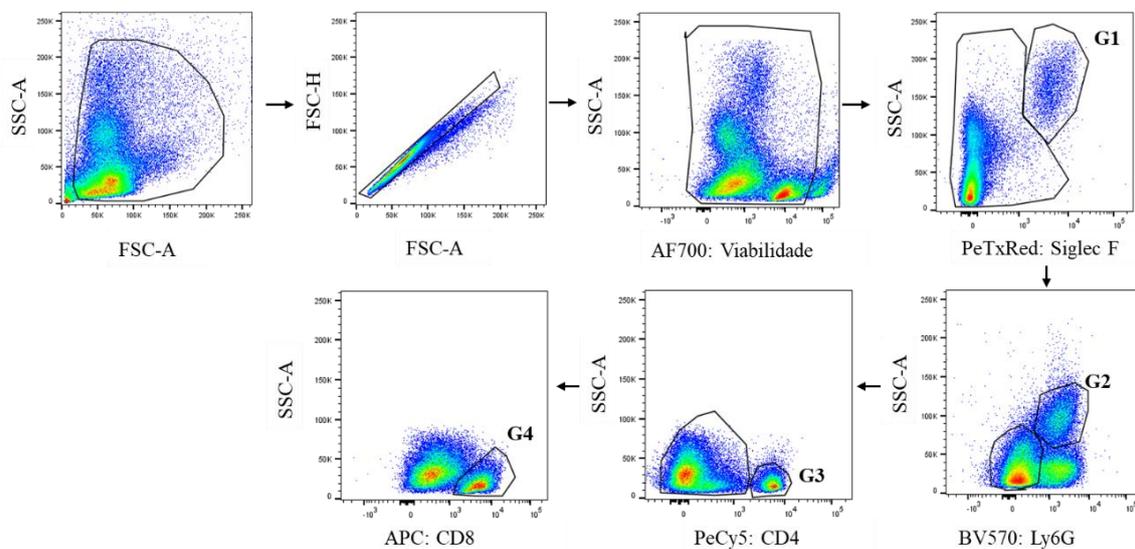
Painel no sangue periférico de monócitos			
Marcador	Fluorocromo	Clone	Diluição
HLADR	Fitc	AF6-120.1	1:50
Ly6C	PE	AL-21	1:800
CD11b	PeCy5	M1/70	1:200
TNF- $\alpha$	BV421	MP6-XT22	1:200
CX3CR1	BV605	SA011F11	1:200
Viabilidade	AF700	-	1:1000

A estratégia de análise no BAL (Figura 9) realizada para a identificação de macrófagos alveolares utilizou os marcadores de viabilidade, CD45<sup>+</sup>, SiglecF<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>; para os linfócitos TCD4<sup>+</sup> foram usados os parâmetros de baixa granulosidade (SSC), tamanho relativo da célula (FSC), viabilidade, CD45<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>; para os eosinófilos os índices foram: viabilidade, CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup> e SiglecF<sup>+</sup> e, finalmente, para neutrófilos: viabilidade, CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, SiglecF<sup>-</sup> e Ly6G<sup>+</sup> (VAN HOECKE et al., 2017).



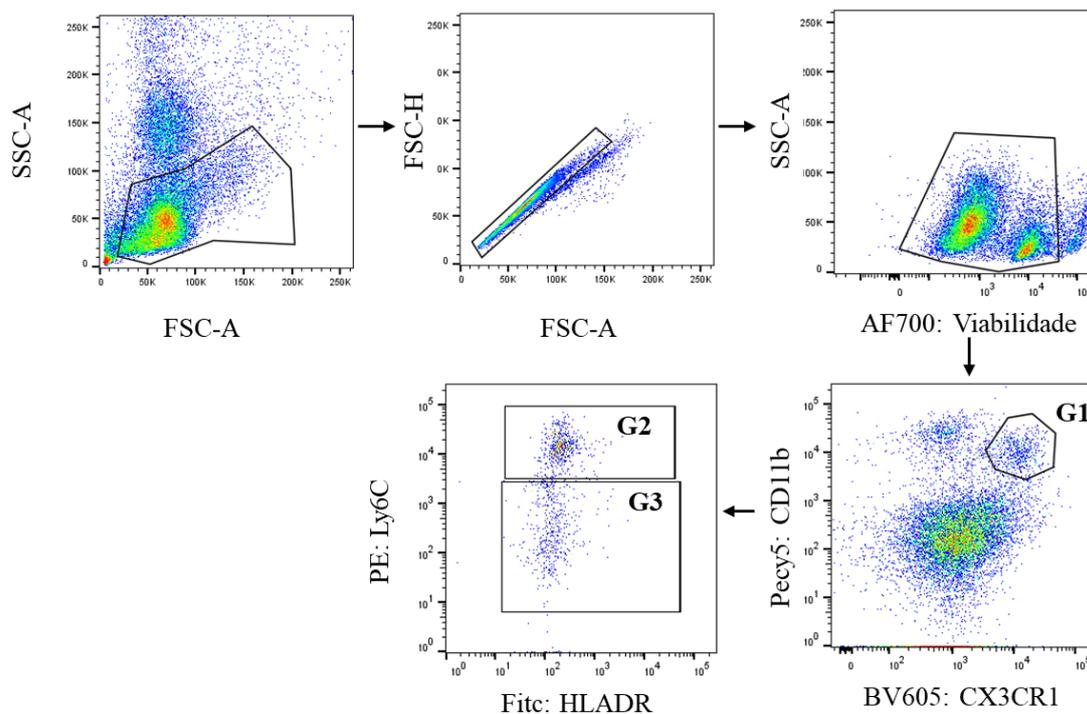
**Figura 9.** Estratégia de análise da citometria de BAL. (A) Estratégia de análise. G1: Macrófagos alveolares identificados por viabilidade, CD45<sup>+</sup>, SiglecF<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>; G2: Linfócitos T CD4<sup>+</sup> identificados por granulosidade (SSC), tamanho relativo da célula (FSC), viabilidade, CD45<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. G3: Eosinófilos identificados por viabilidade, CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup> e SiglecF<sup>+</sup>. G4: Neutrófilos identificados por viabilidade, CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, SiglecF<sup>-</sup> e Ly6G<sup>+</sup>. (B) Identificação por SSC-A e FSC-A. Rosa: linfócitos TCD4<sup>+</sup>, Verde: neutrófilo, Azul: Eosinófilo, Vermelho: macrófago alveolar.

No sangue periférico a estratégia de análise (Figura 10) utilizada para diferenciar eosinófilos foram viabilidade e SiglecF<sup>+</sup>, para neutrófilos foram viabilidade e Ly6G<sup>+</sup>, para linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram viabilidade e CD4<sup>+</sup> e para linfócitos T CD8<sup>+</sup> utilizamos viabilidade e CD8<sup>+</sup>.



**Figura 10.** Estratégia de análise da citometria do sangue periférico para identificação de linfócitos. G1: Eosinófilos, G2: Neutrófilos, G3: Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, G4: Linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

Para identificar as diferentes populações de monócitos no sangue periférico (Figura 11) foram utilizados para monócitos os marcadores de viabilidade, CD11b<sup>+</sup> e CX3CR1<sup>+</sup>; para a imunofenotipagem de monócitos clássicos viabilidade, CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup> e Ly6C<sup>high</sup> e para monócitos não clássicos viabilidade, CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>.



**Figura 11.** Estratégia de análise para identificação de monócitos no sangue periférico. G1: Monócitos Viabilidade, CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>; G2: monócitos clássicos “M1” Viabilidade, CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>high</sup>; G3: monócitos patrulhadores “M2” Viabilidade, CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>.

#### 4.9.4.1 Citometria de fluxo do BAL

Para a análise por citometria de fluxo do BAL foi realizada a coleta do material conforme descrito anteriormente. O conteúdo do BAL foi submetido à centrifugação a 300 G, durante 8 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. No *pellet* foi adicionado 1mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e adicionada Brefeldina (BD Biosciences®) na concentração 1:1000 e, em seguida, as amostras foram incubadas em estufa úmida (5% CO<sub>2</sub> por 4 horas a 37°C). Após esse período, foi adicionado 4ml de solução de ACK buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) para lise das hemácias, e o conteúdo incubado por 10 minutos, TA, ao abrigo da luz, seguido da centrifugação a 300 G, 8 minutos, 4°C e lavagem com 10 ml de PBS 1x. Após a lavagem, foi adicionado 200µL de PBS 1x e as amostras foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo U. As células vivas foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante de viabilidade azul de Tripán. A contagem foi ajustada de acordo com diluição e volume das amostras.

Primeiramente, as amostras foram incubadas com o corante de viabilidade 10 minutos a 4°C, seguido da adição de 100 µL de PBS 1x e centrifugação a 300 G, 8 minutos, 4°C, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 20 µl/poço dos anticorpos de superfície diluídos em solução diluidora de anticorpos (50% de Wash B composto por PBS1x, 0,5% de BSA, 2mM de azida e 50% de PBS1x) e 10% de soro de camundongos C57BL/6 não infectados, sendo incubadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 100 µL de PBS1x e 100 µL de formaldeído 4% para fixação das células seguida de incubação por 20 minutos, TA, ao abrigo da luz. Após a fixação, as amostras foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas e incubadas por 15 minutos, 4°C com 100 µL da solução de Permeabilization Buffer (0,05% de saponina a 10% diluída em Wash B). Em seguida as amostras foram centrifugadas e incubadas por 30 minutos com 50 µL dos anticorpos intracitoplasmáticos diluídos em Permeabilization Buffer e 10% de soro de camundongos C57BL/6 não infectados. Após esse período as amostras foram lavadas com 150 µL de Permeabilization Buffer seguido de centrifugação, adição de 150 µL de PBS1x e centrifugação. Ao final, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de PBS1x, transferidas para tubos de FACS e foi realizada a leitura no citômetro LRSFortessa (Becton Dickinson, EUA), seguida pela análise dos dados obtidos utilizando-se o software Flow Jo (Tree Star Inc., EUA).

#### **4.9.4.2 Citometria de fluxo do sangue periférico**

O processamento da amostra do sangue periférico para citometria foi semelhante a do BAL. Foram coletados, aproximadamente, 500 µL de sangue que foram transferidos para tubos com EDTA e adicionado brefeldina na concentração de 1:1000. Em seguida as amostras foram incubadas em estufa úmida 5% CO<sub>2</sub>, 37°C por 4 horas. Após esse período, foi realizada a lise das hemácias 3 vezes com 20ml de solução de ACK buffer, com incubação de 10 minutos, TA, ao abrigo da luz, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Após a lise, foram adicionados 400 µL de PBS1x, sendo colocados 200 µL de amostra em placas de 96 poços para cada painel de citometria. As células foram contadas em câmara de Neubauer, incubadas com corante de viabilidade, centrifugadas e adicionado os anticorpos de superfície específicos de cada painel. Após a marcação com os anticorpos de superfície, as placas foram lavadas com PBS1x, centrifugadas e as amostras do painel para identificação de monócitos foram incubadas 30 minutos, T.A.,

com o anticorpo CX3CR1. Em seguida foi realizada a lavagem com PBS1x, centrifugação e fixação das células com formaldeído 4%. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas, foi adicionada solução de Permeabilization Buffer e realizada a incubação com os anticorpos intracitoplasmáticos. Após a incubação, as placas foram centrifugadas, foi adicionado PBS1x em cada poço e as amostras foram transferidas para tubos de FACS para leitura no citômetro LRSFortessa seguida pela análise dos dados no software Flow Jo e utilizando o pacote Cytokit no Rstudio (CHEN et al., 2016). Para análise de *t-Distributed Stochastic Neighbor* (tSNE) os indivíduos foram padronizados utilizando o *plugin* “downsample” do FlowJo e as amostras concatenadas de acordo com cada grupo (C57BL/6 0dpi, C57BL/6 3dpi, IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi, IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi). Os arquivos concatenados foram utilizados para alimentar o Cytokit no Rstudio. A identificação de clusters foi realizada utilizando o Rphenograph do Cytokit.

#### 4.10 Histopatologia

Para a realização da análise histopatológica foram utilizados o pulmão esquerdo, o lóbulo direito do fígado e a metade esquerda do cérebro dos camundongos de todas as linhagens. Os órgãos foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth®, Brasil) por até sete dias. Posteriormente, as amostras foram gradualmente desidratadas em etanol, diafanizadas no xilol e incluídas em blocos de parafina, e em seguida obtidos cortes de 4 µm de espessura com os quais foram confeccionadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análises histopatológica e semiquantitativa, realizada em microscopia de luz de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). As lesões exibidas no parênquima pulmonar e hepático foram descritas quanto a intensidade das lesões, inflamação, e fenômenos vasculares.

Para a pontuação das lesões hepáticas, 10 imagens aleatórias foram capturadas por animal com uma ampliação de 20X. O score foi baseado em 4 graus para lesão do parênquima hepático: grau 0, ausência de células inflamatórias; grau 1, algumas regiões do parênquima hepático apresentavam pequenos focos inflamatórios com número reduzido de células inflamatórias, pequenas áreas de necrose; grau 2, o parênquima hepático apresentava focos inflamatórios com número moderado de células, infiltrado inflamatório perivascular, bem como ao redor dos ductos e pequenas áreas de necrose dispersas pelo parênquima; grau 3, o parênquima hepático frequentemente apresentava

focos inflamatórios maiores, infiltrado inflamatório difuso, inflamação perivascular exuberante e ao redor dos ductos e áreas de necrose dispersas pelo parênquima.

Para o score de inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima e presença de hemorragia foram capturadas 10 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X, conforme descrito por (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2018). O score da inflamação peribrônquica foi baseado em 6 graus sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave).

O *score* para inflamação perivascular foi baseado em 6 graus: grau 0, ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1, alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2, alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3, a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4, a maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5, todos os vasos estão completamente inflamados (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2018). Do mesmo modo o score para inflamação do parênquima foi baseado em 6 graus sendo: grau 0 igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1 de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2 de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3 de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4 de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5 mais de 70% do parênquima afetado (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2018).

Já o score das áreas hemorrágicas foi baseado em 4 graus sendo: grau 0, ausência de hemorragia (ausente); grau 1, presença de pequenas zonas hemorrágicas (discreta); grau 2, presença de áreas hemorrágicas significativas (modera); grau 3, presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa). A contagem de granulomas hepáticos e pulmonares também foi realizada (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2018).

A análise morfométrica da gravidade da lesão hepática realizada nos camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> foi realizada calculando-se todas as áreas de inflamação e necrose (COSTA et al., 2005), enquanto no cérebro foram avaliadas as áreas hemorrágicas (RESENDE et al., 2015).

O grau de espessamento dos septos interalveolares realizada nos camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> foi avaliado por meio da captura de trinta imagens aleatórias com

objetiva de 40X, compreendendo uma área de  $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . Com o auxílio do software KS300, todos os pixels do tecido pulmonar da imagem real foram selecionados para a criação da imagem binária, processamento digital e cálculo da área em  $\mu\text{m}^2$  do septo interalveolar. A análise do infiltrado inflamatório pulmonar foi realizada nas imagens previamente selecionadas para avaliar o espessamento dos septos interalveolares. Todas as células contidas em cada imagem foram quantificadas usando o programa de software Carl Zeiss Image Analyzer KS300 (RODRIGUES-MACHADO et al., 2010).

#### **4.11 Avaliação da função pulmonar: espirometria**

A avaliação da função e fisiologia pulmonar foi realizada em camundongos não infectados e infectados com 3dpi, pela técnica de espirometria no Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG. Basicamente, os camundongos foram anestesiados via subcutânea (cetamina 100 mg/Kg/xilazina 09 mg/Kg) para manutenção da respiração espontânea.

Em seguida, os animais foram traqueostomizados, sendo a traqueia exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia. 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 pletismógrafo 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 mortal) de 0,8 mL e fornece semi-automaticamente três manobras diferentes: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. Uma vez no pletismógrafo, 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).

Durante a respiração mecânica, na função de resistência e conformidade (RC) foram detectadas a complacência dinâmica (C<sub>dyn</sub>), o volume corrente (TV) e a resistência (RI). Para medir a complacência quasi-estática (C<sub>chord</sub>), foi realizada a manobra quase estática de pressão-volume, que infla os pulmões a uma pressão padrão de +30 cmH<sub>2</sub>O e depois, expira lentamente até atingir uma pressão negativa de -30 cmH<sub>2</sub>O. A C<sub>chord</sub> foi determinada com pressão de 10cm H<sub>2</sub>O. Foi realizada manobra de fluxo rápido de volume

e os pulmões foram inflados a +30 cmH<sub>2</sub>O e, em seguida, imediatamente conectados a uma pressão altamente negativa para forçar a expiração até -30 cm H<sub>2</sub>O.

A capacidade vital forçada (FVC), o volume expiratório forçado em 50 milissegundos (FEV50) e em 100 milissegundos (FEV100) e as curvas de fluxo-volume foram registrados durante esta manobra. Manobras subótimas foram rejeitadas, e para cada teste em cada camundongo, pelo menos três manobras aceitáveis foram conduzidas 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 sobredose de anestésico, como descrito anteriormente e, o tecido pulmonar coletado para posteriores análises.

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando software Prism 8.0 (GraphPad Inc, EUA). Inicialmente foi utilizado o teste de Grubbs para detectar possíveis valores *outliers*. Em seguida foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação de normalidade das variáveis. A avaliação entre mais de dois grupos foi feita pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Tukey ou Dunn, respectivamente, de acordo com a distribuição de dados. As análises foram realizadas sempre entre 4 grupos, comparando as linhagens infectadas no mesmo dpi e os grupos controles (0dpi). Em todas as análises foram considerados estatisticamente significativos os resultados com o valor de  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

## **5. RESULTADOS**

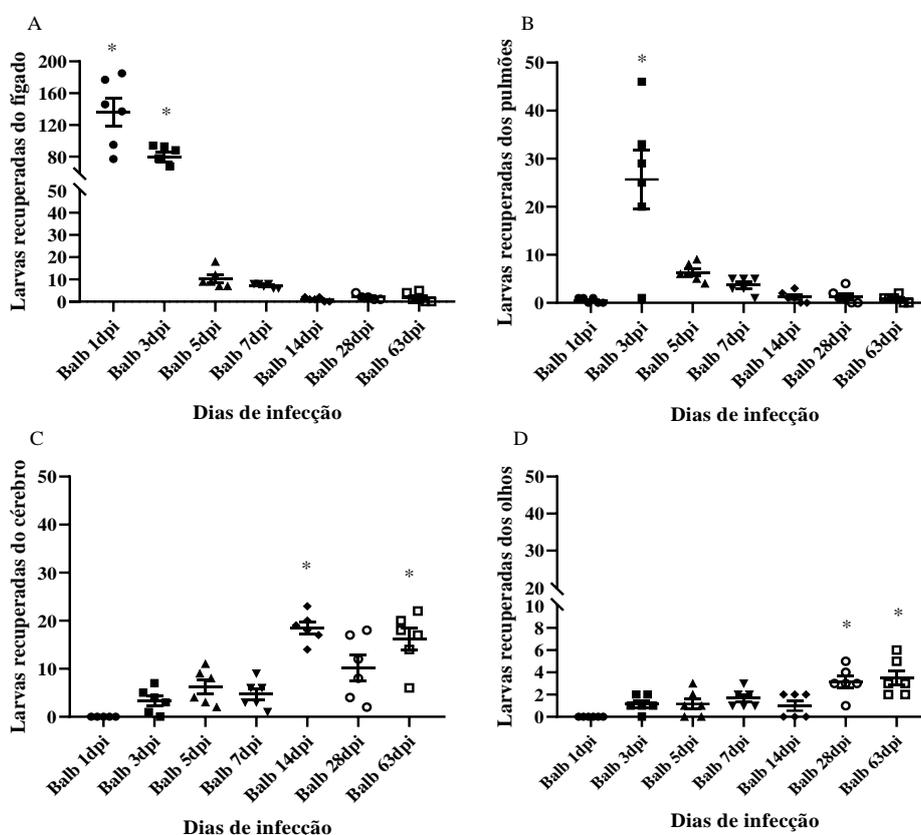
### **CAPÍTULO 1:**

A VIA IL-33/ST2 SUSTENTA UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA TH2 CRÔNICA, DEPENDENTE DE EOSINÓFILOS, COM DANO AOS TECIDOS E AUMENTO DE CARGA PARASITÁRIA DURANTE A INFECÇÃO POR *Toxocara canis*

5.1 A fase de migração larval hepato-pulmonar ocorre com 1dpi e 3dpi e a neurotrópica a partir de 14dpi

O primeiro capítulo desse trabalho, visou investigar o papel da via IL-33/ST2 durante a migração larval por *T. canis*. Para determinar a cinética de migração das larvas e estabelecimento do pico de recuperação de larvas de cada tecido em camundongos BALB/c, foram recuperadas larvas nos tecidos hepáticos, pulmonar, cerebral e ocular, nos tempos 1, 3, 5, 7, 14, 28 e 63dpi.

Os resultados mostraram que com 1 dpi, há predominância de larvas no fígado (Figura 12A), nos pulmões a carga parasitária é maior com 3dpi (Figura 12B), no cérebro com 14dpi (Figura 12C) e nos olhos com 63dpi (Figura 12D).



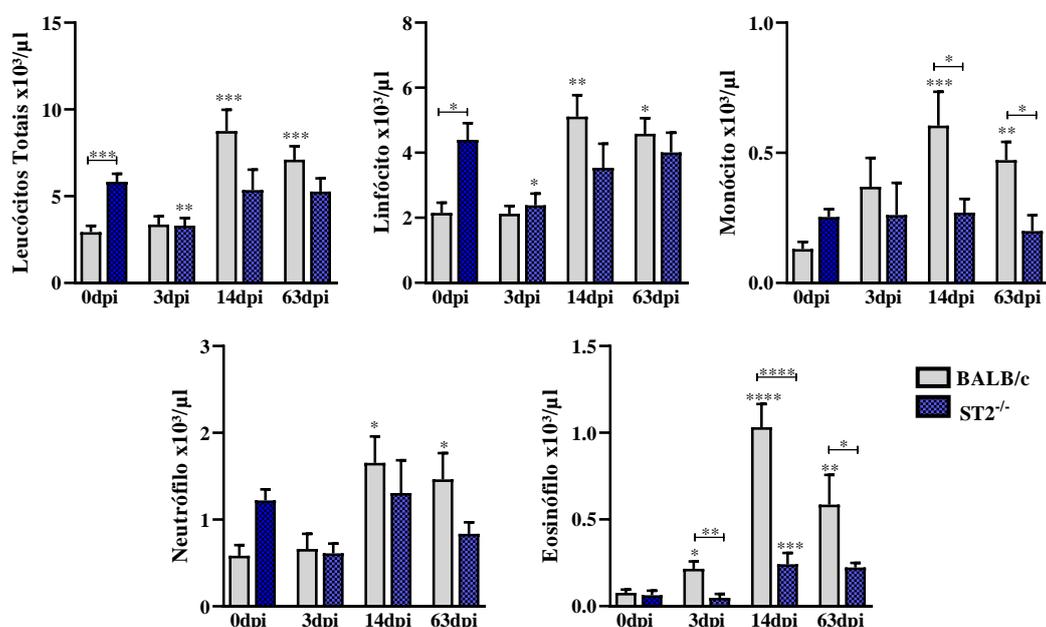
**Figura 12.** Recuperação das larvas de *Toxocara canis* em diferentes tecidos de camundongos BALB/c ao longo do tempo. (A) Larvas recuperadas do tecido hepático. (B) Larvas recuperadas do tecido pulmonar. (C) Larvas recuperadas do tecido cerebral. (D) Larvas recuperadas do tecido ocular. Dados representados em mediana  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais. Para análise estatística foi utilizado o teste

Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, \* $p < 0,05$ .  $n = 6$  animais por tempo de infecção.

## 5.2 Ausência da via IL-33/ST2 reduz a eosinofilia e aumenta a concentração de anticorpos

De acordo com a migração larval observada em camundongos BALB/c foram escolhidos os tempos para avaliar a resposta imunológica em camundongos ST2<sup>-/-</sup> que possuíam esse mesmo *background*, dessa forma, o tempo de 3dpi foi escolhido para avaliar a resposta imunológica na fase hepato-pulmonar e os tempos 14dpi e 63dpi para avaliar a fase tardia da doença, a fase neurotrópica.

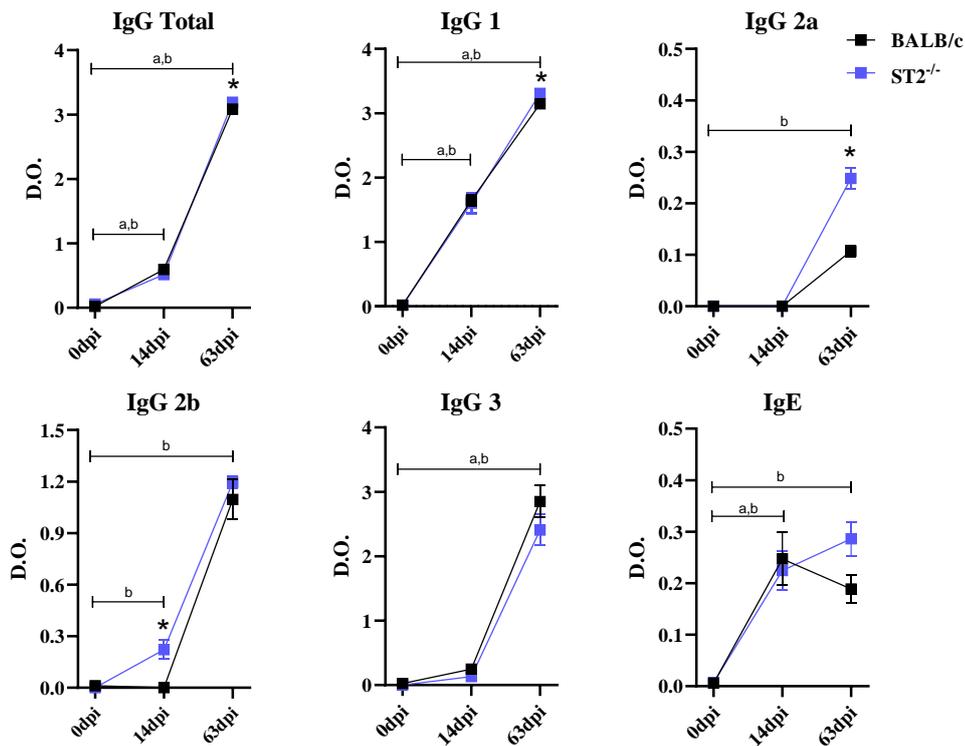
Visando entender aspectos sistêmicos da infecção por *T. canis* foi avaliado o perfil leucocitário no sangue periférico ao longo da infecção (Figura 13). Nós observamos que camundongos BALB/c apresentaram leucocitose com 14dpi e 63dpi, com aumento do número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os camundongos ST2<sup>-/-</sup> apresentaram leucopenia com 3dpi, sendo observado neste mesmo período aumento no número de linfócitos e de eosinófilos com 14dpi. Ao comparar as duas linhagens, houve redução no número de eosinófilos e monócitos em camundongos ST2<sup>-/-</sup> com 14dpi e 63dpi.



**Figura 13.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. As análises estatísticas foram

feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

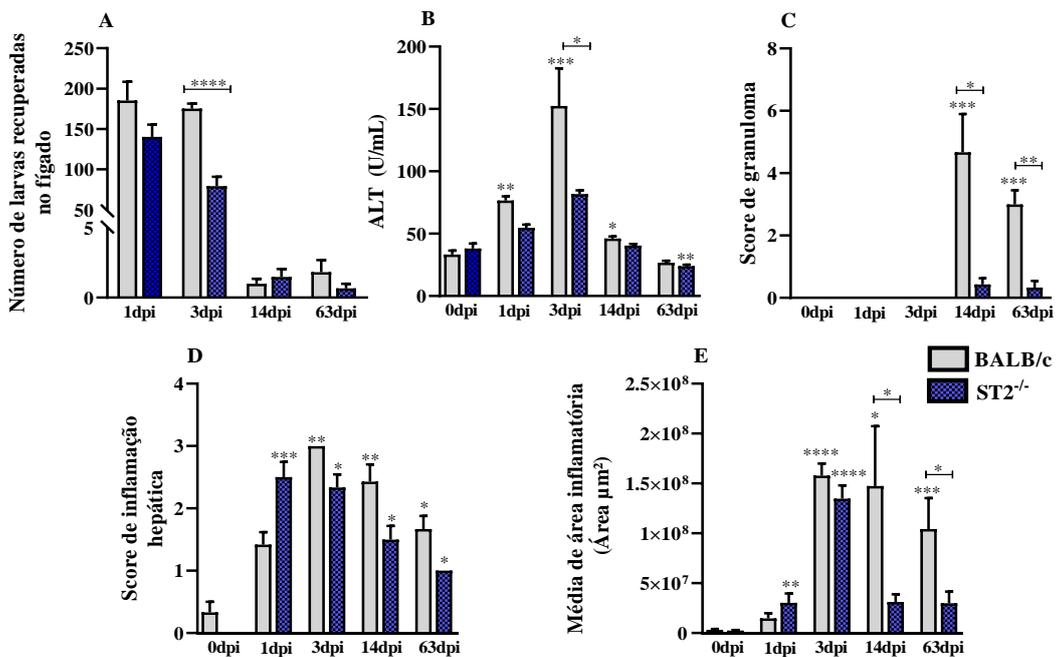
Para avaliar a resposta imunológica humoral, foi realizada a dosagem de anticorpos séricos. Foi observado aumento nas concentrações IgG total com 14dpi e 63dpi em ambas as linhagens, com aumento de IgG1 e IgG3, e aumento de IgG2a e IgG2b em camundongos  $ST2^{-/-}$  com 63dpi quando comparado aos camundongos não infectados (Figura 14). Ao comparar as duas linhagens, observamos aumento na concentração de IgG2b com 14dpi; e IgG1 e IgG2a com 63dpi em camundongos  $ST2^{-/-}$  em relação ao BALB/c. Como esperado, os níveis de IgE aumentaram em ambas as linhagens durante a infecção. Os resultados demonstram que, em nível sistêmico, a via IL-33/ST2 é importante para o estabelecimento da eosinofilia e para o aumento de monócitos na infecção por *T. canis*, além de contribuir para o aumento produção de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b.



**Figura 14.** Avaliação de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE contra antígenos de larvas de *T. canis* em camundongos. Os resultados representam a média  $\pm$  Erro padrão da média, com \*  $p < 0,05$  representando a diferença significativa entre as duas linhagens; <sup>a</sup> diferença significativa no grupo BALB/c comparado ao seu controle; <sup>b</sup> diferença significativa no grupo ST2<sup>-/-</sup> comparado ao seu controle. Foram usados o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

### 5.3 A ausência do receptor ST2 contribui para a redução da carga parasitária no fígado e dano tecidual

Para entendermos o papel da via IL-33/ST2 nas alterações hepáticas causadas durante a infecção por *T. canis*, foram realizados a recuperação de larvas no tecido, a dosagem de ALT e análise histopatológica. Os camundongos ST2<sup>-/-</sup> mostraram redução da carga parasitária e da enzima ALT com 3dpi (Figura 15A-B). Na análise do *score*, observamos diminuição na contagem de granulomas, o que provavelmente ocorreu devido à redução da carga parasitária nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, mas não alterou o score de inflamação hepática (Figura 15C-D). Na análise morfométrica, também foi observada redução da área inflamatória hepática nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, confirmando os achados histopatológicos (Figura 15E).

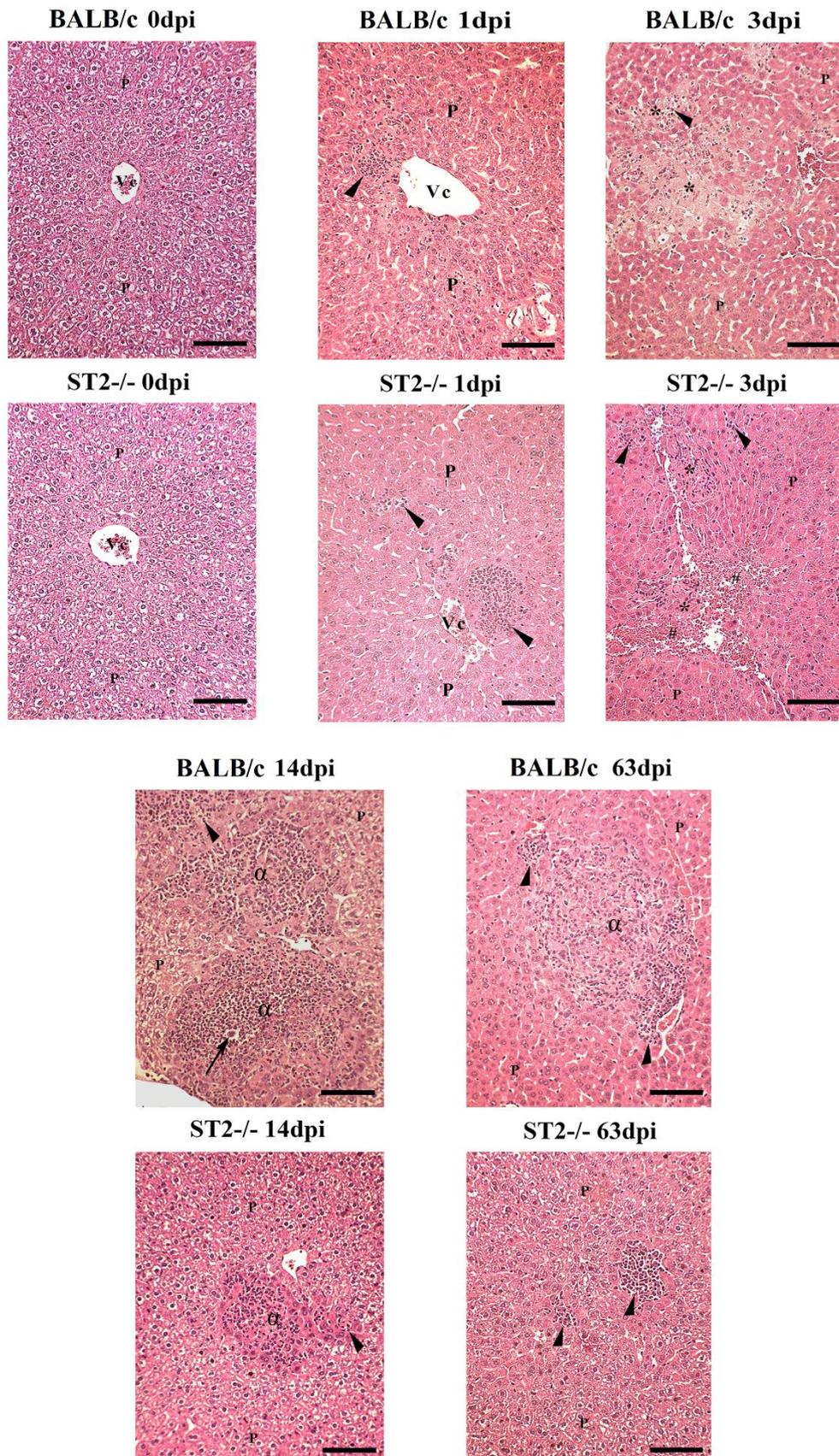


**Figura 15.** Alterações hepáticas em camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. (A) Número de larvas recuperadas no fígado; (B) Análise da atividade enzimática da alanina aminotransferase plasmática (ALT); (C) Score de granulomas; (D) Análise da

inflamação do fígado por score; (E) Análise morfométrica das áreas inflamatórias do fígado. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

A análise histopatológica do fígado mostrou que nos camundongos não infectados, os hepatócitos mantiveram aspecto morfológico compatível com a normalidade (Figura 16). Com 3dpi, em ambas as linhagens havia presença de larvas dispersas no parênquima, áreas de necrose, hemorragia e congestão de vasos sanguíneos e capilares. Também foram observados focos inflamatórios, caracterizados como mistos, compostos por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, porém nos camundongos  $ST2^{-/-}$  a presença de eosinófilos foi escassa. Com 14dpi, ambas as linhagens continuaram a mostrar focos inflamatórios no parênquima, mas nos camundongos  $ST2^{-/-}$  eles eram poucos e menores, com eosinófilos e linfócitos escassos.

Em ambas as linhagens de camundongos, também foi observada a presença de granulomas, os quais se encontravam na fase exsudativa, em sua maioria compostos por eosinófilos, seguidos por macrófagos e zonas de necrose e necrose-exsudativas, sendo que larvas puderam ser identificadas próximo aos granulomas, porém nos camundongos  $ST2^{-/-}$  a presença de granuloma foi encontrada apenas em 3 camundongos. Com 63dpi os camundongos BALB/c e  $ST2^{-/-}$  continuaram apresentando focos inflamatórios no parênquima hepático e perivascular, com poucos eosinófilos neste último. Os animais também apresentavam granulomas na fase exsudativa e granulomas na fase produtiva, compostos por macrófagos, células gigantes, células epitelioides, fibroblastos e colágeno; porém, nos camundongos  $ST2^{-/-}$ , apenas 2 animais apresentaram granulomas. Em ambas as linhagens, a congestão vascular foi frequentemente observada em todo o parênquima hepático. Coletivamente, esses dados sugerem que a IL-33/ST2 pode influenciar na fase inicial de migração das larvas pelo fígado, com um papel fundamental na captura de larvas neste órgão, conseqüentemente gerando mais lesões granulomatosas.

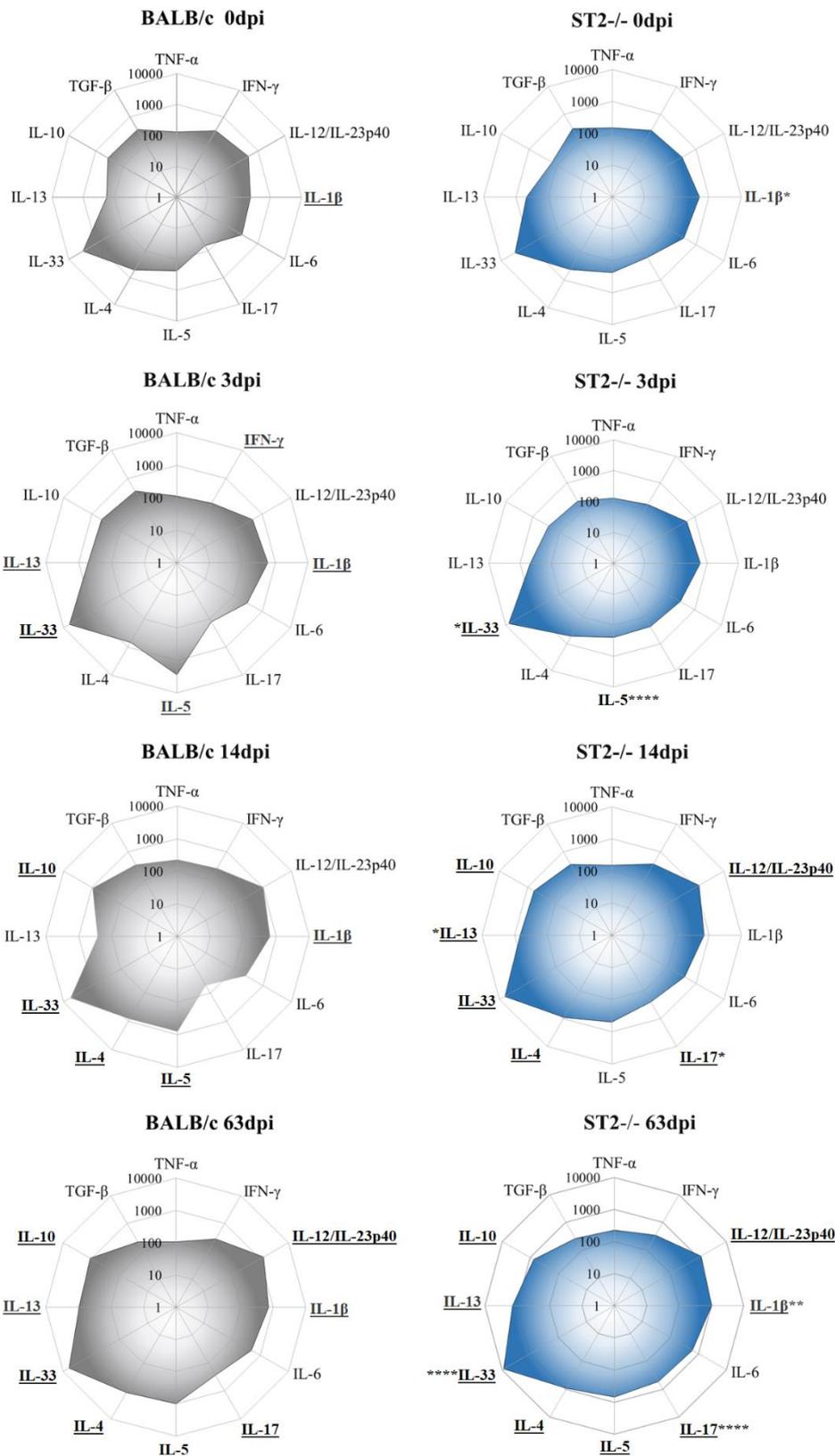


**Figura 16.** Histopatologia hepática em camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de secções de fígado. Parênquima hepático (P), centro lobular da veia (Vc), focos de infiltração inflamatória

(pontas de seta), área de necrose (\*), área de hemorragia (#), granuloma ( $\alpha$ ), larvas de toxocara (seta) Barra = 200 $\mu$ m.

#### **5.4 O perfil de citocinas pulmonares apresenta uma resposta imunológica Th1/Th17 em camundongos ST2<sup>-/-</sup> durante a infecção por *T. canis*.**

Após atingir os pulmões, as larvas de *T. canis* desencadeiam uma resposta imunológica no tecido pulmonar, assim analisamos a influência da via da IL-33/ST2 no perfil de citocinas pulmonares (Figura 17). Observamos que camundongos BALB/c infectados apresentam uma resposta mista de Th1 e Th2, já na fase inicial da infecção (3dpi), representada por redução de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-13 e IL-5. Enquanto em camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, apenas o aumento de IL-33 foi observado com 3dpi, o que era esperado devido à ausência do receptor ST2. Com 14dpi, a resposta imune em ambas as linhagens se tornou mista, com citocinas das respostas Th1, Th2 e Treg em camundongos BALB/c e com citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg em camundongos ST2<sup>-/-</sup>. Comparando as duas linhagens, observamos aumento da IL-33 e redução da IL-5 com 3dpi, aumento da IL-17 e IL-13 com 14dpi e aumento de IL-33, IL-17 e IL-1 $\beta$  em camundongos ST2<sup>-/-</sup> quando comparados com BALB/c com 63dpi. Assim, os resultados demonstram a infecção por *T. canis* induz uma resposta imunológica tipo Th2 através da via IL-33/ST2, entretanto, a ausência do receptor ST2 favorece uma resposta imune polarizada Th1/Th17.

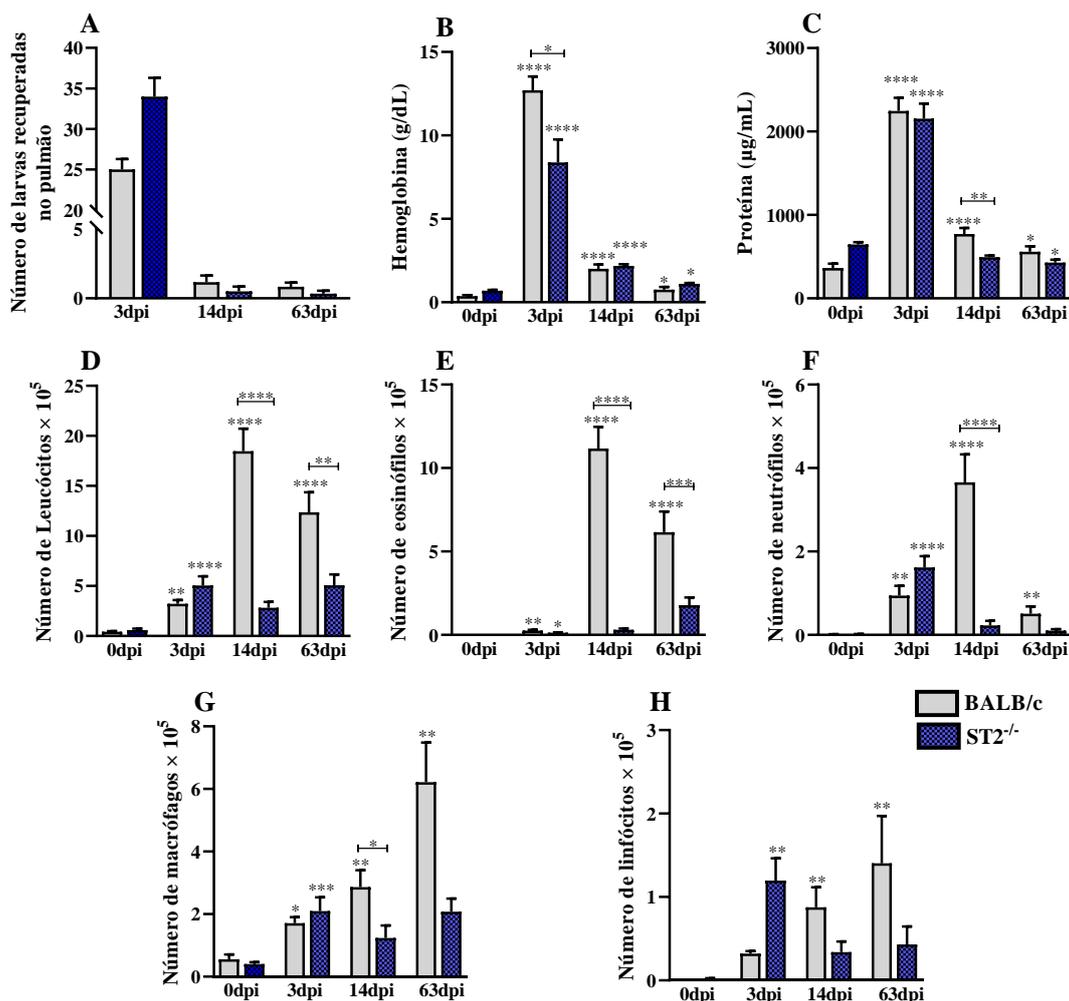


**Figura 17.** Perfil das citocinas presentes no tecido pulmonar durante a infecção *por T. canis*. Os gráficos de radar expressam a concentração de citocinas pulmonares durante a infecção. Os resultados representam a média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com os grupos BALB/c correspondentes. As citocinas foram sublinhadas quando apresentaram diferença estatística com seu respectivo grupo

controle (0dpi). Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

### **5.5 Camundongos $ST2^{-/-}$ apresentam redução da inflamação e da disfunção pulmonar durante a infecção por *T. canis***

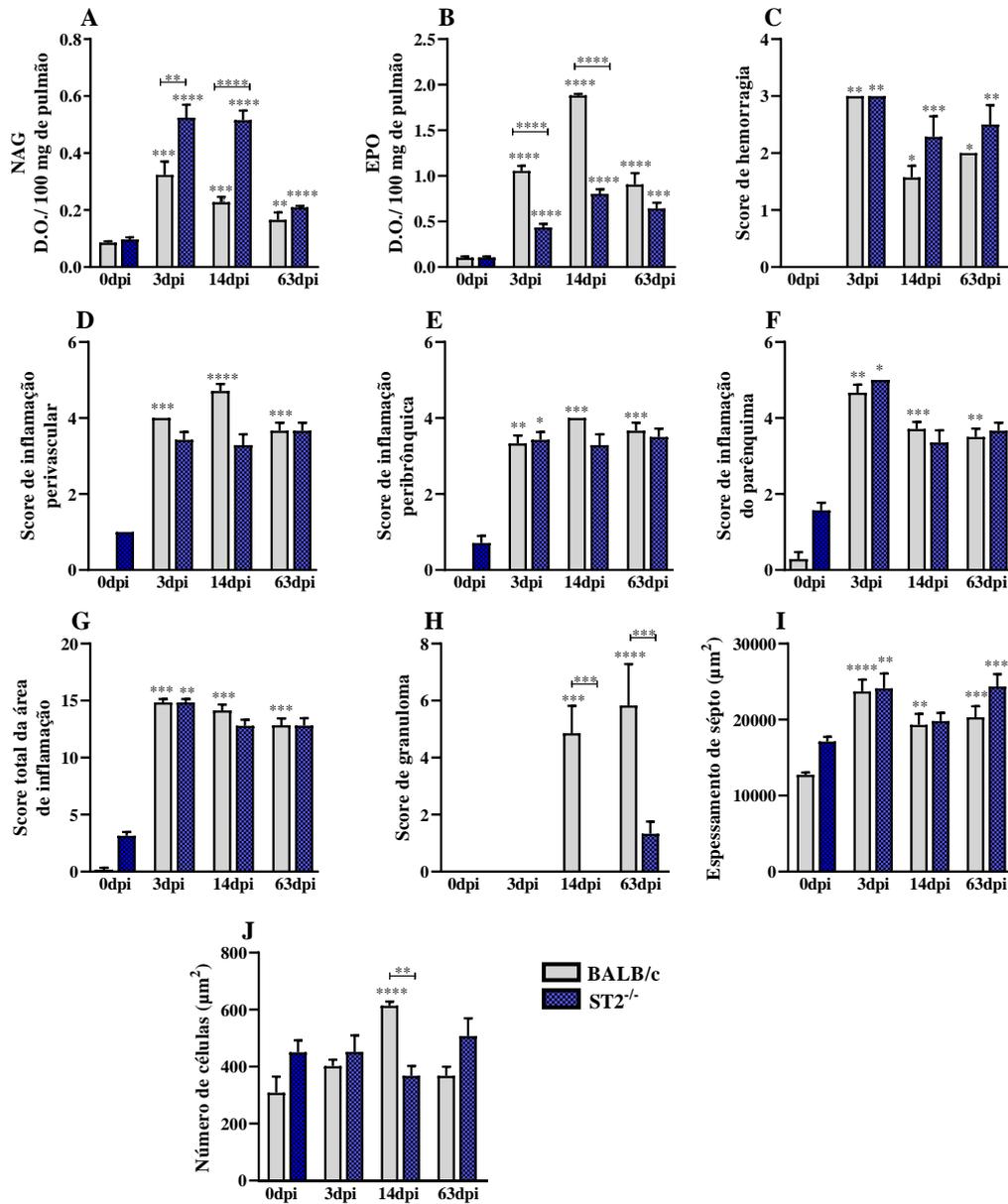
Seguindo a migração larval, analisamos a influência da via da IL-33/ST2 nos pulmões durante a infecção, por meio da carga parasitária, inflamação do tecido pulmonar e das vias aéreas e a fisiologia pulmonar. Em ambas as linhagens, o maior número de larvas foi recuperado com 3dpi, não havendo diferença significativa entre elas em nenhum momento da infecção (Figura 18A). No BAL foi observado aumento da hemoglobina e proteína com 3dpi e 14dpi em ambas as linhagens, o que pode estar relacionado ao aumento da migração larval. Porém nos camundongos  $ST2^{-/-}$  os níveis de hemoglobina e proteína foram menores em relação ao BALB/c (Figura 18B-C). Ao analisar os leucócitos presentes no BAL (Figura 18D-H), os resultados mostraram diminuição no número total de leucócitos com 14dpi e 63dpi em camundongos  $ST2^{-/-}$  (Figura 18D), principalmente de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, em relação aos camundongos BALB/c (Figura 18E-5G).



**Figura 18.** Quantificação de larvas recuperadas nos pulmões e inflamação nas vias aéreas. (A) Número de larvas recuperadas do pulmão; (B) Quantificação de hemoglobina no lavado broncoalveolar (BAL); (C) Níveis de proteína total no BAL; (D) Quantificação da infiltração de leucócitos totais no BAL; (E) Número de eosinófilos no BAL; (F) Número de neutrófilos no BAL; (G) Número de macrófagos no BAL; (H) Número de linfócitos no BAL. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Ao analisar a inflamação pulmonar, encontramos um aumento de NAG e EPO em ambas as linhagens, durante a infecção, porém houve aumento de NAG e diminuição de EPO com 3dpi e 14dpi em camundongos ST2<sup>-/-</sup>, quando comparados com BALB/c (Figura 19A-B). O score histopatológico (Figura 19C-H) e a análise morfométrica (Figura

19I-J) em ambas as linhagens mostraram áreas hemorrágicas, inflamação e consequentemente aumento do número de células e espessamento do septo pulmonar, porém, observamos redução da inflamação perivascular com 14dpi (Figura 19D), número de granulomas com 14dpi e 63dpi (Figura 19H) e número de células com 14dpi (Figura 19J) em camundongos ST2<sup>-/-</sup>, corroborando com os dados do BAL.

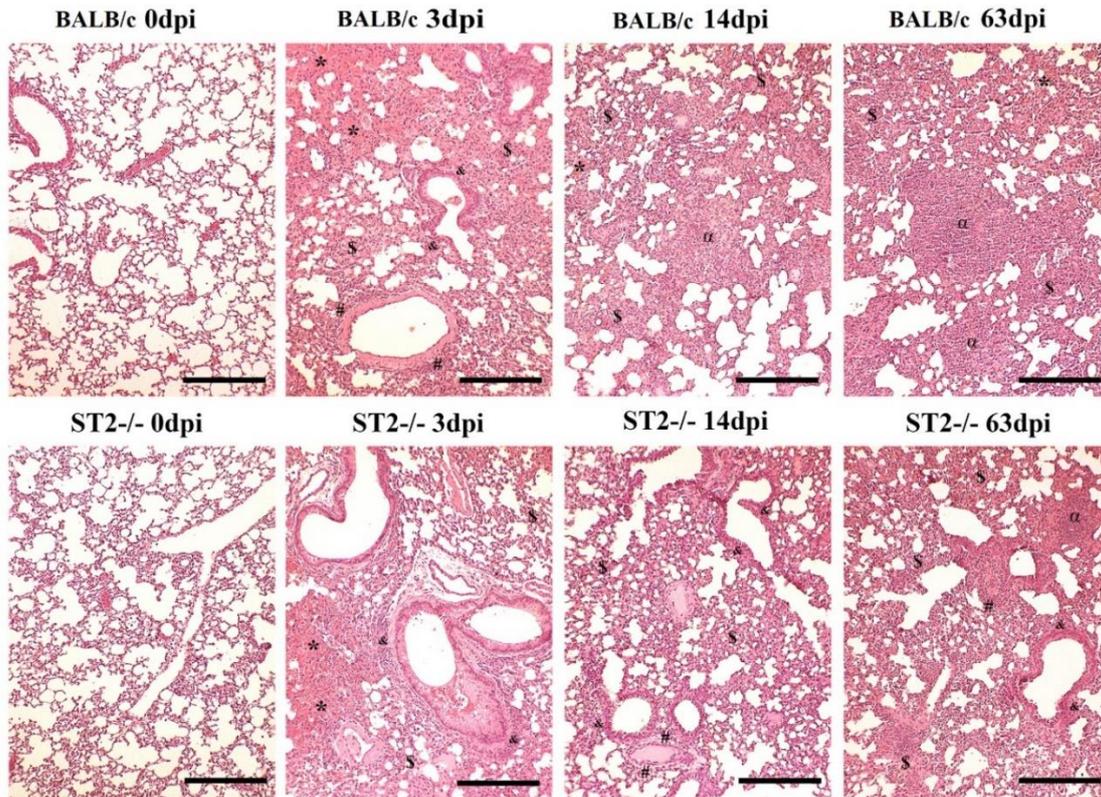


**Figura 19.** Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. (A) Atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido pulmonar; (B) Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido pulmonar; (C) Score de hemorragia; (D) Score de inflamação perivascular; (E) Score de inflamação peribrônquica; (F) Score de lesão do parênquima; (G) Score total de inflamação da área; (H) Score de granuloma; (I) Espessura do septo; (J) Número de células. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não

infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Na análise histopatológica do parênquima pulmonar (Figura 20), descrevemos as lesões causadas pela migração larval do parasita, em termos de tropismo, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, granulomas, fenômenos vasculares e exsudativos. Os camundongos não infectados apresentaram aparência pulmonar morfológica consistente com a normalidade. Com 3dpi, em ambas as linhagens, foi observado espessamento dos septos interalveolares com infiltrado inflamatório misto, caracterizado por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

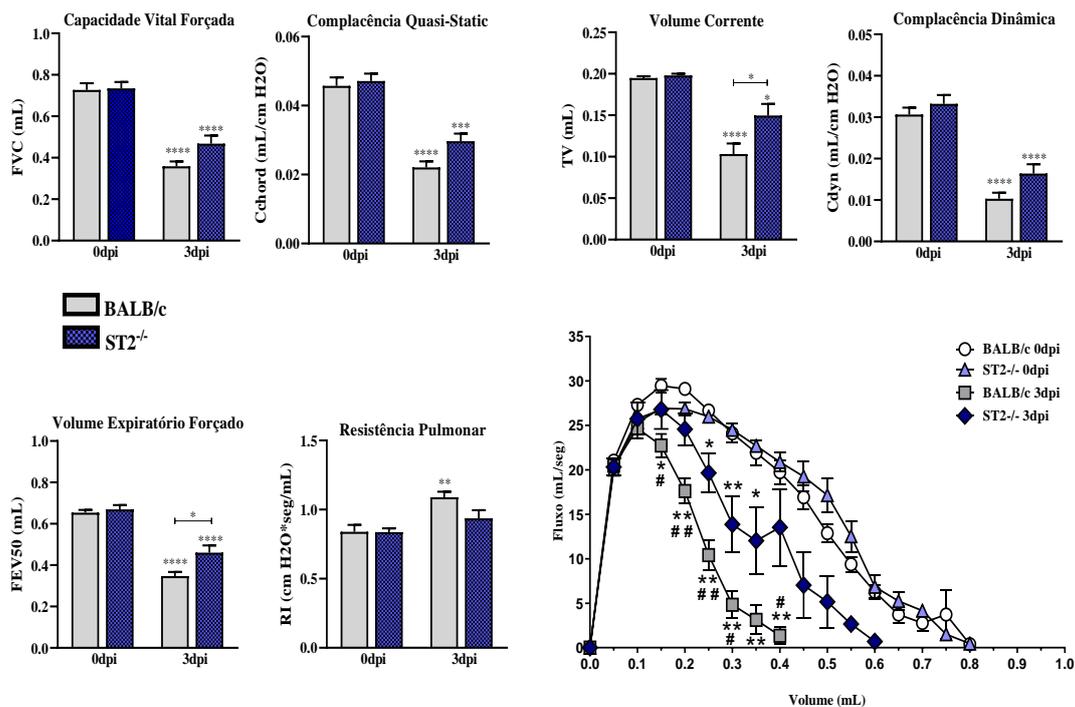
Fenômenos exsudativos, como edema perivascular, áreas hemorrágicas extensas e larvas dispersas no parênquima pulmonar, também foram evidenciados, além de hipertrofia das células dos brônquios e bronquíolos. Entretanto, os camundongos BALB/c apresentaram granulomas na fase exsudativa, compostos principalmente por eosinófilos e macrófagos seguidos por linfócitos. Com 14dpi, a análise histopatológica foi semelhante com 3dpi, porém, nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> foi observado infiltrado inflamatório difuso com escassa presença de neutrófilos e eosinófilos. Em ambas as linhagens, alguns macrófagos apresentavam pigmento acastanhado no citosol, sugestivo de hemossiderina. Em camundongos BALB/c, a presença de granuloma na fase exsudativa foi frequentemente observada, não sendo encontrado nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>. Com 63dpi, ambas as linhagens continuaram apresentando espessamento dos septos interalveolares, com infiltrado inflamatório difuso, caracterizado como misto, além da formação de Tecido Linfoide Associado ao Brônquio (BALT). Também foi possível evidenciar a presença de fenômenos exsudativos e vasculares em todos os camundongos, como pequenos focos hemorrágicos e congestão capilar. Em todos os camundongos BALB/c, havia granulomas na fase produtiva no parênquima pulmonar, enquanto nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> o número de granulomas foi reduzido. Esses resultados indicam que a via da IL-33/ST2 pode ser responsável pelo aumento da inflamação nas vias aéreas, principalmente de eosinófilos, além de favorecer a formação de granulomas durante a infecção por *T. canis*.



**Figura 20.** Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de secções de pulmão. Área de hemorragia (\*), inflamação do parênquima (\$), inflamação das vias aéreas (&), inflamação vascular (#), granuloma (α), Barra = 400µm.

### 5.6 A ausência da via IL-33/ST2 atenuou a disfunção pulmonar durante a infecção por *T. canis*

Para avaliar a disfunção pulmonar causada por *T. canis*, foi realizada a análise da mecânica pulmonar por meio de espirometria, durante o pico da migração larval nos pulmões com 3dpi. (Figura 21). Foi observado que a infecção por *T. canis* contribuiu para a perda do fluxo e dos volumes respiratórios, em decorrência do edema tecidual, conforme indicado pela redução nos valores de FVC e Fluxo e redução da elasticidade pulmonar, indicada pelo aumento da resistência pulmonar (RI) e complacência reduzida (Cchord e Cdyn). Além disso, houve alteração no fluxo das vias aéreas com diminuição do FEV50 em ambas as linhagens. No entanto, os camundongos ST2<sup>-/-</sup> tiveram melhora em relação a TV, Fluxo-volume e FEV50, sugerindo que a via IL-33/ST2 pode aumentar a lesão e a disfunção pulmonar durante a infecção por *T. canis*.

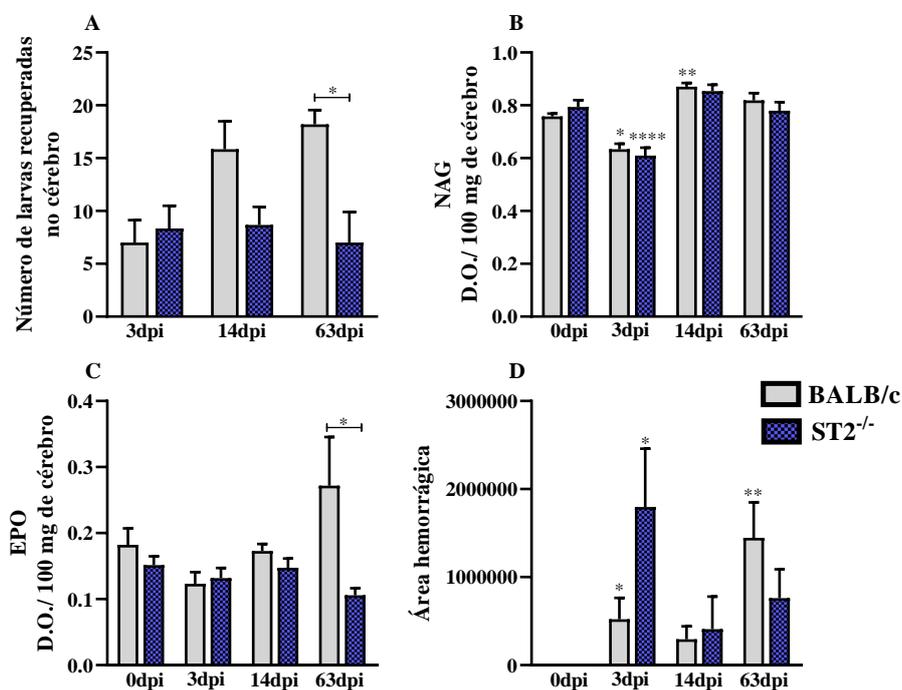


**Figura 21.** Análise da função respiratória de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. As variáveis da mecânica pulmonar foram quantificadas: capacidade vital forçada, complacência *quasi-static*, volume corrente, complacência dinâmica, volume expiratório forçado, resistência pulmonar e curva de fluxo-volume. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo infectado, ##  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo infectado. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

### 5.7 A falta da via IL-33/ST2 está relacionada à redução da carga parasitária e da atividade eosinofílica no cérebro

Depois que as larvas passaram pelos pulmões, avaliamos sua migração para o cérebro. Os resultados da recuperação de larvas no tecido cerebral mostraram que os camundongos ST2<sup>-/-</sup> apresentaram uma carga parasitária menor com 63dpi em comparação com os camundongos BALB/c (Figura 22A). Em ambos os grupos, níveis mais baixos de NAG foram observados com 3dpi (Figura 22B). Além disso, corroborando com os dados pulmonares, os camundongos ST2<sup>-/-</sup> também apresentaram menor

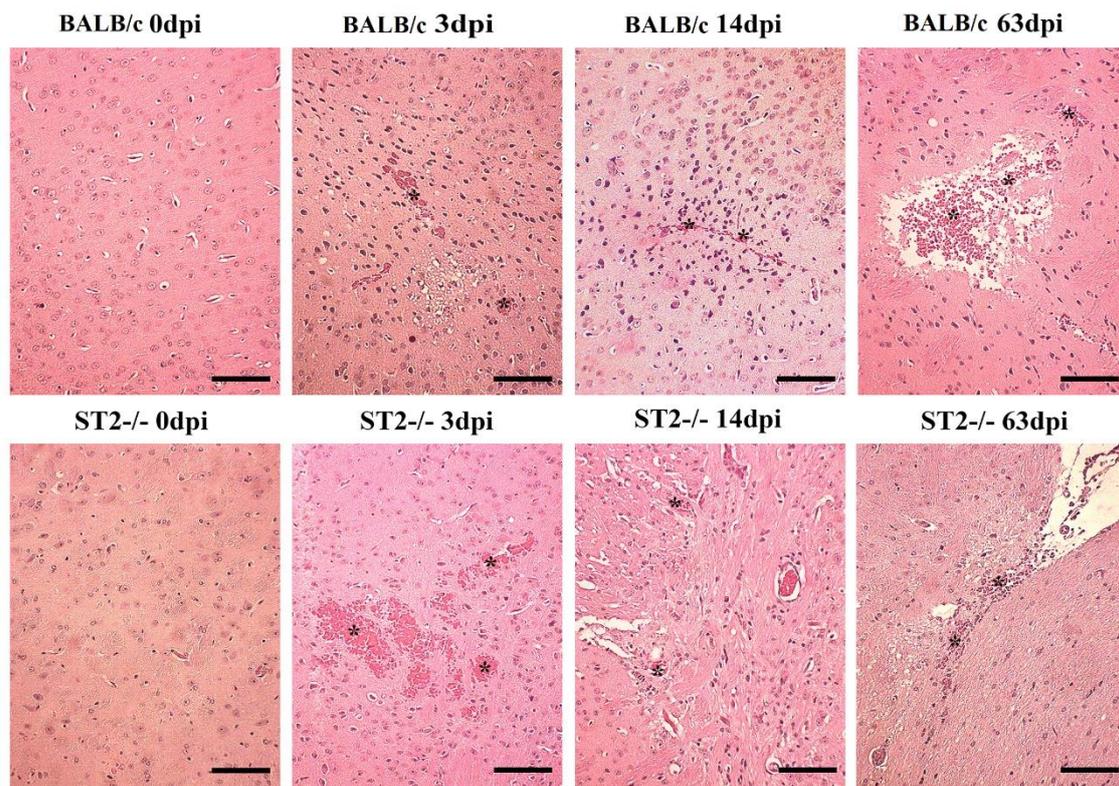
concentração de EPO com 63dpi (Figura 22C). A análise da morfometria de área hemorrágica cerebral mostrou aumento da hemorragia em ambas as linhagens com 3dpi e nos camundongos BALB/c com 63dpi (Figura 22D).



**Figura 22.** Número de larvas recuperadas e inflamação tecidual no cérebro durante a infecção por *T. canis*. (A) Número de larvas recuperadas no cérebro; (B) Atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido cerebral; (C) Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido cerebral; (D) Morfometria de área hemorrágica. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

A análise histopatológica do cérebro de camundongos não infectados mostrou aspecto morfológico compatível com a normalidade (Figura 23). Com 3dpi, ambas as linhagens demonstraram áreas multifocais de hemorragia e vacuolização do neurópilo, no córtex cerebral. Focos hemorrágicos foram visualizados no cerebelo, localizados principalmente na substância branca da folia cerebelar e também no hipocampo. Infiltrados inflamatórios focais com linfócitos, macrófagos e eosinófilos ocasionais foram vistos no córtex cerebral. Com 14dpi, observamos focos hemorrágicos ocasionais no

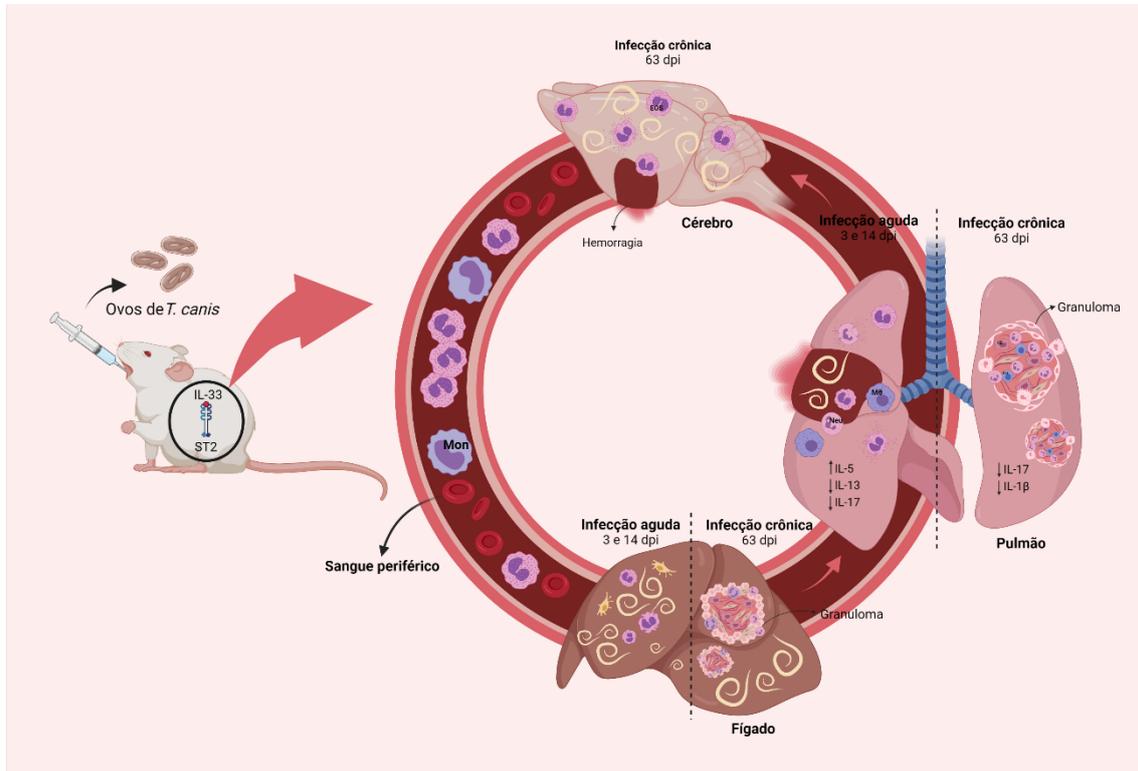
cérebro em ambas as linhagens. E com 63dpi observamos em ambos os grupos que a substância branca da folia cerebelar tinha áreas focais preenchidas com "células gitter", adjacentes às áreas de vacuolização; e áreas focais de gliose com a presença de vasos sanguíneos reativos no cerebelo e cérebro. Larvas e focos hemorrágicos estavam presentes no cérebro e hipocampo. A acumulação perivascular ocasional de hemossiderófagos no cérebro foi observada. Juntos, os resultados mostraram que a via IL-33/ST2 contribui para o aumento da atividade de eosinófilos no tecido cerebral em 63dpi, o que pode estar relacionado ao aumento da carga parasitária cerebral.



**Figura 23.** Histopatologia do tecido cerebral de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de seções cerebrais, área de hemorragia (\*), Barra = 200µm.

Os resultados obtidos neste capítulo possibilitaram verificar, que a presença da via IL-33/ST2 aumentou a eosinofilia e a atividade eosinofílica nos tecidos, aumentou a carga parasitária hepática e cerebral e contribuiu para a formação de granuloma hepático e pulmonar, não controlando a migração larval e os danos teciduais. Além disso, essa via reduz o fluxo de ar nas vias aéreas e altera a resposta imune nos pulmões, diminuindo a atividade do macrófago e da IL-17, que pode ser importante para o controle de danos e

infecções teciduais (Figura 24). Com base nesses resultados, o capítulo seguinte buscou esclarecer o papel dos eosinófilos na toxocarose, sua função na indução da inflamação e na carga parasitária.



**Figura 24.** Influência da via IL-33/ST2 na infecção por *T. canis*. A via IL-33/ST2 durante a infecção por *T. canis* influencia no aumento da carga parasitária hepática e da eosinofilia na fase aguda da infecção, causando maior dano hepático e granulomas. Nos pulmões, contribui para o aumento da resposta Th2, reduz a resposta Th17, aumenta os eosinófilos, a inflamação dos tecidos e o número de granulomas. E na fase crônica, no cérebro, contribui para o aumento da carga parasitária e da atividade eosinofílica no tecido.

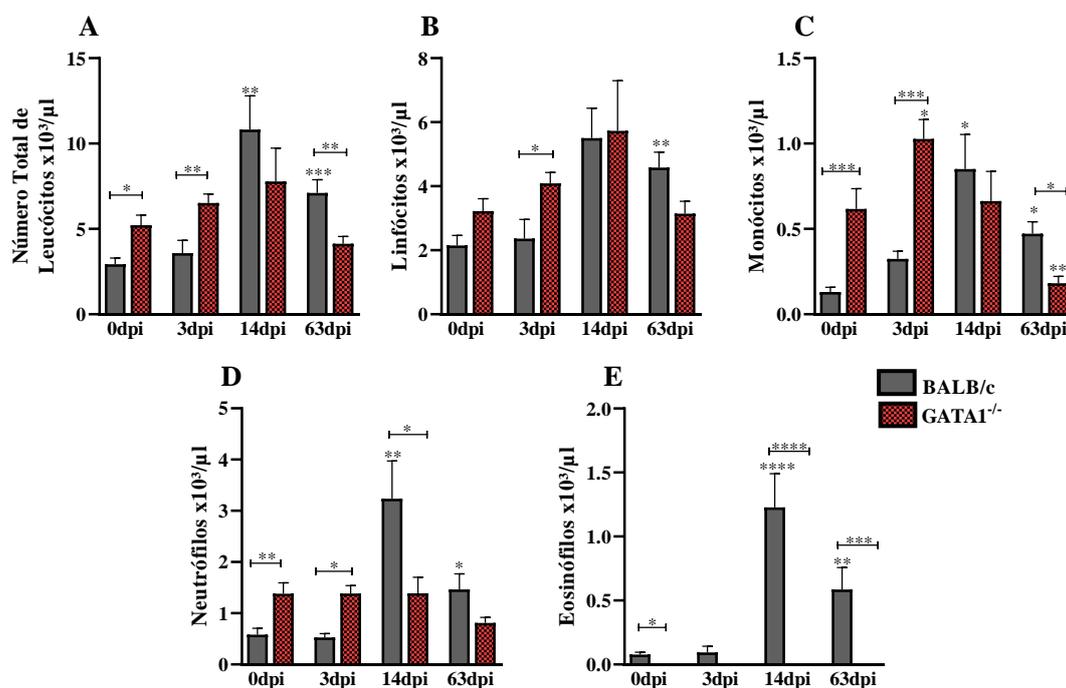
## **6. RESULTADOS**

### **CAPÍTULO 2:**

A PRESENÇA DE EOSINÓFILOS NA INFECÇÃO POR *Toxocara canis* INDUZ INFLAMAÇÃO TECIDUAL E ESTÁ ASSOCIADA AO AUMENTO DA CARGA PARASITÁRIA PULMONAR E CEREBRAL ALÉM DE REDUÇÃO DA ATIVIDADE NEUTROFÍLICA

**6.1 A ausência de eosinófilos aumenta o número de leucócitos no sangue periférico, mas não influencia na resposta humoral**

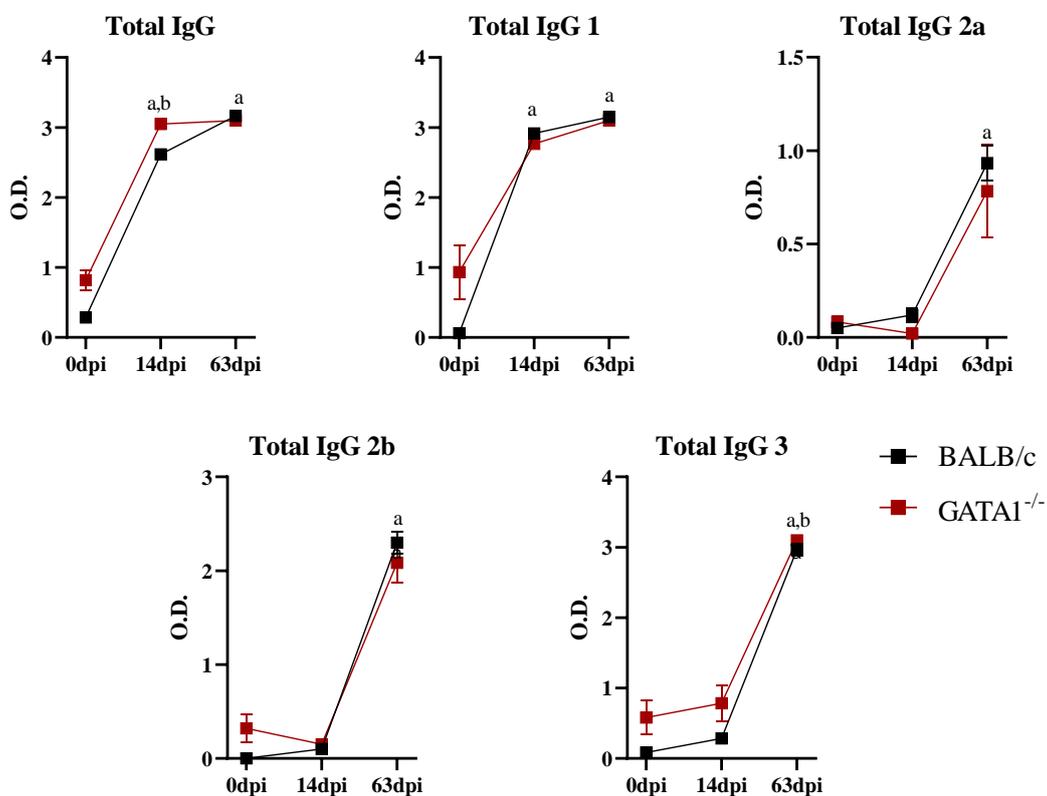
Para entender a influência dos eosinófilos na inflamação sistêmica, foi avaliado o perfil leucocitário no sangue periférico ao longo da infecção (Figura 25). Os camundongos *GATA1*<sup>-/-</sup> demonstraram possuir, de forma fisiológica, aumento de leucócitos, com aumento de monócitos e neutrófilos, comparados ao grupo BALB/c. Ao longo da infecção não foi observada, em nenhum momento da infecção, a leucocitose nos animais *GATA1*<sup>-/-</sup>, enquanto nos BALB/c a leucocitose ocorreu com 14dpi e 63dpi. Com 3dpi, foi observado aumento de linfócitos e monócitos; e redução de neutrófilos, com 14dpi, nos camundongos *GATA1*<sup>-/-</sup> quando comparados aos BALB/c. Como esperado, nos camundongos *GATA1*<sup>-/-</sup> não foram observados a presença de eosinófilos, enquanto nos camundongos BALB/c houve eosinofilia com 14dpi e 63dpi.



**Figura 25.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e *GATA1*<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foram usados o teste

ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

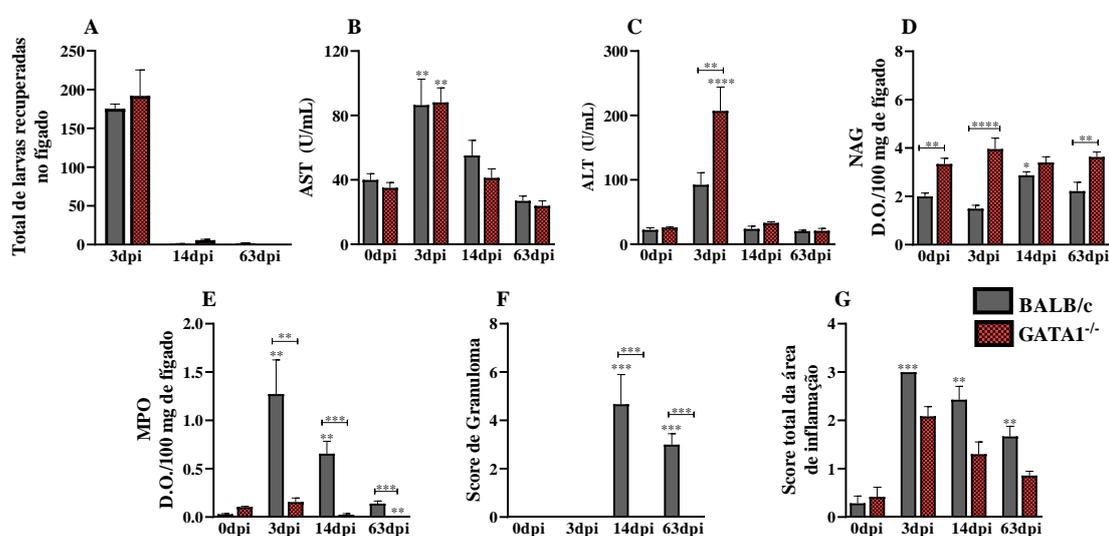
Para avaliar a resposta imunológica humoral, foi realizada a dosagem de anticorpos séricos (Figura 26), sendo observado aumento de IgG total nos camundongos infectados em ambas as linhagens, com aumento significativo de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 nos camundongos BALB/c e somente IgG3 nos camundongos GATA1<sup>-/-</sup> comparado aos camundongos não infectados. Não houve diferença significativa na resposta humoral entre as linhagens. Os resultados demonstram que, em nível sistêmico, os eosinófilos contribuem para leucocitose na fase crônica da infecção por *T. canis* mas não influenciam na imunidade humoral.



**Figura 26.** Avaliação de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 contra antígenos de larvas de *T. canis* em camundongos. Os resultados representam a média ± Erro padrão da média. <sup>a</sup> diferença significativa do grupo BALB/c comparado ao seu controle; <sup>b</sup> diferença significativa no grupo GATA1<sup>-/-</sup> comparado ao seu controle. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

## 6.2 A ausência de eosinófilos no tecido hepático reduz a atividade neutrofílica e a presença de granulomas

Para analisar a influência dos eosinófilos ao longo da migração larval, foram avaliadas as alterações hepáticas por meio da recuperação de larvas no tecido, dosagem de AST, ALT, NAG, MPO e análise histopatológica (Figura 27). Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens na carga parasitária hepática e na enzima AST ao longo da infecção (Figura 27A-B). Os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> não infectados mostraram aumento de NAG (Figura 27D), e com 3dpi foi observado aumento da enzima ALT e redução da atividade de neutrófilos, permanecendo esta redução até a fase crônica da infecção (Figura 27C e E) comparado ao BALB/c. Na análise de score foram observados a presença de granulomas somente nos animais BALB/c com 14dpi e 63dpi e não foi observado diferença entre as linhagens no score total de inflamação (Figura 27F-G).



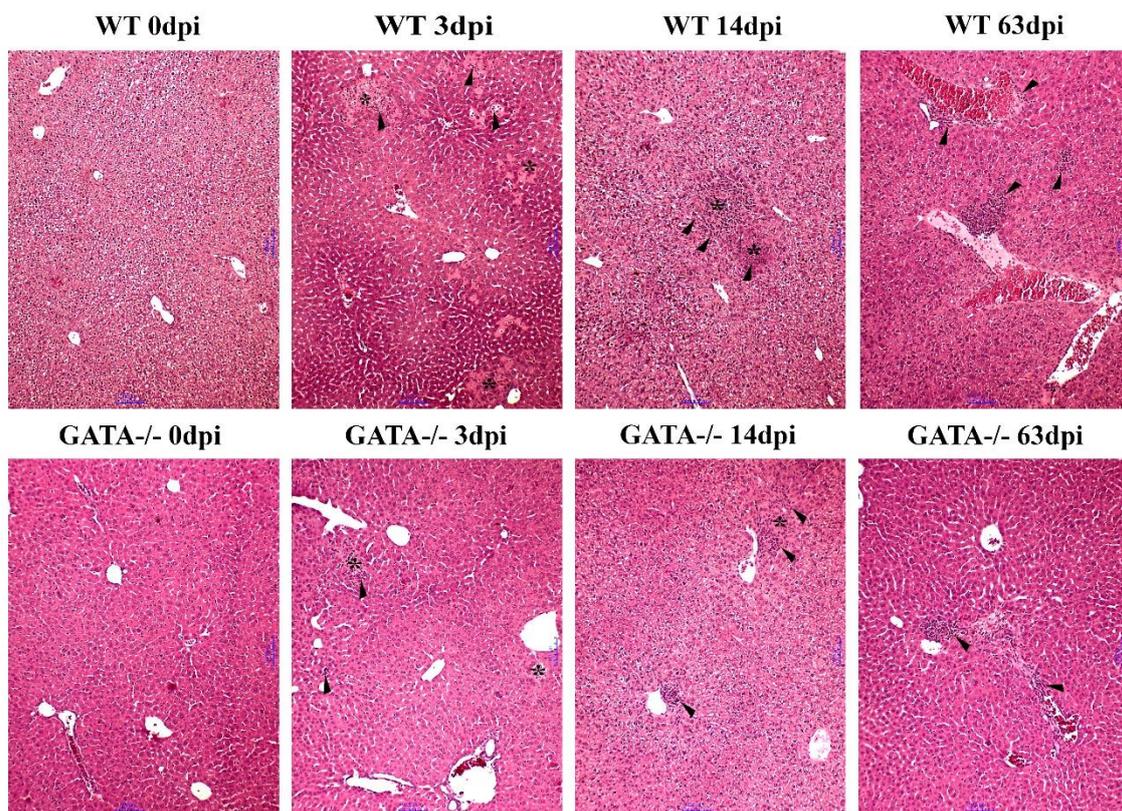
**Figura 27.** Alterações hepáticas em camundongos BALB/c e GATA1<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. (A) Número de larvas recuperadas no fígado; (B) Análise da atividade do aspartato aminotransferase (AST) (C) Análise da atividade enzimática da alanina aminotransferase plasmática (ALT); (D) Atividade da N-acetilglucosaminidase; (E) Atividade da mieloperoxidase; (F) Score de granuloma; (G) Análise da inflamação do fígado por score. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

A análise histopatológica do fígado mostrou que nos camundongos não infectados, de ambas as cepas mantiveram os hepatócitos com aspecto morfológico compatível com a normalidade (Figura 28). No parênquima hepático dos camundongos infectados foi possível observarmos e descrevermos as lesões ocasionadas pela migração larval do *T. canis*, quanto a topografia, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, granulomas, fenômenos vasculares e exsudativos. Ao avaliarmos o parênquima hepático dos camundongos pertencentes ao grupo BALB/c 3dpi foi observado em alguns animais a presença de larvas dispersas pelo parênquima, focos inflamatórios misto compostos por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos dispersos pelo parênquima e em torno de larvas e vasos sanguíneos. Frequentemente, foram observadas zonas maiores de necrose e hemorragia pelo parênquima. Também foi observado em todo o parênquima hepático congestão de vasos sanguíneos e capilares. Nos camundongos do grupo GATA1<sup>-/-</sup> 3dpi foram observadas em alguns animais a presença de larvas dispersas pelo parênquima. O parênquima hepático também exibia focos inflamatórios compostos em maior proporção por neutrófilos e escassos macrófagos e linfócitos dispersos. Frequentemente também foram identificados infiltrado inflamatório como a mesma característica em torno de larvas, vasos sanguíneos, ductos biliares e permeando zonas de necrose. Também foram evidenciados fenômenos vasculares como congestão de vasos sanguíneos e focos hemorrágicos.

Com 14dpi nos animais BALB/c foi constatado a presença de granulomas, os quais se encontravam na fase exsudativa compostos em sua maioria por eosinófilos, seguidos de macrófagos, necrocítico-exsudativos e zonas de necrose, além de ser observado larvas junto aos granulomas. Frequentemente foi observado em todo o parênquima hepática a congestão vascular. Em ambas as linhagens foi possível identificar em todos camundongos a presença de focos inflamatórios dispersos pelo parênquima hepático e perivascular, constituídos por macrófagos, escassos linfócitos e eosinófilos, sendo este último observado somente nos animais BALB/c. No grupo GATA1<sup>-/-</sup> 14dpi também foram evidenciados em alguns camundongos vasos congestionados a presença de pequenos focos de necrose. Próximo a ductos e vasos sanguíneos de maior calibre, por vezes foram identificados fibroblastos e o depósito de fibras colágenas caracterizando fibroplasia inicial.

Em todos os camundongos do grupo BALB/c 63dpi havia a presença de focos inflamatórios dispersos pelo parênquima hepático e perivascular. Também foi constatado a

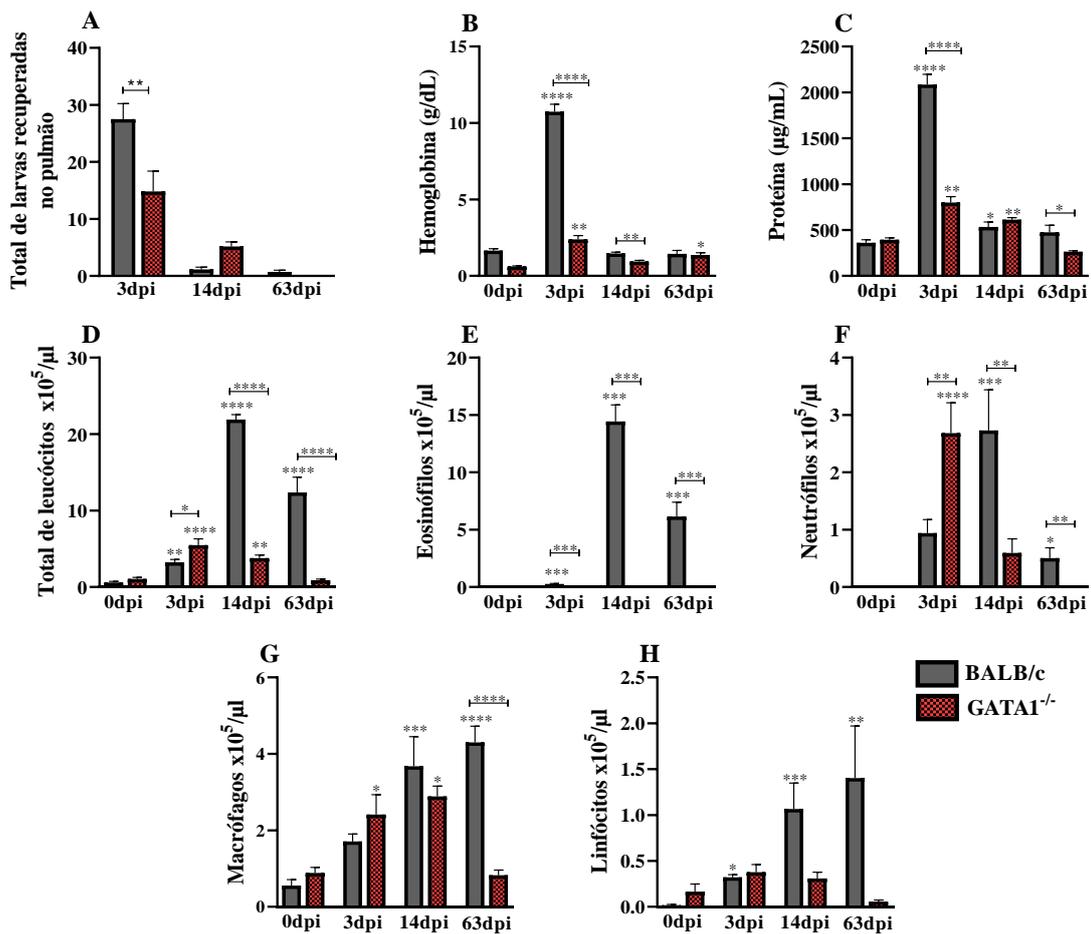
presença de granulomas, os quais se encontravam na fase exsudativa compostos em sua maioria por eosinófilos, seguidos de macrófagos e granulomas na fase produtiva composto por macrófagos, células gigantes, células epitelioides, fibroblastos, colágeno. Frequentemente foi observado em todo o parênquima hepática a congestão vascular. Enquanto que nos animais do grupo  $GATA1^{-/-}$  63dpi foi possível identificar somente a presença de pequenos focos inflamatórios dispersos pelo parênquima hepático com macrófagos e escassos linfócitos e não foram observados fenômenos exsudativos e nem focos de necrose. Coletivamente, esses dados sugerem que os eosinófilos são os principais responsáveis pela presença de granulomas hepáticos na infecção por *T. canis* além de influenciarem na atividade de neutrófilos.



**Figura 28.** Histopatologia hepática em camundongos BALB/c e  $GATA1^{-/-}$  infectados com *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de seções de fígado. Focos de infiltração inflamatória (pontas de seta), área de necrose (\*). Barra = 1000 $\mu$ m.

**6.3 Os camundongos  $GATA1^{-/-}$  apresentam aumento da atividade neutrofílica e redução da carga parasitária na fase aguda e redução da inflamação pulmonar na fase crônica da infecção por *T. canis*.**

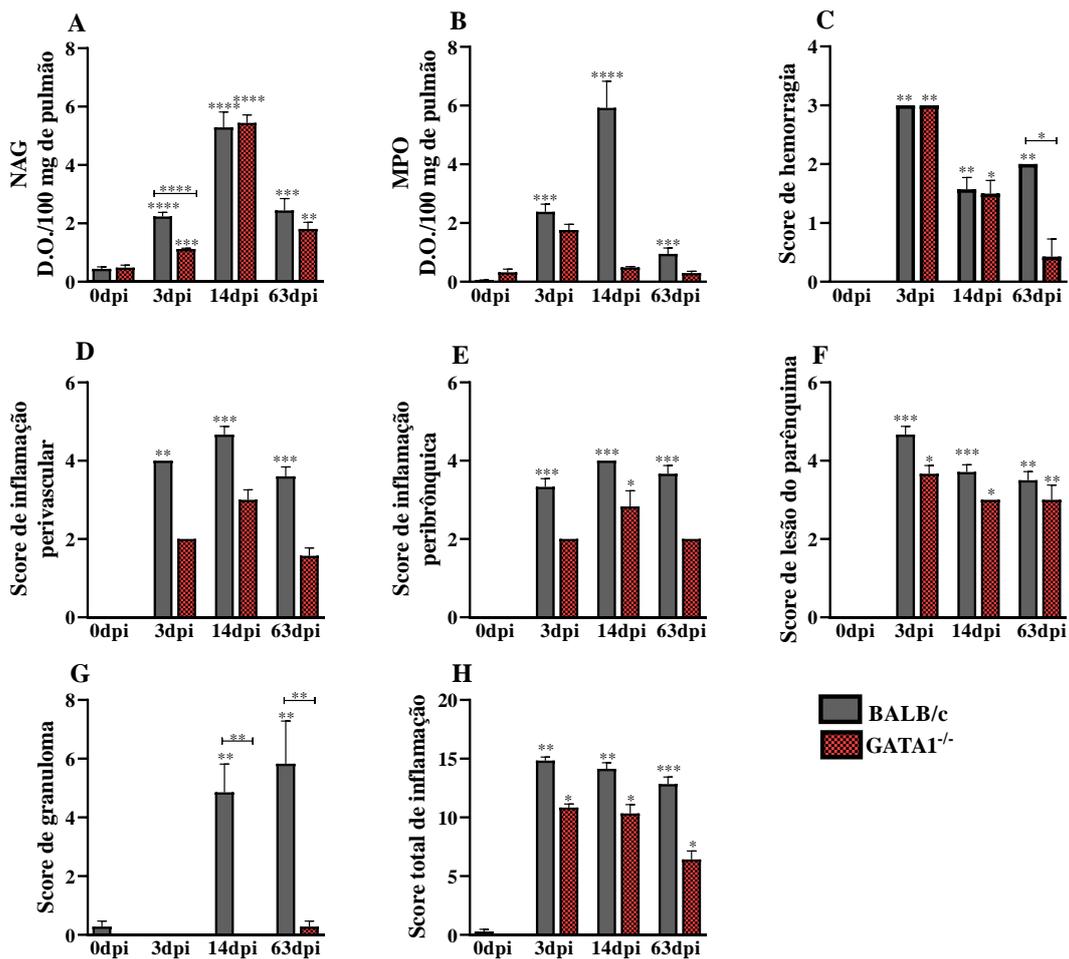
Ao analisar a carga parasitária pulmonar observamos que os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> apresentam redução no número de larvas recuperadas nos pulmões com 3dpi e consequentemente reduziram a concentração de hemoglobina e proteína no BAL (Figura 29A-C). Em relação aos leucócitos no BAL (Figura 29D-H), observamos aumento no número de leucócitos totais nos animais GATA1<sup>-/-</sup> ocorrendo devido ao aumento de neutrófilos. Porém, com 14dpi e 63dpi houve redução dos leucócitos comparado a linhagem BALB/c, devido à redução de neutrófilos, macrófagos e pela ausência de eosinófilos.



**Figura 29.** Quantificação de larvas de *T. canis* recuperadas nos pulmões e inflamação nas vias aéreas. (A) Número de larvas recuperadas do pulmão; (B) Quantificação de hemoglobina no lavado broncoalveolar (BAL); (C) Níveis de proteína total no BAL; (D) Quantificação da infiltração de leucócitos totais no BAL; (E) Número de eosinófilos no BAL; (F) Número de neutrófilos no BAL; (G) Número de macrófagos no BAL; (H) Número de linfócitos no BAL. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p

<0,001, \*\*\*\* p <0,0001. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

No parênquima pulmonar foi avaliados os aspectos relacionados a inflamação tecidual (Figura 30). Foi observado redução da atividade de macrófagos com 3dpi, no score de hemorragia com 63dpi e no score de granulomas com 14dpi e 63dpi nos camundongos GATA1<sup>-/-</sup> quando comparados com BALB/c, demonstrando redução da inflamação tecidual.



**Figura 30.** Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos BALB/c e GATA1<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. (A) Atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido pulmonar; (B) Atividade de mieloperoxidase (MPO); (C) Score de hemorragia; (D) Score de inflamação perivascular; (E) Score de inflamação peribrônquica; (F) Score de lesão do parênquima; (G) Score de granuloma; (H) Score total de inflamação. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001,

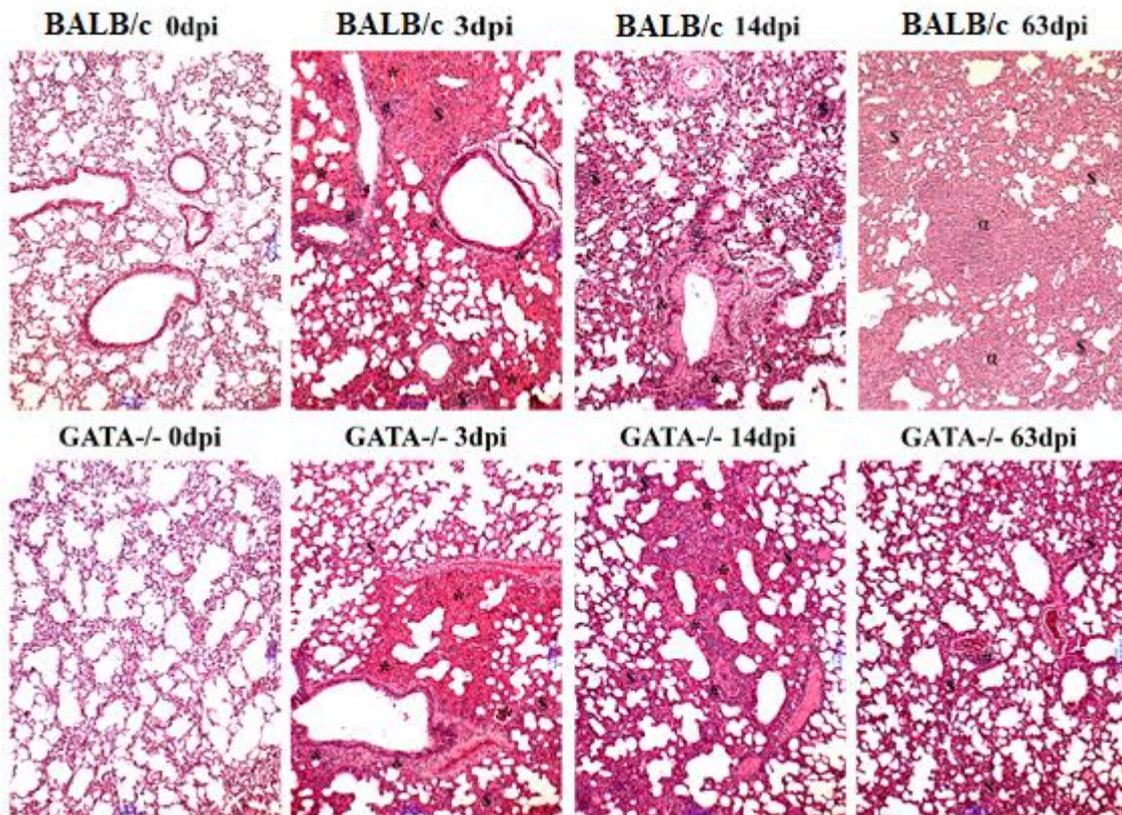
\*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Na análise histopatológica do pulmão de camundongo infectados com *T. canis*, foi possível observarmos e descrevermos as lesões do parênquima pulmonar provocadas pela migração larval do parasita, quanto a topografia, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, granulomas, fenômenos vasculares e exsudativos (Figura 31). Os camundongos não infectados exibiram pulmões compatíveis com a normalidade. Nos animais pertencentes ao grupo BALB/c 3dpi foi observado espessamento dos septos interalveolares as custas do infiltrado inflamatório misto caracterizado por eosinófilos e neutrófilos, macrófagos e em menor quantidade constituído por linfócitos. Por vezes, foram observados em alguns animais a presença de granuloma na fase exsudativa, sendo também evidenciados fenômenos exsudativos como edema perivascular, extensas áreas hemorrágicas. Frequentemente foi observado hipertrofia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos. A maioria dos animais do grupo apresentavam larvas dispersas no parênquima pulmonar e frequentemente próximas das zonas hemorrágicas. No grupo GATA1<sup>-/-</sup> 3dpi, foi observado grande espessamento dos septos interalveolares as custas do infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por macrófagos e linfócitos, como menor frequência foram visualizados neutrófilos. Também foram evidenciados fenômenos exsudativos como edema presente lumén alveolar e perivascular, grandes áreas de hemorragia e vasos congestos. Também foi observado em alguns brônquios e bronquíolos hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio.

Nos camundongos BALB/c 14dpi, observamos o espessamento dos septos interalveolares devido à presença de infiltrado inflamatório misto constituído predominantemente em algumas regiões por eosinófilos e neutrófilos e em outras regiões com predominância de macrófagos e linfócitos. Frequentemente foram evidenciados em todos animais a presença de fenômenos exsudativos e vasculares como zonas hemorrágicas, edema perivascular e hiperemia. Alguns macrófagos apresentavam com pigmento de cor acastanhada em seu citoplasma sugestivo de hemossiderina. Também foi observado hipertrofia e hiperplasia de células do epitélio dos brônquios e bronquíolos. Frequentemente foram observados a presença no parênquima de granuloma na fase exsudativa compostos em sua maioria por eosinófilos, macrófagos seguidos de linfócitos. No grupo GATA1<sup>-/-</sup> 14dpi havia grande espessamento dos septos interalveolares as custas

de infiltrado inflamatório constituído por macrófagos e linfócitos. Também foi identificado a presença de grande número de linfócitos em torno dos vasos e brônquios, áreas hemorrágicas e edema no lúmen alveolar e perivascular. As células do epitélio dos brônquios e bronquíolos apresentaram intensa hipertrofia e hiperplasia e frequentemente foram observados a formação de tampão mucoso obstruindo o lúmen brônquico.

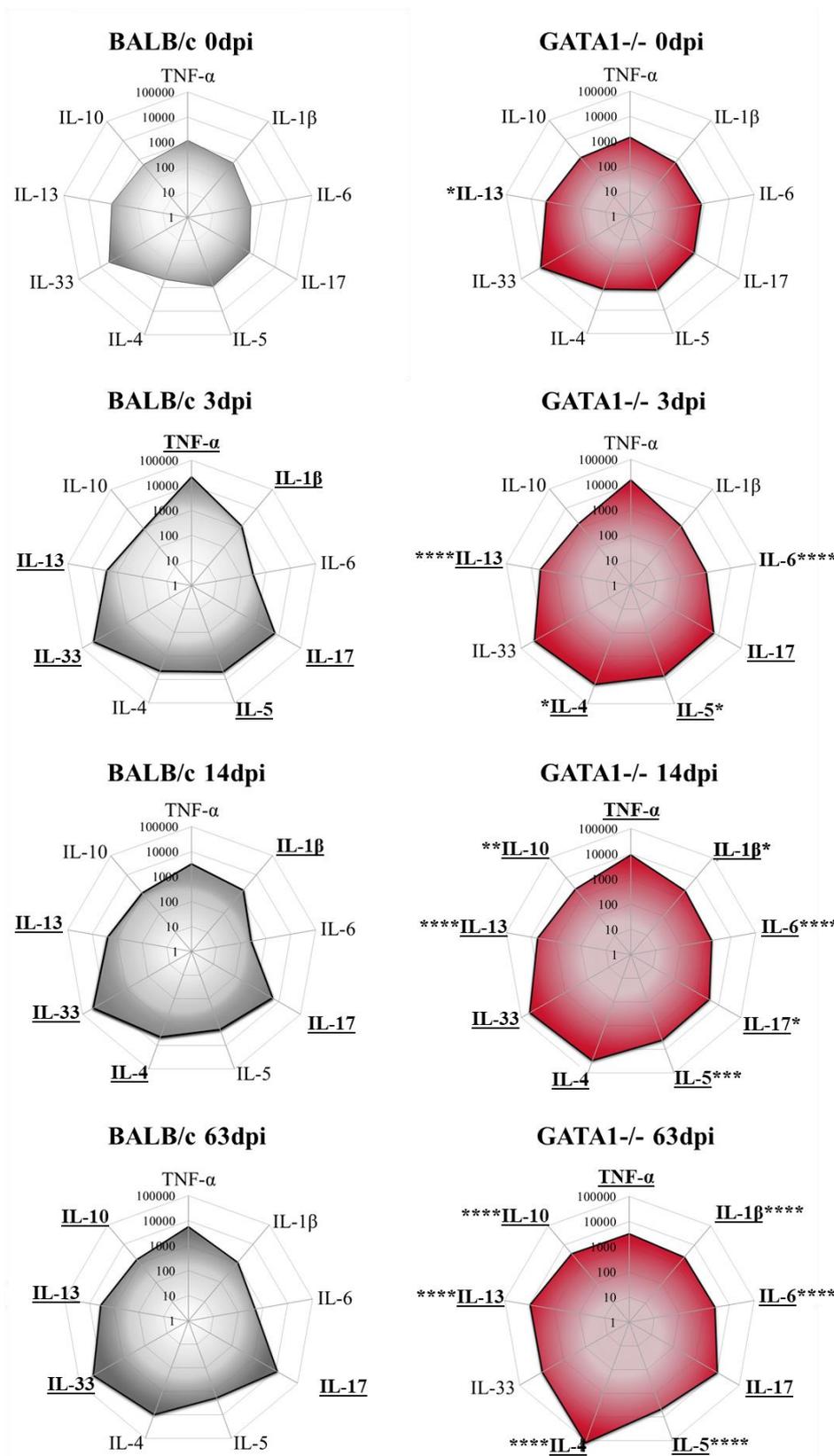
Com 63dpi os camundongos BALB/c apresentaram espessamento dos septos interalveolares, ocasionado pela presença difusa de infiltrado inflamatório misto constituído por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e escassos neutrófilos. Além da presença difusa de infiltrado inflamatório também foi evidenciado em alguns animais a formação de BALT. Foi possível evidenciar em todos animais a presença de fenômenos exsudativos e vasculares como pequenos focos hemorrágicos e congestão de capilares. Alguns macrófagos apresentavam com pigmento de cor acastanhada em seu citoplasma sugestivo de hemossiderina. Na maioria dos animais alguns brônquios e bronquíolos apresentavam hipertrofia e hiperplasia de células do epitélio. Em todos os animais foram observados a presença de granulomas na fase produtiva no parênquima pulmonar. Enquanto nos camundongos GATA1<sup>-/-</sup> 63dpi, foi observado espessamento dos septos interalveolares, ocasionado pela infiltrado inflamatório mononuclear constituído por macrófagos, e linfócito. Em torno dos vasos foi identificado a presença marcante de linfócitos e foi constatado em alguns vasos a presença de hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio brônquico. Por vezes em algumas regiões do parênquima foram observadas em pequena proporção a presença de hemácias extravasadas. Esses resultados indicam que os eosinófilos influenciam na carga parasitária pulmonar, e sua ausência aumenta o número de neutrófilos, que pode ser importante para o controle da infecção por *T. canis*. Além disso, a ausência de eosinófilos contribuiu para a melhora da inflamação pulmonar, reduzindo a formação de granulomas.



**Figura 31.** Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos BALB/c e GATA1<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de secções de pulmão. Área de hemorragia (\*), inflamação do parênquima (\$), inflamação das vias aéreas (&), inflamação vascular (#), granuloma (α), Barra = 1000µm.

#### 6.4 O perfil de citocinas pulmonares apresenta uma resposta imunológica Th1/Th2 em camundongos GATA1<sup>-/-</sup> durante a infecção por *T. canis*.

Analizamos a resposta imunológica no parênquima pulmonar por meio da dosagem de citocinas do perfil Th1, Th2, Th17 e Treg (Figura 32). Ambas as linhagens comparadas aos seus respectivos controles apresentam uma resposta não polarizada, com aumento de citocinas das repostas Th1, Th2 e Th17. Ao comparar as duas linhagens, observamos que a citocina IL-13 se mostrou aumentada nos camundongos GATA1<sup>-/-</sup> não infectados (0dpi) comparados aos BALB/c. Com 3dpi foi observado que os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> aumentaram as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-6 comparado ao BALB/c. Já nas fases mais tardias da infecção, os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> além das citocinas observadas com 3dpi, aumentaram também IL-1β e IL-10 e reduziram a IL-17 com 14dpi e 63dpi. Assim, os resultados demonstram que a ausência de eosinófilos favorece uma resposta imunológica Th2 e reduz a Th17 na infecção por *T. canis*.

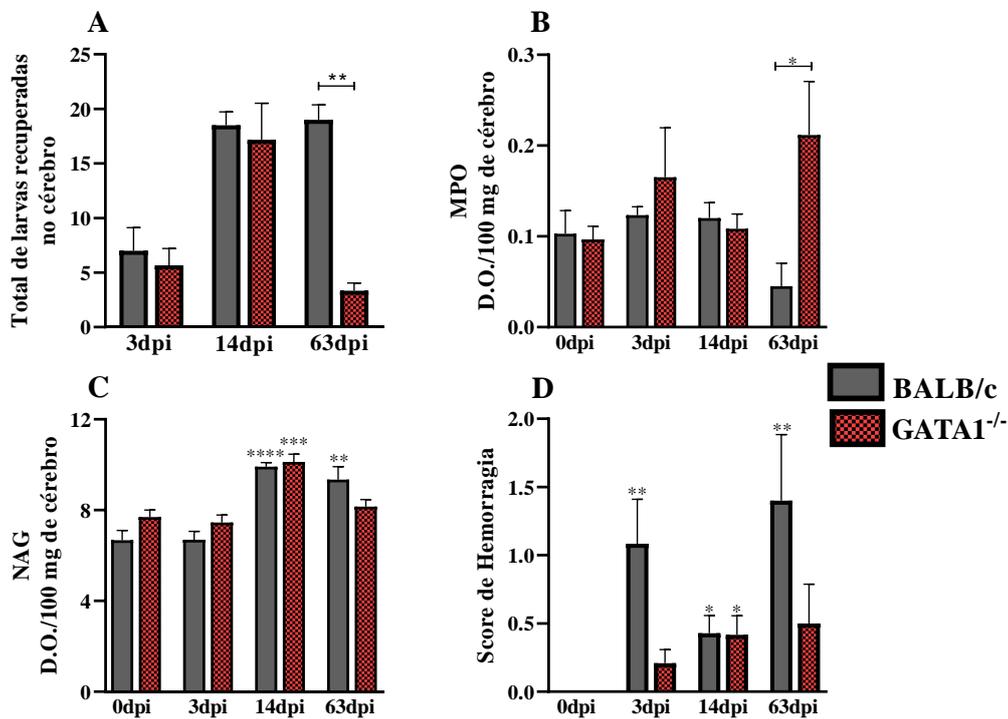


**Figura 32.** Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no parênquima pulmonar de camundongos BALB/c e GATA1<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. Os gráficos de radar expressam a concentração de citocinas pulmonares durante a infecção. Os resultados

representam a média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com os grupos BALB/c correspondentes. As citocinas foram sublinhadas quando apresentaram diferença estatística com seu respectivo grupo controle (0dpi). Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

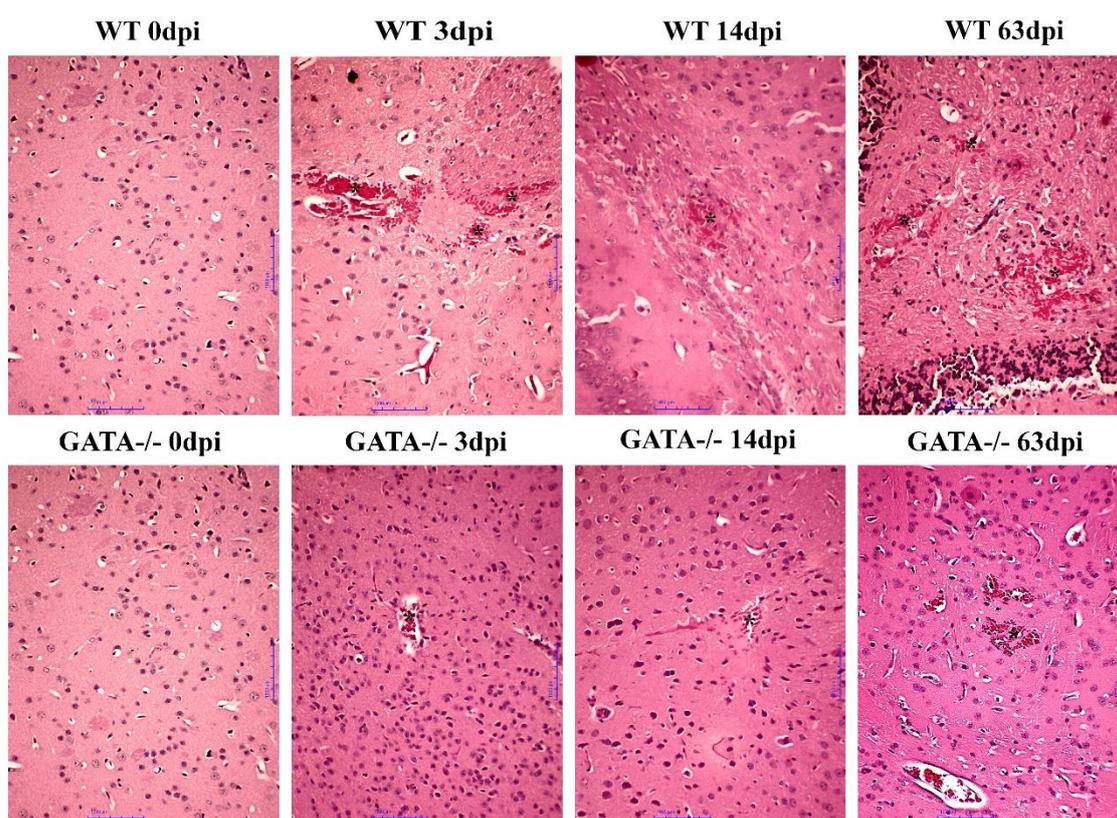
### 6.5 A ausência de eosinófilos reduz a carga parasitária cerebral e aumenta a atividade de neutrófilos na fase crônica da infecção

No tecido cerebral avaliamos a carga parasitária, a atividade de macrófagos e de neutrófilos (Figura 33). Os resultados mostraram que os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> reduziram o número de larvas recuperadas no cérebro com 63dpi comparado ao BALB/c, e aumentaram a atividade de neutrófilo no mesmo tempo de infecção. Não foi observada diferença entre os grupos na atividade de macrófagos e no *score* de hemorragia.



**Figura 33.** Número de larvas recuperadas e inflamação tecidual no cérebro durante a infecção. (A) Número de larvas recuperadas no cérebro; (B) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral; (C) Atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido cerebral; Score de hemorragia (D). As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

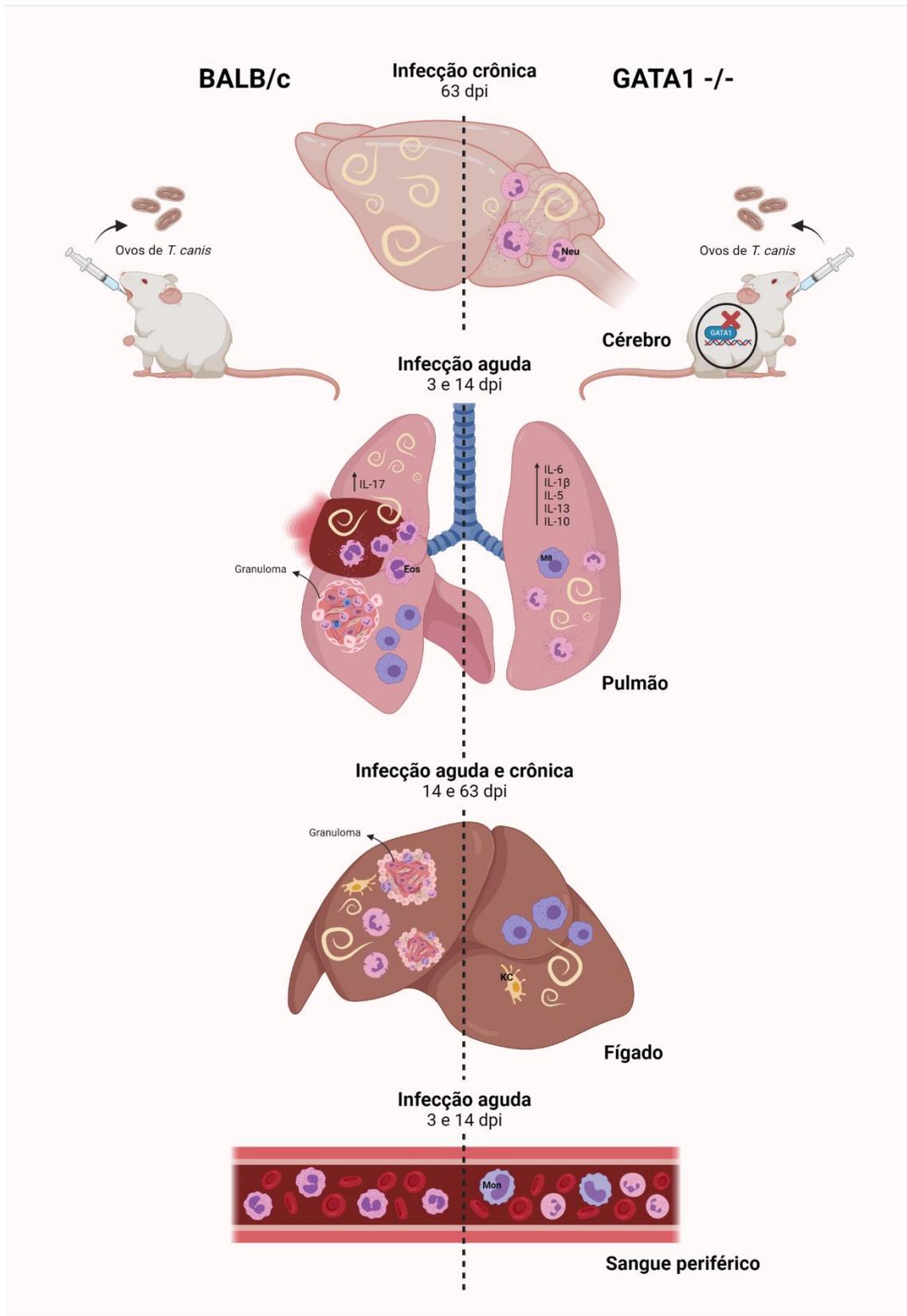
A análise histopatológica do cérebro de camundongos não infectados mostrou aspecto morfológico compatível com a normalidade, sem lesões significativas (Figura 34). Nos camundongos BALB/c com 3dpi e 14dpi foram observados focos de hemorragia e vacuolização e pequenos focos inflamatórios. Com 63dpi havia mais áreas de vacuolização, áreas multifocais de hemorragia e focos inflamatórios. Nos animais *GATA1*<sup>-/-</sup> os parâmetros histopatológicos foram mínimos e caracterizados por hemorragia, vacuolização e inflamação focal em todos os grupos infectados.



**Figura 34.** Histopatologia do tecido cerebral de camundongos BALB/c e *GATA1*<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de seções cerebrais, área de hemorragia (\*), Bar = 1000µm.

Os resultados deste capítulo mostraram que a presença dos eosinófilos contribuiu para o aumento da carga parasitária pulmonar e cerebral e reduz o número de neutrófilos, que podem ser importantes para o controle da infecção por *T. canis*. Além disso, os eosinófilos estimulam a leucocitose e a formação de granulomas pulmonares e hepáticos contribuindo para a inflamação tecidual (Figura 35). Com base nos resultados dos dois primeiros capítulos, buscamos esclarecer no capítulo seguinte a influência da resposta

Th17 na carga parasitária, resposta imunológica e inflamação pulmonar durante a infecção por *T. canis*.



**Figura 35.** Influência do fator de transcrição GATA1 na infecção por *T. canis*. A presença dos eosinófilos durante a infecção por *T. canis* contribui para o aumento da carga parasitária pulmonar e cerebral, para formação de granulomas pulmonares e hepáticos e reduz o número de neutrófilos, que podem ser importantes para o controle da infecção por *T. canis*. Eos = eosinófilos; Neu = neutrófilos ; Kc = Células de Kupffer.

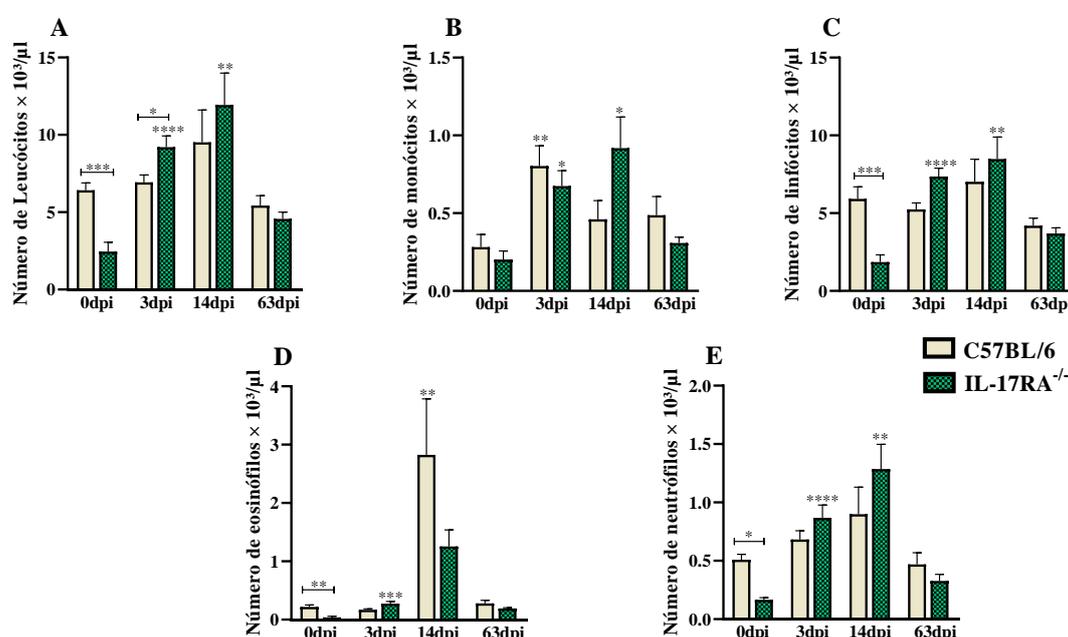
## **7. RESULTADOS**

### **CAPÍTULO 3:**

A PRESENÇA DA RESPOSTA IL-17 DIMINUI A CARGA PARASITÁRIA E CONTRIBUI PARA O AUMENTO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR NA INFECÇÃO AGUDA DE *TOXOCA CANIS*.

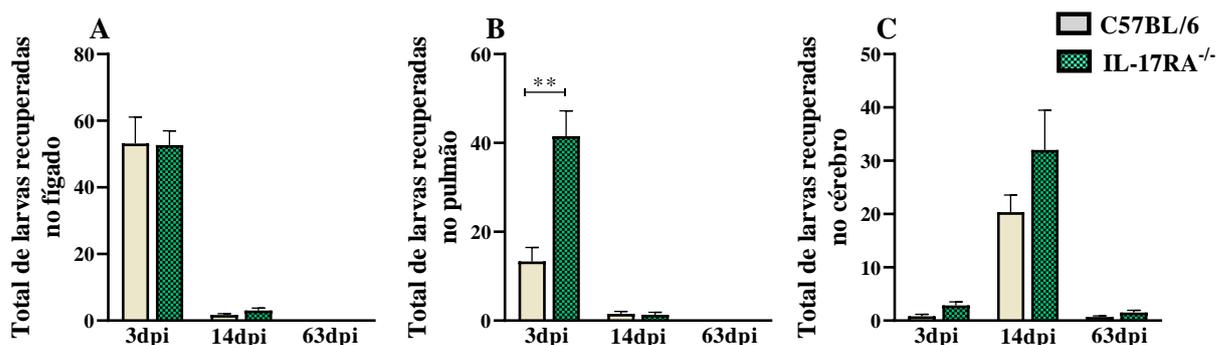
**7.1 A ausência do receptor IL-17RA induz leucocitose e aumenta a carga parasitária pulmonar na fase aguda da infecção por *T. canis***

Para analisar a infecção de forma sistêmica, foi realizado o leucograma na fase aguda e crônica da infecção (Figura 36A-E). Os resultados demonstraram que os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> apresentam naturalmente menor número de leucócitos totais comparado ao C57BL/6, havendo menor número de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. Contudo, houve aumento de leucócitos nos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> na fase aguda da infecção (3dpi), sendo observado um pequeno aumento no número de eosinófilos quando comparado aos camundongos C57BL/6.



**Figura 36.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

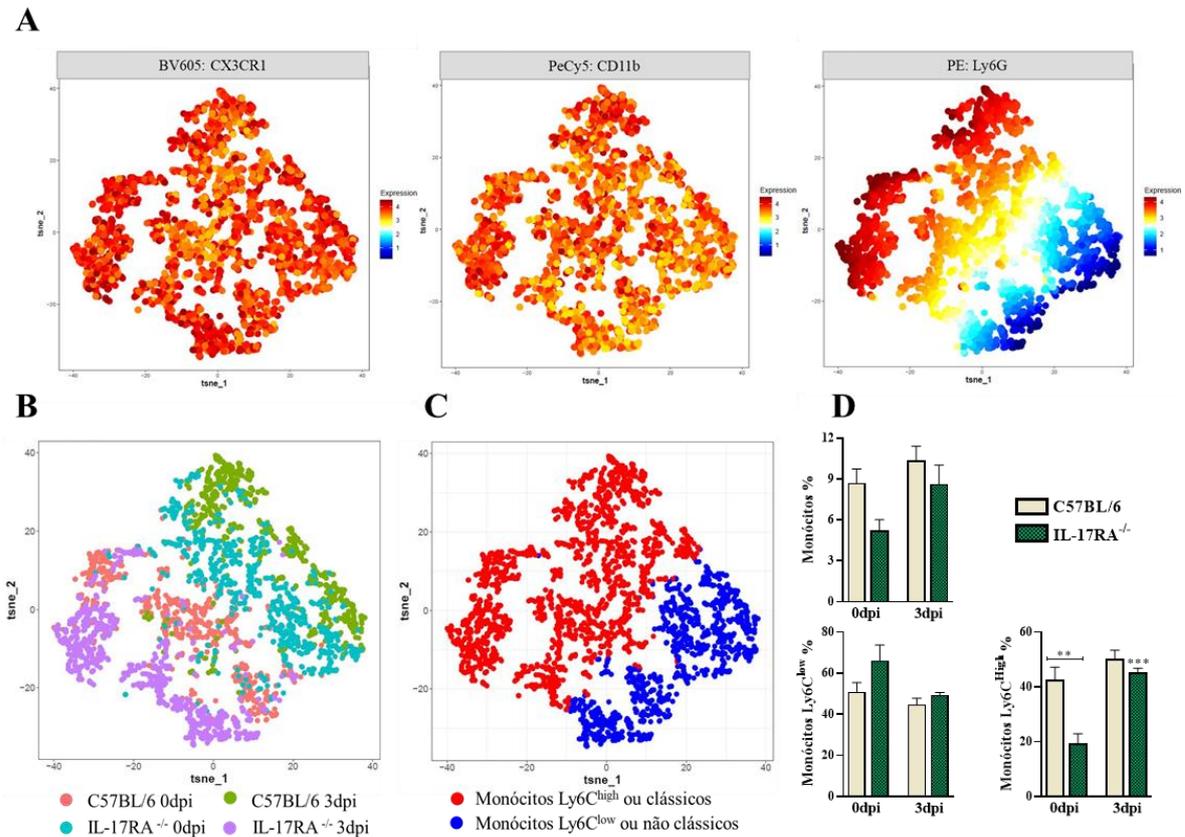
Para a escolha do tempo de infecção e o órgão a ser estudado na resposta Th17, durante a infecção por *T. canis*, foi realizada a recuperação de larvas nos tecidos hepáticos, pulmonar e cerebral (Figura 37A-C). Foi observado nos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> aumento significativo de larvas no tecido pulmonar com 3dpi comparado aos camundongos C57BL/6. Dessa forma, os resultados demonstraram que a resposta Th17 reduz os eosinófilos e é importante para controle da carga parasitária pulmonar na fase aguda da infecção. Por essa razão, o tecido pulmonar no tempo 3dpi foi escolhido para o estudo da resposta Th17.



**Figura 37.** Recuperação total de larvas no fígado, pulmão e cérebro de camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \*\* p < 0,01. Para análise estatística foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

## 7.2 As células da imunidade inata aumentam a expressão de IL-17, IL-4, TNF- $\alpha$ durante a infecção por *T. canis* e a presença do receptor de IL-17 aumenta a expressão dos marcadores de ativação CD69 nos linfócitos TCD4 no sangue

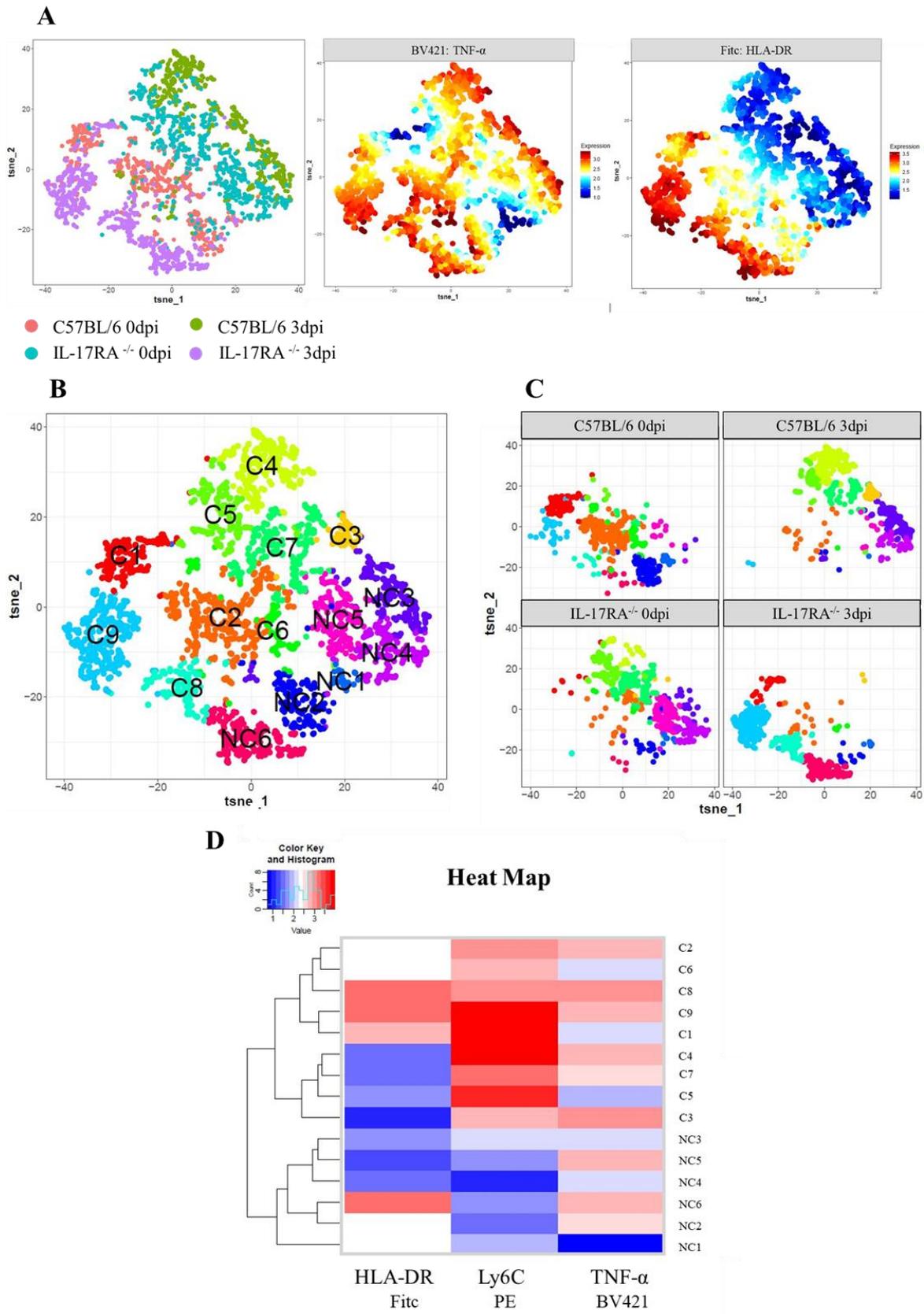
No sangue periférico foi realizado por citometria a imunofenotipagem de monócitos clássicos, também chamados de M1 (CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>high</sup>) e de não clássicos chamados de M2 (CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>) (Figura 38A). O tSNE foi realizado e foi observado as duas populações de monócitos em todos os grupos (Figura 38B-C). Não foi observada diferença significativa entre os grupos na frequência total de monócitos clássicos e não clássicos (Figura 38D). Ao analisar separadamente, os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi aumentaram a frequência de monócitos clássicos, comparado ao grupo IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi. Também foi observado menor frequência de monócitos clássicos nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi comparado ao C57BL/6 0dpi.



**Figura 38.** Análise do sangue periférico por citometria de monócitos em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. (A) tSNE da diferenciação de monócitos clássicos (CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>high</sup>) de não clássicos (CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>); (B) tSNE de monócitos destacando os grupos experimentais C57BL/6 0dpi (rosa), C57BL/6 3dpi (verde), IL17RA<sup>-/-</sup> 0dpi (azul) e IL17RA<sup>-/-</sup> 3dpi (roxo); (C) tSNE de monócitos destacando os monócitos clássicos (vermelho) e não clássicos (azul); (D) Frequência de monócitos totais, monócitos clássicos (Ly6C<sup>high</sup>) e monócitos não clássicos (Ly6C<sup>low</sup>). As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Também analisamos o tSNE para observados a expressão de HLA-DR e TNF- $\alpha$  pelos monócitos (Figura 39A). Os animais C57BL/6 0dpi tiveram expressão média de TNF- $\alpha$  e HLA-DR, enquanto que os IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi apresentou somente expressão média de TNF- $\alpha$ . Os animais do grupo IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi apresentaram alta expressão de HLA-

DR e TNF- $\alpha$ , enquanto os C57BL/6 3dpi expressaram somente TNF- $\alpha$ . A análise pelo programa rPhenograph identificou 9 populações de monócitos clássicos e 6 populações de monócitos não clássicos, e ambos os tipos de monócitos apresentaram expressão de HLA-DR e TNF- $\alpha$  (Figura 39B-D). Os animais C57BL/6 0dpi tiveram maior frequência dos clusters C1, C2, NC1, NC2 e NC5 em que há média expressão de TNF- $\alpha$ . Os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi apresentaram maior frequência dos clusters C5, C6, C7, NC3, NC4 e NC5 com média expressão de TNF- $\alpha$ . Já nos animais C57BL/6 3dpi foi observado maior frequência dos clusters C3, C4, C5, C7, NC3, NC5 e NC6 apresentando mais populações com expressão média de TNF- $\alpha$ . E os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi tiveram maior frequência dos clusters C8, C9 e NC6 todos com expressão média de HLA-DR e TNF- $\alpha$ . As populações C3 e C8 presentes nos animais infectados foram as que apresentam expressão mais alta de TNF- $\alpha$ , enquanto as que tiveram maior expressão de HLA-DR foram C8, C9 e NC6 presentes com maior frequência nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi. Assim, observamos que no sangue periférico os monócitos clássicos e não clássicos estão presentes em animais não infectados e infectados com *T. canis*, e que a IL-17 interfere na via de sinalização do TNF- $\alpha$  durante a toxocarose.



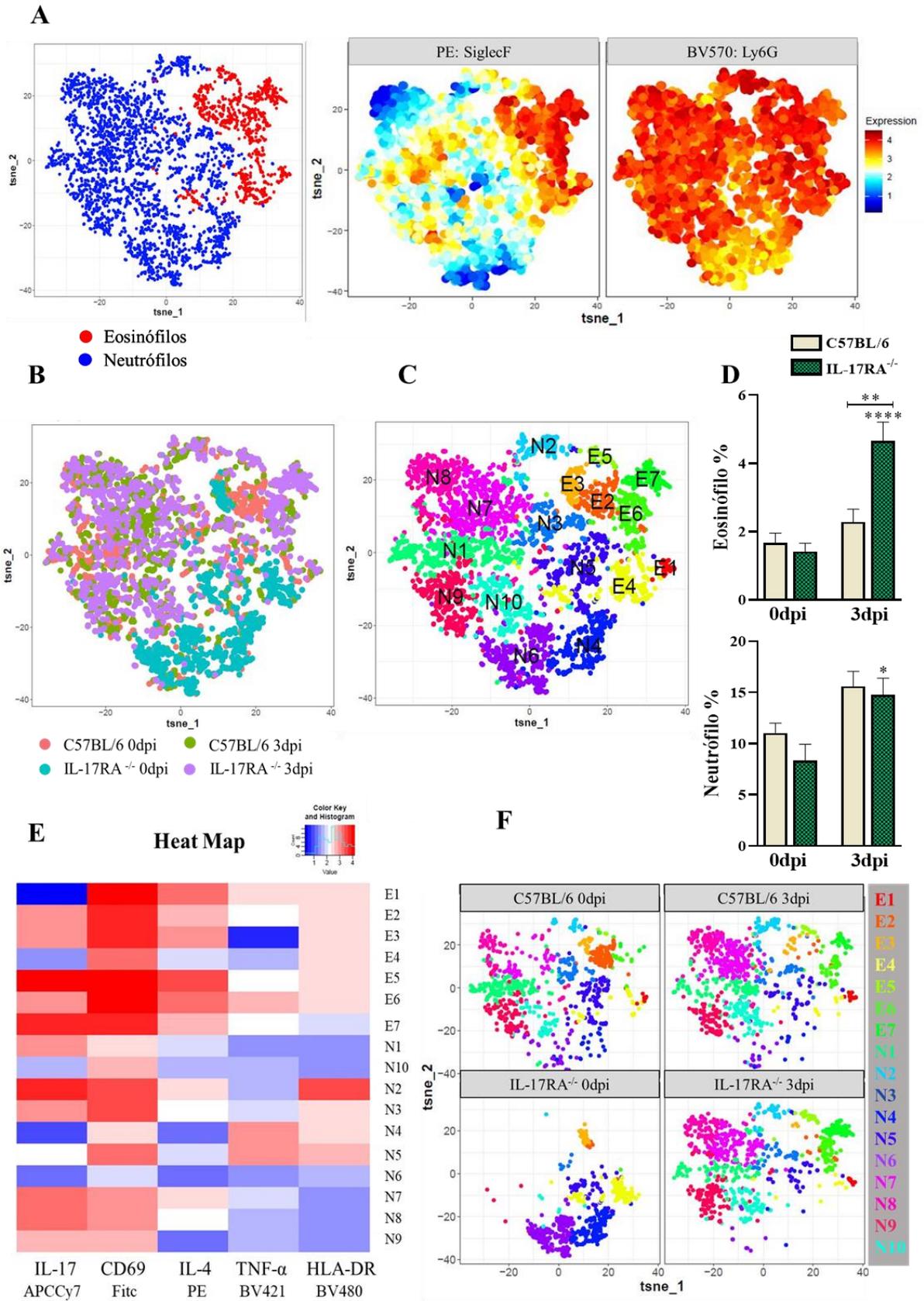
**Figura 39.** Análise dos clusters de monócitos no sangue periférico por citometria em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. (A) tSNE de

monócitos com a expressão HLA-DR e TNF- $\alpha$ ; (B) tSNE de “A” representando análise de cluster por Rphenograph; (C) tSNE de “A” destacando clusters de monócitos por grupo; (D) Heat Map com expressão de marcadores por cluster. C= monócitos clássicos; NC= monócitos não clássicos.

Foi realizada a citometria no sangue periférico para diferenciação de eosinófilos (SiglecF<sup>+</sup>) e neutrófilos (Siglec F- e Ly6G<sup>+</sup>) (Figura 40). Os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi apresentaram maior frequência de neutrófilos e eosinófilos, comparados ao seu grupo controle. Ao comparar as duas linhagens observamos que os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi tiveram maior frequência de eosinófilos (Figura 40D). A análise pelo programa rPhenograph identificou 7 populações de eosinófilos e 10 populações de neutrófilos (Figura 40B-C).

Ao analisar os clusters de eosinófilos observamos que a expressão mais alta de IL-17 estava nos clusters E5 e E7, mais frequentes nos animais infectados (Figura 40E-F). O marcador CD69 estava altamente expresso em todos os clusters e, assim presentes em todos os grupos. A expressão mais alta de IL-4 foi no cluster E5, presentes nos animais infectados, assim como o TNF- $\alpha$  presente no cluster E6. A expressão de HLA-DR foi homogênea em todos os clusters com exceção do E7.

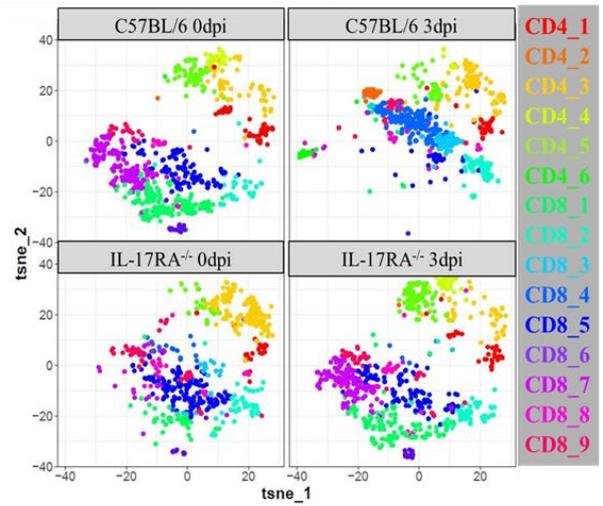
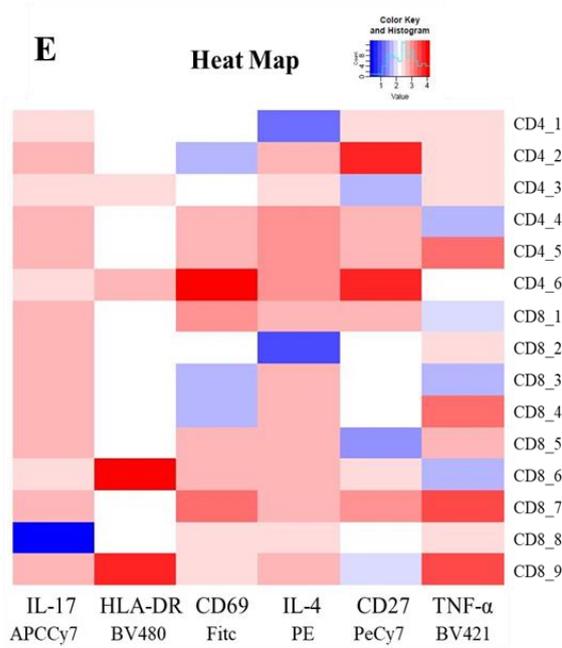
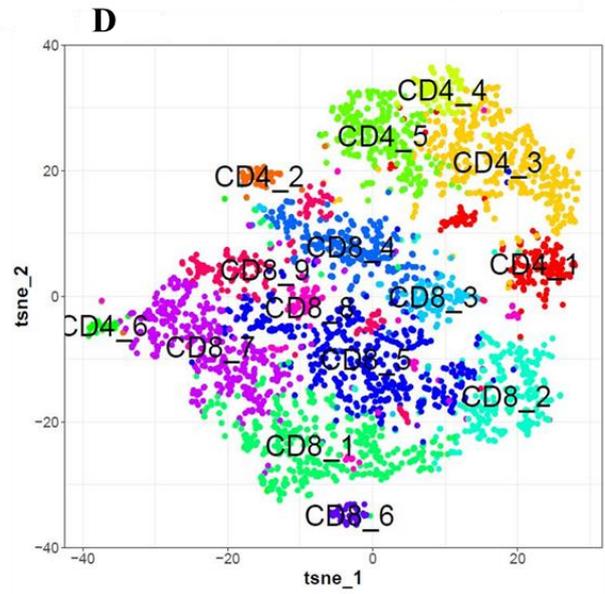
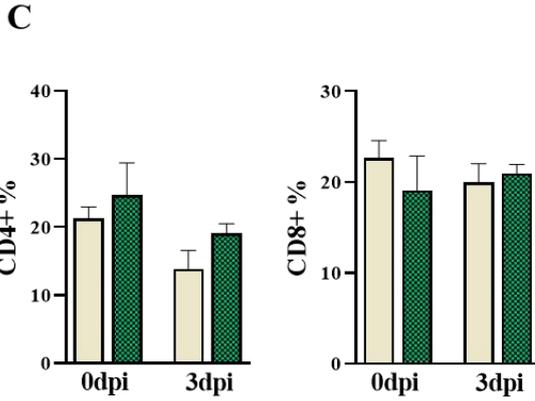
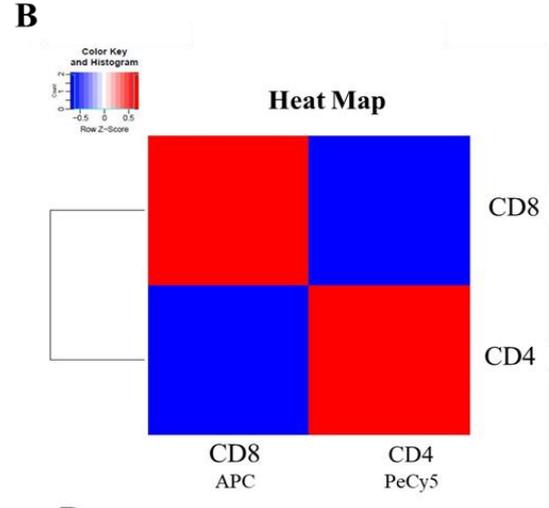
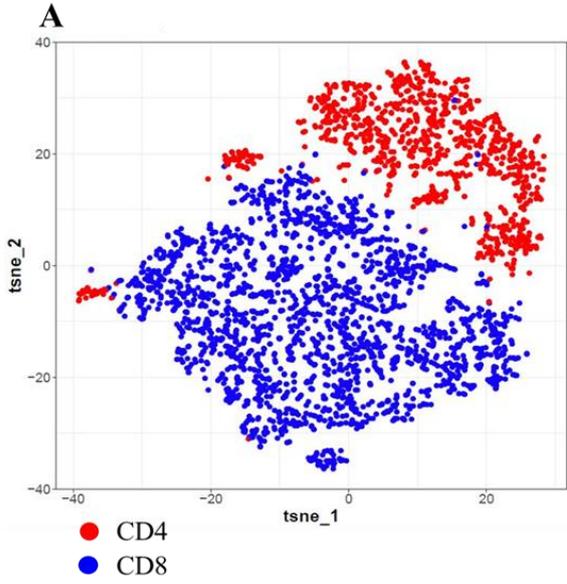
Quando analisamos os clusters de neutrófilos observamos que a maior expressão de IL-17 foi no cluster N2, frequente em todos os grupos, com exceção do IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi, assim como a IL-4, que foi mais expressa nos clusters N2 e N7. Para o marcador CD69 a expressão foi mais alta nos clusters N2, N3 e N5, estando frequente em todos os grupos, assim como TNF- $\alpha$  presente nos cluster N4 e N5. A expressão de HLA-DR foi mais alta no cluster N2 presentes nos grupos C57BL/6 0dpi, C57BL/6 3dpi e IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi. Dessa forma podemos inferir que os animais, ao serem infectados com *T. canis*, apresentam maior frequência de eosinófilos expressando IL-17, IL-4 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, a frequência de neutrófilos expressando IL-17 e IL-4 é maior nos animais dos grupos C57BL/6 0dpi, C57BL/6 3dpi e IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi, enquanto que nos IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi há mais neutrófilos expressando TNF- $\alpha$ .



**Figura 40.** Análise dos clusters de neutrófilos e eosinófilos no sangue periférico por citometria em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi.

(A) tSNE de eosinófilos (vermelho) e neutrófilos (azul) com a expressão SiglecF e Ly6G; (B) tSNE de eosinófilos e neutrófilos destacando os grupos experimentais C57BL/6 0dpi (rosa), C57BL/6 3dpi (verde), IL17RA<sup>-/-</sup> 0dpi (azul) e IL17RA<sup>-/-</sup> 3dpi (roxo); (C) tSNE de “B” representando análise de cluster por Rphenograph; (D) Frequência de eosinófilos (SiglecF<sup>+</sup>) e neutrófilos (SiglecF<sup>-</sup> e Ly6G<sup>+</sup>) no sangue periférico; (E) Heat Map com expressão de marcadores por cluster; (F) tSNE de “B” destacando clusters de neutrófilos e eosinófilos por grupo. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

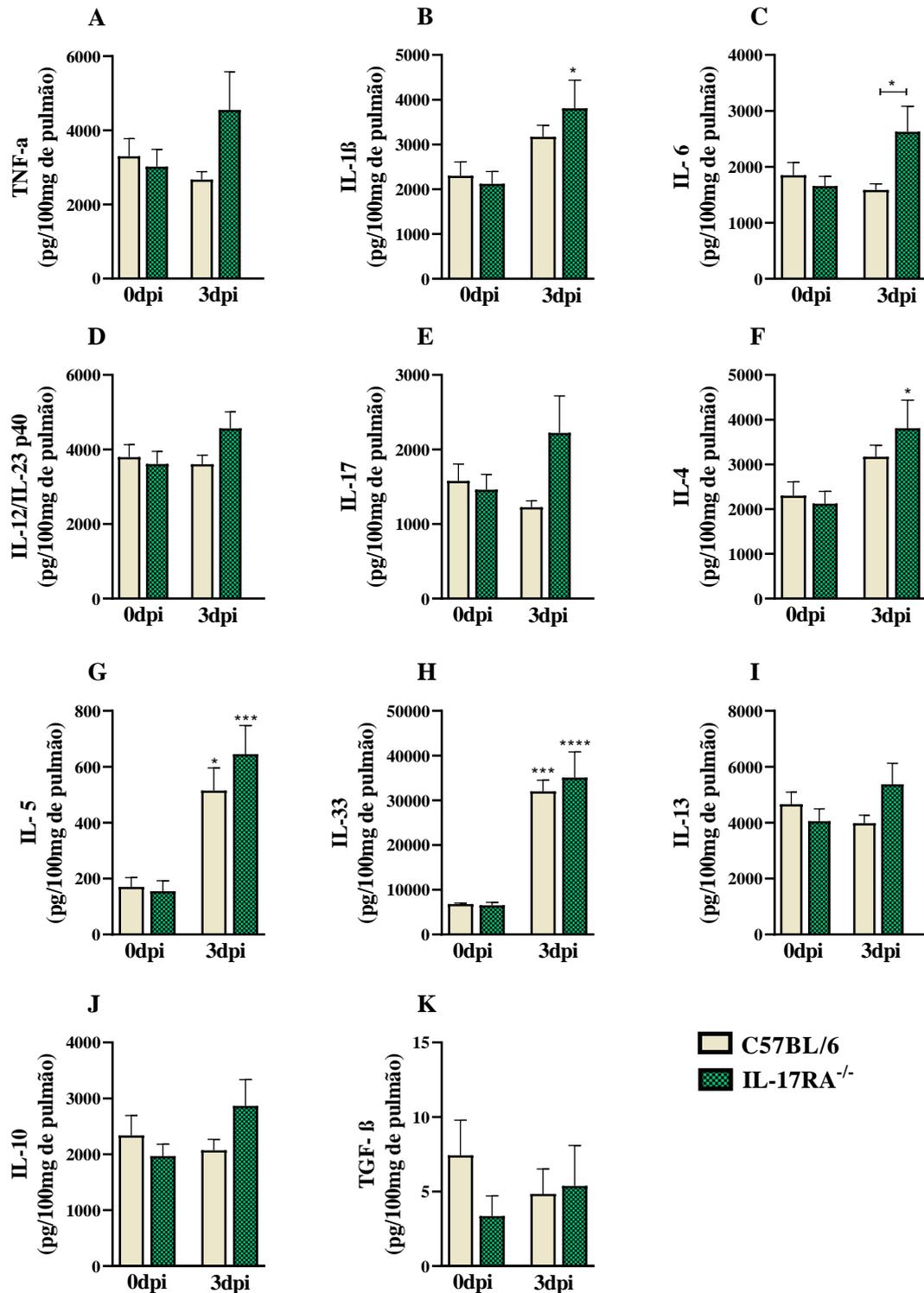
Para diferenciar as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> utilizamos os marcadores CD4 e CD8 (Figura 41A-B). Ao analisar a frequência dessas populações não observamos diferenças estatística entre os grupos experimentais (Figura 41C). Após a análise no programa rPhenograph identificamos 6 populações de linfócitos TCD4 e 9 populações de linfócitos TCD8 (Figura 41D). Essas células podem expressar todos os marcadores utilizados (IL-17, HLA-DR, CD69, IL-4, CD27 e TNF- $\alpha$ ) e esses marcadores foram expressos em todos os grupos (Figura 41E). Os animais do grupo C57BL/6 3dpi se destacaram por serem os únicos a terem maior frequência dos clusters CD4\_2 e CD4\_6, que possuem média expressão de IL-17, IL-4, HLA-DR e TNF- $\alpha$  e alta expressão de CD27 e CD69. Já para os linfócitos TCD8, esses animais tiveram mais frequência dos clusters CD8\_3 e CD8\_4 e apresentaram média expressão de IL-17, IL-4 e TNF- $\alpha$  e baixa expressão de CD27, CD69 e HLA-DR. Dessa forma, percebemos que na infecção aguda por *T. canis* não há uma população homogênea de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico e que há expressão de diferentes citocinas em um mesmo tipo celular.



**Figura 41.** Análise de linfócitos TCD4 e TCD8 por citometria de fluxo em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. (A) tSNE de linfócitos TCD4 (vermelho) e linfócitos TCD8 (azul) com a expressão CD4 e CD8 respectivamente; (B) Heat Map de linfócitos TCD4 e linfócitos TCD8 expressando os marcadores CD4 e CD8; (C) Frequência de linfócitos TCD4 e linfócitos TCD8; (D) tSNE de “A” representando análise de cluster por Rphenograph e destacando clusters de linfócitos TCD4 e linfócitos TCD8 por grupo; (E) Heat Map com expressão de marcadores por cluster. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

### **7.3 A ausência do receptor de IL-17A sustenta uma resposta pulmonar Th1 no parênquima pulmonar na fase aguda da infecção por *T. canis***

Para a análise imunológica no parênquima pulmonar na fase aguda da infecção foram dosadas citocinas das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg por ELISA (Figura 42A-K). Os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram aumento de citocinas Th2, sendo elas IL-5 e IL-33, quando comparados a sua linhagem não infectada (0dpi). Já os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> apresentaram aumento de IL-1β, IL-4, IL-5 e IL-33. Ao comparar as duas linhagens, foi observado que os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> aumentaram a concentração de IL-6. Assim, esses resultados demonstram que, no parênquima pulmonar, a ausência do receptor de IL-17 favorece o aumento da IL-6.

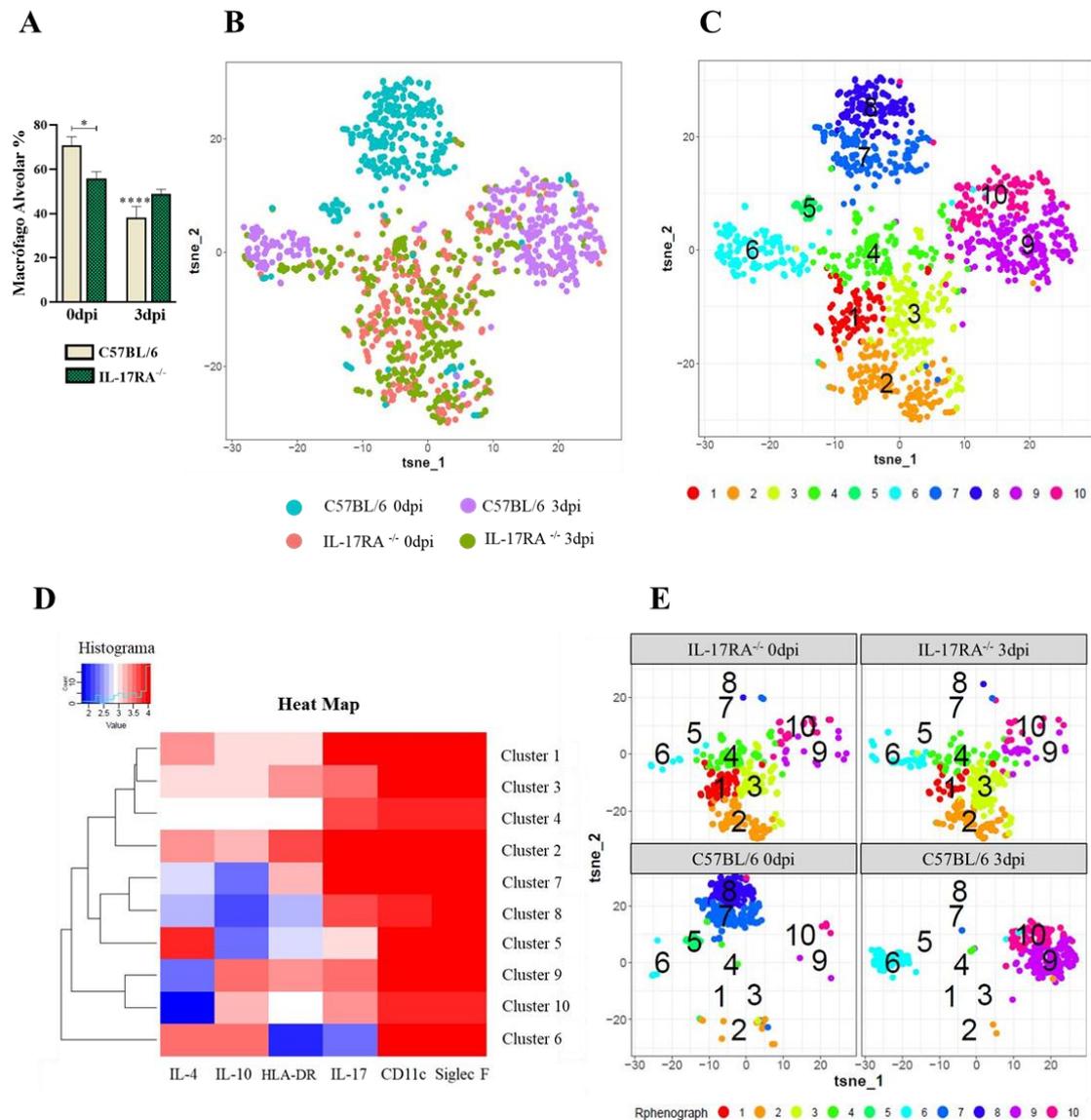


**Figura 42.** Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. (A) TNF- $\alpha$ ; (B) IL-1 $\beta$ ; (C) IL-6; (D) IL-12/IL-23p40; (E) IL-17; (F) IL-4; (G) IL-5; (H) IL-33; (I) IL-13; (J) IL-10; (K) TGF- $\beta$ . As diferenças estatísticas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi) foi representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em

média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

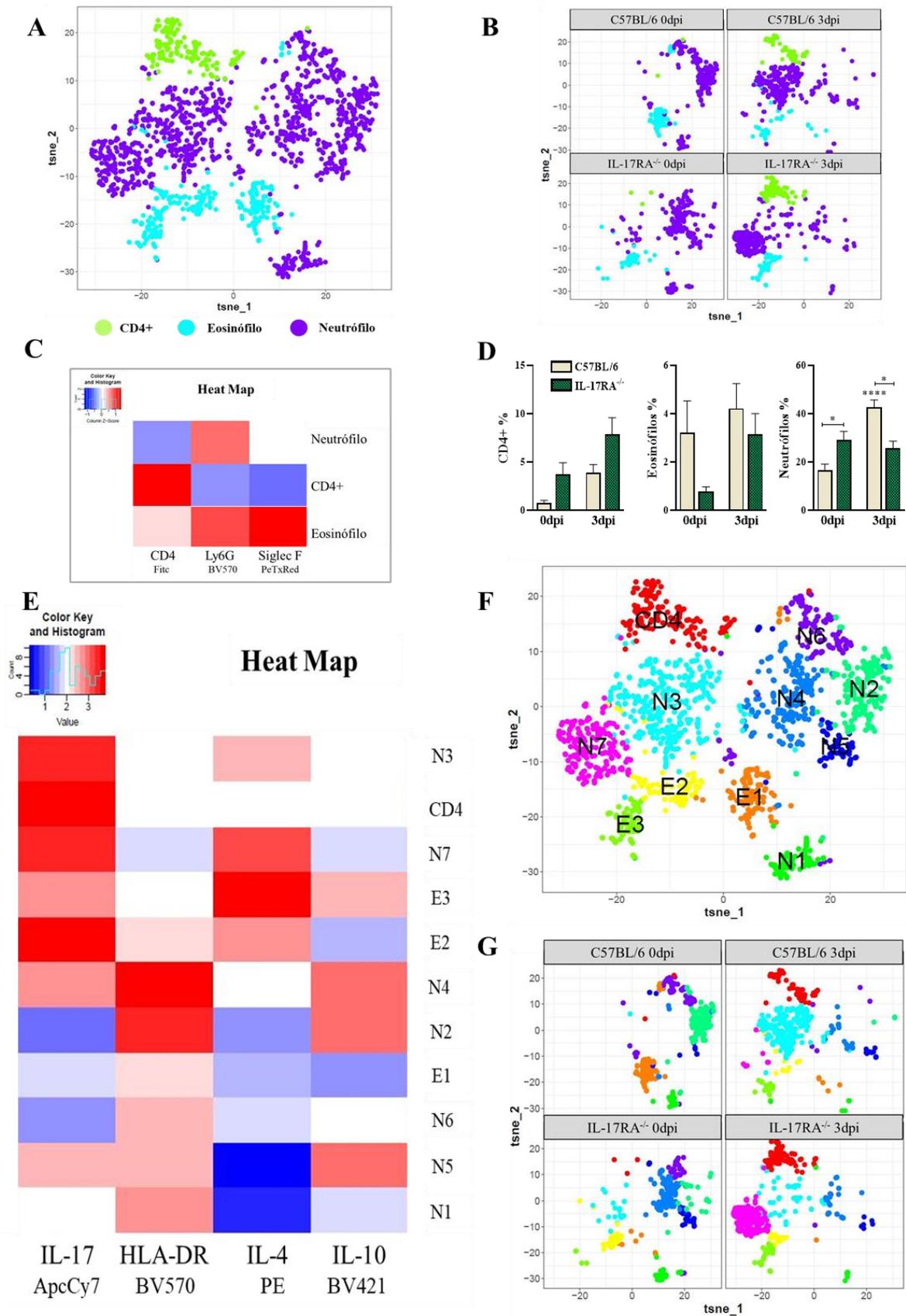
#### **7.4 A infecção por *T. canis* induz alta expressão de IL-17 pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e neutrófilos no BAL**

Para analisar os tipos celulares presentes no BAL, foi realizada a citometria de fluxo para diferenciar macrófagos alveolares, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos e avaliar a expressão de IL-4, IL-17, IL-10 e HLA-DR. Ao analisar a frequência de macrófagos alveolares (CD45<sup>+</sup>, SiglecF<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>) presentes no BAL, observamos que os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> não infectados apresentam menor frequência comparado ao C57BL/6 0dpi (Figura 43A). Ao infectarmos os animais observamos que ambas as linhagens reduzem a frequência dessa população celular, sendo a redução mais acentuada nos animais C57BL/6. O tSNE foi realizado na população de macrófagos alveolares (CD45<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (Figura 43B-E) e o programa rPhenograph foi capaz de identificar 10 tipos clusters. Os clusters 5, 7 e 8 estavam mais presentes nos animais C57BL/6 0dpi e estes apresentaram alta expressão de IL-4 IL-17. Os clusters 6, 9 e 10 foram observados principalmente nos camundongos C57BL/6 3dpi, e apresentaram expressão média de IL-4, IL-10, IL-17, HLA-DR. Os clusters 1, 2, 3 e 4 estavam presentes, de forma similar, nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup> e eles tiveram alta expressão de IL-17 e IL-4 e média expressão HLA-DR. A expressão de CD11c e Siglec-F foi alta em todos os clusters, confirmando a marcação dos macrófagos alveolares. Assim, observamos que a infecção por *T. canis* induz nos macrófagos alveolares o aumento da expressão de IL-10 dos camundongos C57BL/6 3dpi, e como esperado, os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> aumentaram a expressão de IL-17.



**Figura 43.** Análise do BAL por citometria dos macrófagos alveolares nos camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. (A) Frequência de macrófagos alveolares (CD45<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) no BAL; (B) tSNE de macrófagos alveolares destacando os grupos experimentais C57BL/6 0dpi (azul), C57BL/6 3dpi (roxo), IL17RA<sup>-/-</sup> 0dpi (vermelho) e IL17RA<sup>-/-</sup> 3dpi (verde); (C) tSNE de “B” representando análise de cluster por Rphenograph; (D) Heat Map com expressão de marcadores por cluster; (E) tSNE de “B” destacando clusters de macrófagos alveolares por grupo. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Ao analisar os dados pelo tSNE (Figura 44A-C) observamos 3 populações: CD4<sup>+</sup>, eosinófilo (SiglecF<sup>+</sup>) e neutrófilos (SiglecF<sup>-</sup> e Ly6G<sup>+</sup>). Não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação às populações de células CD4<sup>+</sup>. A população de eosinófilos esteve distribuída igualmente em todos os grupos, enquanto que de neutrófilos os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi apresentaram maior frequência comparado ao C57BL/6 0dpi. Nos grupos infectados, os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi reduziram a frequência, comparados ao C57BL/6 3dpi (Figura 44D). Após a diferenciação das populações de CD4<sup>+</sup>, eosinófilo e neutrófilos pelo tSNE, o programa rPhenograph identificou uma única população de CD4<sup>+</sup>, 3 populações de eosinófilos e 7 populações de neutrófilos (Figura 44E-G). A população de CD4<sup>+</sup> apresentou alta expressão de IL-17, estando frequente nos grupos infectados. A população de eosinófilo E1 teve expressão média de HLA-DR e foi observado maior frequência nos animais C57BL/6 0dpi. A população E2 teve alta expressão de IL-17 e média de IL-4 e HLA-DR, e foi mais frequente nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup>. A população E3 apresentou alta expressão de IL-4 e média de IL-10 e IL-17 e esteve mais frequente nos grupos infectados. Ao analisar as populações de neutrófilos observamos que a expressão de IL-17 foi mais alta nos clusters N3, N4 e N7 estando a N3 mais frequente no grupo C57BL/6 3dpi, o N4 no IL-17RA<sup>-/-</sup> 0dpi e o N7 no grupo IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi. A expressão mais alta de HLA-DR foi nos clusters N2 e N4 estando frequente nos grupos não infectados. A IL-4 foi mais expressa no cluster N7 presente no grupo IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi. A IL-10 teve maior expressão nos clusters N2, N4 e N5 que foram mais frequentes nos grupos não infectados. Dessa forma observamos que a infecção por *T. canis* induz aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IL-17, eosinófilos produtores de IL-4, IL-17 e IL-10 e neutrófilos produtores de IL-17 e de IL-4, sendo mais frequentes nos animais C57BL/6 3dpi e IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi, respectivamente.

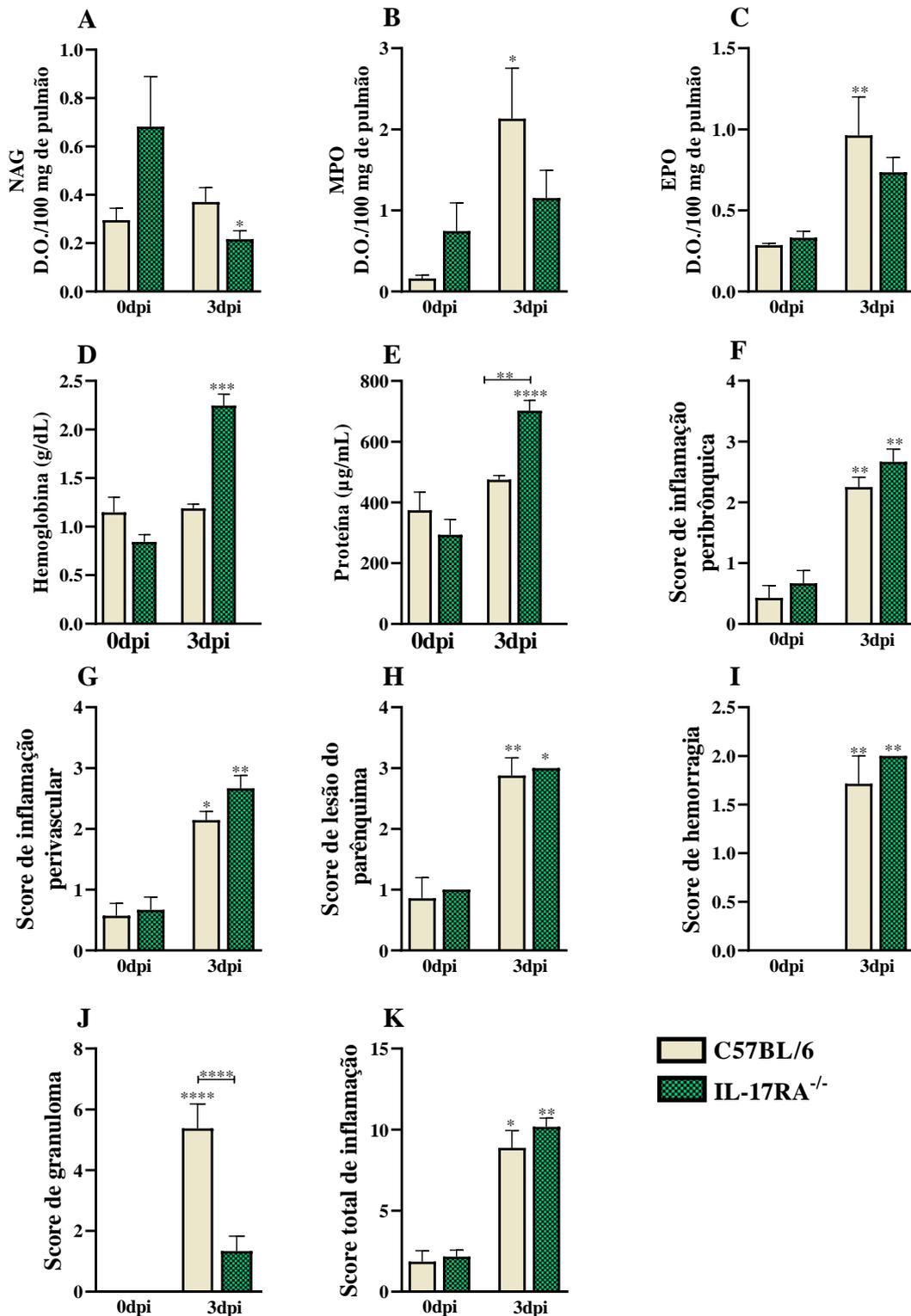


**Figura 44.** Análise do BAL por citometria de eosinófilos, CD4<sup>+</sup> e neutrófilos nos camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. (A) tSNE de

CD4<sup>+</sup> (verde), Eosinófilo (azul), Neutrófilo (roxo); (B) tSNE de “A” nos diferentes grupos experimentais; (C) Frequência de eosinófilos, CD4<sup>+</sup> e neutrófilos no BAL; (D) Heat Map confirmando as populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>), Neutrófilo (Ly6G<sup>+</sup>) e eosinófilos (Siglec F<sup>+</sup>); (E) Heat Map com expressão de marcadores por cluster; (F) tSNE de “A” representando análise de cluster por Rphenograph; (G) tSNE de “A” destacando clusters de eosinófilos, CD4<sup>+</sup> e neutrófilos por grupo. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média ± Erro padrão da média, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

### **7.5 A via IL-17/IL-17RA aumenta o número de granulomas, mas não altera a fisiologia pulmonar durante a fase aguda da infecção por *T. canis***

Ao analisar a atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no parênquima pulmonar, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos infectados em relação a atividade de neutrófilos e eosinófilos (Figura 45). Os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi apresentaram maior concentração de proteínas comparado ao C57BL/6 3dpi, provavelmente em consequência da maior carga parasitária. Na análise histopatológica não observamos diferenças significativas nos scores de inflamação e hemorragia, contudo, os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi reduziram o número de granulomas em relação ao grupo ao C57BL/6 3dpi.



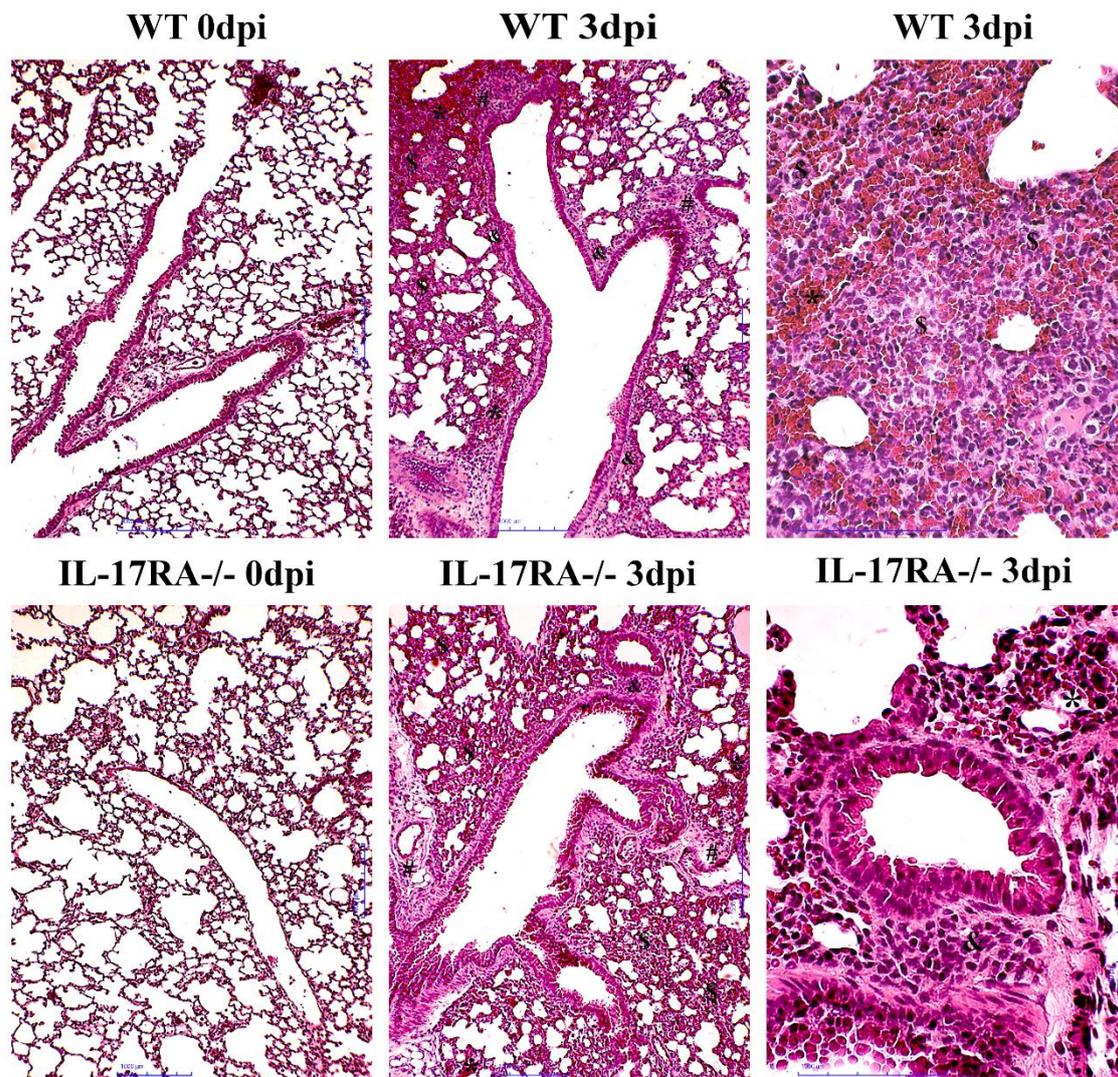
**Figura 45.** Caracterização da inflamação no parênquima pulmonar em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados por *T. canis*. (A) Atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido pulmonar; (B) Atividade de mieloperoxidase (MPO); (C) Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO); (D) Quantificação de hemoglobina no lavado broncoalveolar (BAL); (E) Níveis de proteína total no BAL (F) Score de inflamação peribrônquica; (G) Score de inflamação perivascular; (H) Score de lesão do parênquima;

(I) Score de hemorragia; (J) Score de granuloma; (K) Score total de inflamação. As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foram usados o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Ao realizarmos análise histopatológica do parênquima pulmonar descrevermos as lesões do parênquima pulmonar provocadas pela migração larval do parasita, quanto a topografia, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, granulomas, fenômenos vasculares e exsudativos (Figura 46).

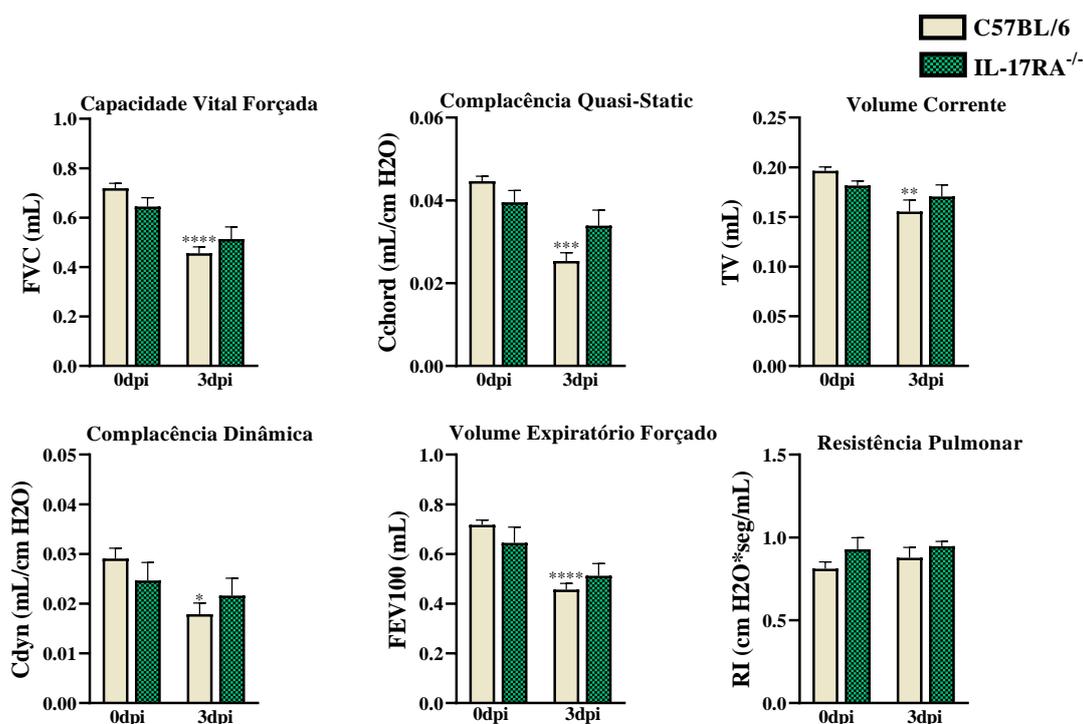
Os camundongos não infectados exibiram aspecto morfológico habitual, sem alterações histopatológicas. Nos camundongos C57BL/6 3dpi foi observado espessamento dos septos interalveolares, as custas do infiltrado inflamatório misto caracterizado por eosinófilos e neutrófilos, macrófagos e em menor quantidade constituído por linfócitos. Frequentemente foram observados em todos os camundongos a presença de granulomas na fase exsudativa, compostos por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Também foram evidenciados fenômenos exsudativos como edema perivascular, áreas hemorrágicas. E frequentemente foi observado hipertrofia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos. A maioria dos animais do grupo apresentavam larvas dispersas no parênquima pulmonar e frequentemente próximas das zonas hemorrágicas.

Nos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi foi observado aumento do espessamento dos septos interalveolares as custas do infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por macrófagos e linfócitos, por vezes foram encontrados neutrófilos e eosinófilos. Foram observados em alguns camundongos, a presença de granulomas na fase exsudativa, compostos por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Os granulomas observados nos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> estavam em menor número e menores quando comparados com os observados no grupo C57BL/6 3dpi. Frequentemente foram evidenciados fenômenos exsudativos como edema perivascular, grandes áreas hemorrágicas, bem como congestão vascular, contribuindo para aparência espessa dos septos alveolares, além de hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio brônquico. Em todos os animais foram observadas larvas dispersas no parênquima pulmonar e frequentemente próximas das zonas hemorrágicas.



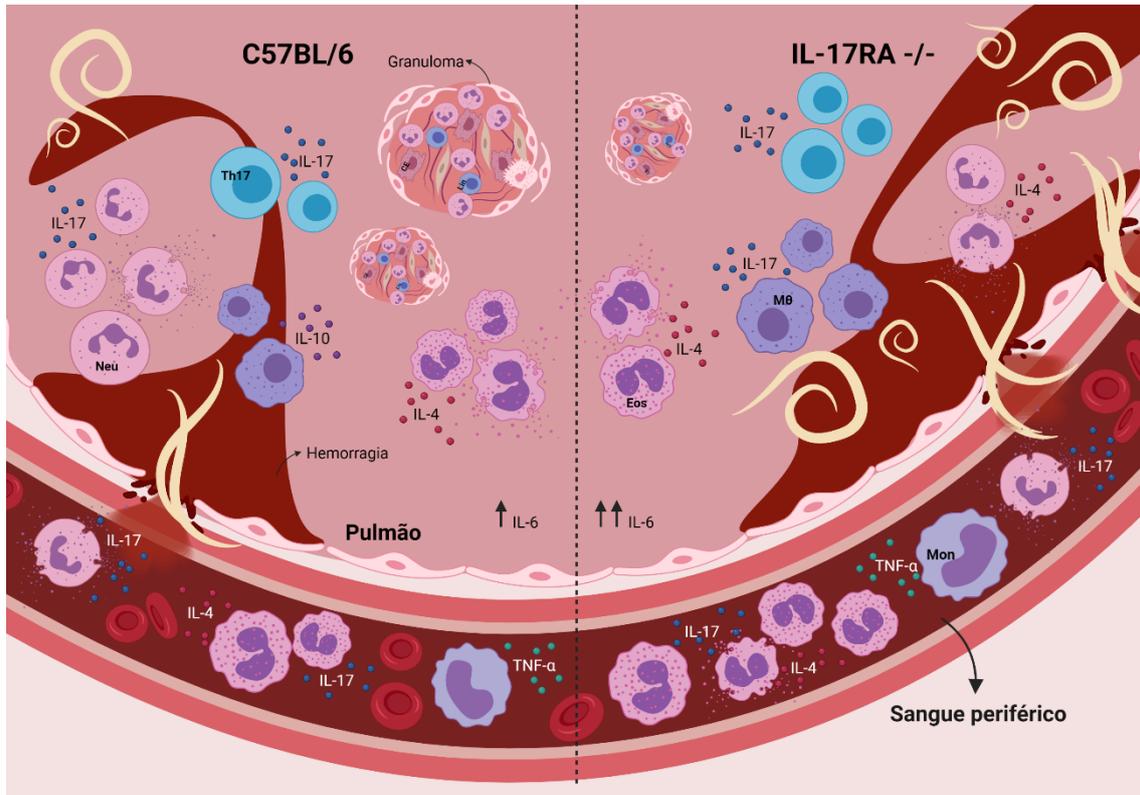
**Figura 46.** Histopatologia do tecido pulmonar em camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis*. Coloração representativa de hematoxilina e eosina de secções de pulmão. Área de hemorragia (\*), inflamação do parênquima (\$), inflamação das vias aéreas (&), inflamação vascular (#). Barra = 1000µm.

Ao analisar a fisiologia pulmonar por meio de espirometria (Figura 47), foi observado que a infecção por *T. canis* nos animais C57BL/6 reduziu a capacidade vital forçada (FVC), complacência *quasi-static* (Cchord), volume corrente (TV), complacência dinâmica (Cdyn) e o volume expiratório forçado (FEV100), comparado ao seu controle não infectado. Nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup> não foi observada diferença estatística em nenhum parâmetro analisado.



**Figura 47.** Análise da função respiratória de camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados com *T. canis* com 3dpi. As variáveis da mecânica pulmonar foram quantificadas: capacidade vital forçada (FVC), complacência *quasi-static* (Cchord), volume corrente (TV), complacência dinâmica (Cdyn), volume expiratório forçado (FEV100) e resistência pulmonar (RI). As análises estatísticas foram feitas entre cada linhagem com seu grupo não infectado (0dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre as duas linhagens no mesmo tempo da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Dados representados em média  $\pm$  Erro padrão da média, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Com base no exposto nesse capítulo, sugerimos que a resposta Th17 é importante para o controle da carga parasitária na fase aguda da infecção por *T. canis*, e que as fontes da citocina IL-17 provêm tanto de linfócitos Th17, quanto das células da imunidade inata, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Contudo, é importante ressaltar que a presença da resposta Th17 amplia a formação de granulomas gerando danos teciduais importantes (Figura 48).



**Figura 48.** Influência do receptor IL-17RA na infecção por *T. canis*. A ausência do receptor IL-17RA durante a infecção por *T. canis* aumenta a frequência de eosinófilos no sangue, contribui para o aumento da carga parasitária pulmonar e da produção de IL-6 e reduz a frequência de neutrófilos secretores de IL-17 e o número de granulomas nos pulmões.

## 8 DISCUSSÃO

---

As doenças causadas por helmintos são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e, por serem negligenciadas, o desenvolvimento de fármacos, vacinas, novas metodologias diagnósticas e o maior conhecimento acerca do desenvolvimento da resposta imunológica ainda são muito escassos (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE, 2002). Dentre as doenças helmínticas negligenciadas está a toxocarose, uma zoonose prevalente em todo mundo, que causa morbidade muito relevante, sendo um problema de saúde pública. Dessa forma, destaca-se a importância deste trabalho que tem como objetivo principal a ampliação do conhecimento a respeito da fisiopatologia e interações imunológicas causada pela infecção do *Toxocara canis*.

Na toxocarose murina há duas fases de migração larval, a primeira fase caracterizada pela migração visceral, com a predominância de larvas no fígado e nos pulmões, conhecida como fase hepato-pulmonar e, mais tardiamente, as larvas migram para o cérebro, os músculos e os olhos, conhecida como fase miotrópica-neurotrópica, (DOS SANTOS et al., 2017). Em nosso estudo observamos estas duas fases, com pico da fase hepato-pulmonar com 3dpi e pico da fase neurotrópica com 14dpi. Para avaliar a fase crônica da doença, incluímos o tempo de 63dpi, a fim de verificar os danos causados pela migração larval e a sobrevivência das larvas na fase tardia. Resende et al., (2015) observaram resultados semelhantes ao nosso estudo em camundongos BALB/c, com predomínio de larvas no fígado e nos pulmões no início da infecção e, posteriormente, no cérebro. Contudo, é importante salientar que as larvas podem migrar pra outros locais como coração e tecidos musculares (MA et al., 2018), que não foram avaliados em nosso estudo.

Durante as infecções helmínticas os granulócitos são considerados um dos tipos celulares mais relevantes na resposta imune, entre eles: eosinófilos, neutrófilos e basófilos, e dependendo do tipo de infecção, os leucócitos podem ter função protetora, imunopatológica e até facilitar o estabelecimento dos helmintos no hospedeiro (MAKEPEACE et al., 2012). Dentre os granulócitos, os eosinófilos têm um papel importante nas infecções helmínticas auxiliam no processo inflamatório, desencadeiam mecanismos de citotoxicidade contra parasitos e podem atuar como células apresentadoras de antígenos (SHI; JIANG, 1999; USTUN et al., 2004).

Na infecção por *T. canis*, ocorre a atração de neutrófilos seguida da ativação de eosinófilos, que geralmente estão aumentados durante o período agudo da fase de inflamação, contudo podem persistir até a fase crônica da infecção (HOLLAND; SMITH, 2006). Em nosso estudo foi observada eosinofilia nas linhagens BALB/c, ST2<sup>-/-</sup>, C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup>, sobretudo na fase hepato-pulmonar, corroborando com dados na literatura.

Margareth et al. (2014) observaram em camundongos BALB/c infectados com 500 ovos de *T. canis* o pico de eosinofilia no sangue periférico com 18dpi. Outro estudo observou aumento de eosinófilos já com 4dpi, persistindo até a fase crônica com 45dpi em camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos de *T. canis* (PECINALI et al., 2005). Os animais BALB/c apresentaram um pico de eosinofilia mais acentuado que os animais deficientes, o que já é esperado nos animais GATA1<sup>-/-</sup> visto que são deficientes de eosinófilos. Nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> a eosinofilia pode ter sido menor em decorrência da ausência da IL-33. A IL-33 é conhecida por atuar como uma alarmina, isto é, age na sinalização de danos celulares e na patogênese de doenças inflamatórias (NILE et al., 2010). Estudos têm indicado que há uma intensa relação entre os eosinófilos e a citocina IL-33, pois ela atua diretamente nos eosinófilos e tem papel na regulação da biologia dessa célula, incluindo sua sobrevivência, ativação e adesão (JOHNSTON; BRYCE, 2017). Como mostrado na análise de citometria do sangue, os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> aumentaram a frequência de eosinófilos ao serem infectados com *T. canis*, comparados aos C57BL/6. Também demonstramos que algumas populações de eosinófilos possuem alta expressão de IL-17 e IL-4. Os eosinófilos humanos expressam, constitutivamente, receptores para IL-17A e IL-17F e supõe-se que sua ativação mediada por Th17 poderia induzir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (CHEUNG; WONG; LAM, 2008). Dessa forma, na ausência do receptor de IL-17, os eosinófilos parecem ser recrutados na tentativa de ampliar a resposta IL-17 e, conseqüentemente, a inflamação.

Os neutrófilos são as primeiras células da imunidade inata ao chegarem ao local de lesão. No presente estudo, eles demonstraram ser produtores de IL-17 e IL-4, principalmente, nos camundongos infectados. Estudos têm relatado o papel dos neutrófilos como produtores da IL-17 na psoríase, doenças autoimunes e infecções bacterianas e infecções helmínticas. Na infecção por *Nippostrongylus brasiliensis*, por exemplo, um fenótipo de neutrófilos alternativamente ativado (N2), conduz o desenvolvimento de um fenótipo de macrófago M2, de longa duração, que, subsequentemente medeia o dano larval parasitário (CHEN et al., 2014; HU et al., 2017; LI et al., 2010; LIN et al., 2011).

Além dos neutrófilos, outra fonte importante das citocinas IL-4, IL-17 e TNF- $\alpha$  são os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, como demonstrado em nosso estudo. Nos animais C57BL/6 com 3dpi observamos alta expressão dessas citocinas e dos marcadores de ativação CD69 e CD27 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue. O CD27 é uma molécula de coestimulação expressa em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> *naives* e, diferente de outros membros da família de receptores de TNF, é liberado da superfície celular, após a ativação das células T (WINKELS et al., 2017). O CD69 é um marcador expresso na superfície dos linfócitos T, após o envolvimento do receptor de célula T (TCR) com CD3; ele ativa citocinas, faz estimulação policlonal mitogênica, realiza o direcionamento e, migração de linfócitos e parece ser um controlador precoce da diferenciação Th17, impedindo a diferenciação das células T em direção a Th17 (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017; MARTÍN et al., 2010). Rodolpho et al. (2018) demonstraram que, durante a infecção por *T. canis* e, BALB/c, os eosinófilos do sangue periférico apresentam uma expressão regulada positivamente de marcadores de ativação, como o CD69, MHC-II, CD80, CD86, assim como demonstrado em nosso estudo, bem como o aumento da expressão de CD69 e HLA-DR em neutrófilos.

Ao analisar as células presentes no sangue de camundongos C57BL/6 e IL-17RA<sup>-/-</sup> observamos a presença de monócitos clássicos e não clássicos e nos animais infectados essas células apresentaram maior expressão de TNF- $\alpha$ . Os monócitos clássicos são células essenciais para o início da resposta inflamatória inicial, enquanto os monócitos não clássicos têm sido amplamente vistos como anti-inflamatórios, mantendo a homeostase vascular. Já o TNF- $\alpha$  parece desempenhar um papel crucial na regulação da sobrevivência e função dos monócitos na periferia, e é secretado principalmente, pelos monócitos clássicos (CHEUNG; WONG; LAM, 2008; STANSFIELD; INGRAM, 2015). No soro de pacientes infectados com *T. canis* foi observado aumento de TNF- $\alpha$  e IL-10 (OLANIYAN; AZEEZ, 2019), por outro lado, Resende et al. (2015) não observaram aumentos significativos para os níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  em camundongos infectados por *T. canis*. No sangue periférico de camundongos infectados com *T. canis* também foi observado aumento das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, mas não de TNF- $\alpha$  (RUIZ-MANZANO et al., 2019).

Depois que as larvas são liberadas dos ovos no intestino, elas penetram a parede intestinal e, via sistema circulatório, migram primeiro para o fígado (MA et al., 2018). As larvas de *T. canis* chegam ao fígado com 1dpi e na fase inicial da infecção já é possível observar focos inflamatórios dispersos por todo o parênquima hepático (BISSERU, 1969;

RESENDE et al., 2015). Em nosso estudo, os camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram menor carga parasitária na fase inicial da infecção e na fase tardia foi observado redução de áreas inflamatórias com presença de poucos eosinófilos e número reduzido de granulomas. Acreditamos que a redução da carga parasitária nos animais ST2<sup>-/-</sup> pode estar relacionada ao aparecimento da resposta imune inata, com aumento de focos inflamatórios hepáticos com 1dpi ou pela influência da microbiota intestinal. Estudos mostram que existe uma diferença na microbiota intestinal entre diferentes linhagens de camundongos, e o desequilíbrio dessa resposta imune pode alterar a resposta imunológica do indivíduo (IVANOV; LITTMAN, 2010), portanto, a microbiota intestinal de camundongos ST2<sup>-/-</sup> pode estar dificultando a penetração de larvas para a mucosa intestinal, ou as bactérias da microbiota podem se translocar junto com as larvas para o tecido hepático, desencadeando uma resposta imune diferenciada nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>.

Os camundongos GATA1<sup>-/-</sup> apresentaram resultados semelhantes aos ST2<sup>-/-</sup> na fase tardia da infecção, com redução da atividade de neutrófilos e ausência de granulomas. Nesses últimos, a análise histopatológica hepática, na fase inicial da infecção, demonstrou a presença de focos inflamatórios compostos por linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos; e na fase crônica, foram observados muitos granulomas exsudativos e produtivos e zonas de necrose. Fan et al., (2004), usando camundongos ICR infectados com 250 ovos de *T. canis*, observaram aumento de ALT com 3dpi e a análise histopatológica mostrou uma resposta inflamatória granulomatosa no parênquima, com infiltração leucocitária aparente, incluindo granulócitos polimorfonucleares e linfócitos. A partir de 4 semanas após a infecção, as lesões granulomatosas eram maiores, com infiltrado leucocitário e células gigantes multinucleadas e presença de granulomas organizados. Resende et al. (2015), utilizando a mesma quantidade de ovos que em nosso estudo (1000 ovos de *T. canis*), observaram lesões no parênquima hepático com 14dpi, caracterizadas por áreas extensas com intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e eosinófilos, e áreas com necrose hepática moderada. Um papel combinado de macrófagos e eosinófilos foi proposto como chave nos mecanismos de formação de granuloma durante infecções por helmintos (ARIYARATNE; FINNEY, 2019).

A IL-33 está relacionada ao aumento de eosinófilos e, embora esta célula seja considerada importante para o controle de infecções por helmintos, estudos sugerem que na infecção por *T. canis*, os eosinófilos podem ter uma capacidade limitada de matar esses helmintos. Além disso, o acúmulo e ativação inadequados de eosinófilos podem resultar

em dano direto ao tecido por meio da liberação de proteínas granulares altamente citotóxicas (JOHNSTON; BRYCE, 2017; KITA, 2011; RANKIN; CONROY; WILLIAMS, 2000; ROCKEY et al., 1983; TAKAMOTO et al., 1997). Assim, a redução/ausência dos eosinófilos pode estar contribuindo para que os camundongos ST2<sup>-/-</sup> e GATA1<sup>-/-</sup> apresentem menos inflamação hepática e granulomas nos tempos mais tardios da infecção.

Durante a migração, as larvas de *T. canis* causam danos aos tecidos e provocam reações inflamatórias, com presença no infiltrado dos pulmões de camundongos infectados de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (PINELLI et al., 2005). Em nosso estudo, observamos, na fase inicial da infecção, nos camundongos GATA1<sup>-/-</sup>, redução da carga parasitária, aumento da atividade de macrófagos e aumento de neutrófilos no BAL, aliado ao aumento das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 e IL-13. Ao contrário desses resultados, observamos nos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> aumento da carga parasitária pulmonar na fase inicial da infecção, com redução da frequência de neutrófilos e aumento da citocina IL-6. Nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> embora a carga pulmonar não tenha se modificado, observamos aumento das citocinas IL-13, IL-17 e IL-1 $\beta$  e diminuição de IL-5 e de eosinófilos.

Em várias infecções por helmintos, as células Th2 produtoras de IL-4, IL-13 e IL-5 estão relacionadas aos mecanismos efetores mais importantes na imunidade pulmonar adaptativa. Pinelli et al., (2007) observaram em camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos de *T. canis* e 7dpi, aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 nos pulmões. Pecinali et al., (2005), utilizando a mesma quantidade de ovos na infecção, observaram aumento das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  no BAL e no plasma com 4dpi, demonstrando a presença de citocinas das respostas Th1 e Th2, assim como em nosso estudo.

A IL-33 atua diretamente nos eosinófilos e induz a produção de citocinas associadas ao tipo 2, a partir de vários tipos de células, incluindo células Th2, ILC2s, mastócitos e basófilos, bem como células epiteliais e endoteliais e, conseqüentemente, afeta a inflamação eosinofílica pela indução de IL-5, que é uma citocina conhecida por ativar os eosinófilos. A via IL-33/ST2 foi capaz de estimular a eosinofilia em camundongos IL-4<sup>-/-</sup> por meio da produção de IL-5 por ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante o modelo de asma induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008). Assim, a redução da IL-5 nesses animais pode estar diretamente relacionada à ausência da via IL-33/ST2.

Em relação a IL-1 $\beta$ , ainda não há relatos de aumento dessa citocina nos pulmões de camundongos infectados com *T. canis*, porém foi observado que macrófagos THP-1 humanos estimulados por TES foram capazes de produzir IL-1 $\beta$  *in vitro*, e foi observado no cérebro de camundongos infectados com *T. canis* com 8 semanas pós-infecção aumento da expressão de proteínas precursoras de IL-1 $\beta$  (CHOU et al., 2017; DŁUGOSZ; BASAŁAJ; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, 2019). Estudos em modelos animais revelam que o papel da IL-1 $\beta$  na imunidade tipo 2 é complexo e específico do patógeno e que, embora esta citocina seja conhecida por promover respostas Th1 e Th17, ela também pode participar da imunidade mediada por linfócitos Th2 (FERGUSON et al., 2015; HELMBY; GRENCIS, 2004). Zaiss et al. (2013) observaram que o nematoide *Heligmosomoides polygyrus* é capaz de induzir a secreção de IL-1 $\beta$  no intestino e suprimir a produção das citocinas inatas IL-25 e IL-33, resultando em imunidade subótima do tipo 2 e permitindo a cronicidade do patógeno. A IL-1 $\beta$  também foi associada à indução de inflamação neutrofílica e aumento da expressão de IL-33 em camundongos com asma induzida por vírus (MAHMUTOVIC PERSSON et al., 2018).

Neutrófilos e eosinófilos demonstraram estar envolvidos na aderência aos helmintos, incluindo nas larvas de *T. canis* (HUWER; SANFT; AHMED, 1989). Ao contrário de outras helmitoses, na toxocarose não parece haver ligação entre os eosinófilos e a morte de larvas, pois estudos demonstram que mesmo após à aderência do eosinófilo às larvas de *T. canis* e degranulação dessas células, as larvas permanecem vivas e sem lesões e, muito possivelmente, isso reflete o capacidade evolutiva das larvas em criarem mecanismos de escape ao sofrerem ataque de eosinófilos (FATTAH et al., 1986; HOLLAND; SMITH, 2006). Nosso estudo confirma esses achados, de que os eosinófilos não são capazes de reduzir a carga parasitária na infecção por *T. canis*. Nos animais GATA1<sup>-/-</sup> 3dpi parece haver uma relação inversa entre o número de larvas recuperadas nos pulmões e o número de neutrófilos encontrados no BAL, porém estudos *in vitro* demonstraram que os neutrófilos também não são capazes de matar as larvas de *T. canis*. Embora sabe-se que a resposta *in vivo* e *in vitro* são diferentes, e que os leucócitos são plásticos e heterogêneos, sendo capazes de se adaptar aos microambientes, modificando suas propriedades fenotípicas e funções (NATOLI; OSTUNI, 2019; NG; OSTUNI; HIDALGO, 2019). Dessa forma não podemos descartar a possibilidade dos neutrófilos serem células atuantes e importantes no combate as larvas de *T. canis*.

Estudos têm ampliado a relação da IL-17 com infecções por helmintos. Nogueira et al., (2016) observaram que camundongos, após múltiplas exposições a *Ascaris suum*

exibiram maior controle da migração larval devido à intensa inflamação pulmonar associada a uma resposta imune Th2/Th17 sistêmica. Na esquistossomose murina, a ausência de sinalização de IL-17A foi relacionada a redução da fibrose hepática (ZHANG et al., 2015). Resende et al. (2015) demonstraram que na toxocarose existe uma mistura de respostas inflamatórias Th2 e Th17, observada pelo aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-6 e IL-17 no soro de camundongos, durante a fase de migração larval, mostrando que larvas de *T. canis* são capazes de desencadear a resposta Th17.

Em nosso estudo, observamos que a IL-17 tem grande importância na resposta contra a infecção por *T. canis*, sendo produzida por diversas células no BAL, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, conforme demonstrado pela técnica de citometria. Também observamos que os animais C57BL/6 3dpi aumentaram a frequência de neutrófilos, expressando mais IL-17, enquanto nos animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi houve alta expressão de IL-4. Os neutrófilos expressam e produzem citocinas constitutivamente ou mediante ativação por estímulo microambiental e podem ser fonte significativa de citocinas pró-inflamatórias e/ou imunorreguladoras, as principais citocinas secretadas são IL-17 e IFN- $\gamma$ , contudo estudos também já relataram a produção de IL-4, IL-1ra e TGF- $\beta$  (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014).

Além dos linfócitos Th17, outras células demonstraram ser fontes de IL-17, como as células T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T $\gamma\delta$ , células NK, ILC3 e células da linhagem mieloide, incluindo neutrófilos e micróglia (MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019). A IL-17 tem se mostrado essencial no recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos no combate a bactérias extracelulares e fungos, em superfícies mucosas e, na pele, ela contribui para a homeostase epitelial e estimula células B, agindo como uma ponte entre as respostas imunes inata e adquirida (RUIZ DE MORALES et al., 2020). Embora o seu efeito mais conhecido seja o de induzir a inflamação, de forma isolada, a IL-17 não é tão potente, pois sua maior função é a de recrutar células imunes e agir de forma sinérgicas com outras citocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-22. Dessa forma acreditamos que, no combate às larvas de *T. canis*, a IL-17 seja o componente principal, contudo, é necessário a ação sinérgica com outros componentes do sistema imunológico.

Os macrófagos alveolares devido a exposição à alta pressão parcial de oxigênio, surfactante e sinais fornecidos por células alveolares tipo I e II produzem um fenótipo distinto de outras células, que os permitem ser diferenciados de células derivadas de monócitos transitórios recrutadas para o espaço alveolar durante a lesão tecidual. A identificação desses macrófagos é feita pela expressão de altos níveis de integrina CD11c

e da lectina Siglec F (JOSHI; WALTER; MISHARIN, 2018). Em nosso estudo observamos que os macrófagos alveolares estavam presentes em todos os grupos e, demonstramos que os animais IL-17RA<sup>-/-</sup>, independente da infecção com *T. canis*, tiveram alta expressão de IL-17, enquanto que os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> 3dpi apresentaram menor expressão de IL-10 comparado ao C57BL/6 3dpi. Acreditamos que a alta expressão de IL-17, está relacionado à tentativa de equilibrar a resposta imunológica e aumentar a produção dessa citocina que não está atuante nesses animais. Não há relatos da expressão de IL-17 em macrófagos alveolares de camundongos infectados com *T. canis*, contudo foi demonstrado que eles foram os principais produtores de IL-17 na inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA (SONG et al., 2008), demonstrando seu papel durante processos inflamatórios nos pulmões.

A IL-10 é considerada uma citocina reguladora, visto que ela atua como um potente regulador de *feedback* negativo que efetua o controle e a resolução da inflamação. Esse efeito é amplo e ocorre em níveis celulares e humorais, podendo inibir a apresentação de antígenos por células dendríticas e inibir a ativação de macrófagos e infiltração celular no local da lesão, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias (O’GARRA et al., 2008; STEEN et al., 2020). Os macrófagos M2 são principalmente ativados por IL-4/IL-13 e IL-10 em resposta à lesão e eles agem para promover a cicatrização de feridas, atenuando a inflamação e estimulando a formação da matriz extracelular (STEEN et al., 2020; WYNN; BARRON, 2010). Acreditamos que essa expressão elevada de IL-10 nos macrófagos alveolares nos animais C57BL/6 dpi seja uma tentativa do sistema imunológico em minimizar os efeitos inflamatórios da resposta Th17 nos pulmões.

Nos pulmões, o receptor IL-17RA é expresso em fibroblastos pulmonares, células endoteliais pulmonares e células do músculo liso das vias aéreas; e a sinalização por meio desse receptor induz a produção de quimiocinas, assim como da citocina IL-6 (WEAVER et al., 2013). Em nosso estudo, a citocina IL-17 mostrou ser a principal citocina produzida pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no BAL na infecção por *T. canis*. Embora haja muitas evidências de que as citocinas efectoras dos linfócitos Th17 podem desempenhar papéis protetores contra agentes infecciosos no pulmão, há evidências crescentes de que essa via também pode resultar em patologia pulmonar (WEAVER et al., 2013).

As infecções por *T. canis* nos pulmões são caracterizadas por inflamação pulmonar persistente, a presença de hemoglobina e extravasamento de proteínas, que alteram a permeabilidade vascular; hiperresponsividade das vias aéreas e, frequentemente, são observados a presença de granulomas (BUIJS et al., 1994; KAYES; JONES; OMHOLT,

1988; PINELLI et al., 2005). Pinelli et al., (2007) ao analisarem a histopatologia pulmonar de animais BALB/c infectados com 100 e 1000 ovos de *T. canis*, mostraram que a infecção causou infiltração perivascular e inflamação peribronquiolar nos pulmões, com a presença de eosinófilos e linfócitos, e alveolite com a presença de macrófagos e hemorragia, do 7dpi até 60dpi. Em camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos de *T. canis* foi observado lesões parenquimatosas, com espessamento do septo, infiltrado inflamatório intenso e presença de áreas hemorrágicas (RESENDE et al., 2015), assim como demonstrado nos camundongos selvagens em nosso estudo. Também observamos que os camundongos ST2<sup>-/-</sup>, GATA1<sup>-/-</sup> e IL-17RA<sup>-/-</sup> infectados desenvolveram menos granulomas comparado aos selvagens. Na infecção por *T. canis* as larvas desencadeiam a formação de granulomas no tecido pulmonar, que são compostos principalmente por eosinófilos e, posteriormente, por macrófagos. Os granulomas são formados como consequência da persistência crônica do antígeno ou parasito, na tentativa de contê-los, o problema é que geralmente resulta na formação de tecido cicatricial, com consequente redução da função do órgão (ARIYARATNE; FINNEY, 2019; KAYES; ADAMS OAKS, 1978; SALES et al., 2017).

Estudos mostraram que camundongos ST2<sup>-/-</sup> com hiperresponsividade das vias aéreas induzida por alérgeno (AHR) apresentaram inflamação reduzida nas vias aéreas periféricas, com presença de eosinófilos e macrófagos no BAL, apresentando resultado semelhante ao nosso estudo, sugerindo que a via IL-33/ST2 é importante para o influxo desses tipos de células nas vias aéreas (ZOLTOWSKA et al., 2016). Townsend et al. (2000) utilizando um modelo de formação de granuloma pulmonar induzido por ovos de *Schistosoma mansoni*, demonstraram que a formação de granuloma pulmonar primário é inibida em camundongos ST2<sup>-/-</sup>, além de reduzir os eosinófilos nos pulmões, ou seja, em concordância com o estudo, a via IL-33/ST2 é importante para o aumento de eosinófilos e estes, por sua vez, são essenciais para a formação de granulomas na infecção por *T. canis*.

A IL-17A desempenha um papel significativo na maturação do granuloma, desde o estágio inicial até o maduro, e mostrou ser indispensável para a resposta protetora contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* no pulmão (OKAMOTO YOSHIDA et al., 2010). Também foi demonstrado na paracoccidiodomicose que a deficiência de IL-6, IL-23 ou do receptor IL-17RA prejudicou a formação de granuloma e conferiu suscetibilidade durante a infecção (SALES et al., 2017). Assim, demonstramos que a presença do receptor IL-17RA é importante para a formação de granulomas. No entanto

é importante notar que um maior número de granulomas nem sempre está associado a redução da carga parasitária na infecção por *T. canis*, como observado nos resultados de ST2<sup>-/-</sup> e GATA<sup>-/-</sup> e, o aumento desses granulomas podem levar a um comprometimento tecidual.

Ao analisarmos a função pulmonar, na fase inicial da infecção, observamos disfunção pulmonar mecânica nos camundongos infectados, causada pelo aumento do dano tecidual e da exsudação pela migração larval. Mudanças substanciais na fisiologia pulmonar foram observadas nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> em comparação com o BALB/c, provavelmente devido ao maior quadro hemorrágico e à maior atividade macrofágica e redução da inflamação eosinofílica. A resposta imune Th2 nas infecções por helmintos demora vários dias para ser elaborada, entretanto, há um rápido mecanismo de reparo tecidual no início da infecção por helmintos, ocorrendo por meio de macrófagos ativados alternativamente (AAMs), que podem ser rapidamente induzidos por células imunes inatas como ILC2s, que são essenciais para limitar os danos e reparar o tecido afetado (FAZ-LÓPEZ; MORALES-MONTOR; TERRAZAS, 2016). Outro fator a ser observado é que os eosinófilos durante algumas infecções por helmintos, como na toxocarose, liberam proteínas que às vezes são prejudiciais aos tecidos circundantes do hospedeiro, intensificando o dano tecidual (FAZ-LÓPEZ; MORALES-MONTOR; TERRAZAS, 2016; MALHEIRO et al., 2008). A presença do receptor IL-17RA parece não alterar a mecânica pulmonar na fase aguda da infecção, já a via IL-33/ST2 altera a fisiologia pulmonar, piorando o fluxo de ar nas vias aéreas.

Após a migração hepato-pulmonar, as larvas de *T. canis* migram para o cérebro e podem permanecer no tecido cerebral por longos períodos, não encapsuladas e vivas, sugerindo vantagens para o parasita em se acumular em um órgão considerado imunoprivilegiado (BARDÓN; CUÉLLAR; GALÉN, 1994; HOLLAND; HAMILTON, 2013). Hamilton et al. (2008) observaram a expressão gênica de IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no cérebro de camundongos infectados com *T. canis* com 3dpi, persistindo até 42dpi. Outro estudo recente demonstrou aumento das citocinas IL-5 e IL-4 com 28dpi no cérebro de camundongos infectados com *T. canis* quando comparados a camundongos não infectados (WAINDOK; STRUBE, 2019), demonstrando em ambos os estudos, a presença de IL-5. Neste trabalho, observamos que os camundongos ST2<sup>-/-</sup> e GATA1<sup>-/-</sup> apresentaram diminuição da carga parasitária na fase crônica da infecção, que pode estar associada ao tipo de resposta imune local, principalmente, devido ao aumento da atividade de neutrófilos observada nos

camundongos  $GATA1^{-/-}$  63dpi e à redução da atividade eosinofílica nos animais  $ST2^{-/-}$  63dpi, que demonstrou não contribuir para o controle da carga parasitária. A resposta imune sistêmica em outros tecidos, como os pulmões, também pode ter contribuído para evitar que mais larvas migrassem para o cérebro. Ainda assim, não descartamos a possibilidade de que algumas larvas desses animais tenham preferência por migrar para outros tecidos, como os músculos, que não foram estudados neste trabalho.

## 9 CONCLUSÃO

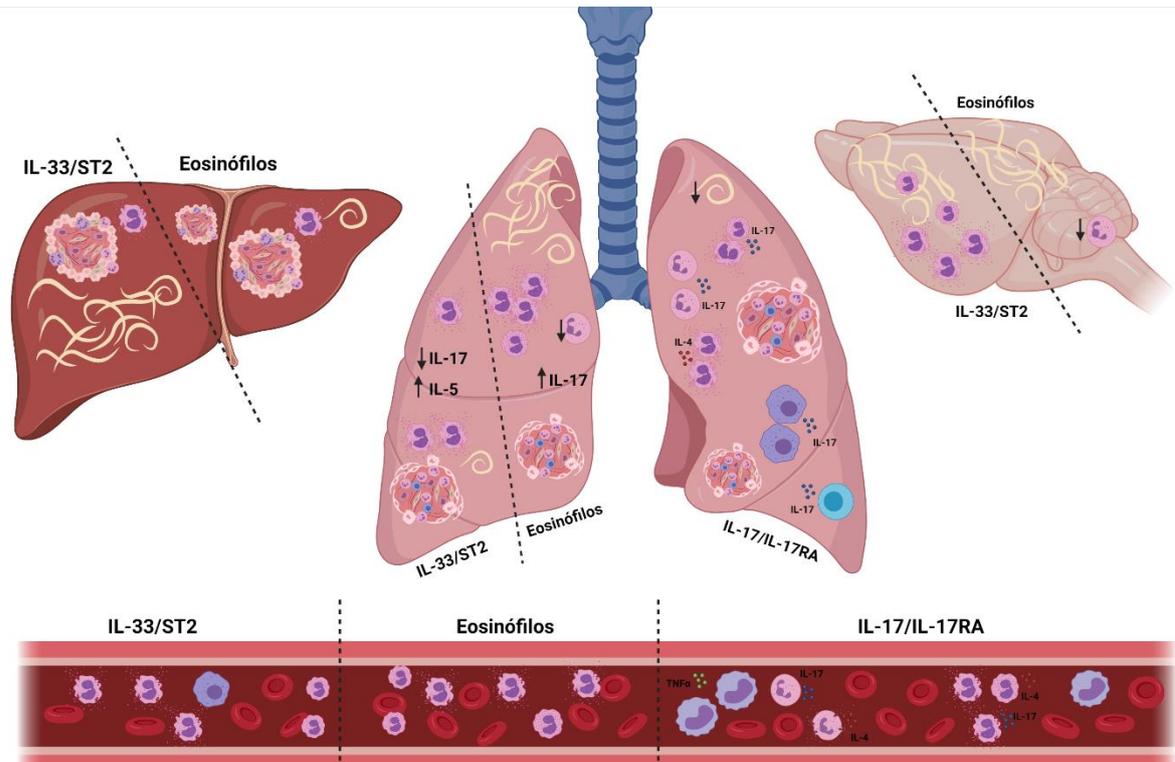
---

Diante dos resultados apresentados, nosso estudo sugere que a presença do receptor IL-17RA e a ausência da via IL-33/ST2 e de eosinófilos são favoráveis para a redução da carga parasitária de *T. canis* no hospedeiro; e que a resposta Th17 e a atividade de neutrófilos parecem ser mais importantes no controle da migração larval (Figura 49).

A via IL-33/ST2 demonstrou influenciar a atividade de eosinófilos, ampliando a eosinofilia, aumentando o número de eosinófilos recrutados nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral, além de reduzir as respostas Th17 e Th1 no tecido pulmonar.

Nosso estudo também mostrou que além dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as células da imunidade inata, como neutrófilos e eosinófilos, também produzem a citocina IL-17 na infecção por *T. canis* e que o microambiente imunológico provocado pela presença das larvas pode modificar a expressão de citocinas e de marcadores de ativação nas células imunológicas.

Por fim, sugerimos que as respostas inflamatórias sistêmicas, hepática, pulmonar e cerebral, desencadeadas para controlar a migração larval, levam ao dano tecidual, sobretudo pela ação dos eosinófilos, que não controlam a carga parasitária e mostraram ser os principais agentes na formação do granuloma hepático e pulmonar.



**Figura 49.** Influência da via IL-33/ST2, eosinófilos e IL-17/IL-17RA na infecção por *T. canis*. A presença da via IL-17/IL-17RA e a ausência da via IL-33/ST2 e de eosinófilos são favoráveis para a redução da carga parasitária de *T. canis* e parecem ser em consequência das respostas Th17 e a atividade de neutrófilos. Entretanto, as respostas inflamatórias desencadeadas para controlar a migração larval, levam ao dano tecidual, sobretudo pela ação dos eosinófilos, que não controlam a carga parasitária e mostraram ser os principais agentes na formação do granuloma na toxocarose.

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Nosso trabalho de caracterização da resposta imunológica na infecção por *T. canis* ampliou o conhecimento a respeito da fisiopatologia e imunologia na relação *Toxocara*-hospedeiro. Nosso estudo foi de caráter básico, com o objetivo de ampliar mais profundamente os mecanismos imunológicos e patológicos desencadeados pelo hospedeiro que podem auxiliar na descoberta de novas terapias imunológicas, no desenvolvimento de vacinas frente a nematódeos e no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas.

Os resultados apresentados mostram que a via IL-33/ST2 e os eosinófilos induzem susceptibilidade à toxocarose e aumentam danos teciduais no fígado e pulmão. Enquanto a via IL-17/IL-17RA está associada à resistência as larvas de *T. canis*, porém leva a formação de granulomas hepáticos e pulmonares. Esses achados são de extrema importância, uma vez que evidencia a necessidade de mais estudos a respeito dessa infecção que é tão negligenciada e possibilita o estudo dessas vias como possíveis alvos terapêutico no controle da migração larval e prevenção de danos aos tecidos durante a infecção, além de promover um maior entendimento da modulação do sistema imunológico por esse parasito.

## 11 REFERÊNCIAS

---

- AHN, S. J.; RYOO, N.-K.; WOO, S. J. Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. **Asia Pacific Allergy**, v. 4, n. 3, p. 134, 2014.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375–388, 2011.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007.
- ARANZAMENDI, C.; SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC, L.; PINELLI, E. Helminths: Immunoregulation and inflammatory diseases - Which side are trichinella spp. and toxocara spp. on? **Journal of Parasitology Research**, v. 2013, 2013.
- ARAUJO, E. S. et al. The role of IL-33/ST2, IL-4, and eosinophils on the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* in BALB/c mice.(Original Paper)(Report). **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, 2016.
- ARIYARATNE, A.; FINNEY, C. A. M. Eosinophils and macrophages within the Th2-induced granuloma: Balancing killing and healing in a tight space. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 10, 2019.
- B. L. MAKEPEACE et al. Granulocytes in Helminth Infection - Who is Calling the Shots? **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1567–1586, 2012.
- BARDÓN, R.; CUÉLLAR, C.; GALÉN, J. L. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. **Journal of Helminthology**, v. 68, n. 4, p. 359–360, 1994.
- BARRERA, M. G. et al. In vivo evaluation of albendazole microspheres for the treatment of *Toxocara canis* larva migrans. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 451–454, 2010.
- BISSERU, B. Studies on the Liver, Lung, Brain and Blood of Experimental Animals Infected with *Toxocara canis*. **Journal of Helminthology**, v. 43, n. 3–4, p. 267–272, 1969.
- BOES, J.; HELWIGH, A. B. Animal models of intestinal nematode infections of humans. **Parasitology**, v. 121, n. S1, p. S97--S111, 2000.
- BROSSCHOT, T. P.; REYNOLDS, L. A. The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity review-article. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 4, p. 1039–1046, 2018.
- BUIJS, J.; LOKHORST, W.H.; ROBINSON, J.; NIJKAMP, F. P. *Toxocara canis*-induced

murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. **Parasite Immunology**, 1994.

CARVALHO, E. A. D. A.; ROCHA, R. L. Toxocaríase: Larva migrans visceral em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 2, p. 100–110, 2011.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites - Toxocariasis. 2013.

CHEN, F. et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 938–946, 2014.

CHEN, H. et al. Cytokit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 9, p. 1–17, 2016.

CHEN, J. et al. Toxocariasis: A silent threat with a progressive public health impact. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2018.

CHEUNG, P. F. Y.; WONG, C. K.; LAM, C. W. K. Molecular Mechanisms of Cytokine and Chemokine Release from Eosinophils Activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: Implication for Th17 Lymphocytes-Mediated Allergic Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5625–5635, 2008.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 273–282, 2001.

CHOU, C. M. et al. Enhanced expressions of neurodegeneration-associated factors, UPS impairment, and excess A $\beta$  accumulation in the hippocampus of mice with persistent cerebral toxocariasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.

COSTA, C. A. X. et al. Study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by. p. 329–334, 2005.

DE LA FUENTE, M.; MACDONALD, T. T.; HERMOSO, M. A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 6, p. 615–623, 2015.

DENT, L. A. et al. Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 989–993, 1999.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and Molecular Aspects Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and

- Molecular Aspects. **Society**, v. 16, n. 2, p. 265–272, 2003.
- DLUGOSZ, E. et al. Toxocara canis mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3365–3371, 2015.
- DLUGOSZ, E.; BASAŁAJ, K.; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A. Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on Toxocara canis glycans. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 2925–2933, 2019.
- DOS SANTOS, S. V. et al. Migration pattern of Toxocara canis larvae in experimentally infected male and female Rattus norvegicus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 698–700, 2017.
- EL-SAYED, N.; RAMADAN, M. Toxocariasis in Children: An Update on Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. v. 12, n. 04, p. 222–227, 2017.
- ELEFANT, G. R. et al. Evaluation of a di-O-methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 236–243, 2016.
- ELSE, K. J. et al. Whipworm and roundworm infections. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.
- ESPINOZA, E. Y. E. et al. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by Toxocara canis in experimentally infected rats. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 11–12, p. 511–520, 2002.
- FAN, C. et al. Enhanced inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by Toxocara canis in mice. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 6–7, p. 273–281, 2004.
- FAN, C. et al. Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 663–686, 2015.
- FATTAH, D. I. et al. Toxocara canis: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. **Experimental Parasitology**, v. 61, n. 3, p. 421–431, 1986.
- FAZ-LÓPEZ, B.; MORALES-MONTOR, J.; TERRAZAS, L. I. Role of Macrophages in the Repair Process during the Tissue Migrating and Resident Helminth Infections. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- FERGUSON, B. J. et al. The Schistosoma mansoni T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 13, p. 809–813, 2015.

- FERREIRA, I. R. S. et al. FREQUENCY OF GEO-HELMINTHS IN RECREATIONAL AREAS OF THE CITY OF. n. October 2015, 2018.
- GAFFEN, S. L. Structure and signaling in the IL-17 receptor superfamily. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 8, p. 1–24, 2010.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. IgG induced by vaccination with ascaris suumExtracts is protective against infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–15, 2018.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H. et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 9, p. 697–706, 2013.
- GIACOMIN, P. R. et al. *Toxocara canis* larval excretory/secretory proteins impair eosinophil-dependent resistance of mice to *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 8, p. 435–445, 2008.
- GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic Reviews**, v. 3, n. 1, p. 230–250, 1981.
- GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M.; CYPESS, R. H. Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 3, p. 254–258, 1979.
- GURRAM, R. K.; ZHU, J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 16, n. 3, p. 225–235, 2019.
- HADI, A. Morphology study of *Toxocara canis* (Werner, 1788) worms by scanning microscope. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 14, n. 03, p. 293–298, 2019.
- HAGAN, H.A.; WILKINS, U. J. B. R. J. H. B. M. G. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immunology**, p. 625–632, 1985.
- HAMILTON, C. M. et al. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 3, p. 181–185, 2008.
- HELMBY, H.; GRENCIS, R. K. Interleukin-1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 12, p. 3674–3681, 2004.
- HOLLAND, C. V. H. V. S. **Toxocara: the enigmatic parasite**. [s.l.] 2006, [s.d.].
- HOLLAND, C. V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: The enigma remains. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 81–94, 2017.
- HOLLAND, C. V.; HAMILTON, C. M. The significance of cerebral toxocariasis: a model

system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 1, p. 78–83, 2013.

HOLLAND, C. V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara* : the enigma remains. n. 2015, 2016.

HORIUCHI, A. et al. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1–2, p. 83–87, 2005.

HOTEZ, P. J.; WILKINS, P. P. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, p. 1–4, 2009.

HU, S. et al. IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **EBioMedicine**, v. 23, p. 88–99, 2017.

HUANG, L. et al. Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection1. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2015.

HUANG, L.; APPLETON, J. A. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 798–807, 2016.

HUMPHREYS, N. E. et al. IL-33, a Potent Inducer of Adaptive Immunity to Intestinal Nematodes. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2443–2449, 2008.

HUWER, M.; SANFT, S.; AHMED, J. S. Enhancement of neutrophil adherence to *toxocara canis* larvae by the C3 component of complement and IgG antibodies. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene - Abt. 1 Orig. A**, v. 270, n. 3, p. 418–423, 1989.

INCHAUSPE, S.; ECHANDI, L. V.; DODDS, E. M. Diagnosis of ocular toxocariasis by detecting antibodies in the vitreous humor. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)**, v. 93, n. 5, p. 220–224, 2018.

INCLAN-RICO, J. M.; SIRACUSA, M. C. First Responders: Innate Immunity to Helminths. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 861–880, 2018.

IVANOV, I. I.; LITTMAN, D. R. Segmented filamentous bacteria take the stage. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 3, p. 209–212, 2010.

JESUS, A. R. DE et al. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. p. 98–105, 2002.

JOHNSTON, L. K.; BRYCE, P. J. Understanding interleukin 33 and its roles in eosinophil development. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. MAY, p. 1–7, 2017.

- JOSHI, N.; WALTER, J. M.; MISHARIN, A. V. Alveolar Macrophages. **Cellular Immunology**, v. 330, n. January, p. 86–90, 2018.
- KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: Therapeutic target and novel biomarker. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 827–840, 2008.
- KAYES, S. G.; ADAMS OAKS, J. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. **American Journal of Pathology**, v. 93, n. 2, p. 277–294, 1978.
- KAYES, S. G.; JONES, R. E.; OMHOLT, P. E. Pulmonary Granuloma Formation in Murine Toxocariasis: Transfer of Granulomatous Hypersensitivity Using Bronchoalveolar Lavage Cells. v. 74, n. 6, p. 950–956, 1988.
- KITA, H. Karlova universita v Praze 1348 až 1409. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 161–177, 2011.
- KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 1, p. 30–37, 2004.
- KUMAR, P. et al. Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation Article Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 659–671, 2016.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 Induces Antigen-Specific IL-5 + T Cells and Promotes Allergic-Induced Airway Inflammation Independent of IL-4 . **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 4780–4790, 2008.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6469–6477, 2009.
- LARKIN, B. M. et al. Induction and regulation of pathogenic Th17 cell responses in schistosomiasis. p. 873–888, 2012.
- LE, H. et al. Interleukin-33: A mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cells and their progenies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–9, 2013.
- LEE, R. M. et al. Toxocariasis in North America : A Systematic Review. v. 8, n. 8, p. 1–7, 2014.
- LEONARDI, D. et al. High efficacy of albendazole-PEG 6000 in the treatment of *Toxocara canis* larva migrans infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 375–378, 2009.
- LERMAN, L. O. et al. **Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association**. [s.l: s.n.]. v. 73

- LI, L. et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 331–342, 2010.
- LI, X. et al. IL-17 receptor–based signaling and implications for disease. **Nature Immunology**, v. 20, n. 12, p. 1594–1602, 2019.
- LIEW, F. Y.; 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, n. 2, p. 103–110, 2010.
- LIN, A. M. et al. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 490–500, 1 jul. 2011.
- MA, G. et al. Human toxocariasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. e14–e24, 2018.
- MACDONALD, A. S.; ARAUJO, M. I.; PEARCE, E. J. Immunology of parasitic helminth infections. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 427–433, 2002.
- MACIEL, J. S.; ESTEVES, R. G.; SOUZA, M. A. A. Prevalência de helmintos em areias de praças públicas do município de São Mateus, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 14, n. 2, p. 15–22, 2016.
- MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 999–1008, 2013.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. Immunological underpinnings of Ascaris infection, reinfection and coinfection and their associated co-morbidities. **Parasitology**, n. May, 2020.
- MAGNAVAL, J. F. Letters to the Editor Apparent Weak Efficacy of Ivermectin for Treatment of Human Toxocariasis. v. 42, n. 10, p. 31059, 1998.
- MAHMUTOVIC PERSSON, I. et al. IL-1 $\beta$  mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation. **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2018.
- MAIZELS, R. M. Toxocara canis: Molecular basis of immune recognition and evasion. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 365–374, 2013.
- MAIZELS, R. M.; SMITS, H. H.; MCSORLEY, H. J. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. **Immunity**, v. 49, n. 5, p. 801–818, 2018.
- MALHEIRO, A. et al. pcDNA-IL-12 vaccination blocks eosinophilic inflammation but not airway hyperresponsiveness following murine Toxocara canis infection. **Vaccine**, v. 26, n. 3, p.

305–315, 2008.

MARGARETH, J. et al. Bio Technology Expression of the costimulatory molecules CD80 , C86 and MHC II in Eosinophil , during the peak of eosinophilia in the syndrome larvas migrans. v. 66, p. 20216–20221, 2014.

MARTÍN, P. et al. CD69 Association with Jak3/Stat5 Proteins Regulates Th17 Cell Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 20, p. 4877–4889, 2010.

MAZUR-MELEWSKA, K. et al. Production of interleukins 4 and 10 in children with hepatic involvement in the course of *Toxocara* spp. infection. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 2, p. 101–107, 2016.

MAZUR-MELEWSKA, K. et al. Clinical pathology of larval toxocariasis. In: **Advances in Parasitology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2020. v. 109p. 153–163.

MBOW, M. et al. T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 186–195, 2013.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; GAFFEN, S. L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 892–906, 2019.

MCGUINNESS, S. L.; LEDER, K. Global Burden of Toxocariasis: A Common Neglected Infection of Poverty. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p. 52–61, 2014.

MELIOU, M. et al. Toxocariasis of the Nervous System. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 2, p. 291–299, 2020.

MILLER, A. M. et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 2, p. 339–346, 2008.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 763–776, 2012.

MONTEIRO, NATHALIA; GONÇALVES, CAROLINA; RODRIGUES, ALEXANDRE; OLIVEIRA, RAFAEL; LIMA, JAQUELINE; AVELAR, JULIANA; CASTRO, ANA MARIA; REZENDE, H. Corrência De Potenciais Agentes Causadores. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 14, p. 73–77, 2018.

MOREIRA, G. M. S. G. et al. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 456–464, 2014.

MUSSO, C. et al. Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitoria, ES, Brazil. **Virchows Archiv**, v. 450, n. 4, p. 411–417, 2007.

- NAGY, D. et al. Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 581–588, 2012.
- NATOLI, G.; OSTUNI, R. Adaptation and memory in immune responses. **Nature Immunology**, v. 20, n. 7, p. 783–792, 2019.
- NCBI:TXID6265. **Toxocara canis**. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6265>>. Acesso em: 23 ago. 2019.
- NG, L. G.; OSTUNI, R.; HIDALGO, A. Heterogeneity of neutrophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 4, p. 255–265, 2019.
- NILE, C. J. et al. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes: ORIGINAL ARTICLE. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 172–180, 2010.
- NOGUEIRA, D. S. et al. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2016.
- NOORDIN, R. et al. **Serodiagnostic methods for diagnosing larval toxocariasis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2020. v. 109
- O’GARRA, A. et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 114–131, 2008.
- OKAMOTO YOSHIDA, Y. et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 8, p. 4414–4422, 2010.
- OLANIYAN, M.; AZEEZ, M. Seroprevalence of *Toxocara canis* and the parasitic effect on plasma cytokines in children aged 6 to 11 years in Saki-East local government area in Nigeria. **Environmental Disease**, v. 4, n. 1, p. 12, 2019.
- OTHMAN, A. A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: Are we still far behind? **Acta Tropica**, v. 124, n. 3, p. 171–178, 2012.
- PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, 2010.
- PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **Journal of Helminthology**, v. 75, n. 4, p. 299–305, 2001.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

- PECINALI, N. R. et al. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 121–130, 2005.
- PEVNY, L. et al. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. **Development**, v. 121, n. 1, p. 163–172, 1995.
- PINELLI, E. et al. Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 6, p. 826–832, 2005.
- PINELLI, E. et al. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 76–82, 2007.
- POULSEN, C. S. et al. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* - is it possible? **Parasite Immunology**, v. 37, n. 4, p. 204–207, 2015.
- PRESTES, L. F. et al. Contaminação Do Solo Por Geohelmintos Em Áreas Públicas De Recreação Em Municípios Do Sul Do Rio Grande Do Sul (Rs), Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 2, p. 155–162, 2015.
- RANKIN, S. M.; CONROY, D. M.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and eosinophil recruitment: Implications for human disease. **Molecular Medicine Today**, v. 6, n. 1, p. 20–27, 2000.
- RESENDE, N. M. N. M. et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 354, 2015.
- RIBEIRO, L. M. et al. Soil Contamination in Public Squares in Belo Horizonte, Minas Gerais, By Canine Parasites in Different Developmental Stages. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 4, p. 229–231, 2013.
- ROARK, C. L. et al.  $\gamma\delta$  T cells: an important source of IL-17. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 3, p. 353–357, 2008.
- ROCKEY, J. H. et al. In vitro interaction of eosinophils from ascarid-infected eyes with *Ascaris suum* and *Toxocara canis* larvae. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 24, n. 10, p. 1346–1357, 1983.
- RODOLPHO, J. M. DE A. et al. Robust phenotypic activation of eosinophils during experimental *Toxocara canis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, 2018.
- RODRIGUES-MACHADO, M. D. G. et al. Effects of sepsis-induced acute lung injury on glycogen content in different tissues. **Experimental Lung Research**, v. 36, n. 5, p. 302–306, 2010.
- ROLDÁN, W. H.; ELEFANT, G. R.; FERREIRA, A. W. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human

toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 11, p. 557–567, 2015.

ROSTAMI, A. et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007809, 2019a.

ROSTAMI, A. et al. Human toxocariasis – A look at a neglected disease through an epidemiological ‘prism’. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, n. June, p. 104002, 2019b.

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

RUBINSKY-ELEFANT, G. et al. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 3–23, 2010.

RUIZ-MANZANO, R. A. et al. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1–11, 2019.

RUIZ DE MORALES, J. M. G. et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 1, p. 102429, 2020.

SALES, F. et al. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma Formation during experimental *Paracoccidioidomycosis*. v. 8, n. August, 2017.

SÁNCHEZ, S. S.; GARCÍA, H. H.; NICOLETTI, A. Clinical and magnetic resonance imaging findings of neurotoxocariasis. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. FEB, p. 1–7, 2018.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SCHNIEDER, T.; LAABS, E. M.; WELZ, C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 193–206, 2011.

SHI, H.; JIANG, H. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Chinese Journal of Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 275–278, 1999.

SHIN, M. H.; LEE, Y. A.; MIN, D. Y. Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. SUPPL., p. 125–132, 2009.

SILVEIRA, M. R. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway

eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6263–6272, 2002.

SMITH, H. et al. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 182–188, 2009.

SONG, C. et al. IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6117–6124, 2008.

STANSFIELD, B. K.; INGRAM, D. A. Clinical significance of monocyte heterogeneity. **Clinical and Translational Medicine**, v. 4, n. 1, 2015.

STEEN, E. H. et al. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. v. 9, n. 4, p. 184–198, 2020.

STEIN, K. K. The *C. elegans* eggshell. **WormBook**, p. 1–36, 2018.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, n. 2, p. 209–215, 1985.

SUTHERLAND, T. E. et al. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. **Nature Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1116–1125, 2014.

TAGO, K. et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 5, p. 1377–1383, 2001.

TAKAMOTO, M. et al. Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57B1/6 mice genetically deficient in IL-5. **Immunology**, v. 90, n. 4, p. 511–517, 1997.

TANG, X.; LIU, D.; LIANG, C. Cellular and Molecular Life Sciences Regulation of the transcription factor GATA-1 at the gene and protein level. v. 58, n. 2001, p. 2008–2017, 2017.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines : facts beyond expression. v. 5, n. October, p. 1–7, 2014.

TOWNSEND, M. J. et al. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 6, p. 1069–1075, 2000.

UGA, S. et al. Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 287–294, 2000.

- USTUN, S. et al. Interleukin (IL) 5 levels and eosinophilia in patients with intestinal parasitic diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 24, p. 3643–3646, 2004.
- VAN HOECKE, L. et al. Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 123, p. 1–8, 2017.
- VANOIRBEEK, J. A. J. et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 96–104, 2010.
- WAINDOK, P.; STRUBE, C. Neuroinvasion of *Toxocara canis* - and *T. cati* -larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile. p. 1–12, 2019.
- WEATHERHEAD, J. E. et al. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. v. 11, n. October, p. 1–14, 2020.
- WEAVER, C. T. et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, p. 477–512, 2013.
- WEBSTER, G. A. A Report On *Toxocara Canis* Werner, 1782 1. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v. 22, n. 8, p. 272–274, 275–279, 1958.
- WILDER, H. C. **Nematode endophthalmitis**. [s.l: s.n.].
- WINKELS, H. et al. CD27 co-stimulation increases the abundance of regulatory T cells and reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice. **European Heart Journal**, v. 38, n. 48, p. 3590–3599, 2017.
- WOODHALL, D. M.; FIORE, A. E. Toxocariasis: A review for pediatricians. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 2, p. 154–159, 2014.
- WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 245–257, 2010.
- XU, S.; CAO, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 7, n. 3, p. 164–174, 2010.
- YASUDA, K. et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, p. 3451–3456, 2012.
- YU, C. et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1387–1395, 2002.
- ZAISS, M. M. et al. IL-1 $\beta$  Suppresses Innate IL-25 and IL-33 Production and Maintains

Helminth Chronicity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.

ZHANG, Y. et al. Lack of IL-17 signaling decreases liver fibrosis in murine schistosomiasis japonica. **International Immunology**, v. 27, n. 7, p. 317–325, 2015.

ZHU, J.; PAUL, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 4–12, 2010.

ZIBAEI, M. et al. Soil contamination with *Toxocara* spp. eggs in the public parks from three areas of Khorram Abad, Iran. **Nepal Medical College journal : NMCJ**, v. 12, n. 2, p. 63–65, 2010.

## ANEXO I

---

### Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 56/2018  
**Título do projeto:** Caracterização da resposta imunológica na infecção experimental por *Toxocara canis*  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Lilian Lacerda Bueno  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Parasitologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 23/04/2018. Validade: 23/04/2018 à 22/04/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 25/04/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## RESEARCH ARTICLE

# Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice

Thaís Leal-Silva<sup>1,2</sup>, Flaviane Vieira-Santos<sup>1</sup>, Fabrício Marcus Silva Oliveira<sup>1</sup>, Luiza de Lima Silva Padrão<sup>1</sup>, Lucas Kraemer<sup>1</sup>, Pablo Hemanuel da Paixão Matias<sup>1</sup>, Camila de Almeida Lopes<sup>1</sup>, Ana Cristina Loiola Ruas<sup>1</sup>, Isabella Carvalho de Azevedo<sup>1</sup>, Denise Silva Nogueira<sup>1</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>3</sup>, Marcelo Vidigal Caliarí<sup>3</sup>, Remo Castro Russo<sup>4</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1</sup>, Lilian Lacerda Bueno<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Post-graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Laboratory of Protozooses, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **4** Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

\* llbueno@icb.ufmg.br



## OPEN ACCESS

**Citation:** Leal-Silva T, Vieira-Santos F, Oliveira FMS, Padrão LdLS, Kraemer L, da Paixão Matias PH, et al. (2021) Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. PLoS Negl Trop Dis 15(7): e0009639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639>

**Editor:** Subash Babu, NIH-National Institute for Research in Tuberculosis-ICER, INDIA

**Received:** March 15, 2021

**Accepted:** July 9, 2021

**Published:** July 29, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639>

**Copyright:** © 2021 Leal-Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Abstract

Toxocariasis is a neglected disease that affects people around the world. Humans become infected by accidental ingestion of eggs containing *Toxocara canis* infective larvae, which upon reaching the intestine, hatch, penetrate the mucosa and migrate to various tissues such as liver, lungs and brain. Studies have indicated that Th2 response is the main immune defense mechanism against toxocariasis, however, there are still few studies related to this response, mainly the IL-33/ST2 pathway. Some studies have reported an increase in IL-33 during helminth infections, including *T. canis*. By binding to its ST2 receptor, IL-33 stimulating the Th2 polarized immune cell and cytokine responses. Thus, we aimed to investigate the role of the IL-33/ST2 pathway in the context of *T. canis* larval migration and the immunological and pathophysiological aspects of the infection in the liver, lungs and brain from Wild-Type (WT) BALB/c background and genetically deficient mice for the ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>). The most important findings revealed that the IL-33/ST2 pathway is involved in eosinophilia, hepatic and cerebral parasitic burden, and induces the formation of granulomas related to tissue damage and pulmonary dysfunction. However, ST2<sup>-/-</sup> mice, the immune response was skewed to Th1/Th17 type than Th2, that enhanced the control of parasite burden related to IgG2a levels, tissue macrophages infiltration and reduced lung dysfunction. Collectively, our results demonstrate that the Th2 immune response triggered by IL-33/ST2 pathway mediates susceptibility to *T. canis*, related to parasitic burden, eosinophilia and granuloma formation in which consequently contributes to tissue inflammation and injury.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** This investigation received partial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APQ-00766-18), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 421392/2018-5 and Grant# 302491/2017-1) and Pró-Reitoria de Pesquisa of Universidade Federal de Minas Gerais to cover research inputs. TLS is grateful for the PhD fellowship provided by the Brazilian National Research Council (CNPq), Post-graduation Program in Infectology and Tropical Medicine/ Universidade Federal de Minas Gerais. MCV, MAR, RCR, RTF and LLB are Research Fellows from the Brazilian National Research Council (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, publication fees, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Author summary

Toxocariasis is a neglected disease caused by *Toxocara canis*, which has 19% worldwide seroprevalence, and is associated with socioeconomic, geographic and environmental factors. Humans become infected by accidental ingestion of *T. canis* eggs present in contaminated food, water or soil. After ingestion, the larvae hatch in the intestine and can reach various tissues such as liver, lung and brain. Helminth infections usually trigger a Th2 immune response in the host, by releasing cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33. IL-33 is an alarmin that binds to the ST2 receptor, and some studies have observed an increase in this cytokine in toxocariasis, however there are no studies regarding the IL-33/ST2 role in this infection. Thus, we evaluated the influence of this pathway by analyzing immunological and pathophysiological aspects in *T. canis*-infected mice. Our results demonstrated that the IL-33/ST2 pathway is related to parasite burden on the liver and brain and also increases the number of eosinophils in the blood and tissues. In addition, it involved with the pulmonary immune response and granulomas with impact in lung function. In conclusion, the IL-33/ST2 pathway governs the host susceptibility to *T. canis* in mice.

## Introduction

Toxocariasis is a zoonosis caused by nematodes of the genus *Toxocara*, whose main etiologic agent is *Toxocara canis* [1,2], a neglected disease with cosmopolitan distribution worldwide and seroprevalence rates estimated at 19%. Of these, the highest rates are associated with socioeconomic, geographic and environmental factors [3].

Humans are infected by accidental ingestion of *T. canis* eggs containing infective third stage larvae present in contaminated food, water, soil or utensils. After ingesting eggs, the larvae penetrate the intestinal mucosa and migrate to multiple organs [4]. Human toxocariasis can manifest in different ways based on the parasite tropism, and the severity of the disease will depend on the parasitic burden, the duration of larval migration, aging and immune-mediated responses of the immunocompromised individuals [2,5]. According to the larval migration site and clinical symptoms, toxocariasis is divided into four clinical forms: the Visceral larva migrans (VLM), Neurotoxocariasis (NT), Ocular toxocariasis (OT) and Covert or Common toxocariasis (CT) [2,4,5].

Experimental models have proven to be important to better understand the disease and mice have been widely used for this purpose [6–8], since the migration pathway, immune responses and lesions produced by *T. canis* larvae in humans and mice are similar [5,7–10]. It has been reported that during infection there is presence of persistent pulmonary inflammation, airway hyperreactivity and production of Th2 type cytokines, with the presence of eosinophilia and production of specific antibodies [4,11]. Some studies describe the presence of granulomas in liver lesions, with the participation of Th1 immune response and innate immunity cells, mainly eosinophils and macrophages [12,13]. In the brain, it is common to have hemorrhagic areas with recruitment of neutrophils, eosinophils and activation of microglia/macrophages [6,14]. The excretory-secretory *T. canis* (TES) antigens normally stimulate the production of Th2 type cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33, and there is an increase in eosinophils, IgE and IgG antibodies and Th1 cytokines reduction [4,6,8].

The ST2 receptor is a member of the IL-1 superfamily and is the IL-33 cytokine receptor [15]. Several tissues and innate immunity cells express IL-33, including macrophages,

dendritic cells, mast cells, epithelial, fibroblasts and glial cells [16]. The binding of IL-33 to its ST2 receptor activates transcription factors, via MyD88 dependent but TRIF independent pathway, and stimulates the production of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 in wild type mice, also restoring the Th2 asthma phenotype in IL-4 deficient mice [17].

The activation of the IL-33/ST2 pathway has been previously studied in nematode infection. In infection with *Strongyloides venezuelensis* it is responsible for inducing pulmonary eosinophilic inflammation, maintaining airway hyperresponsiveness, Th2 response in the lungs and consequently may play a role in expelling the worms from the lungs [18,19]. Resende *et al.* [6] observed high concentrations of IL-33 in BALB/c mice infected with *T. canis* from the 5th day after infection, however, the importance of activating the IL-33/ST2 pathway to control parasitic burden and pathophysiology in the context of *T. canis* infection has not yet been demonstrated.

Therefore, we believe that it is necessary to understand the immunological and pathophysiological mechanisms related to the IL-33/ST2 pathway during infection by *T. canis*. Thus, we further investigate if the IL-33/ST2 pathway may be relevant to the host's immune response during *T. canis* infection. Our results suggested that the IL-33/ST2 pathway in *T. canis* infection is important for the establishment of eosinophilia and its presence is related to hepatic and cerebral parasitic tropism, with increased liver and lung tissue inflammation, with loss of function. However, ST2<sup>-/-</sup> mice showed a skewed Th1/Th17 immune response with reduced parasite load, attenuating the tissue injury and chronic inflammation. Thus, the IL-33/ST2 pathway sustained the Th2 immune response contributing to eosinophil activity, tissue damage and parasite tropism during infection by *T. canis* in mice.

## Material and methods

### Ethics statement

All procedures performed during the experiments were conducted according to the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the local Animal Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol number 56/2018.

### Animals

For this study were used female BALB/c mice (*Mus musculus*) with approximately 8 weeks of age genetically deficient for the ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>), which were kindly provided by Dr. João Santana da Silva of University of São Paulo (USP) and wild-type mice (WT) BALB/c obtained from the animal facility of the Federal University of Minas Gerais.

During the experimental period, the mice were fed with filtered water and commercial chow (Nuvilab Cr-1, Nuvital Nutrients, Brazil) *ad libitum*. Mice were maintained at the Animal Facility of the Department of Parasitology of the Federal University of Minas Gerais under controlled conditions of temperature (24 ± 1° C) and lighting (12-hour light-dark cycle).

### Parasites

Adult *Toxocara canis* worms were obtained from the feces of naturally infected puppies which were kept at the Zoonosis Control Center (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The puppies were treated with anti-helminthics (Drontal Puppy, São Paulo, Brazil) in the dosage of 1mL/kg. The adult parasites of *T. canis* were collected after elimination in fecal samples and maintained in water until being processed at the Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites at the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

The adult female worms were dissected and the uterus was removed. Purification of the eggs was performed as previously described [6]. Briefly, the eggs were isolated from the uterus

by mechanical maceration purified by filtration on 100 $\mu$ m nylon strainers. Then, they were incubated for embryonation in 50 mL culture flasks with 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The culture was kept in a BOD incubator at 26  $\pm$  1 °C, undergoing oxygenation three times per week by stirring. After 6 weeks of culture, fully embryonated eggs were used in experimental infections.

### Experimental infection

On the day of inoculation, the culture eggs were incubated with 5% sodium hypochlorite solution in a CO<sub>2</sub> incubator for 1 hour and 40 minutes to facilitate the hatching of the larvae, then the solution was washed in water to remove the sodium hypochlorite.

All mice, except for the control group (0dpi), were inoculated via the intra-gastric route by gavage with 1000 embryonated *T. canis* eggs, followed by 0.1 mL of H<sub>2</sub>O to rinse the remaining eggs from the syringe and needle [6].

### Experimental design

The WT and ST2<sup>-/-</sup> mice were randomized and euthanized on day 0 (control group), 3, 14, and 63 days post-infection (dpi) to evaluate acute and chronic phase of infection (Fig 1A). At all times of infection (dpi), including the control group, a single experiment was carried out with 13 animals, 7 for histopathological analysis and 6 for other analysis. All mice were euthanized with a lethal injection of xylazine/ketamine (8.5 mg/kg and 130 mg/kg).

### Parasitological analysis

The parasitic burden was assessed by the recovery of larvae from the liver, lungs and brain. Each tissue was collected and sliced with scissors and placed in a Baermann apparatus for 4 hours in the presence of PBS (0.4 M NaCl and 10 mM NaPO<sub>4</sub>) at 37 °C. The recovered larvae were then fixed (10% formaldehyde in PBS) and counted in an optical microscope [6].

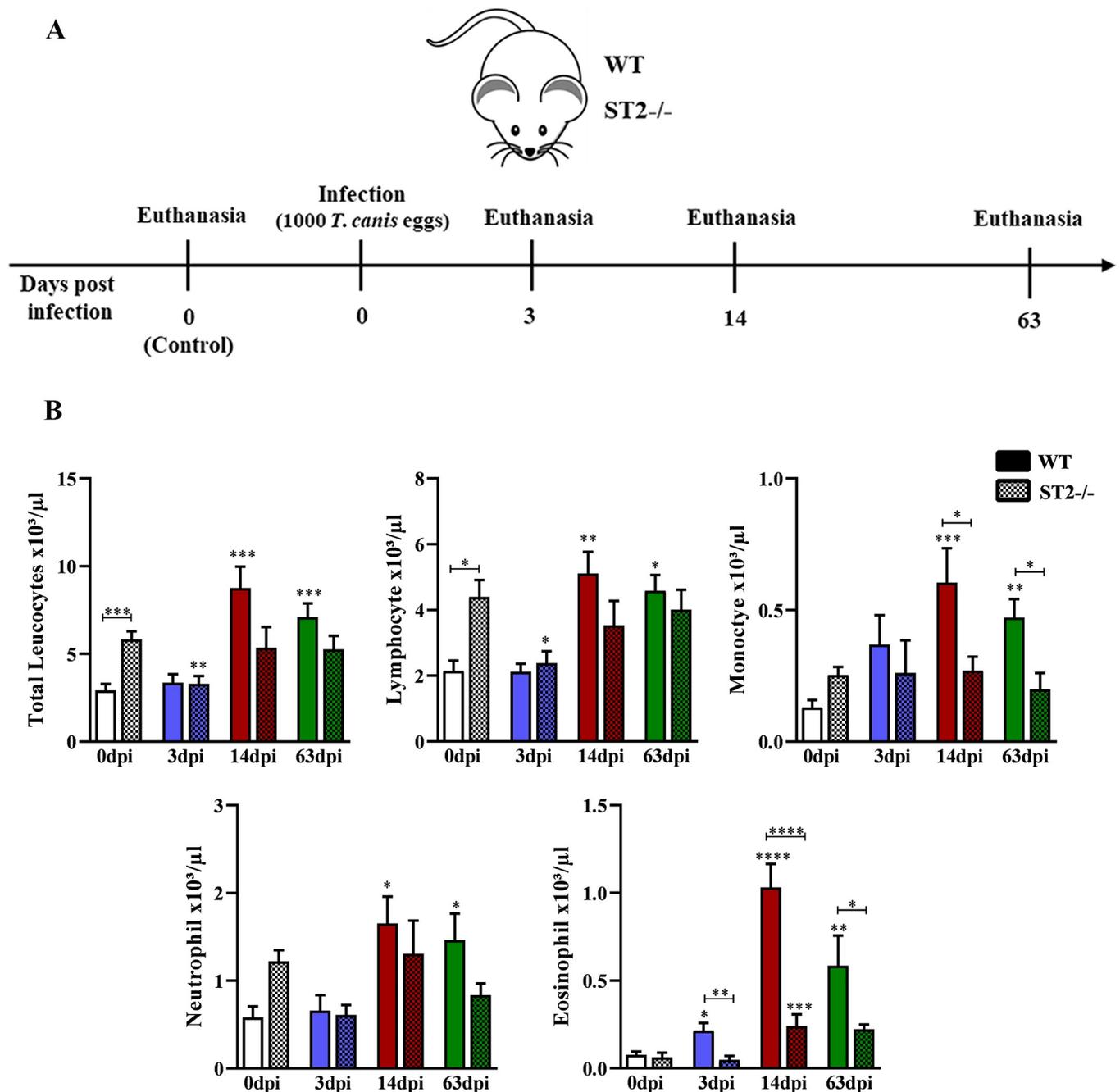
### Leukocyte analysis

Approximately 500 $\mu$ L of blood was collected by cardiac puncture and then transferred to tubes containing the EDTA anticoagulant for leukocyte analysis. Subsequently, the tubes were centrifuged to collect the plasma, which was stored at -80 °C for later analysis. The global leukocyte count was performed using a Bio-2900 Vet automatic hematological counter. For differential white blood cell counting, blood smears were stained with Panotic (Laborclin, Brazil), and 100 white blood cells were differentiated under a light microscope.

### Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by inserting a 1.7 mm catheter into the trachea of mice and washing the lungs twice with 1 ml of sterile PBS. BAL samples were centrifuged at 300  $\times$  g for 10 min at 4 °C and the pellet was used to determine the total and differential cellularity using optical microscopy as described [20]. Supernatants were used for hemoglobin and total protein quantification, according to the manufacturer's instructions.

Alveolar hemorrhage was assessed by quantifying the hemoglobin present in the BAL, using the Hemoglobin K023-1 kit (Bioclin Quibasa, Brazil). The concentration was determined by spectrophotometry by measuring the absorbance at 540 nm. Hemoglobin (Hb) content was expressed in g/dL of Hb per ml of BAL. The quantification of total protein was determined by the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, USA) as described [21]. The results were expressed in  $\mu$ g of total protein per ml of BAL.



**Fig 1. Characterization of the experimental design and leukogram of WT and ST2<sup>-/-</sup> mice infected with *T. canis*.** (A) Experimental design of the infection with 1000 *T. canis* eggs at 0 (control group), 3, 14 and 63 days after infection; (B) Leukogram of different days after infection with *T. canis*. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean  $\pm$  S.E.M., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g001>

### Evaluation of enzymatic activity of alanine aminotransferase (ALT)

To assess liver enzyme activity, alanine aminotransferase (ALT) was quantified by means of a colorimetric enzymatic assay using the Transaminase ALT-K035-1 kit (Bioclin Quibasa, Brazil) determined by the manufacturer instructions.

### Pulmonary cytokine profile

To assess the concentration of pulmonary cytokines, the right lung of each animal was removed and homogenized (TissueLyser LT—Qiagen, German) in extraction solution (0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 IU of aprotinin A) at the rate of 1 mL per 100 mg of lung tissue. The homogenates were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the supernatant was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for cytokine quantification. Levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12/IL-23p40, IL-6, IL-4, IL-33, IL-13, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$  and IL-17A were assayed by sandwich ELISA kit (R&D Systems, USA) according to the manufacturer's instructions. The absorbance of the samples was determined using a Versa Max ELISA microplate reader (Molecular Devices, USA) at a wavelength of 492 nm.

### Eosinophil peroxidase (EPO) and macrophage n-acetylglucosaminidase (NAG) assays

The indirect activity of macrophages and eosinophils was assessed by the concentration of N-acetylglucosaminidase (NAG) and eosinophils peroxidase (EPO), respectively, in pulmonary and brain homogenates performed according to the method previously described [21,22]. After tissue homogenization (TissueLyser LT—Qiagen, Hilden, Germany), the homogenate was centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the resulting pellet was used to determine NAG and EPO activity. Absorbance was expressed by a VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, USA) according to each assay and the results were expressed as optical densities (O.D.).

### Extraction of crude antigen from L3 larva

For the production of crude larvae L3 antigen, the culture eggs were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at room temperature (RT) and incubated with 5% sodium hypochlorite solution in a  $\text{CO}_2$  incubator for 1 hour and 40 min. After incubation, the solution with embryonated eggs was concentrated and washed three times in 20 mL PBS by centrifugation at  $800 \times g$  for 10 min at RT.

The supernatant was discarded and Hank's saline solution (HBSS), pH 2.0, was added to the pellet containing the embryonated eggs and incubated for 30 min in 5%  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^{\circ}\text{C}$ . After that period, HBSS at pH 7.0 was added. Then, the embryonated eggs were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 minutes at RT and the solution was resuspended in RPMI-1640 medium (SIGMA, USA), supplemented with 4% penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA) and placed in 24-well plates at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  for a period of 72 hours for the larvae to hatch. After incubation, L3 larvae were collected and transferred to a 50 ml graduated tube, where they were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at RT. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 5 mL of PBS and was taken to a sonicator for 10 cycles of 1 min with an interval of 30 seconds each. After sonication, the contents were centrifuged at  $800 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The amount of protein was measured using a commercial BCA kit (ThermoFisher Scientific, USA), performed according to the manufacturer's instructions.

### Antibody detection

To measure the total IgG antibodies, ELISA assays were performed using the plasma of *T. canis* infected and non-infected animals. The assay was performed as previously described [23]. Briefly, the ELISA plates (Greiner-Bio-One, USA) were sensitized with 100  $\mu\text{L}$  of crude L3

larvae antigen diluted in carbonate bicarbonate buffer at a concentration of 1 $\mu$ g per well and left overnight at 4°C. The next day, the plates were washed with the washing solution (PBS-0.05% Tween 20) and 250 $\mu$ L of the blocking solution (PBS + 3% BSA) was added, being incubated for 1 hour at 37°C. After blocking, all solution from the wells was removed by aspiration, and 100 $\mu$ L of plasma were added to the wells, diluted 1:1000 in PBS with 3% BSA and incubated at 4°C overnight. The next day, the plates were washed with the washing solution and 100 $\mu$ L of the anti-mouse IgG antibody conjugated to peroxidase diluted 1:2000 in PBS-BSA 3% was added. After incubation at 37°C for 1 hour, the plates were washed again, and 100 $\mu$ L of the developer solution (0.1 M citric acid, 0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% OPD and 0.1% H<sub>2</sub>O) was added. The plates were incubated at 37°C in the dark for 20 minutes and the reaction was stopped by adding 50 $\mu$ L of 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was measured in an ELISA reader with an absorbance of 492 nm. All tests were performed in duplicates. The ELISA assay for IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3, was the same as described above, except for the dilutions of plasma that were 1:10, 1:200, 1:100, 1:100 and 1:200 respectively, and the secondary antibodies anti-IgE mouse, anti-IgG1 mouse, anti-IgG2a mouse, anti-IgG2b mouse and anti-IgG3 mouse, which were diluted in PBS-BSA 3% in 1:1000, except anti-IgG2a mouse which was diluted 1:500.

### Histopathological and morphometric analysis

After removal of the organs, the left lung, the right lobe of the liver and the left half of the brain were fixed in a buffered 10% formaldehyde solution (Synth, Brazil) for seven days. Subsequently, the samples were gradually dehydrated in ethanol, diaphanized in xylol and included in paraffin blocks, obtaining 4 $\mu$ m thick cuts with which histopathological slides were made and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histopathological, semiquantitative morphometric analysis. All histopathological analysis were performed blindly.

For the liver lesions score, 10 random images were captured per animal with a 20X magnification. The score was based on 4 degrees for hepatic parenchyma injury: grade 0, absence of inflammatory cells; grade 1, some regions of the liver parenchyma had small inflammatory foci with reduced number of inflammatory cells, small areas of necrosis; grade 2, the hepatic parenchyma had inflammatory foci with a moderate number of cells, perivascular inflammatory infiltrate, as well as around the ducts and small areas of necrosis dispersed by the parenchyma; grade 3, hepatic parenchyma frequently presented larger inflammatory foci, diffuse inflammatory infiltrate, exuberant perivascular inflammation and around the ducts, areas of necrosis dispersed by the parenchyma. Counting of hepatic and pulmonary granulomas was also performed.

For the airway inflammation score were captured 10 random images per animal with 20X magnification, as described by [23] and analyzed perivascular inflammation, peribronchial inflammation, parenchyma injury, and hemorrhage.

Morphometric analysis of liver injury severity was performed by calculating all areas of inflammation and necrosis, while in the brain the hemorrhagic areas were evaluated, as described by [6,24].

The degree of thickening of the interalveolar septa was assessed by capturing thirty random images with a 40X objective, comprising an area of 1.6 $\times$ 10<sup>6</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>. Using the KS300 software, all pixels of the lung tissue in the real image were selected for the creation of a binary image, digital processing and calculation of the area in  $\mu$ m<sup>2</sup> of the interalveolar septum. The analysis of the pulmonary inflammatory infiltrate was performed on the images previously selected to assess the thickening of the interalveolar septa. All cells contained in each image were quantified using the Carl Zeiss Image Analyzer KS300 software program [25].

## Assessment of respiratory mechanics

The evaluation of pulmonary function was carried out in mice WT and ST2<sup>-/-</sup> infected with 0dpi (control group) and 3dpi (peak of larvae in the lung) as described by [20,23,26]. Briefly, the animals were anesthetized by a subcutaneous injection (8.5 mg/kg xylazine and 130 mg/kg ketamine) to maintain spontaneous breathing and then were tracheostomized and placed on a body plethysmograph, connected to a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System, Buxco Research Systems, Wilmington, Carolina do North, USA). First, an average breathing frequency of 160 breaths/min was imposed to the animal by pressure-controlled ventilation. Under mechanical respiration the Dynamic Compliance (C<sub>dyn</sub>), the Tidal Volume (TV) and Lung Resistance (R<sub>lung</sub>) were determined by Resistance and Compliance (RC) test. To measure the Chord Compliance (C<sub>chord</sub>) the quasi-static pressure-volume maneuver was performed, which inflates the lungs to a standard pressure of +30 cmH<sub>2</sub>O and then slowly exhales until a negative pressure of -30 cmH<sub>2</sub>O is reached. Chord compliance was determined at 10 cmH<sub>2</sub>O pressure. Fast-flow volume maneuver was performed, and the lungs were inflated to +30 cmH<sub>2</sub>O, and afterwards immediately connected to a highly negative pressure in order to enforce expiration until -30 cmH<sub>2</sub>O. The Forced Vital Capacity (FVC), Forced Expiratory Volume at 50 milliseconds (FEV<sub>50</sub>), and the Flow-Volume Curves were recorded during this maneuver. Suboptimal maneuvers were rejected, and for each test in every single mouse, at least three acceptable maneuvers were conducted to obtain a reliable mean for all numeric parameters.

## Statistical analysis

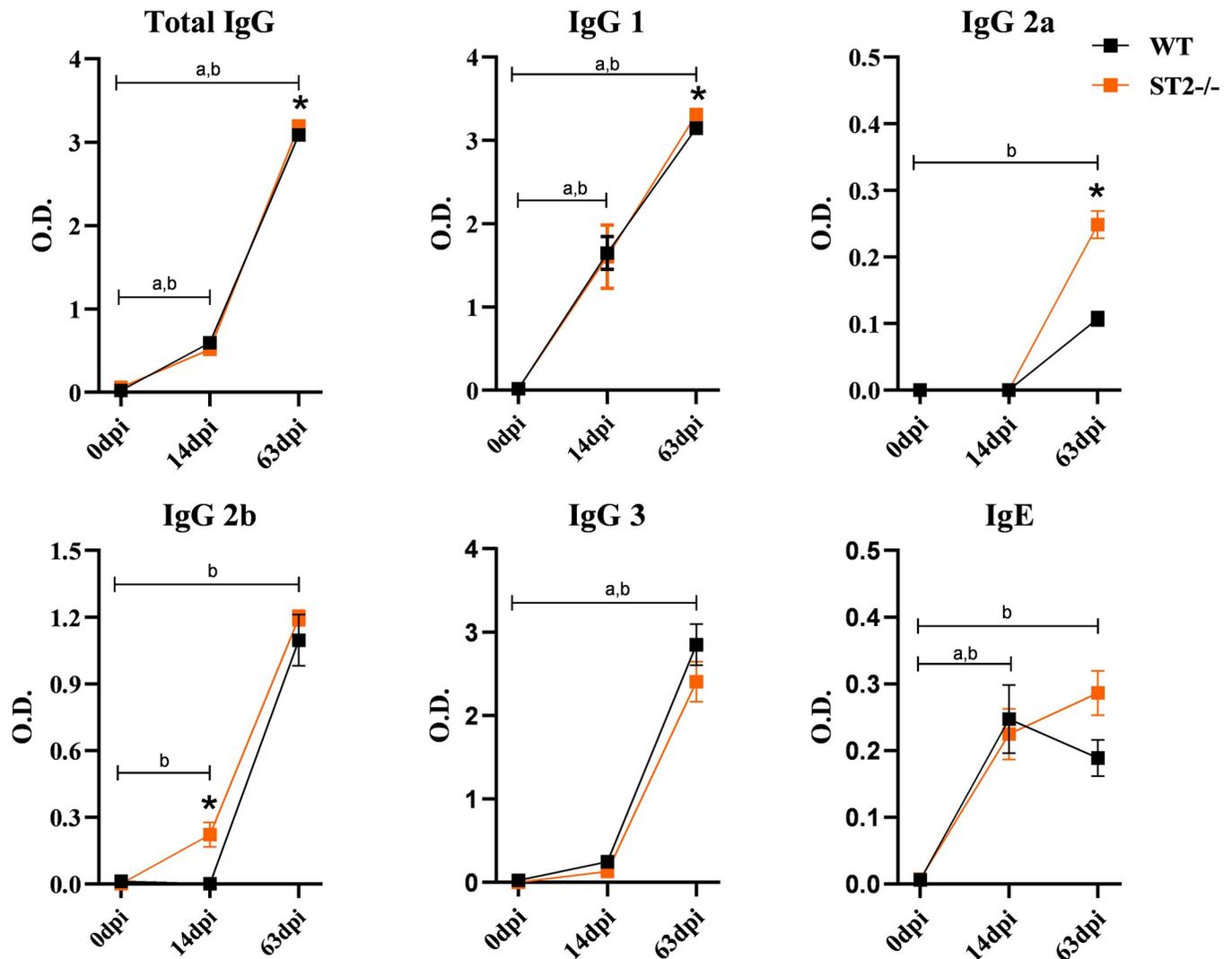
The Prism 8.0 software (GraphPad Inc, USA) was used for the statistical analysis. Grubb's test was used to detect possible outlier values. The Shapiro-Wilk test was performed to verify the distribution of the data. For the comparison between the uninfected groups (0dpi) and each days of infection, one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparisons test or the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-test were used. All tests were considered significant when the p value was equal to or less than 0.05.

## Results

### Absence of the IL-33/ST2 pathway reduces eosinophilia and increases antibodies levels

There are few data in the literature that evaluate the role of IL-33/ST2 pathway in helminth infections, and none of them assess its role during infection by *T. canis*, so we sought to determine whether the IL-33/ST2 pathway influences immunological and pathophysiological parameters during infection by *T. canis*.

Initially, to assess the influence of the IL-33/ST2 pathway on the systemic aspects throughout the infection by *T. canis*, the leukocyte profile and the levels of antibodies in the peripheral blood were evaluated (Fig 1B). We observed that WT mice presented leukocytosis in the 14dpi and 63dpi with increased number of lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils, while ST2<sup>-/-</sup> mice showed leukocytosis only in the 3dpi with increased lymphocytes and eosinophilia in the 14dpi. Interestingly, comparing the two strains, uninfected ST2 mice have a higher number of peripheral leukocytes, especially lymphocytes when compared to WT. Furthermore, there was a reduction in the number of eosinophils and monocytes in ST2<sup>-/-</sup> mice with 14dpi and 63dpi. When analyzing the levels of antibodies, we observed that the total IgG concentrations during infection increased with 14dpi and 63dpi in both strains, with an increase in IgG1 and IgG3 in both strains, and an increase in IgG2a and IgG2b in ST2<sup>-/-</sup> mice



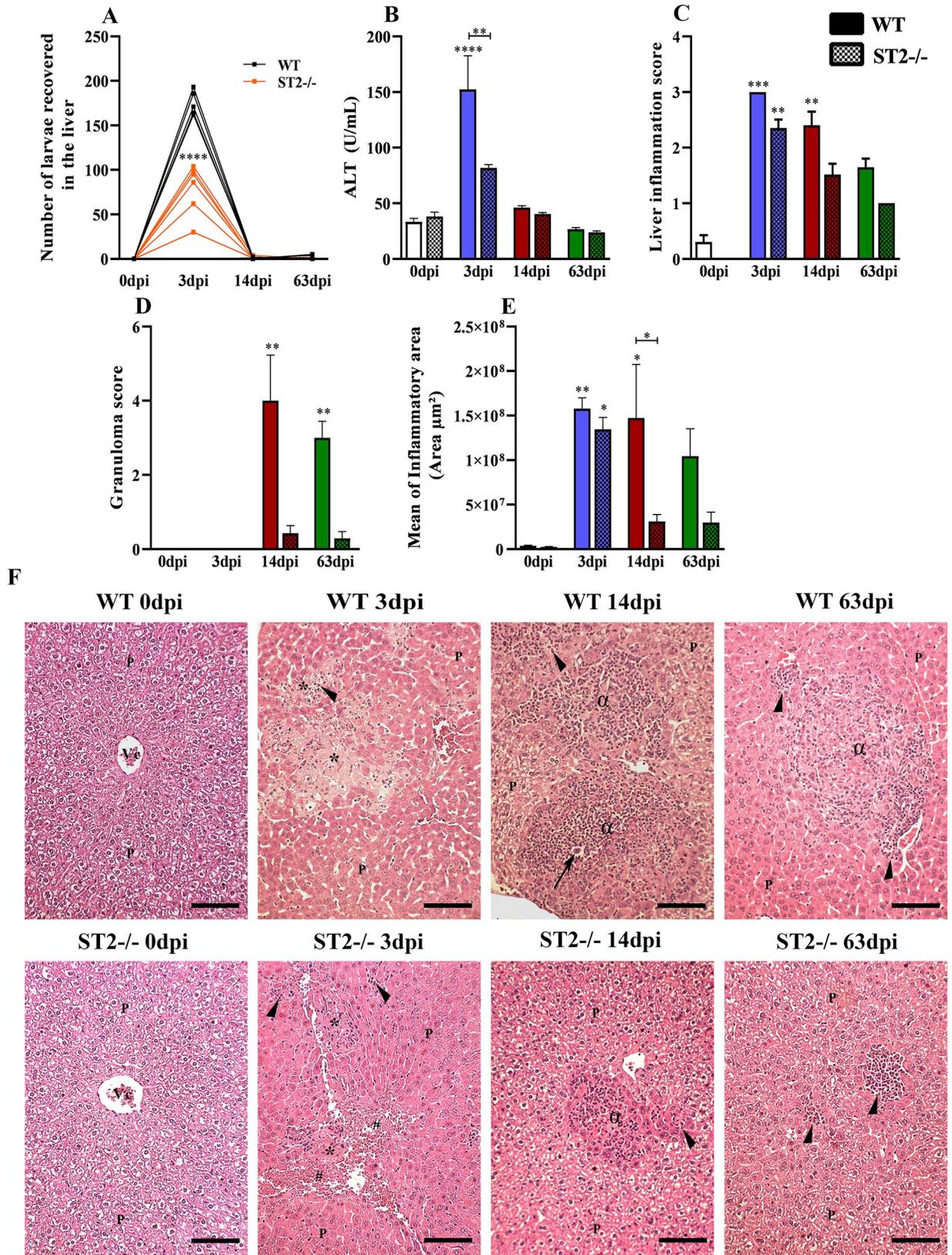
**Fig 2. Characterization of the humoral response against antigens from crude extract of L3 larvae in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice.** Evaluation of total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgE antibodies against antigens from *T. canis* larvae in mice. Results represent mean  $\pm$  S.E.M., \* $p < 0.05$ ; <sup>a</sup>Significant difference in the 0dpi WT group; <sup>b</sup> Significant difference in the 0dpi ST2<sup>-/-</sup> group. One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g002>

with 63dpi compared to uninfected mice (Fig 2). When comparing the strains, we observed an increase in the concentration of IgG2b with 14dpi and IgG1 and IgG2a with 63dpi in ST2<sup>-/-</sup> mice compared to WT. As expected, IgE levels increased in both strains during infection. The results demonstrate that, at the systemic level, the IL-33/ST2 pathway is important for the establishment of eosinophilia and for the increase of monocytes in *T. canis* infection, in addition to contributing to the production of IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies.

### Lack of ST2 receptor contributes to the reduction of parasitic load in the liver and tissue damage

We assessed the role of the IL-33/ST2 pathway in liver changes caused by *T. canis* infection. The ST2<sup>-/-</sup> mice showed an intense reduction of parasitic burden and ALT enzyme with 3dpi (Fig 3A and 3B). In the analysis of the score, we observed a decrease in the granuloma count, which probably occurred due to the reduction of the parasitic load in the ST2<sup>-/-</sup> mice, but did



**Fig 3. Liver changes in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice infected with *T. canis*.** (A) Number of larvae recovered from the liver; (B) Analysis of the enzymatic activity of plasmatic alanine aminotransferase (ALT); (C) Number of granulomas; (D) Analysis of liver inflammation by score; (E) Morphometric analysis of liver inflammatory areas; (F) Representative hematoxylin and eosin staining of liver sections, hepatic parenchyma (P), vein lobular center (Vc), inflammatory infiltration foci (arrowheads), necrosis area (\*), hemorrhage area (#), granuloma ( $\alpha$ ), toxocara larvae (arrow). Bar = 200 $\mu$ m. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean  $\pm$  S.E. M., \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001. One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g003>

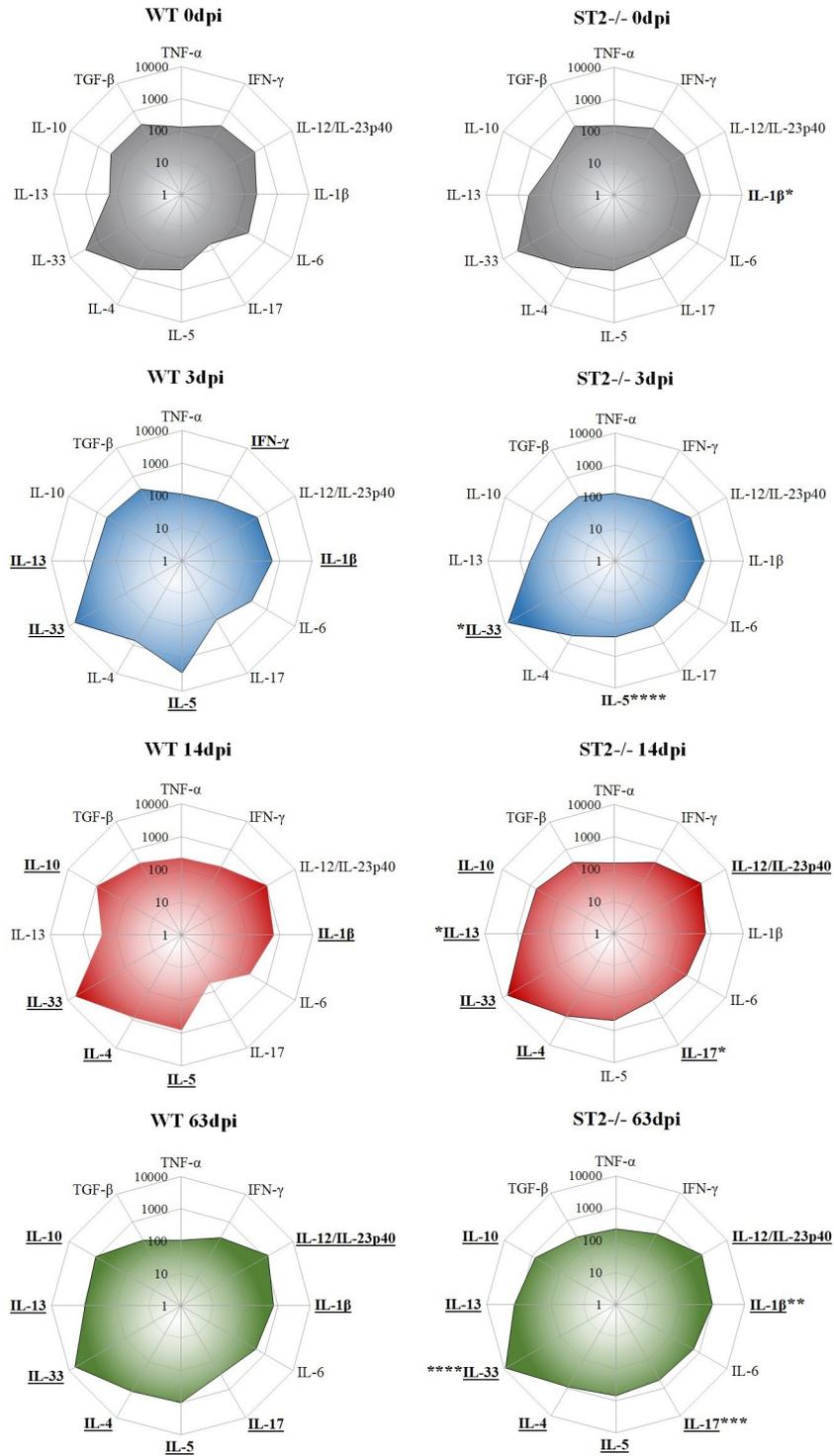
not alter the liver inflammation (Fig 3C and 3D). In the morphometric analysis, a reduction in the hepatic inflammatory area was also observed in ST2<sup>-/-</sup> mice, confirming histopathological findings (Fig 3E). The histopathological analysis of the liver showed that in uninfected mice, the hepatocytes maintained a morphological aspect consistent with normality (Fig 3F). At 3dpi in both strains there were the presence of dispersed larvae in the parenchyma, larger areas of necrosis, hemorrhage and congestion of blood vessels and capillaries. It was also observed inflammatory foci characterized as mixed composed of eosinophils, neutrophils, macrophages and lymphocytes, however in ST2<sup>-/-</sup> mice the presence of eosinophils was scarce. At 14dpi, both strains continued to show inflammatory foci in the parenchyma, but in ST2<sup>-/-</sup> mice they were few and smaller with scarce eosinophils and lymphocytes. In both strains of mice, the presence of granulomas was also observed, which were in the exudative phase, mostly composed by eosinophils, followed by macrophages, necrotic-exudatives and necrosis zones, and larvae could be identified next to the granulomas, however in the ST2<sup>-/-</sup> mice the presence of granuloma was found only in 3 mice. At 63dpi the WT and ST2<sup>-/-</sup> mice continued to present inflammatory foci in the hepatic and perivascular parenchyma, with few eosinophils in the latter. The animals also presented granulomas in the exudative phase and granulomas in the productive phase composed of macrophages, giant cells, epithelioid cells, fibroblasts and collagen. However, in ST2<sup>-/-</sup> mice, only 2 animals presented granulomas. In both strains, vascular congestion was frequently observed throughout the liver parenchyma. Collectively, these data suggest that IL-33/ST2 pathway can influence the initial phase of migration of the larvae to the liver, increasing the parasitic load and, consequently, damage to the liver parenchyma.

### The pulmonary cytokine profile shows skewed Th1/Th17 immune response in ST2<sup>-/-</sup> mice during *T. canis* infection

After reaching the lungs, the larvae trigger an immunological response in the lungs, therefore we analyzed the influence of the IL-33/ST2 pathway on the pulmonary cytokine profile (Fig 4). We observed that infected WT mice exhibit a mixed response of Th1 and Th2 already in the initial stage of infection (3dpi), represented by an increase in IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-13 and IL-5. While in infected ST2<sup>-/-</sup> mice, only an increase in IL-33 was observed with 3dpi, which was expected due to the absence of the ST2 receptor. At 14 dpi, the immune response in both strains became mixed, with cytokines from the Th1, Th2 and Treg responses in WT mice and with Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in ST2<sup>-/-</sup> mice. Comparing the two strains, we observed an increase in IL-33 and a reduction in IL-5 with 3dpi, an increase in IL-17 and IL-13 with 14dpi, and with 63dpi increase in IL-33, IL-17 and IL-1 $\beta$  in ST2<sup>-/-</sup> mice when compared to WT. Thus, the results demonstrate that in *T. canis* infection induced a Th2 type of immune response via IL-33/ST2 pathway, however, the absence of ST2 receptor favoring a Th1/Th17 polarized immune response.

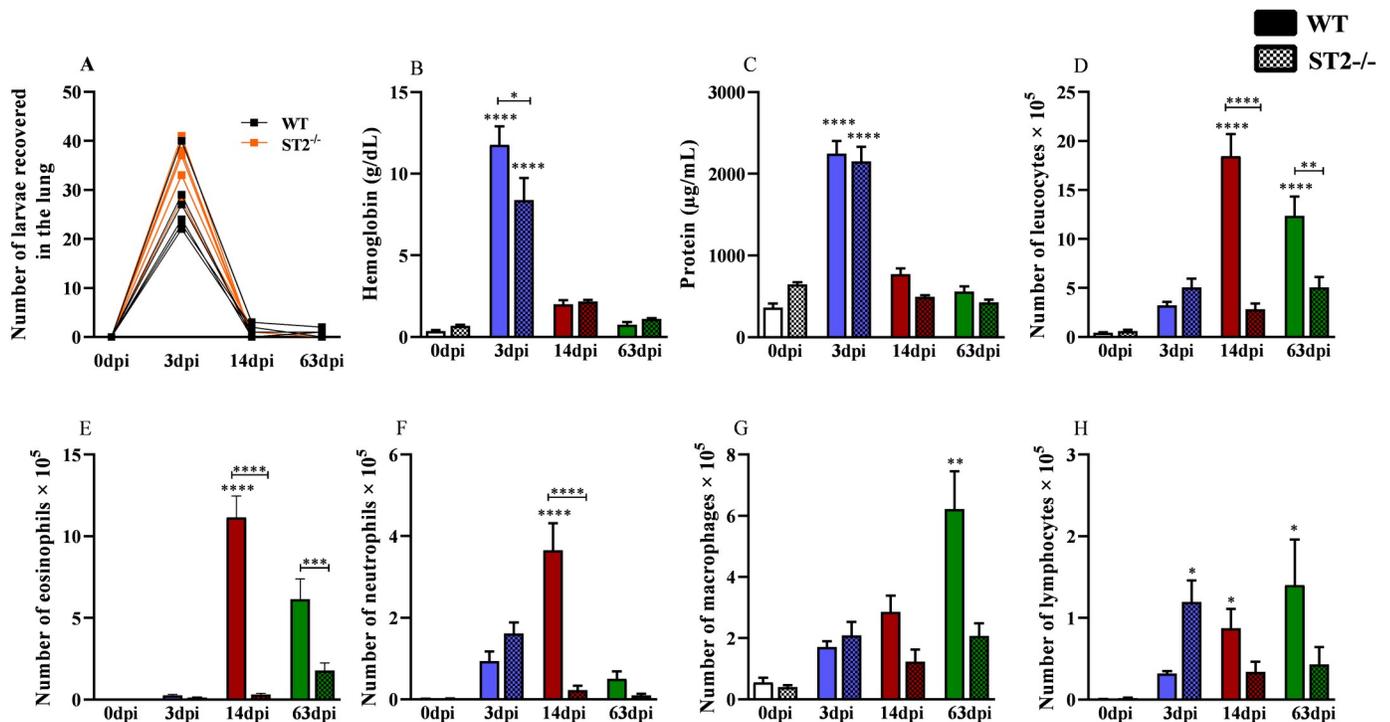
### ST2<sup>-/-</sup> mice show reduced lung inflammation and dysfunction during *T. canis* infection

Following the larval migration, the next step was to analyze the influence of the IL-33/ST2 pathway in the lungs during infection, through parasitic burden, tissue and airway



**Fig 4. Profile of cytokines present in lung tissue during infection with *T. canis*.** Radar graphs express the concentration of pulmonary cytokines throughout the infection. The results represent the mean  $\pm$  S.E.M., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  when compared to the corresponding WT groups. Cytokines were underlined when they had statistical difference with their respective control group (0dpi). One-way ANOVA test and the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g004>



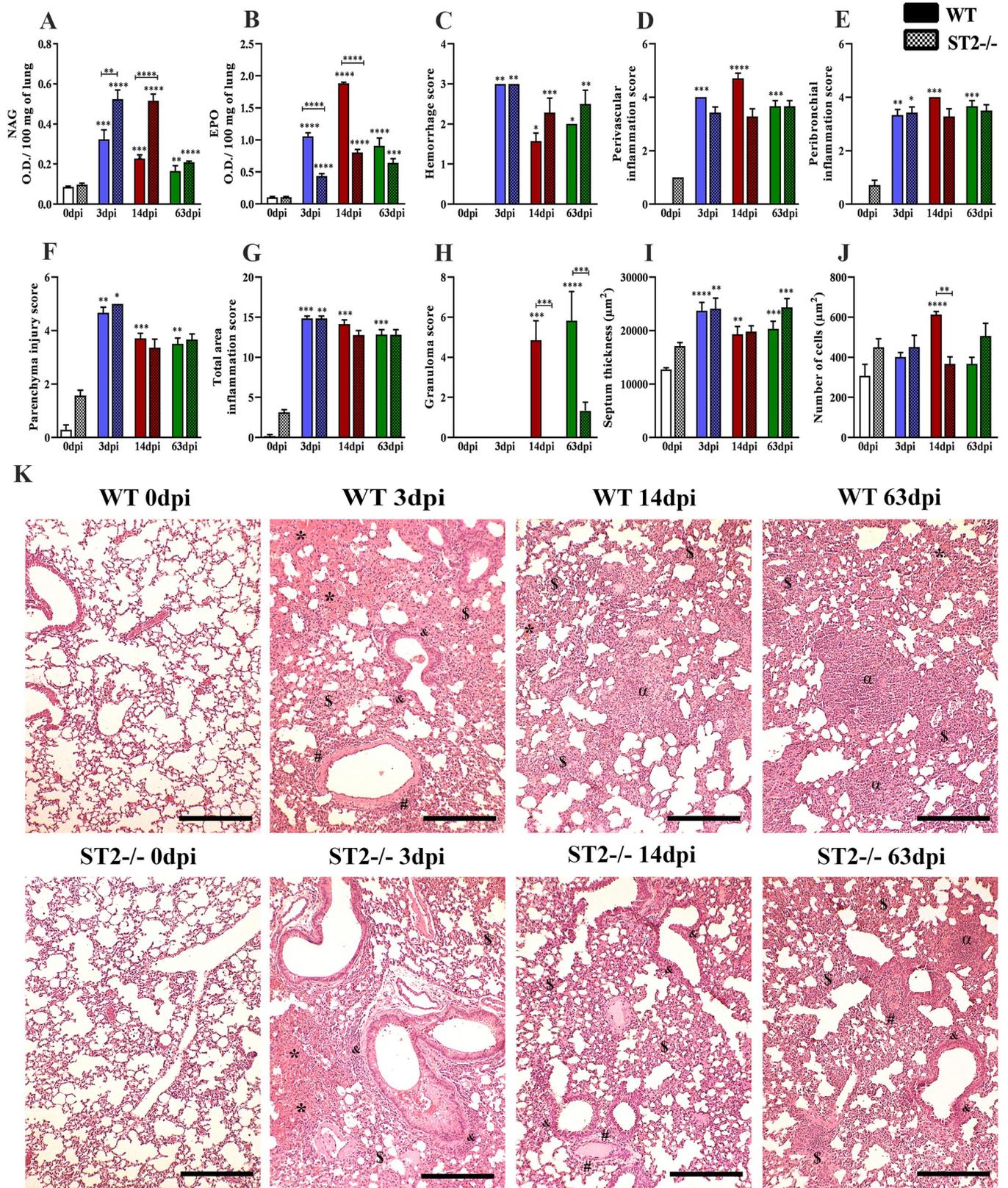
**Fig 5. Quantification of recovered larvae in the lungs and inflammation in the airways.** (A) Number of larvae recovered from the lung; (B) Hemoglobin quantification in the bronchoalveolar lavage (BAL); (C) Total protein levels in BAL; (D) Quantification of total leukocytes infiltration in BAL; (E) Number of eosinophils in BAL; (F) Number of neutrophils in BAL; (G) Number of macrophages in BAL; (H) Number of lymphocytes in BAL. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean  $\pm$  S.E.M., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g005>

inflammation, and pulmonary physiology. In both strains, the largest number of larvae was recovered in the 3dpi, with no significant difference between them at any time of the infection (Fig 5A). In the BAL were observed an increase in hemoglobin and protein with 3dpi and 14dpi in both strains, which may also be related to increased larval migration, however in the  $ST2^{-/-}$  mice hemoglobin and protein levels were lower compared to WT (Fig 5B and 5C). When analyzing the leukocytes present in the BAL (Fig 5D, 5E, 5F, 5G and 5H), the results showed decrease in the total number of leukocytes with 14dpi and 63dpi in  $ST2^{-/-}$  mice (Fig 5D), mainly with a reduction in eosinophils, neutrophils and macrophages in relation to the WT mice (Fig 5E, 5F and 5G).

When analyzing lung inflammation, we found an increase in NAG and EPO in both strains during infection, however there was an increase in NAG and a decrease in EPO with 3dpi and 14dpi in  $ST2^{-/-}$  mice when compared to WT (Fig 6A and 6B). Histopathological scores (Fig 6C, 6D, 6E, 6F, 6G and 6H) and morphometric analysis (Fig 6I and 6J) in both strains showed hemorrhagic areas, inflammation and consequently an increase in the number of cells and thickening of the pulmonary septum, however, we observed a reduction in perivascular inflammation with 14dpi (Fig 6D), number of granulomas with 14dpi and 63dpi (Fig 6H) and the number of cells with 14dpi (Fig 6J) in  $ST2^{-/-}$  mice, corroborating with the BAL data.

In the histopathological analysis of the pulmonary parenchyma (Fig 6K), we describe the lesions caused by the larval migration of the parasite, in terms of tropism, inflammatory infiltrate, presence or absence of larvae, granulomas, vascular and exudative phenomena. The uninfected mice exhibited a morphological pulmonary appearance consistent with normality.



**Fig 6. Characterization of inflammation in the lung parenchyma in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice infected with *T. canis*.** (A) N-acetylglucosaminidase (NAG) activity in lung tissue; (B) Eosinophils peroxidase (EPO) activity in lung tissue; (C) Hemorrhage score; (D) Perivascular inflammation score; (E) Peribronchial inflammation score; (F) Parenchyma injury score; (G) Total area inflammation score; (H) Granuloma score; (I) Septum thickness; (J) Number of cells; (K) Representative hematoxylin and eosin staining of lung sections, hemorrhage area (\*), parenchyma inflammation (\$), airways inflammation (&), vascular inflammation (#), granuloma (α), Bar = 400μm. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean ± S.E.M., \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001. One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g006>

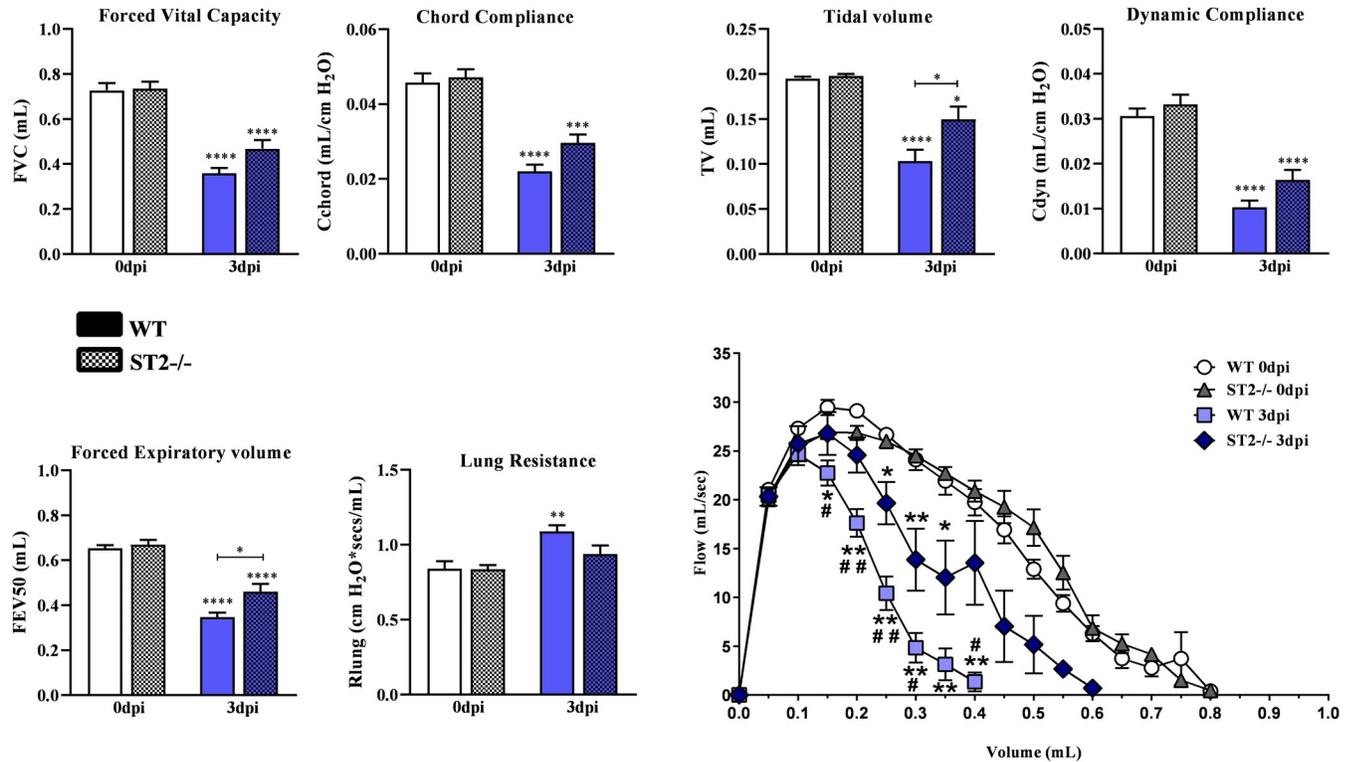
With 3dpi in both strains, thickening of the interalveolar septa with mixed inflammatory infiltrate was observed, characterized by eosinophils, neutrophils, macrophages and lymphocytes. Exudative phenomena, such as perivascular edema, extensive hemorrhagic areas, dispersed larvae in the lung parenchyma, were also evidenced and hypertrophy of the cells of the bronchi and bronchioles was frequently observed. However, in the WT mice, granulomas were observed in the exudative phase, composed mostly of eosinophils and macrophages followed by lymphocytes. At 14dpi, the histopathological analysis was similar with 3dpi, however, in ST2<sup>-/-</sup> mice was observed diffuse inflammatory infiltrate with the scarce presence of neutrophils and eosinophils. In both strains, some macrophages had a brownish pigment in their cytosol suggestive of hemosiderin. In WT mice, the presence of granuloma in the exudative phase was frequently observed, not being found in ST2<sup>-/-</sup> mice. At 63dpi, both strains continued to show thickening of the interalveolar septa with diffuse inflammatory infiltrate, characterized as mixed in addition to the formation of Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT). It was also possible to show the presence of exudative and vascular phenomena in all mice, such as small hemorrhagic foci and capillary congestion. In all WT mice, there were granulomas in the productive phase in the lung parenchyma, while in ST2<sup>-/-</sup> mice the number of granulomas was reduced. These results indicate that the IL-33/ST2 pathway may be responsible for the increase of inflammation in the airways, mainly of eosinophils, in addition to favoring the formation of granulomas during *T. canis* infection.

### Disruption of IL-33/ST2 pathway attenuated lung dysfunction during infection by *T. canis*

To assess pulmonary dysfunction caused by *T. canis*, analysis of pulmonary mechanics was performed by spirometry at the peak of larval migration in the lungs in the 3dpi (Fig 7). It was observed that *T. canis* infection contributes to the loss of the respiratory flow and volumes in consequence to tissue edema, as indicated by the reduction in the values of FVC and Flow, also with reduced pulmonary elasticity as indicated by increased lung resistance (Rlung) and reduced compliance (Cchord and Cdyn), besides causing changes in the airway flow with decreasing FEV50 in both strains. However, the ST2<sup>-/-</sup> mice had an improvement in relation to TV, Flow and FEV50, suggesting that the IL-33/ST2 is detrimental for lung injury and dysfunction during *T. canis* infection.

### Lack of the IL-33/ST2 pathway is related to the reduction of parasitic load and eosinophilic activity in the brain

After the larvae passed through the lungs, we evaluated their migration to the brain. The results of larvae recovery in brain tissue showed that the ST2<sup>-/-</sup> mice had a lower parasitic burden with 63dpi compared to the WT mice (Fig 8A). In both groups, lower levels of NAG were observed with 3dpi (Fig 8B). In addition, corroborating the lung data, ST2<sup>-/-</sup> mice also had a lower concentration of EPO in the 63dpi (Fig 8C). Analysis of the morphometry of the cerebral hemorrhagic area showed an increase in hemorrhage in both strains with 3dpi and in the WT mice with 63dpi (Fig 8D). Histopathological analysis of the brain of uninfected mice showed a



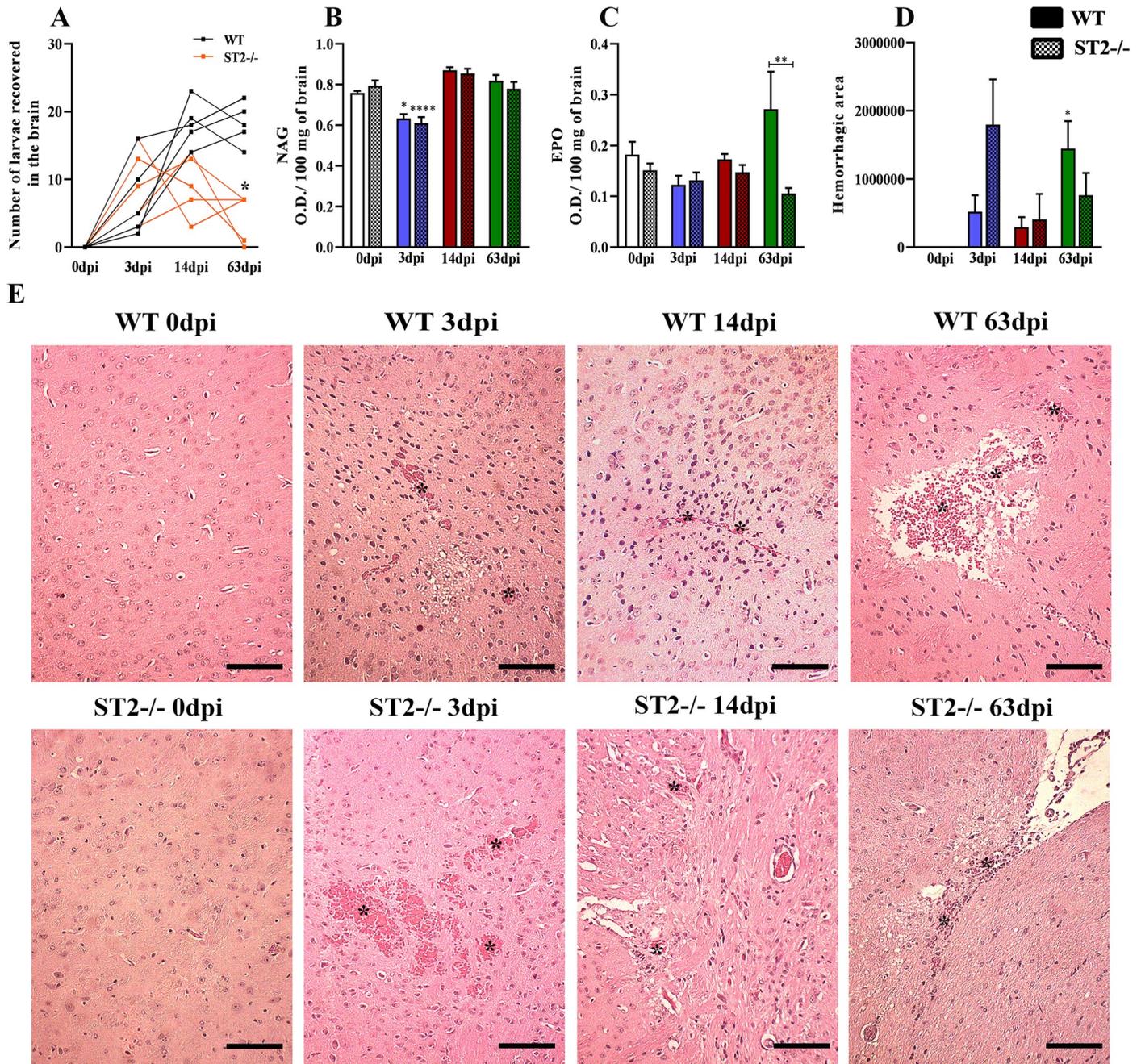
**Fig 7. Respiratory function analysis of WT and ST2<sup>-/-</sup> mice infected with *T. canis* with 3dpi.** Variables from lung mechanics were quantified: Forced vital capacity, Chord compliance, Tidal Volume, Dynamic compliance, Forced Expiratory Volume, Lung resistance and Flow–volume curve. Results represent mean ± S.E.M., \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001, when compared with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar; #*p*<0.05 when compared to infected group, ##*p*<0.001 when compared to infected group. One-way ANOVA test was used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g007>

morphological aspect consistent with normality, without histopathological changes (Fig 8E). With 3dpi, both strains demonstrated multifocal areas of hemorrhage and vacuolization of the neuropile in the cerebral cortex. Hemorrhagic foci were visualized in the cerebellum, located mainly in the white matter of the cerebellar folia and also in the hippocampus. Focal inflammatory infiltrates with lymphocytes, macrophages and occasional eosinophils were seen in the cerebral cortex. At 14 dpi, we observed occasional hemorrhagic foci in the cerebrum in both strains. And with 63dpi we observed in both groups that the white matter of the cerebellar folia had focal areas filled with “gitter cells” adjacent to the vacuolization areas and focal areas of gliosis and reactive blood vessels were detected in the cerebellum and cerebrum. Larvae and hemorrhagic foci were present in the cerebrum and hippocampus. Occasional perivascular accumulation of hemosiderophages in the cerebrum was observed. Together, the results showed that the IL-33/ST2 pathway contributes to the increase in eosinophil influx into the brain tissue at 63dpi, which may be related to increased cerebral parasitic load.

### Discussion

Studies show that several cells of the immune system express the ST2 receptor, such as Th2 cells, ILC2, cytotoxic T cells, B cells, macrophages, eosinophils, neutrophils and dendritic cells [27,28]. The total absence of the ST2 receptor, as shown in the animals used in our study, can deregulate the production of cytokines by macrophages, reduce the recruitment of immune cells to the site of infection and thus cause changes of Th2 response that may be important for



**Fig 8. Number of larvae recovered and tissue inflammation during infection in the brain.** (A) Number of larvae recovered in the brain; (B) N-acetylglucosaminidase (NAG) activity in brain tissue; (C) Eosinophils peroxidase (EPO) activity in brain tissue; (D) Hemorrhage score; (E) Representative hematoxylin and eosin staining of brain sections, hemorrhage area (\*), Bar = 200µm. Results represent mean ± S.E.M., \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\*\**p* < 0.0001. One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s test were used.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g008>

toxocarasis control [27,29]. In general, helminth infections develop a Th2-type immune response with an increase in IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33 cytokines, which may assist in the expulsion of worms in the lungs [19], but there are still no studies on the importance of the cytokine IL-33 in *T. canis* infection. Thus, we thought of the hypothesis regarding the influence of the IL-33/ST2 pathway on the host immune response and its effects on *T. canis* migration.

Our results suggest that the IL-33/ST2 pathway in *T. canis* infection contributes to the increase of systemic eosinophils resulting in increased inflammation and tissue damage, in addition to reducing the Th17 response which may be related to the control of parasite migration to the brain.

During tissue migration, *T. canis* larvae release secretion and excretion products (TES) that promote leukocytosis with eosinophilia in their hosts [6–8]. However, the absence of the ST2 receptor reduced eosinophilia and the presence of monocytes in peripheral blood during infection. IL-33 act as an alarmin, recruiting chemokines that promote monocyte migration, in addition to having a role in signaling cell damage [30,31]. Studies have also indicated that IL-33 acts directly on eosinophils and regulates their biology, survival, activation and adherence [27].

The humoral response during infection by *T. canis* is the basis for the diagnosis and monitoring of disease treatment [2,8]. A study with *T. canis*-infected mice has reported an increase in IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 in chronic phases of the disease, and IgG1 has been shown to be the best marker of infection [32], presenting findings similar to our study. In ST2<sup>-/-</sup> mice an increase in total IgG, IgG1, IgG2a and IgG2b was observed when compared to WT, suggesting that IL-33 may interfere with the humoral immune response. However, further studies relating the IL-33/ST2 pathway with the humoral response in *T. canis* infection are required.

After the larvae are released from the eggs, in the intestine, they penetrate the intestinal wall and migrate through the circulatory system to various organs, migrating first to the liver, then to the lungs and brain [4]. The *T. canis* larvae reach the liver with 1dpi, and in the initial stage of infection it is already possible to observe inflammatory foci dispersed throughout the liver parenchyma [6,33]. In our study, associated with a reduction in the parasite load in the liver tissue, the ST2<sup>-/-</sup> mice increased the hepatic inflammatory foci with 1dpi (S1 Fig), suggesting an early innate immune response in these animals or the influence of the gut microbiota. Studies show that there is a difference in the gut microbiota between different strains of mice, and the imbalance of this immune response can alter the individual's immunological fitness [34], thus, the gut microbiota of ST2<sup>-/-</sup> mice may be hindering the penetration of larvae into the gut mucosa, or the bacteria of the microbiota can translocate together with the larvae to the liver tissue, triggering a differentiated immune response in ST2<sup>-/-</sup> mice.

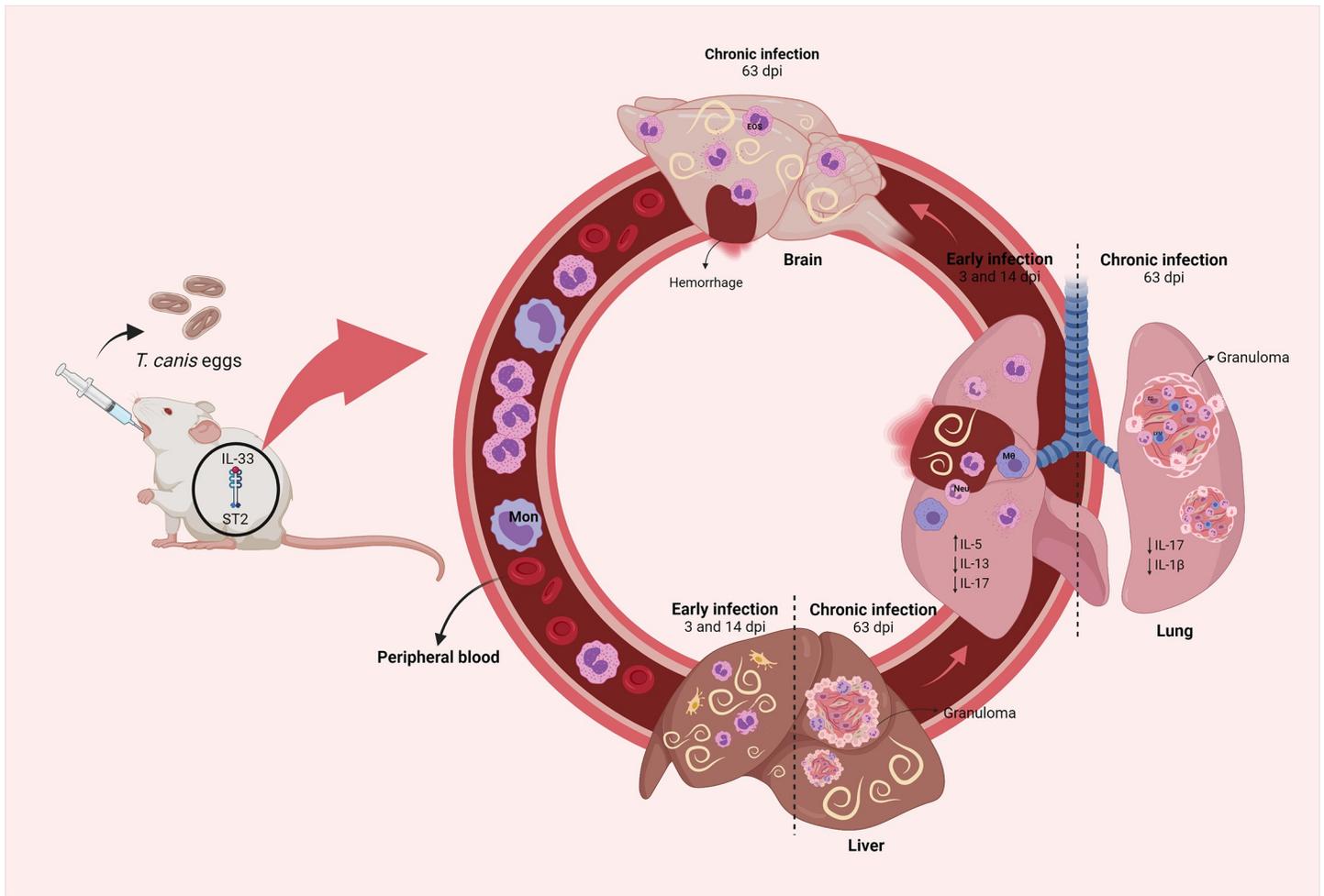
The presence of lesions in the liver parenchyma, granulomatous inflammatory response, increased ALT levels, presence of organized granulomas, and areas of liver necrosis during *T. canis* infection have also been demonstrated in other studies [6,35]. However, in ST2<sup>-/-</sup> mice there were smaller inflammatory areas with the presence of few eosinophils and a reduced number of granulomas. A combined role of macrophages and eosinophils has been proposed as key players in the mechanisms of granuloma formation during helminth infections [36]. IL-33 is related to the increase in eosinophils, and although this cell is considered important for the control of helminth infections, studies suggest that in *T. canis* infection, eosinophils may have a limited ability to kill these helminths and the larvae can escape efficiently from these cells. In addition, the inappropriate accumulation and activation of eosinophils can result in direct tissue damage through the release of highly cytotoxic granular proteins [27,37–40]. Thus, the reduction of eosinophils may be contributing to the ST2<sup>-/-</sup> mice presenting less hepatic inflammation and granuloma.

In several helminth infections, IL-4, IL-13 and IL-5 producing Th2 cells are related to the most important effector mechanisms in adaptive pulmonary immunity against helminths [41]. In our study, ST2<sup>-/-</sup> mice decreased the concentration of IL-5 and increased IL-33, IL-13 and IL-17 in the initial stage of infection, and with 63dpi in addition to IL-33 and IL-17, also increased IL-1 $\beta$  concentration. IL-33 acts directly on eosinophils and induces the production of type 2-associated cytokines from several types of cells, including Th2 cells, ILC2s, mast cells

and basophils, and consequently affects eosinophilic inflammation through the induction of IL-5, which is a cytokine known to activate eosinophils. Thus, the reduction of IL-5 in these animals may be directly related to the absence of the IL-33/ST2 pathway. Studies in animal models reveal that the role of IL-1 $\beta$  in type 2 immunity is complex and pathogen-specific, and that although this cytokine is known to promote Th1 and Th17 responses, it can also participate in Th2-mediated immunity [42,43]. Zaiss *et al.* [44] found that the nematode *Heligmosomoides polygyrus* is capable of inducing secretion of IL-1 $\beta$  in the intestine and suppressing the production of the innate cytokines IL-25 and IL-33, resulting in suboptimal type 2 immunity and allowing chronicity of the pathogen. Thus, it is suggested that there is a relationship between the IL-33/ST2 pathway and IL-1 $\beta$ , but its role in *T. canis* infection is not clear. Studies have been expanding the relation of IL-17 to helminth infections, Nogueira *et al.* [21] observed that mice after multiple exposures to *Ascaris suum* exhibited greater control of larval migration due to intense pulmonary inflammation associated with a polarized systemic Th2/Th17 immune response. Resende *et al.* [6] demonstrated that in toxocarosis there is a mixture of Th2 and Th17 inflammatory responses, observed by the increase of cytokines IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 and IL-17 in the serum of mice during larval migration, showing that *T. canis* larvae are capable of triggering the Th17 response. There is evidence that there is a complex relationship between IL-17 and the cytokines of the Th2 response, while it can increase the production of IL-4 and IL-13 from Th2 cells and innate lymphoid cells, these same cytokines can also interrupt the production of IL-17 through a negative feedback loop [45]. Studies also indicate that there is a relationship between IL-33 and the Th17 response, one study reported that IL-33 was able to suppress IL-17A production by attenuating experimental autoimmune encephalomyelitis [46]. Other study also noted that administration of IL-33 suppressed the Th17 response secreted by lamina propria lymphocytes (LPL) and replaced the Th1 response with Th2 in chronic colitis induced by sodium dextran sulfate (DSS) in mice [47]. Therefore, further studies are needed to identify the relationship between the Th17 response and the IL-33/ST2 pathway during *T. canis* infection. Our observations show that during infection, the absence of the IL-33/ST2 pathway influences the pulmonary immunological response, mainly inducing the Th17 response.

Upon reaching the lungs, *T. canis* larvae triggered an inflammatory response in the lung parenchyma and in the airways, with the presence of hemoglobin and protein leakage, altering vascular permeability, as described by [48]. The ST2<sup>-/-</sup> mice showed a reduction in leukocytes in BAL, mainly in eosinophils, less perivascular inflammatory infiltrate, reduction in the number of cells and increase in macrophage infiltrate in pulmonary parenchyma and consequently generated a smaller number of granulomas. Studies showed that ST2<sup>-/-</sup> mice prompted by allergen-induced airway hyperresponsiveness (AHR) presented reduced inflammation in the peripheral airways, suggesting that IL-33/ST2 signaling is important for the influx of cells into the airways [49]. Townsend *et al.* [50] using a model of pulmonary granuloma formation induced by *Schistosoma mansoni* eggs, demonstrated that the formation of primary pulmonary granuloma is severely inhibited in ST2<sup>-/-</sup> mice, in addition to reducing eosinophils in the lungs, as occurred in our study. Thus, we believe that the IL-33/ST2 pathway influences the formation of granulomas during helminth infections and may be associated with eosinophils. However, it is important to note that a larger number of granulomas may not be associated with a reduction of parasitic load in *T. canis* infection, since as larvae are able to leave the confines of a fibrotic encapsulated granuloma, migrate to another place and begin the granulomatous process again [51].

Finally, when analyzing the pulmonary function in the initial phase of infection, substantial changes in pulmonary physiology were observed in ST2<sup>-/-</sup> mice compared to WT, probably due to the greater hemorrhagic condition and the type of cells present during inflammation,



**Fig 9. Influence of the IL-33/ST2 pathway on *T. canis* infection.** The IL-33/ST2 pathway during *T. canis* infection influences the increase of hepatic parasite load and eosinophilia in the acute phase of the infection, causing greater liver damage and granulomas. In the lungs, it contributes to an increase in the Th2 response, reduces the Th17 response, increases eosinophils, tissue inflammation and the number of granulomas. And in the chronic phase in the brain, it contributes to an increase in the parasite burden and tissue eosinophilic activity.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.g009>

showing greater macrophage activity by increasing NAG and reducing eosinophilic inflammation. The type 2 immune response in helminth infections takes several days, however, there is a rapid mechanism of tissue repair at the beginning of helminth infection, occurring by means of alternatively activated macrophages (AAMs), which can be rapidly induced by innate immune cells such as ILC2s, that are essential to limit damage and repair affected tissue [52]. Another factor to note is that eosinophils during some helminth infections, such as toxocariasis, release proteins that are sometimes harmful to the surrounding tissues of the host, intensifying tissue damage [52,53]. Thus, our study demonstrates that the IL-33/ST2 pathway is also capable of altering pulmonary physiology, worsening airflow in the airways.

After passing through the first migration phase that predominantly affects the liver and lungs, *T. canis* larvae migrate to muscles and the brain, this being known as myotropic-neurotropic phase [54]. Studies have shown that the larvae can remain in the brain tissue for long periods, being non-encapsulated and alive, suggesting advantages for the parasite to accumulate in an organ considered immune-privileged where they could be protected from the host lymphoid system [55,56]. In the present study, we observed that the ST2<sup>-/-</sup> mice showed a

decrease in the parasitic burden in the chronic phase of the infection, which may be associated with the type of local immune response, mainly due to the reduction of eosinophilic activity, which has been shown not to contribute to the control of burden parasitic. The systemic immune response and other tissues, such as the lungs, may also have contributed to preventing more larvae from migrating to the brain. However, we do not rule out the possibility that some larvae in these animals have a preference for migrating to other tissues, such as muscles, which were not studied in this work.

In conclusion, we describe the role of the IL-33/ST2 pathway during *T. canis* infection in the acute and chronic phase of the disease (Fig 9). The presence of the IL-33/ST2 pathway increases eosinophilia and eosinophilic activity in tissues, increases the hepatic and cerebral parasitic burden and contributes to the formation of hepatic and pulmonary granuloma, which does not control larval migration nor causes tissue damage. Also, this pathway reduces airflow in the airways and changes the immune response in the lungs, decreasing the macrophage and IL-17 activity that may be important for the control of tissue damage and infection. Our observations indicate that the presence of the IL-33/ST2 pathway induces susceptibility to toxocarasis, which could be a possible therapeutic target for study in the control of larval migration and prevention of tissue damage. Finally, further studies on the immunological and pathophysiological mechanisms are needed to understand the parasite-host relationship during *T. canis* infection.

## Supporting information

**S1 Fig. Liver inflammation score and representative hematoxylin and eosin staining of liver sections in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice infected with *T. canis* with 1dpi.** (A) Liver inflammation score; (B) Representative hematoxylin and eosin staining of liver sections, hepatic parenchyma (P), vein lobular center (Vc), inflammatory infiltration foci (arrowheads).

Bar = 200µm. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean ± S.E.M., \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

(TIF)

**S2 Fig. Profile of cytokines present in lung tissue during infection with *T. canis*.** (A) TNF-α; (B) IFN-γ; (C) IL-1-β; (D) IL-6; (E) IL-12/IL-23p40; (F) IL-17; (G) IL-4; (H) IL-5; (I) IL-33; (J) IL-13; (K) IL-10; (L) TGF-β. Statistical comparisons were made between each strain with its specific uninfected group (0dpi) represented by the asterisk without the bar and between strains at the same time of infection represented by the asterisk with the bar. Results represent mean ± S.E.M., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used.

(TIF)

**S1 Table. Main findings in the liver, lung and brain histopathological analysis in *T. canis* infection.**

(PDF)

## Acknowledgments

We are grateful to Silvana Tecles Brandão, manager of the Zoonosis Control Center of the city of Belo Horizonte and to the local veterinarians for their assistance in the collection of *T. canis* adult worms. Figures were made using [biorender.com](https://biorender.com).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Thaís Leal-Silva, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Data curation:** Thaís Leal-Silva, Flaviane Vieira-Santos, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Luiza de Lima Silva Padrão, Lucas Kraemer, Pablo Hemanuel da Paixão Matias, Camila de Almeida Lopes, Ana Cristina Loiola Ruas, Isabella Carvalho de Azevedo, Denise Silva Nogueira, Remo Castro Russo.

**Formal analysis:** Thaís Leal-Silva, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Milene Alvarenga Rachid, Remo Castro Russo.

**Funding acquisition:** Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Investigation:** Thaís Leal-Silva, Flaviane Vieira-Santos, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Lucas Kraemer, Lilian Lacerda Bueno.

**Methodology:** Thaís Leal-Silva, Flaviane Vieira-Santos, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Denise Silva Nogueira, Milene Alvarenga Rachid, Marcelo Vidigal Caliari, Remo Castro Russo, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Resources:** Milene Alvarenga Rachid, Marcelo Vidigal Caliari, Remo Castro Russo, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Supervision:** Thaís Leal-Silva, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Writing – original draft:** Thaís Leal-Silva, Flaviane Vieira-Santos, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Lucas Kraemer, Denise Silva Nogueira, Milene Alvarenga Rachid, Marcelo Vidigal Caliari, Remo Castro Russo, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

**Writing – review & editing:** Thaís Leal-Silva, Flaviane Vieira-Santos, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Luiza de Lima Silva Padrão, Lucas Kraemer, Pablo Hemanuel da Paixão Matias, Camila de Almeida Lopes, Ana Cristina Loiola Ruas, Isabella Carvalho de Azevedo, Denise Silva Nogueira, Milene Alvarenga Rachid, Marcelo Vidigal Caliari, Remo Castro Russo, Ricardo Toshio Fujiwara, Lilian Lacerda Bueno.

## References

1. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. Society. 2003; 16: 265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265>
2. Chen J, Liu Q, Liu GH, Zheng W Bin, Hong SJ, Sugiyama H, et al. Toxocariasis: A silent threat with a progressive public health impact. *Infect Dis Poverty*. 2018; 7: 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0384-1> PMID: 29335021
3. Rostami A, Riahi SM, Holland C V., Taghipour A, Khalili-Fomeshi M, Fakhri Y, et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809> PMID: 31856156
4. Ma G, Holland C V., Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, et al. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18: e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6) PMID: 28781085
5. Holland C V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001407> PMID: 26670118
6. Resende NMNM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC, et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 354. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0962-7> PMID: 26135397
7. Pecinali NR, Gomes RN, Amendoeira FC, Bastos ACMPMP, Martins MJQAQA, Pegado CS, et al. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet Parasitol*. 2005; 134: 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.022> PMID: 16168564

8. Ruiz-Manzano RA, Hernández-Cervantes R, Del Río-Araiza VH, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Morales-Montor J. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. *Parasite Immunol.* 2019; 41: 1–11. <https://doi.org/10.1111/pim.12672> PMID: 31557337
9. Camparoto ML, Fulan B, Colli CM, Paludo ML, Falavigna-Guilherme a L, Fernandez M a. Initial stage of development and migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mouse experimental model. *Genet Mol Res.* 2008; 7: 444–450. <https://doi.org/10.4238/vol7-2gmr443> PMID: 18551411
10. Lescano SAZ, Nakhle MC, Ribeiro MCSA, Chieffi PP. IgG Antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012; 54: 145–152. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652012000300006> PMID: 22634886
11. Aranzamendi C, Sofronic-Milosavljevic L, Pinelli E. Helminths: Immunoregulation and inflammatory diseases—Which side are trichinella spp. and toxocara spp. on? *J Parasitol Res.* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/329438> PMID: 23365718
12. Kayes SG, Adams Oaks J. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. *Am J Pathol.* 1978; 93: 277–294. PMID: 717533
13. Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 2001; 75: 299–305. <https://doi.org/10.1017/s0022149x01000464> PMID: 11818044
14. Springer A, Heuer L, Janecek-Erfurth E, Beineke A, Strube C. Histopathological characterization of *Toxocara canis*- and *T. cati*-induced neurotoxocarosis in the mouse model. *Parasitol Res.* 2019; 118: 2591–2600. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06395-7> PMID: 31350619
15. Sattler S, Smits HH, Xu D, Huang FP. The evolutionary role of the IL-33/ST2 system in host immune defence. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013; 61: 107–117. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0208-8> PMID: 23283516
16. Le H, Kim W, Kim J, Cho HR, Kwon B. Interleukin-33: A mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cells and their progenies. *Front Immunol.* 2013; 4: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00001> PMID: 23355837
17. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 Induces Antigen-Specific IL-5 + T Cells and Promotes Allergic-Induced Airway Inflammation Independent of IL-4. *J Immunol.* 2008; 181: 4780–4790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4780> PMID: 18802081
18. Araujo ES, de Jesus Pereira CA, de Moura Pereira AT, Moreira JMP, de Rezende MC, Rodrigues JL, et al. The role of IL-33/ST2, IL-4, and eosinophils on the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* in BALB/c mice. (Original Paper)(Report). *Parasitol Res.* 2016;115.
19. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 3451–3456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201042109> PMID: 22331917
20. Oliveira FMS, Matias PH da P, Kraemer L, Gazzinelli-Guimarães AC, Santos FV, Amorim CCO, et al. Comorbidity associated to *ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13: 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007896> PMID: 31765381
21. Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Resende NM, Silva CC, de Oliveira LM, et al. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10: 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382> PMID: 26814713
22. Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, et al. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 352–358. <https://doi.org/10.1189/jlb.1104682> PMID: 15894588
23. Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, Nogueira DS, Oliveira FMS, Barbosa FS, Amorim CCO, et al. IgG induced by vaccination with *ascaris suum* Extracts is protective against infection. *Front Immunol.* 2018; 9: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00001> PMID: 29403488
24. Costa CAX, Brito KNO, Gomes MA, Caliaro M V. Study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by. 2005; 329–334.
25. Rodrigues-Machado MDG, Silva GC, Pinheiro MB, Caliaro M V., Borges EL. Effects of sepsis-induced acute lung injury on glycogen content in different tissues. *Exp Lung Res.* 2010; 36: 302–306. <https://doi.org/10.3109/01902141003609983> PMID: 20497025
26. Russo RC, Savino B, Mirolo M, Buracchi C, Germano G, Anselmo A, et al. The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN $\gamma$ -producing  $\gamma$ DT cells in mice. *Am J Physiol—Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314: L1010–L1025. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2017> PMID: 29469612

27. Johnston LK, Bryce PJ. Understanding interleukin 33 and its roles in eosinophil development. *Front Med*. 2017; 4: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00051> PMID: 28512632
28. Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol*. 2012; 33: 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.04.005> PMID: 22609147
29. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie ANJ, O'Neill LAJ, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*. 2004; 5: 373–379. <https://doi.org/10.1038/ni1050> PMID: 15004556
30. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes: ORIGINAL ARTICLE. *Immunology*. 2010; 130: 172–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x> PMID: 20070408
31. Tjota MY, Camacho DF, Turnquist HR, Sperling AI. IL-33 Drives Monocyte Recruitment to Lung Interstitium through Chemokine Upregulation. *ImmunoHorizons*. 2017; 1: 101–108. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700024> PMID: 29629429
32. Novák J, Panská L, Macháček T, Kolářová L, Horák P. Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitol*. 2017; 62: 823–835. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0099> PMID: 29035857
33. Bisseru B. Studies on the Liver, Lung, Brain and Blood of Experimental Animals Infected with *Toxocara canis*. *J Helminthol*. 1969; 43: 267–272. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00004806> PMID: 4986046
34. Ivanov II, Littman DR. Segmented filamentous bacteria take the stage. *Mucosal Immunol*. 2010; 3: 209–212. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.3> PMID: 20147894
35. Fan C, Lin Y, Hung C, Chang S, Su K. Enhanced inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* in mice. *Parasite Immunol*. 2004; 26: 273–281. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00708.x> PMID: 15541031
36. Ariyaratne A, Finney CAM. Eosinophils and macrophages within the Th2-induced granuloma: Balancing killing and healing in a tight space. *Infect Immun*. 2019; 87. <https://doi.org/10.1128/IAI.00127-19> PMID: 31285249
37. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: Implications for human disease. *Mol Med Today*. 2000; 6: 20–27. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(99\)01635-4](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(99)01635-4) PMID: 10637571
38. Kita H. Karlova universita v Praze 1348 až 1409. *Immunol Rev*. 2011; 242: 161–177. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x> PMID: 21682744
39. Takamoto M, Ovington KS, Behm CA, Sugane K, Young IG, Matthaei KI. Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57B1/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology*. 1997; 90: 511–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00208.x> PMID: 9176103
40. Rockey JH, John T, Donnelly JJ, McKenzie DF, Stromberg BE, Soulsby EJ. In vitro interaction of eosinophils from ascarid-infected eyes with *Ascaris suum* and *Toxocara canis* larvae. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24: 1346–1357. PMID: 6618795
41. Weatherhead JE, Gazzinelli-guimaraes P, Knight JM, Fujiwara R, Hotez PJ, Bottazzi ME, et al. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. 2020; 11: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594520> PMID: 33193446
42. Ferguson BJ, Newland SA, Gibbs SE, Toulomousis P, Fernandes dos Santos P, Patel MN, et al. The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in macrophages. *Int J Parasitol*. 2015; 45: 809–813. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.08.005> PMID: 26385440
43. Helmbj H, Grecis RK. Interleukin-1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 3674–3681. <https://doi.org/10.1002/eji.200425452> PMID: 15549727
44. Zaiss MM, Maslowski KM, Mosconi I, Guenat N, Marsland BJ, Harris NL. IL-1 $\beta$  Suppresses Innate IL-25 and IL-33 Production and Maintains Helminth Chronicity. *PLoS Pathog*. 2013; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003531> PMID: 23935505
45. Allen JE, Sutherland TE, Rückerl D. IL-17 and neutrophils: Unexpected players in the type 2 immune response. *Curr Opin Immunol*. 2015; 34: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.001> PMID: 25794823
46. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 1804–1814. <https://doi.org/10.1002/eji.201141947> PMID: 22585447
47. Zhu J, Wang Y, Yang F, Sang L, Zhai J, Li S, et al. IL-33 alleviates DSS-induced chronic colitis in C57BL/6 mice colon lamina propria by suppressing Th17 cell response as well as Th1 cell response. *Int Immunopharmacol*. 2015; 29: 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.032> PMID: 26359542

48. BUIJS J.; LOKHORST W.H.; ROBINSON J.; NIJKAMP FP. *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Parasite Immunol.* 1994.
49. Zoltowska AM, Lei Y, Fuchs B, Rask C, Adner M, Nilsson GP. The interleukin-33 receptor ST2 is important for the development of peripheral airway hyperresponsiveness and inflammation in a house dust mite mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2016; 46: 479–490. <https://doi.org/10.1111/cea.12683> PMID: 26609909
50. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie ANJ. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med.* 2000; 191: 1069–1075. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.1069> PMID: 10727469
51. Parsons JC. *Ascarid Infections of Cats and Dogs.* *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* Elsevier Inc.; 1987. pp. 1307–1339. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(87\)50004-3](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(87)50004-3) PMID: 3328391
52. Faz-López B, Morales-Montor J, Terrazas LI. Role of Macrophages in the Repair Process during the Tissue Migrating and Resident Helminth Infections. *Biomed Res Int.* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8634603> PMID: 27648452
53. Malheiro A, Aníbal FF, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Perini A, Martins MA, et al. pcDNA-IL-12 vaccination blocks eosinophilic inflammation but not airway hyperresponsiveness following murine *Toxocara canis* infection. *Vaccine.* 2008; 26: 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.023> PMID: 18083279
54. Lescano SZ, Queiroz ML, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 627–628. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000600016> PMID: 15558175
55. Bardón R, Cuéllar C, Galén JL. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminthol.* 1994; 68: 359–360. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00001644> PMID: 7706687
56. Holland C, Hamilton CM. The significance of cerebral toxocarasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. *J Exp Biol.* 2013; 216: 78–83. <https://doi.org/10.1242/jeb.074120> PMID: 23225870