

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

Efeitos da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamster (*Mesocricetus auratus*): avaliação da carga parasitária e da coinfeção por *Schistosoma mansoni*

LUCIANA RIBEIRO SERAFIM

BELO HORIZONTE
2014

LUCIANA RIBEIRO SERAFIM

Efeitos da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamster (*Mesocricetus auratus*): avaliação da carga parasitária e da coinfeção por *Schistosoma mansoni*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial a obtenção do título de doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo

Co-orientadora: Dr.^a Silvia Regina Costa Dias

BELO HORIZONTE

2014

Projeto desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com o Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Élide Rabelo. Às vezes nos falta palavras para expressar nossa gratidão, mas saiba que você me ajudou muito além do que imagina. Obrigada por seus conselhos, ajuda e orientação. Obrigada por ser essa pessoa alegre e por ter esse coração imenso.

À Silvia Dias minha coorientadora e amiga. Obrigada. Iniciamos como colegas de laboratório. Você no final do seu doutorado e eu começando. Sua ajuda foi fundamental.

Aos meus colaboradores do Laboratório de Imunopatologia (UFOP): professora Cláudia Carneiro, os doutorandos Nívia Carolina, Bruno Roatt e a técnica Renata. Obrigada por toda a ajuda que recebi de vocês no processamento e análise das minhas infinitas amostras.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular (ICB/UFMG) e agregados: Ana Flávia, Ana Cristina, Bruna, Jéssica, Lorrana, William, Carina, Fernando, Vivian e os recém-chegados Talita, Ana Maria, Nayara e Pedro. As contribuições de vocês foram além do trabalho braçal. Vocês me ajudaram tornando menos difícil os resultados negativos.

Aos técnicos do departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) Carlos Manoel, José Carlos, Hudson e Zenite obrigada pela preciosa ajuda.

À Cíntia Fagundes do departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG) por gentilmente ceder os antígenos SEA e SWAP.

Ao Centro de pesquisa René Rachou (FIOCRUZ Minas) pelo fornecimento das cercárias utilizadas nos experimentos.

Aos coordenadores do Laboratório de Fisiologia dos Insetos Hematófagos e do Laboratório de Malária pelo uso de seus equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia (ICB/UFMG) pela preciosa oportunidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento do projeto (Edital de Incentivo a Parasitologia Básica).

Ao meu amado Matheus que teve muita, muita, muita paciência comigo. Inclusive quando eu mesma já não tinha. Obrigada por me fazer companhia nos fins de semana que tive que coletar amostras, pelas idas e vindas de Ouro Preto.

A minha família que também teve paciência e acreditou junto comigo que seria possível realizar este sonho.

A Deus que permitiu que tudo isso acontecesse.

RESUMO

Infecções por ancilostomídeos se constituem em um grave problema de saúde pública em vários locais do mundo, incluindo o Brasil. Pacientes afetados apresentam diferentes níveis de patogenicidade que podem estar relacionadas à carga parasitária e/ou a associações com outros parasitos, tendo em vista que as áreas endêmicas para ancilostomose apresentam sobreposição para outras parasitoses. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar dois aspectos da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamster, o primeiro relacionado à carga parasitária e o segundo relacionado à coinfeção com o parasito *Schistosoma mansoni*. Na avaliação da carga parasitária foram usados inóculos crescentes de *A. ceylanicum* (25 L3, 75 L3, 125 L3 e 250 L3), e os animais acompanhados por 21 dias. Foi avaliado o peso, a eliminação de ovos nas fezes, hemograma, resposta humoral, análise histopatológica do intestino delgado e morfometria dos vermes adultos. A carga parasitária não alterou o estabelecimento, sobrevivência ou fecundidade dos vermes adultos, com número de ovos encontrados nas fezes proporcional a quantidade de larvas usadas no inóculo. A percentagem de vermes recuperados foi de 28,0%; 24,8%; 24,6% e 24,8%, respectivamente ao inóculo usado. Foi observada uma relação inversamente proporcional entre inóculo e o peso dos animais. Outros parâmetros que mostraram associação entre o tamanho do inóculo foram: contagem de leucócitos, eritrócitos, níveis de hemoglobina e percentagem do hematócrito. Foi também observada alterações na histologia intestinal de acordo com o inóculo. A morfometria dos vermes adultos revelou redução significativa da largura das fêmeas na infecção realizada com 250 L3 em relação ao grupo 25 L3. Em uma segunda parte do trabalho foi avaliada a influência da coinfeção com *S. mansoni* em hamsters. Foram realizados dois experimentos alternando a ordem da infecção. Foram avaliados o peso, a eliminação de ovos nas fezes, hemograma, resposta humoral (IgG), análise histopatológica do intestino delgado e morfometria dos granulomas. Foi observado que a cronologia da infecção influenciou os resultados em relação à perda de peso nos grupos coinfectados. Quando o *A. ceylanicum* antecedeu a infecção por *S. mansoni* os animais apresentaram a mesma redução de peso, que foi observada no grupo infectado apenas por *A. ceylanicum*, o que não ocorreu na coinfeção precedida por *S. mansoni*. Embora *A. ceylanicum* e *S. mansoni* sejam hematófagos não houve exacerbação da anemia no grupo coinfectado. O estabelecimento da segunda infecção não foi prejudicado pela infecção prévia, em nenhum dos experimentos realizados, entretanto, houve redução do número de adultos recuperados quando usados na segunda infecção. Não foi observada uma correlação positiva entre a quantidade de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado, ou eliminados nas fezes com a produção de IgG anti-SEA. Em geral no grupo Sm+Acy houve menor produção de IgG. A coinfeção não influenciou a formação, desenvolvimento ou evolução dos granulomas no intestino delgado dos hamsters infectados.

Palavras-chave: *Ancylostoma ceylanicum*, *Schistosoma mansoni*, hamster, ancilostomídeos, efeito “crowding”, coinfeção.

ABSTRACT

Hookworm infections constitute a serious public health problem in many parts of the world, including Brazil. Patients presents different aspects of the disease burden, which may be related to the parasite load and/or associations with other parasites, as the endemic areas for this parasite are overlapping with others parasitic diseases. Therefore, this study aimed to evaluate two aspects of infection with *Ancylostoma ceylanicum* in hamster; the first related to the parasite load and the second related to the co-infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. In the assessment of parasitic burden *A. ceylanicum* increasing inocula of the L3 larvae (25, 75, 125 and 250) were used, and the animals followed for 21 days for the evaluations of weight, number of eggs in the faeces, blood count, humoral response, histopathological analysis of the small intestine and morphometry of adult worms. The averages of adult worms recovered were: 28, 0%; 24, 8%; 24, 6% and 24, 8% according to the number of third stage larva used to inocula size of 25, 75, 125 and 250 L3, respectively. The size of the inoculum did not affect the establishment, survival or fecundity of adult helminthes. Reductions in the red blood cell and hemoglobin levels in the infected group were correlated inversely with the number of white blood cells. Moreover, differential cell counting revealed a positive correlation between the worm load and leucocytes numbers. The humoral response against excretory-secretory antigens was more robust and sensitive compared with the response against crude extract, with no positive correlation with the number of worms. The effect of the population density was more evident in female worms with a reduction of the width of the females from the group infected with 250 L3 in comparison to the 25 L3 group. An inverse correlation relationship between inoculum and weight of the animals was observed. The second part of the study was to evaluate the influence of coinfection with *S. mansoni* in hamsters. Two experiments were conducted by switching the order of infection. Weight were assessed, the elimination of eggs in the feces, blood count, humoral response (IgG), histopathological analysis of the small intestine and morphology of granulomas. It was observed that the chronology of infection influenced the results in relation to weight loss in coinfecting groups. When the *A. ceylanicum* preceded infection by *S. mansoni* animals showed the same weight reduction observed in the group infected only by *A. ceylanicum*, which did not occur in coinfection preceded by *S. mansoni*. Although *A. ceylanicum* and *S. mansoni* are bloodsucking worms, no exacerbation of anemia in the coinfecting groups were observed. The establishment of the second infection was not affected by prior infection in any of the experiments. It was not observed a positive correlation between the amount of *S. mansoni* eggs retained in the liver or eliminated in the faeces with the production of anti-SEA IgG. In general the production of IgG to the group Sm + Acey was lower in comparison to the Sm group. The co-infection did not influence the formation, development and evolution of granulomas in the small intestine of infected hamsters.

Keywords: *Ancylostoma ceylanicum*, *Schistosoma mansoni*, hamster, hookworm, “crowding” effect, Coinfection.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Alteração de peso semanal dos grupos experimentais em gramas.	41
GRÁFICO 2: Recuperação de vermes adultos e O.P.G..	43
GRÁFICO 3: Parâmetros hematológicos no dia da eutanásia.....	45
GRÁFICO 4: Contagem diferencial de leucócitos..	46
GRÁFICO 5: Avaliação Morfométrica do intestino delgado de hamsters..	48
GRÁFICO 6: Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente ao extrato proteico total de <i>A.ceylanicum</i> (A) e ES (B)..	50
GRÁFICO 7- Peso médio dos grupos ao longo do experimento.	71
GRÁFICO 8- Eliminação de ovos de <i>A. ceylanicum</i>	72
GRÁFICO 9- Eliminação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em fezes de hamster infectados. Média de eliminação por grupo.....	73
GRÁFICO 10- A: Média de recuperação de vermes adultos de <i>A. ceylanicum</i> do intestino delgado de hamster. B: Média de recuperação de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> dos vasos mesentéricos de hamster.	74
GRÁFICO 11- Número de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos no fígado.	75
GRÁFICO 12- Hemograma realizado aos 30 dpi.	77
GRÁFICO 13 - Hemograma realizado aos 60 dpi..	78
GRÁFICO 14 - Hemograma realizado aos 75 dpi	79
GRÁFICO 15- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 30 dpi..	80
GRÁFICO 16- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 60 dpi	81
GRÁFICO 17- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 75 dpi.	82
GRÁFICO 18- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos antígenos aos 30 dpi frente aos antígenos: A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de <i>A. ceylanicum</i> ; D: ES... ..	83
GRÁFICO 19- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos 64 dpi frente aos antígenos: A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de <i>A. ceylanicum</i> ; D: ES.....	84
GRÁFICO 20- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos 75 dpi frente aos antígenos A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de <i>A. ceylanicum</i> ; D: ES.....	85
GRÁFICO 21 - Avaliação Morfométrica do intestino delgado de hamsters.....	88
GRÁFICO 22: Área média dos granulomas no fígado de hamsters.....	89
GRÁFICO 23- Aferição de peso dos grupos experimentais.	91
GRÁFICO 24- Exame Parasitológico de Fezes (Formol-Éter).....	92
GRÁFICO 25- Recuperação de vermes.	93
GRÁFICO 26- Número de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos no fígado.	94

GRÁFICO 27- Hemograma de hamster fêmeas.....	95
GRÁFICO 28- Hemograma aos 90 dpi.	96
GRÁFICO 29- Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente aos antígenos. A: SEA; B: SWAP; C: Extrato bruto de <i>A. ceylanicum</i> ; D: ES.	98
GRÁFICO 30 - Avaliação morfométrica do intestino delgado de hamters.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Morfometria de fêmeas adultas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	52
Tabela 2 - Morfometria de machos adultos de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	53
Tabela 3: Análise do estágio evolutivo nos granulomas do intestino delgado aos 75 dpi	89
Tabela 4: Análise da fase evolutiva do granuloma aos 90 dpi	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema do delineamento experimental	33
FIGURA 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado de hamster não-infectados (NI) ou infectados com 25, 75, 125, e 250 L3 de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	49
FIGURA 3 Esquema delineamento experimental das coinfeccções.	63
FIGURA 4: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters.	87
FIGURA 5: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters.	100
FIGURA 6: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Ancylostoma ceylanicum</i> ,	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: porcentagem

≤: menor ou igual

µg/ml: microgramas por mililitro

µl: Microlitro

µm: micrometro

Acey-1: grupo infectado com *A. ceylanicum* do experimento 1

Acey-2: grupo infectado com *A. ceylanicum* do experimento 2

Acey+Sm: grupo infectado com *A. ceylanicum* e coinfectado com *S.mansoni*

ANOVA: análise de variância

Anti-IgG: anti- imunoglobulina gama

CEUA-UFMG: Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dpi: dias pós-infecção

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético).

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ES: antígeno de Excreção e secreção

EUA: Estados Unidos da América

g: força gravitacional

h: hora

HE: Hematoxilina-Eosina

ICB/UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

IFN-γ: interferon gama

IgE: imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina gama

IL-2: interleucina dois

IL-4: interleucina quatro

IL-5: interleucina cinco

IL-6: interleucina seis

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

IL-23: interleucina 23

kDa : quilo dalto

Kg: quilograma

KOH: hidróxido de potássio

LPM: Laboratório de Parasitologia Molecular

M: molar

min.: minutos

mg: miligrama

ml: mililitros

mm: milímetro

MWCO: Molecular Weight Cut Off

n: número

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NI: não infectado

ns: não significativo

NUPEB-UFOP: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto

O.P.G: ovos por grama de fezes

°C: graus Celsius

PBMC: peripheral blood mononuclear cel

PBS: phosphate buffered salin

PBST: Solução de tampão fosfato e tween 20

pH: potencial de Hidrogênio

rpm: rotações por minuto

SD: desvio padrão

SEA: Soluble egg antigens

Sm-1: grupo infectado com *S. mansoni* do experimento 1

Sm-2: grupo infectado com *S. mansoni* do experimento 2

Sm+Acey: grupo infectado com *S. mansoni* e coinfectado com *A. ceylanicum*

SWAP: soluble worm antigen preparation

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th1: T helper tipo 1

Th2: T helper tipo 2

TNF- α ; Fator de necrose tumoral alfa

TNK; Natural killer T

T_{reg}: T regulador

U/mL : unidades por mililitro

v/v: volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Ancilostomose	18
1.2. Esquistossomose mansoni	20
1.3. Efeitos dependentes da densidade populacional “crowding effect”	23
1.4. Coinfecções	24
1.5. Justificativa	28
2. Objetivos.....	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2.. Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO 1 - EFEITO “CROWDING”	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Delineamento experimental	33
3.2. Infecção experimental	34
3.2.1. Infecção por <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	34
3.3. Coleta de sangue	34
3.4. Aferição de peso	35
3.5. Exame parasitológico de fezes	35
3.6. Necropsia e recuperação dos vermes adultos.....	35
3.6.1. Recuperação de <i>A. ceylanicum</i>	35
3.7. Morfometria dos vermes adultos de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	35
3.8. Processamento histológico das amostras obtidas durante as necropsias	36
3.9. Avaliação histopatológica	36
3.9. 1. Intestino delgado	37
3.10. Preparação de antígenos	37
3.10.1. Antígeno de Excreção e secreção de verme adulto de <i>A. ceylanicum</i>	37

3.10.2. Preparação de extrato proteico total de vermes adulto de <i>A. ceylanicum</i>	38
3.11. Dosagem de proteínas.....	38
3.12. ELISA	38
3.13. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Aferição de peso	41
4.2. Exame parasitológico de fezes	41
4.2.1. Ovos por grama de fezes (O.P.G)	41
4.3. Recuperação dos vermes adultos de <i>A. ceylanicum</i>	42
4.4. Exames hematológicos.....	44
4.4.1. Hemograma.....	44
4.4.2. Contagem diferencial de leucócitos	46
4.5. Análise histológica	47
4.6. ELISA	50
4.7. Morfometria de <i>A. ceylanicum</i> adultos.....	51
5. DISCUSSÃO	54
CAPÍTULO 2 - COINFECCÕES	59
6. OBJETIVOS	61
6.1. Objetivo geral.....	61
6.2. Objetivos específicos.....	61
7. MATERIAL E MÉTODOS	62
7.1. Delineamento experimental	62
7.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL	64
7.2.1. Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	64
7.2.2. Infecção por <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	64
7.3. Coleta de sangue	64
7.4. Aferição de peso	64

7.5. Exame parasitológico de fezes	64
7.5.1. Fórmol-éter	64
7.5.2. O.P.G.	65
7.6. Necropsia e recuperação dos vermes adultos.....	65
7.6.1. Recuperação de <i>S.mansoni</i>	65
7.6.2. Recuperação de <i>A. ceylanicum</i>	66
7.7. Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos no fígado	66
7.8. Processamento histológico das amostras obtidas durante as necropsias	66
7.9. Avaliação histopatológica de intestino delgado	66
7.10. Preparação de antígenos	67
7.10.1.. Antígeno de excreção e secreção de verme adulto de <i>A. ceylanicum</i>	67
7.10.2. Antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e Antígeno de ovo de <i>S. mansoni</i> (SEA)	67
7.11. Dosagem de proteínas.....	68
7.12. ELISA	68
7.13. Análise estatística.....	68
8. RESULTADOS EXPERIMENTO 1.....	71
8.1. Aferição do peso.....	71
8.2. Exame parasitológico de fezes	72
8.2.1. O.P.G	72
8.2.2. Eliminação de ovos de <i>S. mansoni</i>	72
8.3. Recuperação dos vermes adultos de <i>A. ceylanicum</i> e <i>S. mansoni</i>.....	73
8.4. Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos no fígado	74
8.5. Exames hematológicos.....	75
8.5.1. Série vermelha	75
8.5.2. Leucograma	80
8.6. ELISA	82
8. 7. Análise histológica	86
9. RESULTADOS EXPERIMENTO 2.....	91
9.1. Aferição do peso.....	91

9.2. Exame parasitológico de fezes	91
9.2.1. Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i>	91
9.2.2. O.P.G	92
9.3. Recuperação dos vermes adultos de <i>A. ceylanicum</i> e <i>S. mansoni</i>.....	92
9.4. Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos no fígado	93
9.5. Exames hematológicos.....	94
9.5.1. Série vermelha	94
9.5.2. Leucograma	96
9.6. ELISA	97
9.7. Análise histopatológica.....	98
10. DISCUSSÃO	104
11. CONCLUSÕES.....	110
13. ANEXOS	126

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Ancilostomose

A ancilostomose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo. Nos países em desenvolvimento, leva a quadros de anemia e desnutrição entre a população mais carente. A doença acomete entre 576 e 740 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (De Silva *et al.*, 2003; WHO 2012). Utilizando como parâmetro o índice DALYs - Disability-adjusted life years- (WHO, 2010), que analisa o número de anos vividos com incapacidade, a infecção causada por ancilostomídeos é uma das doenças parasitárias mais importantes em humanos, por se tratar de uma morbidade crônica de longa duração, que afeta crianças e adultos. (De Silva *et al.*, 2003; Loukas *et al.*, 2005, Pullan *et al.* 2010) .

As espécies de Ancylostomatidae de interesse na medicina humana e veterinária são *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *A. ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliense*, sendo os dois últimos parasitos definitivos do intestino delgado de cães e gatos. A infecção do hospedeiro ocorre pela penetração ativa da larva de terceiro estágio (L3) na pele do hospedeiro. Após a migração pelos tecidos, a larva alcança os pulmões onde sofre muda. Ascende a árvore brônquica até a laringe e é deglutida. Após a passagem pelo estômago, a larva alcança o intestino delgado onde se fixa na mucosa intestinal através da cápsula bucal e inicia a hematofagia. Após o amadurecimento sexual dos vermes ocorre a cópula. As fêmeas fazem a postura de milhares de ovos embrionados que alcançam o meio externo juntamente com as fezes do hospedeiro. Em condições favoráveis de temperatura e umidade ocorre a eclosão da larva de primeiro estágio. No ambiente a larva sofre duas mudas até se tornar uma larva infectante (L3). O desenvolvimento do ovo até a larva de terceiro estágio acontece no período de cinco a oito dias, (Soulsby, 1965).

Durante a penetração e migração da L3 no hospedeiro humano podem ocorrer reações assintomáticas até erupções cutâneas (Loukas e Prociv, 2001). A patogenia da ancilostomose é consequência direta da perda de sangue que ocorre durante a fixação e alimentação dos parasitos adultos no intestino delgado. A infecção por ancilostomídeos é uma importante causa de anemia ferropriva, que em infecções maciças, podem causar, devido à enteropatias por perda de proteínas, retardo físico e mental em crianças, além de óbito (Prociv e Croese, 1990; Hotez *et al.*, 2006 a). Estima-se que *A. duodenale* pode

causar a perda de 250µl de sangue por verme/dia. A perda sanguínea associada a uma dieta inadequada de ferro pode levar a quadros graves de anemia. Quando os estoques de ferro se encontram reduzidos é observado a correlação negativa entre a intensidade da infecção, que pode ser medida pelo número de ovos nas fezes, e a redução do níveis de hemácias e hemoglobina. O desenvolvimento de anemia, portanto é o somatório de fatores como níveis do estoque de ferro, intensidade da infecção e da espécie de ancilostomídeo, visto que *A. duodenale* causa maiores perdas de sangue comparadas às demais espécies do gênero.

Estudos mostram que a infecção por ancilostomídeos não confere proteção à reinfeções e indicam que o pico de intensidade de infecção ocorre em indivíduos adultos ou mais velhos (Gandhi *et al.*, 2001; Bethony *et al.*, 2002). Em regiões endêmicas observa-se que o aumento da carga parasitária está associado à idade do hospedeiro (Bethony *et al.*, 2002, Hotez *et al.*, 2004) diferente do que ocorre, por exemplo, na esquistossomose.

Os tratamentos antihelmínticos são eficazes na eliminação de vermes adultos, no entanto as reinfeções ocorrem rapidamente (Albonico *et al.*, 1995; Quinnell *et al.*, 1993). Para elucidar os mecanismos de evasão da resposta do sistema imune durante a ancilostomose já foram utilizados inúmeros modelos experimentais como coelhos (Bhopale *et al.*, 1980), galinhas (Goyal *et al.*, 1986), cães (Dias *et al.* 2013a) camundongos, e hamsters (Dias *et al.*, 2013b; Pacanaro *et al.*, 2014).

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) frequentemente é empregado como modelo experimental, embora apresente limitações como poucos insumos para estudos imunológicos e resistência parcial a infecções sucessivas (Garside *et al.*, 1990; Brailsford e Behnke, 1992). As infecções nesse modelo utilizando inóculos com 100 L3 de *A. ceylanicum* apresentam predominantemente perfil Th1, com aumento de citocinas proinflatórias IFN- γ e TNF- α . Após a patência ocorre a mudança para o perfil Th2 com aumento dos níveis de IL-4 e IL-10. (Loukas *et al.*, 2006).

A resposta Th2 está associada à proteção parcial do hospedeiro tanto na ancilostomose como em outros parasitos gastrointestinais, sendo que a IL-4 e IL-5 possuem papel fundamental na resposta. Os ancilostomídeos podem promover sua sobrevivência secretando agentes imunossupressores e, possivelmente, estimulando o aparecimento de populações T_{reg} (Pritchard *et al.*, 2007).

1.2. Esquistossomose mansônica

A esquistossomose é a segunda doença tropical mais importante na área de saúde pública, causando cerca de 280.000 mortes anuais (Steinmann *et al.*, 2006; Hotez *et al.*, 2008b;). Apesar do progresso no controle ou eliminação da esquistossomose em diversas áreas (Hotez *et al.*, 2008a; Hotez *et al.*, 2008b), a doença ainda permanece endêmica em 76 países em desenvolvimento (Chitsulo *et al.*, 2000; van der Werf *et al.*, 2003, Gryssels 2012). Em 54 países, as pessoas infectadas possuem a forma de esquistossomose intestinal (Chitsulo *et al.*, 2000). Estima-se que a população infectada seja de 207 milhões e o número de pessoas que se encontra em risco de contrair a doença seja de 779 milhões em todo o mundo (Bethony *et al.*, 2006; Steinmann *et al.*, 2006; Hotez *et al.*, 2008a; Hotez *et al.*, 2008b;). Dentre as pessoas infectadas, 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões sofrem as consequências graves da doença (Chitsulo *et al.*, 2000; Engels *et al.*, 2002).

A esquistossomose mansônica e a ancilostomose fazem parte das 14 doenças tropicais denominadas doenças tropicais negligenciadas, devido ao descaso das autoridades em vários países que são endêmicos para essas parasitoses, em destinar recursos para o controle e tratamento (Hotez *et al.*, 2006b, Gray *et al.*, 2010).

Os adultos de *Schistosoma mansoni* habitam os vasos sanguíneos mesentéricos do sistema porta hepático, onde as fêmeas realizam a ovoposição de aproximadamente 300 ovos por dia. Uma pequena parte dos ovos consegue atravessar o epitélio intestinal e atingir a luz intestinal. Estes ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro. As fezes despejadas em coleções de água com condições ideais de luminosidade, salinidade, temperatura e a presença do hospedeiro intermediário (*Biomphalaria*) permitem a continuidade do ciclo do parasito. Na água o mirácido emerge e nada ativamente a procura de seu hospedeiro intermediário. Quando o encontra penetra ativamente em seus tecidos. O mirácido dá origem ao esporocisto e este, por sua vez, as cercárias. As cercárias são a forma infectante para vertebrados. Após emergir do caramujo as cercárias nadam a procura de seu hospedeiro definitivo. Após encontrá-lo ocorre a penetração ativa na pele do hospedeiro. A cercária perde a sua cauda, se tornando o esquistossômulo que migra, via corrente sanguínea, para os pulmões e posteriormente através de vários órgãos até atingir o sistema porta hepático, onde se tornam adultos. Os adultos em cópula migram até as veias mesentéricas e as fêmeas iniciam o processo de ovoposição (Schmidt e Roberts, 2000). Os ovos que não

alcançam a luz intestinal são levados pela corrente sanguínea, atingindo diversos órgãos, principalmente o fígado. Embora os adultos sejam hematófagos e habitem os vasos sanguíneos, são os ovos os causadores da patologia na esquistossomose (Schramm e Hass, 2010).

A esquistossomose mansônica é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A primeira apresenta uma fase pré-postural que ocorre cerca de 10-30 dias após a infecção. Os vermes adultos se alojam nas veias mesentéricas do hospedeiro onde ocorre a liberação de antígenos secretados do tubo digestivo intestino e do tegumento do parasito. Tais antígenos provocam uma reatividade inflamatória caracterizada pelas citocinas IL-2 e IFN- γ . Observa-se um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos (Pearce *et al.*, 1991).

A fase aguda propriamente dita aparece em torno de 50 dias e dura até cerca de 120 dias após a infecção. Ela é caracterizada pela dispersão dos ovos pelo corpo do hospedeiro. Eles são encontrados principalmente na parede do intestino e no fígado, provocando, então, a formação de granulomas, cujo volume pode chegar até 100 vezes o volume do ovo. O surgimento e exacerbação da reação granulomatosa marcam a fase aguda. Observa-se uma mudança importante no padrão de resposta imunológica para um perfil do tipo 2 com predomínio de citocinas como IL-4 e IL-5 embora a participação de TNF- α e IFN- γ sejam de grande importância para o processo de recrutamento primário de células (Pearce *et al.*, 1991; Boros, 1994).

O desenvolvimento do granuloma nesse estágio é predominantemente celular, principalmente formado por eosinófilos, macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos (Weinstock, 1992). Na segunda fase de formação do granuloma, onde o seu diâmetro apresenta-se maior, há um predomínio das citocinas IL-4 e IL-5.

A fase crônica, que se inicia a partir do 4^o mês após a infecção, é caracterizada pela redução do tamanho dos granulomas em torno dos ovos. A esquistossomose pode apresentar variações clínicas que vão da forma intestinal benigna até as mais graves como a hepatoesplênica e hepatointestinal. A modulação da reatividade imunológica inflamatória resulta na redução dos granulomas e da sintomatologia.

As manifestações clínicas variam dependendo principalmente da localização e intensidade do parasitismo e da capacidade de reação imunológica do hospedeiro à infecção. Em geral, ocorrem diarreia e desconforto abdominal. Nos casos mais

graves, ocorrem ascite e varizes esofageanas e circulação colateral. Em casos de desnutrição o quadro clínico é agravado (Andrade e Warren 1964). Ao longo dos anos foram propostos mecanismos para explicar o fenômeno de modulação na esquistossomose: a) indução da anergia de linfócitos Th1 (Stadecker, 1992); imunomodulação por IL-10 (Flores-Villanueva, *et al.*, 1994; Falcão *et al.*, 1998); linfócitos T supressores (Fidel e Boros, 1990); linfócitos B ativados (Jankovic *et al.*, 1998); apoptose de linfócitos no fígado (Carneiro-Santos *et al.*, 2000).; participação de células T CD4⁺ reguladoras (T_{reg}) e CD8⁺ (Taylor *et al.*, 2006; Ekkens *et al.*, 2007).

Nos modelos experimentais como camundongos, o estabelecimento da doença também se dá pelo desenvolvimento de uma resposta granulomatosa caracterizada pela formação de granulomas induzidos por antígenos solúveis do ovo (SEA) compostos por linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, eosinófilos e células epitelióides e gigantes. Ao longo do curso da infecção, na qual há a passagem da fase aguda para a fase crônica (120-140 dias) também se observa a modulação desses granulomas. Os animais apresentam alguns sintomas, tais como diarreia durante a fase aguda e, pequenas lesões na mucosa intestinal que podem levar a morte dos animais através do seu sangramento.

Esse papel duplo da reatividade ao ovo é um dos fenômenos mais intrigantes na doença. Ele pode estar relacionado tanto a particularidades antigênicas dos componentes do ovo quanto aos microambientes particulares onde o granuloma ocorre, ou seja, o fígado e a mucosa intestinal. Desta maneira, o granuloma parece apresentar um papel inflamatório patogênico e um papel imunorregulador no qual há o recrutamento e supressão de linfócitos específicos para os antígenos do ovo do parasito (Rumbley *et al.*, 1998).

Se a reatividade inflamatória aos antígenos do parasito parece ser importante na imunidade adquirida e na proteção a reinfeção, o fenômeno da imunomodulação tem um papel fundamental na diminuição do dano tecidual e sua ausência está associada ao desenvolvimento das formas mais graves da doença em humanos e modelos experimentais.

A larga extensão das áreas endêmicas e a constante reinfeção dos indivíduos, associadas às precárias condições sanitárias, faz com que o tratamento da esquistossomose baseado apenas em quimioterapia seja ineficiente (Bergquist, 1998). A interrupção da transmissão é o ideal a ser buscado. Não podendo ser alcançado apenas com o tratamento das populações infectadas (Katz, 1999), pois a

quimioterapia isoladamente não afeta a transmissão da infecção ou as altas taxas de reinfeção (Bergquist, 1998). A rápida reinfeção após o tratamento (Hotez *et al.*, 2008a) tem atenuado a efetividade dos programas de controle baseados no tratamento com praziquantel, além disso já foram observados uma redução na susceptibilidade do parasito à droga. (Doenhoff e Pica-Mattocchia, 2006; Gryseels *et al.*, 2006). Assim, um programa integrando tratamento quimioterápico, o qual propicia uma redução da carga parasitária em curto prazo e a vacinação que propicia uma resposta imune-protetora de longa duração seria o mais adequado para o controle da esquistossomose (Capron *et al.*, 2002).

1.3. Efeitos dependentes da densidade populacional – “crowding” effect”

Diversos pesquisadores observaram em infecções experimentais ou naturais a diminuição do tamanho dos vermes em infecções mais intensas. Este fenômeno foi nomeado efeito “crowding” (Read, 1951; Holmes, 1961; Roberts, 2000). Read (1951) descreveu o efeito “crowding” como uma relação inversamente proporcional entre as dimensões do helminto e sua densidade populacional. Além da redução do tamanho e peso do verme há a diminuição de ovos produzidos (Roberts, 2000). O exemplo clássico desse efeito é para o cestoda *Hymenolepis diminuta* (Chandler, 1939; Read, 1951; Kennedy e Behnke, 2001).

Os mecanismos básicos que promovem a ocorrência do efeito “crowding” no crescimento e reprodução de helmintos geram discussões e controvérsias. As hipóteses propostas estão relacionadas à competição (intraespecífica ou interespecífica) por recursos limitados e espaço; produtos inibitórios secretados, reações inflamatórias no intestino do hospedeiro em função da maior carga parasitária que poderiam, portanto, interferir com o desenvolvimento do parasito (Roberts e Insler, 1982; Bush e Lotz, 2000; Roberts, 2000; Homes, 2002;).

Alguns trabalhos apontam que geralmente os nematodas são mais resilientes e os efeitos de redução de tamanho e fecundidade observados nos cestodas são menos intensos (Andreassen *et al.*, 1999; Bush e Lotz, 2000; Roberts, 2000; Paterson e Viney, 2002). No entanto sabe-se que toda competição é energeticamente dispendiosa e reduz o “fitness” de todos os organismos envolvidos (Roberts, 2000). Os mecanismos

responsáveis por tais efeitos podem ser mais complexos e, portanto, medidas precisas do tamanho do parasito e a determinação das taxas de fecundidade podem ajudar a discriminar entre as hipóteses alternativas que levam a esse efeito.

1.4. Coinfecções

O poliparasitismo é a ocorrência de duas ou mais espécies de parasitos em um mesmo organismo. Este fenômeno é comum em regiões onde distintas espécies de parasitos coexistem em alta frequência. Os indivíduos afetados geralmente fazem parte da parcela mais pobre da população (Petney e Andrews, 1998).

Estudos indicam que indivíduos infectados com múltiplas espécies de helminto (poliparasitados), frequentemente apresentam infecções mais graves que indivíduos infectados com uma única espécie (Booth *et al.*, 2004). O quadro de poliparasitismo pode resultar em deficiência física e cognitiva (Hotez *et al.*, 2006b; Hotez *et al.*, 2007; Hotez *et al.*, 2008b;), sendo que já foi visto que o poliparasitismo tem um impacto substancial na saúde física da população africana (Beasley *et al.*, 2002). As coinfecções envolvendo ancilostomídeos e *Schistosoma* sp estão entre as mais frequentes.

Em estudo epidemiológico realizado no Brasil com 500 indivíduos; 39,5% estavam infectados com *S. mansoni*, e 76% destes indivíduos também estavam infectados com *Necator americanus* (Webster *et al.*, 1997). Em outro estudo realizado com crianças em idade escolar da região sudeste, observou-se que 41% das crianças apresentavam infecção por *S. mansoni* e *N. americanus* (Pullan *et al.*, 2008).

Existe um crescente interesse em determinar como diferentes parasitos interagem entre si e com o hospedeiro, e como este responde à coinfecção. O tema tem sido abordado em estudos epidemiológicos (Brito *et al.*, 2006; Brooker e Clements, 2009; Pullan *et al.*, 2010), ecológicos (Graham, 2008) e fisiológicos (Wu *et al.*, 2009).

Sob o enfoque imunológico observou-se que animais coinfectados por macroparasitos (helmintos) e microparasitos (vírus, bactérias e protozoários) apresentavam alterações em suas respostas, quando comparados aos animais com infecções únicas. Durante infecções concomitantes a resposta imune para cada parasito pode ser inferior àquela observada em infecções individuais ou contrariamente, ser potencializada (Graham, 2002).

A cronologia e a ordem em que ocorrem estas infecções podem influenciar os efeitos e a gravidade da doença em seu hospedeiro (Christensen *et al.*, 1987). Por

exemplo, quando *Toxoplasma gondii* precede *S. mansoni* em infecções em modelo murino, o hospedeiro apresenta uma esquistossomose branda. Inversamente, quando *S. mansoni* antecede *T. gondii*, o hospedeiro apresenta grave reação inflamatória no fígado, resultando em morte dos animais coinfetados (Marshall *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2001).

A coinfeção pode também resultar em eliminação de um dos parasitos. Animais susceptíveis (camundongos AKR) foram capazes de eliminar a infecção por *Trichuris muris* quando previamente infectados com *S. mansoni*. Os camundongos que desenvolveram resposta Th1 contra a infecção por *T. muris* não conseguiram eliminar o parasito, no entanto eles se tornaram resistentes depois que ocorreu a infecção por *S. mansoni* devido ao desenvolvimento de uma forte resposta Th2. (Curry *et al.*, 1995).

Yoshida e colaboradores (1999) observaram que resposta imune Th2 dominante induzida pelo *S. mansoni* foi protetora. Os roedores infectados com *S. mansoni* ao serem desafiados com *Strongyloides venezuelensis* apresentavam redução significativa dos vermes adultos recuperados de *S. venezuelensis*.

Camundongos coinfetados com *Litomosoides sigmodontis* e *Leishmania major* mostraram desenvolvimento tardio das lesões leishmaniosas, quando comparados aos animais infectados somente com *L. major*, sugerindo a existência de efeitos benéficos em coinfeções para o hospedeiro (Lamb *et al.*, 2005).

Helmintos influenciam não apenas a resistência do hospedeiro a outro patógeno como também a gravidade da doença resultante. A malária cerebral é associada com a superprodução de citocinas proinflamatórias. Infecções por helmintos são capazes de diminuir a produção destas citocinas induzindo a secreção de IL-10 e TGF β (Specht e Hoerauf, 2007).

Assim, a coexistência de parasitos em um mesmo hospedeiro pode resultar em interações sinérgicas ou antagônicas da resposta imune e as manifestações clínicas podem ser tanto exacerbadas como reprimidas (Brito *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de uma vacina multivalente para prevenir a infecção por ancilostomídeos e a esquistossomose foi proposto (Hotez *et al.*, 2008 a). Entretanto, muitos estudos têm demonstrado que coinfeções entre helmintos e outros parasitos podem influenciar na eficácia de vacinas ao modular a resposta imune do hospedeiro (Cooper *et al.*, 2000, Nookala *et al.*, 2004).

Até o momento poucos trabalhos experimentais foram realizados analisando a resposta imune decorrente da associação de *S. mansoni* e ancilostomídeos. A exemplo

do que ocorre em outras coinfeções, se faz necessário o conhecimento de tal interação e as consequências para o seu hospedeiro.

1.5. JUSTIFICATIVA

1.5. Justificativa

As helmintíases constituem um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento como o Brasil. Sabe-se que a carga parasitária tem influencia direta sobre a gravidade da doença no hospedeiro, porém pouco se sabe de seu efeito sobre a população de vermes albergadas e como isso pode influenciar no curso da infecção. As coinfeções tornam este cenário ainda mais complexo.

As coinfeções são frequentemente relatadas na população humana e animal em estudos epidemiológicos, no entanto poucos trabalhos reproduzem em modelos experimentais. Estudos demonstram que a coinfeção pode ter natureza antagonista ou sinérgica. Ela influencia o padrão da transmissão do parasito, pode atenuar sintomas ou mesmo agravar doenças desencadeadas pelos parasitos envolvidos. Além disso, as coinfeções podem contribuir para a perda de acurácia de exames clínicos e laboratoriais, diminuir a biodisponibilidade e toxicidade de drogas utilizadas em tratamentos e diminuir a eficácia de programas de controle de doenças baseadas em imunizações.

Os trabalhos direcionados para o desenvolvimento de vacinas, mesmo que não esterilizantes, para ambas as classes de parasitos continuam a ser desenvolvidos. As infecções por Ancilostomídeos e *Schistosoma* sp desencadeiam respostas imunológicas semelhantes em pacientes infectados naturalmente pelos dois helmintos. Existe uma proposta de desenvolver uma vacina única para o controle das duas parasitoses. Contudo existe uma carência de estudos em modelo experimental da associação entre as duas infecções. Assim, o presente estudo visa obter maiores subsídios sobre o curso da infecção, das alterações biológicas para os parasitos e da patogenia causada ao hospedeiro em resposta a diferentes cargas parasitárias e da coinfeção entre dois helmintos, que possuem sobreposição de endemicidade em várias partes do mundo.

Por questões didáticas esse trabalho será apresentado em dois capítulos. O primeiro é relativo ao efeito da superpopulação na infecção experimental de *A. ceylanicum* em hamster e o segundo relativo à coinfeção desse parasito com o trematoda *S. mansoni*.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em modelo experimental em função da carga parasitária analisando parâmetros parasitológicos, hematológicos e imunológicos.

2.2.. Objetivos específicos

2.1.1. Avaliar a influência da carga parasitária no curso da infecção por *A. ceylanicum*.

2.1.2. Realizar morfometria dos vermes adultos provenientes de grupos infectados com diferentes inóculos de *A. ceylanicum*;

2.1.3. Avaliar os níveis de IgG total produzido frente ao extrato bruto de *A. ceylanicum* e antígenos ES, para os diferentes grupos experimentais;

2.1.4. Avaliar parâmetros hematológicos em hamster infectados com diferentes cargas de *A. ceylanicum*;

2.1.5 Realizar análises histopatológicas qualitativas e quantitativas do intestino delgado de animais infectados por *A. ceylanicum*, para os diferentes grupos experimentais

CAPÍTULO 1 - EFEITO “CROWDING”

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento experimental

A infecção por *Ancylostoma ceylanicum* foi avaliada utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, como modelo experimental. Eles foram divididos aleatoriamente nos grupos Não infectado (NI) e grupos infectados com quatro diferentes inóculos (25, 75, 125 e 250 L3) de *A. ceylanicum*. Foram avaliados os efeitos da carga parasitária tanto para o hospedeiro (parâmetros parasitológicos, clínicos, hematológicos, histopatológicos) quanto para os helmintos (efeito “crowding” ou efeito dependente da densidade). Os animais foram identificados e acompanhados individualmente. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número 73/2012 (Anexo D).

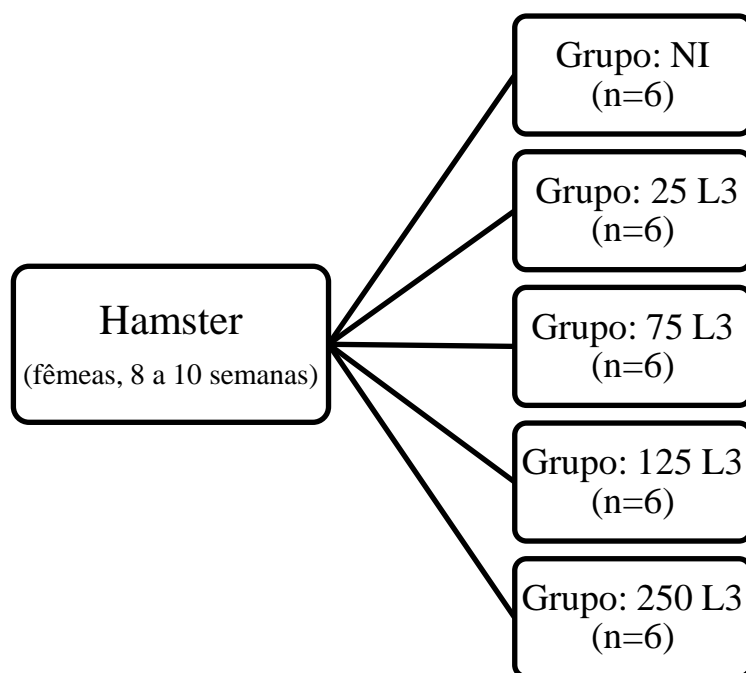


FIGURA 1: Esquema do delineamento experimental

3.2. Infecção experimental

3.2.1. Infecção por *Ancylostoma ceylanicum*

As coproculturas de hamsters infectados foram incubadas por 7 dias a 27°C (Roberts & O'Sullivan 1950). As larvas infectantes foram recuperadas das coproculturas pelo Método de Baermann-Moraes modificado (Barçante *et al.* 2003). Após a visualização da motilidade das L3 em microscópio estereoscópio, as larvas foram contadas por estimativa e os inóculos com 25, 75, 125 e 250 L3 foram ajustados para o volume final de 200 µl/hamster. As larvas foram recontadas para certificar o número de larvas presentes no volume final utilizado. A infecção foi realizada por via oral com auxílio de agulha gavage.

3.3. Coleta de sangue

O sangue dos hamsters foi coletado por punção do plexo orbital (Pansky *et al.*, 1961). A contenção manual dos animais foi realizada pela região cervical, de modo que automaticamente provocou a estase venosa na região cefálica e a exteriorização do globo ocular. Após a exteriorização do globo instilou-se uma gota de colírio anestésico (Cloridrato de proximetacaína 0,5%), e após 3 minutos introduziu-se o tubo capilar, contendo EDTA 0,5 M, entre o glóbulo ocular exposto e o fundo da cavidade orbitária. Foi realizada uma pequena pressão acompanhada de rotação do tubo capilar. O volume total de sangue obtido por coleta foi de aproximadamente 500 µl/ hamster. Uma alíquota de 30 µl foi utilizada para realização de hemograma completo (BC- 2800 Vet Mindray) e contagem diferencial em microscópio óptico (Olympus BH2 - Japan) realizado no Laboratório de Imunopatologia-NUPEB-UFOP. O restante da amostra de sangue foi submetido à centrifugação a 14.000 g, 5 min., temperatura ambiente para a recuperação de plasma. Este foi armazenado em alíquotas a -20°C e utilizado para ensaios imunológicos posteriores. As coletas ocorreram no dia da infecção 0 dpi (dia pós-infecção) e no dia da eutanásia (21 dpi). Os valores utilizados como parâmetro fisiológicos para hamsters no hemograma e leucograma foram obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981).

3.4. Aferição de peso

O peso dos hamsters foi aferido no dia 0 do experimento e a cada sete dias até o término do experimento, utilizando balança semi-analítica.

3.5. Exame parasitológico de fezes

Após dez dias da infecção por *A. ceylanicum* foi iniciada a coleta de fezes dos grupos experimentais para o exame parasitológico de fezes, que consistiu na contagem de ovos por grama de fezes (O.P.G), utilizando câmara de McMaster de acordo com Gordon e Whitlock (1939). Os exames parasitológicos de fezes foram realizados a cada dois dias até o dia anterior a eutanásia dos animais dos grupos experimentais.

3.6. Necropsia e recuperação dos vermes adultos

3.6.1. Recuperação de *A. ceylanicum*

A eutanásia dos animais foi realizada por sobredose de sedativo/anestésico (45mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 240mg/kg de ketamina, via intraperitoneal). Os hamsters foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta. O intestino delgado foi retirado, individualmente colocado em placa de Petri, contendo solução de PBS 0,15M; pH 7,4 e aberto longitudinalmente para a recuperação dos vermes adultos que posteriormente foram separados por sexo e contados.

Os vermes recuperados dos grupos experimentais foram mortos em água a 80°C e transferidos para tubos identificados de poliestireno de 1,5 ml contendo solução de formaldeído 3,7% para posterior morfometria.

3.7. Morfometria dos vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum*

Os vermes fixados e armazenados em formaldeído 3,7% foram diafanizados em solução de lactofenol de Amann (10 g de ácido fênico, 83 ml de ácido láctico, 160 ml de glicerina e 100 ml de água destilada), por aproximadamente 72 horas. Os vermes foram pinçados desta solução e posicionados em lâmina de vidro com a cavidade bucal voltada para cima. Sobreposta uma lamínula (18 X 18 mm) e o espaço preenchido com solução de lactofenol. Os vermes foram observados em microscópio de luz (Olympus BH2 - Japan), e fotografados para posterior morfometria.

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos nos dois sexos: comprimento total, largura total e da cavidade bucal, comprimento da cabeça até a papila cervical e comprimento do esôfago, comprimento do dente. Além destas medidas, nas fêmeas foi medida a distância entre a extremidade anterior a vulva, distância entre a vulva e a extremidade posterior. Comprimento dos órgãos reprodutivos. Nos machos foram medidos o comprimento e largura do gubernáculo e espículo.

3.8. Processamento histológico das amostras obtidas durante as necropsias

O intestino delgado foi fixado aberto, sobre um papel filtro, com solução de formaldeído 3,7% tamponado e, depois de 24 horas, foi enrolado a partir da extremidade posterior sobre ele mesmo. As demais amostras também foram acondicionadas em solução de formaldeído 3,7% tamponado. Após 24 h as amostras foram transferidas para cassetes histológicos identificados, acondicionados em uma solução de formaldeído 3,7% tamponado nova e transportados para Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto (NUPEB – UFOP), onde foram realizadas todas as análises histológicas.

Os cassetes contendo as amostras foram colocados em cestas de inox e processados em equipamento automatizado (EASYPATH-LEICA). Resumidamente, o tecido foi imerso em água por 10 minutos para a retirada do excesso de formaldeído. Em seguida as amostras foram desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto (Synth, Brasil) por 30 minutos. Posteriormente as amostras foram diafanizadas em xilol (Synth, Brasil) em dois banhos de 15 minutos cada. Por fim o processo foi encerrado em banho de parafina histológica (Synth, Brasil), por 15 min. As amostras desidratadas e diafanizadas foram transferidas para cassetes de inclusão e seu conteúdo preenchido com a solução de parafina histológica e cera de abelha 2% (Synth, Brasil) (LEICA EG 1150 H).

3.9. Avaliação histopatológica

Os cortes foram realizados em micrótomo com aproximadamente quatro μ m de espessura e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (HE). As imagens visualizadas em microscópio de luz com aumento de 400 vezes foram digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B.

As imagens obtidas analisadas com auxílio do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.9. 1. Intestino delgado

Os cortes histológicos de intestino delgado foram corados por HE e avaliados qualitativamente quanto às alterações da mucosa (hipercelularidade da lâmina própria e hipersecreção das células de Paneth, hiperplasia de células caliciformes e erosão), da submucosa e muscular, e, Morfométricamente, para obtenção de medidas das vilosidades (altura e espessura) e criptas (altura). Foram analisados 10 vilosidades com estrutura intacta por hamster/grupo.

3.10. Preparação de antígenos

3.10.1. Antígeno de excreção e secreção de verme adulto de *A. ceylanicum*

Para a obtenção dos produtos excretados/secretados (ES) de adultos de *A. ceylanicum* recuperados vivos da mucosa intestinal de hamsters infectados foram lavados três vezes com solução salina tamponada estéril (PBS, pH 7,4). Em capela de fluxo laminar, as lavagens com PBS se repetiram mais duas vezes e, em seguida, foram lavados três vezes com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com antibiótico/antimicótico 1% (Sigma, EUA) e 1,6% de l-glutamina (Synth, Brasil).

Após a lavagem, os vermes foram transferidos para tubos de 15 ml contendo meio de cultura RPMI 1640 em uma proporção de 10 vermes por mililitro de meio e, no máximo 5 ml por tubo. A cultura foi incubada em estufa a 37°C e 5% de gás carbônico durante 48 h. A cada 12 h, o meio de cultura era renovado, sendo que o sobrenadante contendo os produtos ES foi retirado e armazenado a -20°C. Ao final da incubação, os sobrenadantes coletados foram agrupados em tubos de 50 ml e os parasitos armazenados a -20°C para a produção do extrato proteico total. Todos os procedimentos feitos durante a cultura ocorreram em capela de fluxo laminar em condições de esterilidade.

O meio de cultura coletado contendo os produtos ES dos parasitos foi centrifugado por 10 min., 1500 g, 4°C, para retirada de ovos, restos celulares ou outras partículas em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo Vivaspin 20 5kDa MWCO (GE Healthcare) para concentração dos produtos ES,

seguindo instruções do fabricante, até redução para 1-5% do volume inicial. Os produtos ES concentrados foram alíquotados em tubos de 1,5 ml e armazenados a -80°C até sua utilização.

3.10.2. Preparação de extrato proteico total de vermes adulto de *A. ceylanicum*

Os vermes adultos utilizados para a produção de antígeno ES foram utilizados também para a produção de antígeno bruto. O extrato proteico total de vermes adultos foi obtido através da maceração manual dos parasitos, com auxílio de pistilo de vidro e volume mínimo de PBS (pH 7,4). O homogenato foi transferido para tubos de microcentrífuga (1,5 ml). Em seguida, o extrato bruto foi sonificado utilizando aparelho de ultrassom (Branson Sonc Power – Sonofer Cell Disruptor 450), sendo realizados cinco ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos em banho de gelo, com amplitude de 40%. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 3000 g, 4°C, por 15 minutos. O sedimento foi descartado e o extrato bruto solúvel foi alíquotado e armazenado a -80°C até o seu uso.

3.11. Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas presentes nas amostras de ES e de extrato proteico total de vermes adulto de *A. ceylanicum* foram estimadas conforme método descrito por Bradford (1976). A cada poço de uma placa de microtitulação (BD) foi adicionado 20 µl da amostra a ser dosada e 180 µl de reagente de Bradford [Coomassie brilliant blue R-250 0,1% (m/v) em solução aquosa com etanol 5% (v/v) e ácido fosfórico 10% (v/v), filtrado em papel filtro número 1] (BioAgency). Sobre os poços foi acrescentado solução padrão contendo 0,5-2 µg de albumina sérica bovina - fração VI (Sigma) em 20 µl de água Mili-Q. A leitura realizada em um leitor de ELISA (Versamax Microplate Reader Tunable – Molecular Devices) com o comprimento de onda de 595 nm. A equação da curva padrão foi calculada pelo programa Excel (Microsoft Office).

3.12. ELISA

Placas de microtitulação de poliestireno (BD Falcon) foram sensibilizadas com 100 µl/poço da solução de extrato proteico total (1µg/ml) ou de ES (5µg/ml) de *A. ceylanicum* em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M NaHCO₃ pH 9,6). Após três

lavagens com PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05% (PBST 0,05%) foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de PBST 0,05% e caseína 3% (Molico, Nestlé) a temperatura ambiente por 90 minutos. Após nova lavagem o plasma dos hamsters foi utilizado diluído 1:100 (v/v), em duplicata e incubado por 18h, a 4° C . Repetida a lavagem com PBST 0,05% foi adicionado o conjugado biotilado anti-IgG total de hamster (BD) na diluição de 1:5000 (v/v), incubado por 2h a 4° C. Após nova lavagem com PBST 0,05% foi adicionada a solução contendo estreptavidina (Sigma) diluída 1:3000 (v/v), em PBST 0,05% e Incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após três lavagens com PBST 0,05%, a revelação da reação foi feita utilizando o cromógeno TMB (BD OptEIA®) e após 10 min. a reação foi interrompida utilizando solução de ácido sulfúrico 2M. A placa lida em espectrofotômetro (Versamax Microplate Reader Tunable – Molecular Devices) a 492 nm. Os valores de absorbância obtidos foram expressos pela média aritmética entre a duplicata de cada amostra. O cut-off foi determinado pela média das amostras negativas mais três vezes o desvio padrão.

3.13. Análise estatística

Para a análise estatisticamente significativa dos dados gerados foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov.

As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não pareado (dados paramétricos) e Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney (dados não paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA ou Reapeated Measures ANOVA seguido do de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do teste de Dunns (dados não paramétricos). Foi utilizado o teste de Grubbs para detectar outliers (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Todos os resultados analisados foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Aferição de peso

Os animais foram pesados no início do experimento e posteriormente a cada sete dias (Gráfico 1). Aos 7 dpi não houve diferença no ganho de peso na comparação dos grupos infectados entre si ou com o grupo NI.

A partir de 14 dpi observa-se ganho de peso do grupo NI e perda de peso nos grupos 25 L3, 75 L3 e 125 L3. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos NI com os grupos 25 L3 ($p < 0,01$); 75 L3 ($p < 0,01$); 125 L3 ($p < 0,05$) e 250 L3 ($p < 0,01$). Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos infectados.

Aos 21 dpi foi observado ganho de peso nos grupos NI e 25 L3. Houve perda acentuada de peso nos grupos infectados. Na comparação entre os grupos foi observada diferença estatisticamente significativa entre 125 L3 ($p < 0,05$), 250 L3 ($p < 0,01$) e NI, mostrando uma relação direta entre aumento de carga e danos causados ao hospedeiro.

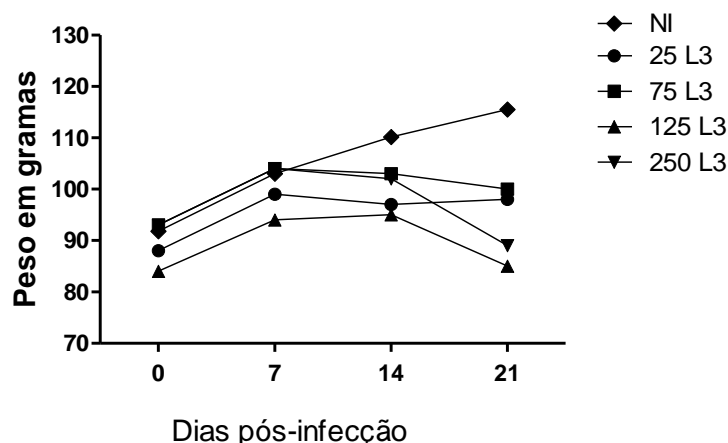


GRÁFICO 1: Alteração de peso semanal dos grupos experimentais em gramas. Não infectado (NI); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 25 L3, 75 L3, 125 L3 e 250 L3. Dados apresentados em média.

4.2. Exame parasitológico de fezes

4.2.1. Ovos por grama de fezes (O.P.G)

A cinética de eliminação de ovos nas fezes dos grupos infectados com diferentes inóculos de *A. ceylanicum* está representada no gráfico 2B. A patência para todos os grupos foi observada aos 14 dpi. Os valores de O.P. G foram compatíveis com os

inóculos, ou seja o número de ovos eliminados pelo grupo 25 L3 foi menor que no grupo 75 L3 e este menor que o grupo 125 L. O grupo 250 L3 apresentou os maiores valores no exame.

4.3. Recuperação dos vermes adultos de *A. ceylanicum*

Após 20 dias de experimento os animais foram eutanasiados para a recuperação dos vermes adultos. Dos animais do grupo infectado com 25 L3 foram recuperados ao todo do intestino delgado 42 vermes adultos de *A. ceylanicum*. Destes 24 machos e 18 fêmeas. A recuperação média do grupo foi de 28% em relação ao inóculo. Dos animais do grupo infectado com 75 L3 foram recuperados ao todo 112 adultos, destes 60 machos e 52 fêmeas. A média de recuperação foi 24,88 %. Dos animais do grupo infectado com 125 L3 foram recuperados ao todo 154 vermes adultos, sendo 72 machos e 82 fêmeas. A média de recuperação foi de 24,64 %. Para o grupo infectado com 250 L3 a média de recuperação foi de 24,85% e o total de vermes obtidos do grupo foi 435, sendo 214 machos e 221 fêmeas. A proporção de machos em relação às fêmeas foi similar em todos os grupos, resultado ilustrado no gráfico 2A.

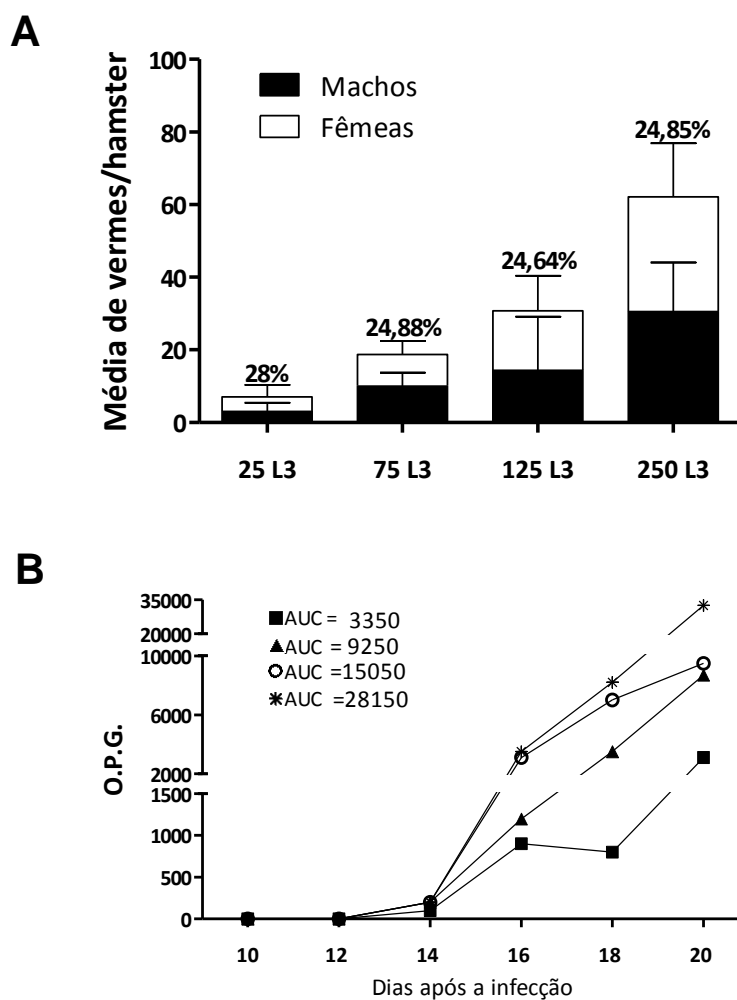


GRÁFICO 2: Recuperação de vermes adultos e O.P.G. A) Recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* em intestino delgado de hamsters. Em porcentagem a taxa de recuperação em relação ao inóculo. Barra escura e branca, machos e fêmeas, respectivamente. (B) O.P.G. obtido de fezes coletada nas gaiolas a cada dois dias (início 10 dpi). Grupos infectados via oral com 25 L3 (■), 75 L3 (▲), 125 L3 (*) e 250 L3 (⊙). AUC: área abaixo do gráfico.

4.4. Exames hematológicos

4.4.1. Hemograma

Os grupos infectados com os inóculos de 25, 75, 125 e 250 L3 apresentaram redução gradativa dos níveis de hemácias (Gráfico 3A), hemoglobina (Gráfico 3B) e hematócrito (Gráfico 3C), quando comparados aos valores fisiológicos para hamsters e também com o grupo NI. Esta redução foi significativa na comparação do grupo NI com o grupo 125 L3 ($p < 0,05$) e 250 L3 ($p < 0,001$). Comparando os grupos infectados entre si é observado diferença significativa entre os grupos 25 L3 e 250 L3 ($p < 0,01$) e 75 L3 e 250 L3 ($p < 0,05$).

Na avaliação dos níveis de hemoglobina observa-se a redução nos grupos infectados com diferença estatisticamente significativa para o grupo 250 L3 ($p < 0,01$) e entre os grupos 25 L3 e 250 L3 ($p < 0,05$). As mesmas diferenças estatisticamente significativas são observadas quando avaliamos o hematócrito dos animais.

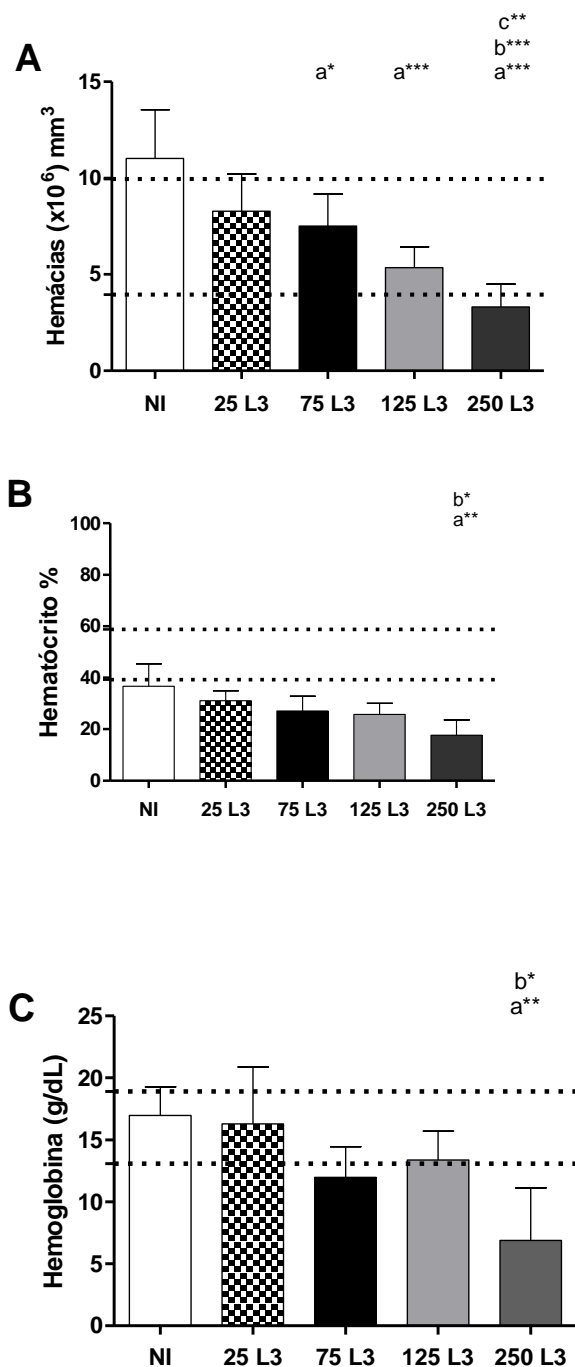


GRÁFICO 3: Parâmetros hematológicos no dia da eutanásia. Hemácias valores por milímetro cúbico (A), Hematócrito valores em porcentagem (B) e Hemoglobina em gramas por decilitro (C). Grupos: não infectado (NI); infectado com 25 larvas de terceiro estágio por via oral (25 L3), 75 L3, 125 L3 e 250 L3. Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamsters fêmeas de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI. ^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo 25 L3, ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo 75 L3, ^d Estatisticamente significativo comparado ao grupo 125 L3. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Dados mostrados como média+ desvio padrão.

4.4.2. Contagem diferencial de leucócitos

Os resultados da contagem diferencial de leucócitos estão no gráfico 4. Foi observado aumento do número de linfócitos com diferença estatisticamente significativa nos grupos 125 L3 ($p < 0.01$) e 250 L3 ($p < 0.001$) quando comparados ao grupo NI. As comparações entre os grupos infectados também mostram diferença estatisticamente significativa no número de linfócitos e eosinófilos nos grupos 75 L3 ($p < 0.01$), 125 L3 ($p < 0.01$) e 250 L3 ($p < 0.001$). O grupo 250 L3 mostrou os valores mais elevados de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos com diferença estatisticamente significativa quando comparado a todos os grupos.

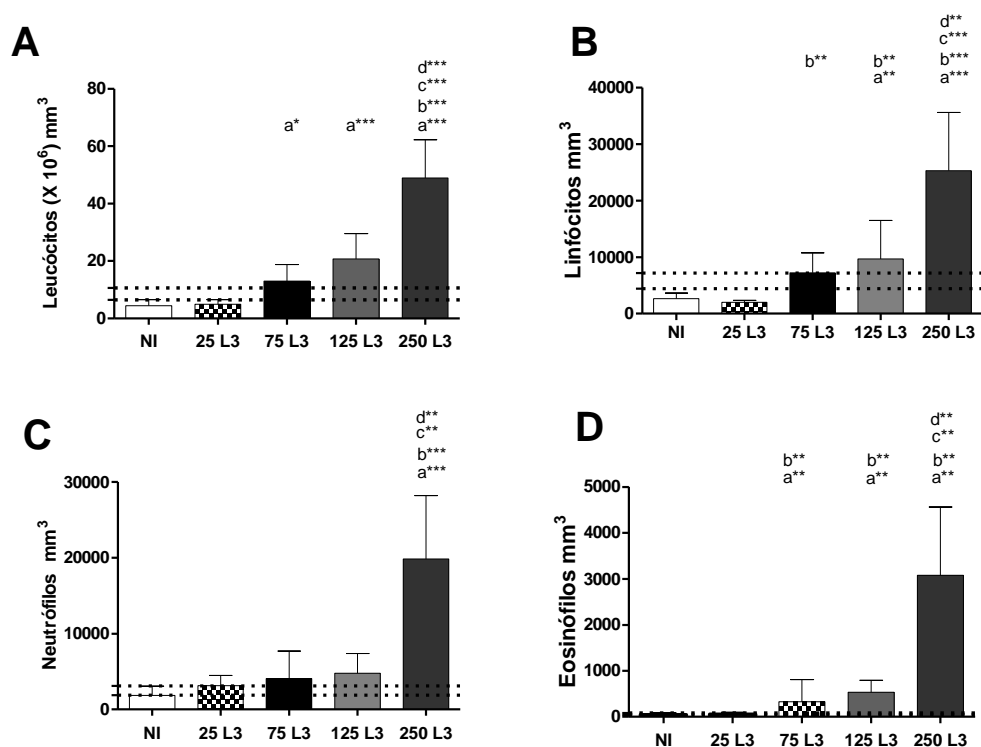


GRÁFICO 4: Contagem diferencial de leucócitos. (A) Leucócitos, (B) Linfócitos, (C) Neutrófilos totais e (D) eosinófilos por milímetros cúbico de sangue. Valores individuais. Grupos: não infectado (NI); infectado com 25 larvas de terceiro estágio por via oral (25 L3), 75 L3, 125 L3 e 250 L3. Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamsters fêmeas de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).^a Estatisticamente significante comparado ao grupo NI. ^b Estatisticamente significante comparado ao grupo 25 L3, ^c Estatisticamente significante comparado ao grupo 75 L3, ^d Estatisticamente significante comparado ao grupo 125 L3. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Dados mostrados como média + desvio padrão.

4.5. Análise histológica

Os cortes histológicos de intestino delgado corados por HE (Figura 2) foram avaliados qualitativamente para análise das alterações da mucosa (hipercelularidade da lâmina própria e hipersecreção das células de Paneth, hiperplasia de células caliciformes e erosão), da submucosa e muscular, e, Morfométricamente, para obtenção de medidas das vilosidades (altura e espessura) e criptas (altura), os resultados estão representados no gráfico 5.

Os hamsters do grupo NI apresentaram aspecto histológico normal na mucosa, com estruturas íntegras e razão vilosidade-cripta, média de 3:1. As células de Paneth e caliciformes se apresentaram em número reduzido.

O grupo 25 L3 apresentou leve perda de arquitetura intestinal com redução da altura das vilosidades e aumento do número de células caliciformes. Houve redução na relação vilosidade-cripta para 2:1, embora considerado como padrão *borderline*, ainda permanece dentro da normalidade. Quando comparado ao grupo NI não foram observadas lesões entéricas significativas.

O grupo 75 L3 apresentou leve perda de arquitetura intestinal com redução significativa da altura das vilosidades ($p < 0,05$) e aumento do número de células caliciformes. Houve redução na relação vilosidade-cripta para 1:1.

O grupo 125 L3 apresentou a perda de arquitetura intestinal, aumento de células caliciformes, redução da altura das vilosidades e significativa hipertrofia das criptas de *Lieberkün* ($p < 0,05$). Houve redução na relação vilosidade-cripta para 1:1.

O grupo 250 L3 apresentou perda de arquitetura intestinal, aumento de células caliciformes, redução significativa na altura das vilosidades ($p < 0,01$) e hipertrofia das criptas de *Lieberkün* no intestino delgado em relação ao grupo NI., Houve redução na relação vilosidade-cripta para 1:1

Nos grupos infectados com 75, 125 e 250 L3 foi observados redução da razão vilosidade:cripta para 1:1, demonstrando que o aumento da carga parasitária teve influencia direta sobre as alterações na arquitetura da camada mucosa desse órgão.

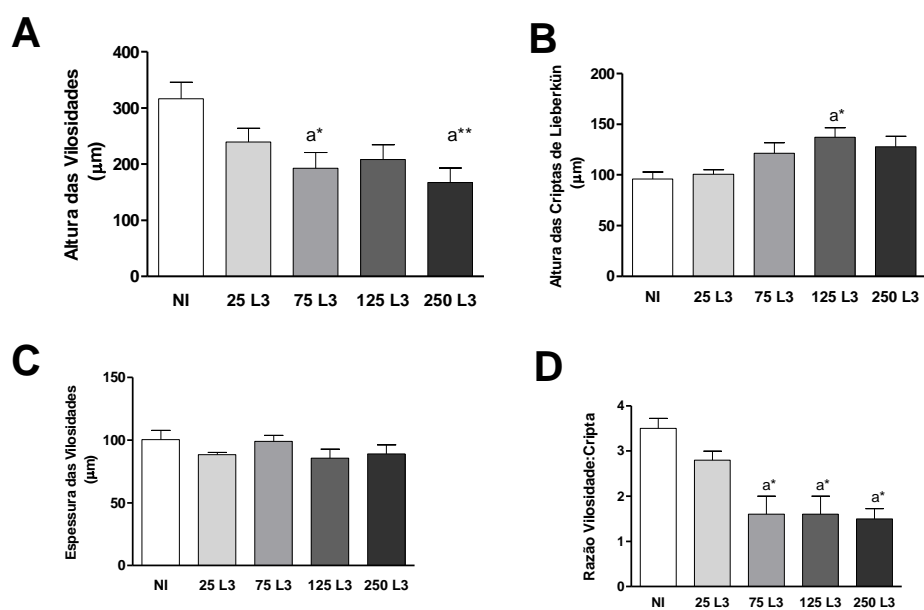


GRÁFICO 5: Avaliação Morfométrica do intestino delgado de antes. A- Altura das vilosidade. B- Altura das criptas de Lieberkün. C- Espessura das vilosidades. Valores em micrômetros. D- Razão vilosidade:cripta. Não infectado (NI); Infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 25 larvas de terceiro estágio (25 L3), 75 L3, 125 L3 e 250 L3. ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI. Barra= média e erro padrão. *= $p < 0,05$

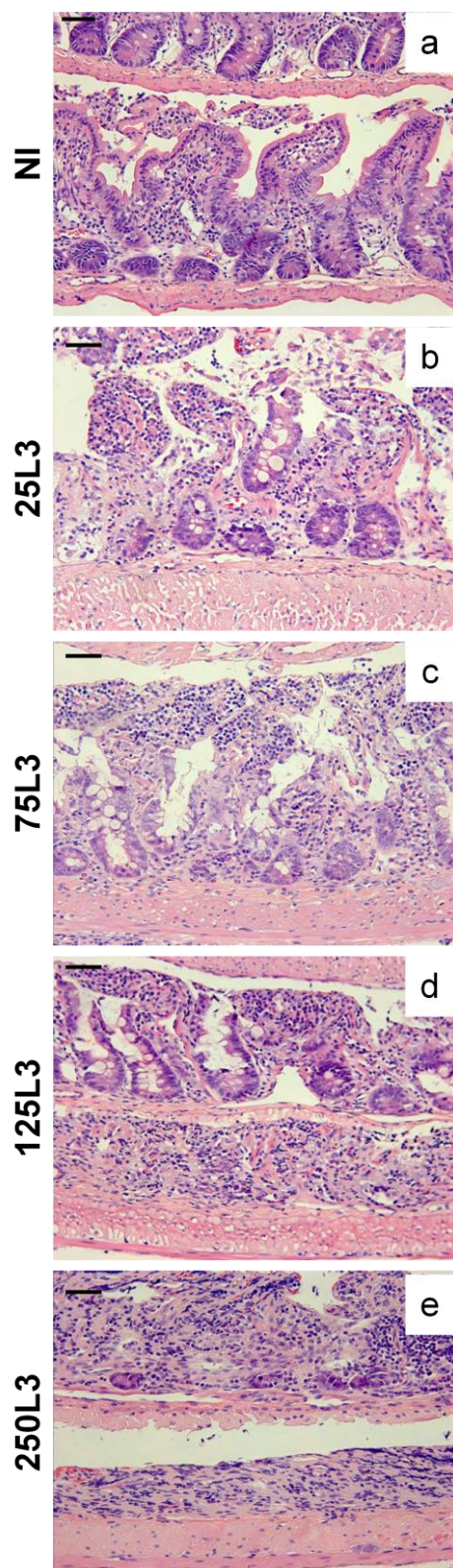


FIGURA 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado de hamster não-infectados (NI) ou infectados com 25, 75, 125, e 250 L3 de *Ancylostoma ceylanicum*. Aspecto histológico normal das vilosidades e criptas de *Lieberkühn* na mucosa intestinal de hamsters grupo NI; lâmina própria hipercelular com discreta a moderada alteração da arquitetura intestinal em hamsters infectados com 25 L3 e 75 L3 ; Redução na razão vilosidade-cripta com alteração moderada à intensa da arquitetura intestinal em hamster pertencentes aos grupos 125 L3 e 250 L3. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm.

4.6. ELISA

Os plasmas dos hamsters infectados com diferentes inóculos de *A. ceylanicum* foram testados para avaliar os níveis de IgG total frente aos antígenos de extrato bruto e ES. Todos os grupos infectados apresentaram valores de absorbâncias superior ao cut-off determinado para o ensaio, usando plasmas de animais não infectados (Gráfico 6). Foi observado diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos infectados 75 L3 ($p < 0,01$) e 250 L3 ($p < 0,01$) com o grupo NI. Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos infectados entre si. Demonstrando que o aumento de anticorpos não é linear nos inóculos acima de 75 L3.

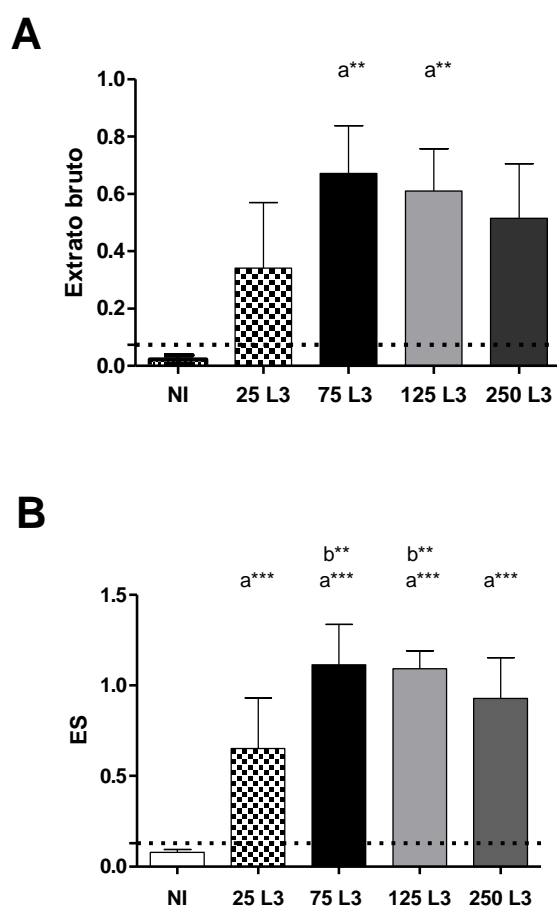


GRÁFICO 6: Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente ao extrato proteico total de *A. ceylanicum* (A) e ES (B). Grupos: não infectado (NI); infectado com 25 larvas de terceiro estágio por via oral (25 L3), 75 L3, 125 L3 e 250 L3. ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI. ^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo 25 L3, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Dados mostrados como média + desvio padrão.

4. 7.Morfometria de *A. ceylanicum* adultos

As comparações entre as fêmeas dos grupos mostram diferenças estatisticamente significativa em diversos parâmetros. Houve redução do comprimento da cavidade bucal ($p < 0,001$); largura da cavidade bucal ($p < 0,05$); distância da vulva à extremidade posterior ($p < 0,001$); distância do ânus à extremidade posterior ($p < 0,01$); largura total ($p < 0,01$) e comprimento do dente ($p < 0,01$). Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatisticamente significativa significativa (Tabela 1).

Dos parâmetros avaliados nos machos dos grupos 25 L3 e 250 L3, somente houve diferença estatisticamente significativa para a média de largura da cavidade bucal que se apresentou maior no grupo de 250 L3 (Tabela 2)

Tabela 1 - Morfometria de fêmeas adultas de *Ancylostoma ceylanicum* (média ± desvio padrão)

Parâmetros (µm)	Inóculo				p
	25 L3 (n=15)	75 L3 (31)	125 L3 (28)	250 L3 (n=66)	
Comprimento da cabeça até a papila cervical	0.504±0.06	0.572±0.02 ^a	0.579±0.06 ^a	0.519±0.03 ^{b,c}	< 0.0001
Distância entre a vulva e a extremidade posterior	0.144±0.01	0.162 ±0.01 ^a	0.162 ±0.01 ^a	0.133±0.01 ^{b,c}	< 0.0001
Distância da vulva ao ânus	2.273±0.58	2.406±0.29	2.213±0.17	2.247±0.24	0.0676
Comprimento do esôfago	0.751±0.03	0.842±0.03 ^a	0.841±0.04 ^a	0.761±0.04 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento do dente	0.049±0.00	0.046±0.00	0.047±0.00	0.045±0.01	0.1407
Comprimento da cavidade bucal	0.158±0.01	0.128±0.01 ^a	0.126±0.01 ^a	0.149±0.01 ^{b,c}	< 0.0001
Largura da cavidade bucal	0.134±0.01	0.109±0.00 ^a	0.113±0.00 ^a	0.135±0.01 ^{b,c}	< 0.0001
Largura dente	0.057±0.01	0.046±0.00 ^a	0.047±0.00 ^a	0.057±0.00 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento total	7.423±0.49	7.363±0.55	7.248±0.55	7.103±0.54	0.1349
Largura total	0.346±0.02	0.348±0.03	0.345±0.02	0.323±0.02 ^{b,c}	0.0001

^a Estatisticamente significante comparado ao grupo 25 L3.

^b Estatisticamente significante comparado ao grupo 75 L3.

^c Estatisticamente significante comparado ao grupo 125 L3.

p Obtido do teste Kruskal-Wallis .

Tabela 2 - Morfometria de machos adultos de *Ancylostoma ceylanicum* (média ± desvio padrão)

Parâmetros	Inóculo				<i>p</i>
	25 L3 (n=10)	75 L3 (n=29)	125 L3 (n=29)	250 L3 (n=65)	
Comprimento da cabeça até a papila cervical	0.450±0.05	0.496±0.05 ^a	0.518±0.08 ^a	0.468±0.03 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento do esôfago	0.698±0.06	0.726±0.11	0.775±0.04 ^a	0.688±0.02 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento do espículo	0.659±0.09	0.827±0.09 ^a	0.831±0.09 ^a	0.731±0.14 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento do dente	0.040±0.00	0.039±0.00	0.040±0.00	0.040±0.00	0.0857
Comprimento da cavidade bucal	0.137±0.01	0.125 ±0.01 ^a	0.122 ±0.01 ^a	0.139±0.00 ^{b,c}	< 0.0001
Largura da cavidade bucal	0.110±0.01	0.099±0.01	0.099±0.01	0.115±0.01 ^{b,c}	< 0.0001
Comprimento total	6.065±0.39	6.031±0.81	6.193±0.38	5.984±0.35	0.3217
Largura total	0.281±0.01	0.285±0.02	0.273±0.02	0.283±0.01	0.2549
Largura dente	0.055±0.00	0.032±0.00 ^a	0.035±0.00 ^a	0.053±0.00 ^{b,c}	< 0.0001

^a Estatisticamente significante comparado ao grupo 25 L3.

^b Estatisticamente significante comparado ao grupo 75 L3.

^c Estatisticamente significante comparado ao grupo 125 L3.

p Obtido do teste Kruskal-Wallis .

5. Discussão

Os hamsters são hospedeiros permissivos ao parasito *A. ceylanicum* e a sua infecção por ancilostomídeos está bem estabelecida na literatura (Garside e Behnke 1989; Bungiro *et al.*, 2001, 2008; Dondji *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2013b).

Animais infectados apresentam alteração no crescimento e anemia, semelhante ao hospedeiro humano. A espoliação sanguínea dos ancilostomídeos foi estimada em 200 µl por verme/dia (Roche e Patzted, 1966), que em infecções maciças associadas a uma nutrição deficiente podem causar anemia ferropriva, perda de proteínas e dano tecidual (Bundy *et al.*, 1995; Hotez e Pritchard, 1995; Stoltzfus *et al.*, 1997). A gravidade da doença em humanos está diretamente associada ao número de vermes albergados no intestino. Por exemplo, enquanto a infecção por 50 vermes adultos de *A. ceylanicum* causaria apenas sintomas brandos, a infecção por 1000 vermes poderia causar uma doença mais grave (Behnke, 1987).

No presente trabalho observamos que os hamsters infectados com apenas 25 L3 não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos. Neste caso, provavelmente os mecanismos fisiológicos foram suficientes para compensar a espoliação sanguínea. Os hamster infectados com os maiores inóculos apresentaram redução significativa nos níveis de hemoglobinas e contagem de eritrócitos em comparação ao grupo NI. O grupo 250 L3 foi o que apresentou os valores hematológicos mais reduzidos em comparação ao grupo NI. Como a espoliação sanguínea é a principal consequência do parasitismo dos ancilostomídeos este resultado não foi inesperado.

O trato gastrointestinal não é apenas um conjunto de órgãos para a digestão, absorção e excreção, é também o habitat de vários microrganismos, incluindo os ancilostomídeos. A resposta imune do trato gastrointestinal atua como a primeira linha de defesa contra antígenos administrados e patógenos intestinais (Hooper e Gordon, 2001; Hooper *et al.*, 2012).

Em estudos com hamsters experimentalmente infectados com *A. ceylanicum* foram observados em cortes histológicos do intestino delgado alterações na arquitetura da mucosa intestinal, como redução na altura das vilosidades, diminuição da profundidade das criptas de Lieberküm, aumento no número de mastócitos, células caliciformes e eosinófilos (Alkazmi *et al.*, 2006, 2008; Alkazmi e Behnke, 2013). Estas mudanças observadas estão associadas com a carga parasitária e duração da infecção. No presente trabalho foi observado uma correlação positiva entre carga parasitária e os

danos causados ao hospedeiro. Houve redução na altura das vilosidades nos grupos infectados e a destruição das vilosidades no grupo 250 L3.

Outro efeito do parasitismo gastrointestinal é a redução da ingestão voluntária de comida pelo hospedeiro (Sykes, 1987). Desta forma, as infecções agudas provocadas por uma grande carga de vermes pode resultar numa diminuição significativa da taxa de ingestão de alimentos e uma diminuição na absorção de nutrientes. Este fenômeno pôde ser confirmado pela perda de peso durante o experimento dos grupos infectados. A quantidade de peso perdido foi mais proeminente no grupo 250 L3, provavelmente devido à associação entre carga parasitária e dano tecidual causado pelo verme e inflamação local.

Com base no dano tecidual, a distribuição dos vermes no inóculo mais baixo (25 L3 e 75 L3) foi restrita ao duodeno e jejuno. Somente observamos danos na porção do íleo no grupo 250 L3. Não observamos, mesmo no maior inóculo, erosão ou lesão transmural.

A proporção de fêmeas e machos recuperados foi similar em todos os grupos, o que poderia ser explicado pelo fato dos animais terem sido eutanasiados aos 21 DPI, durante a fase aguda da ancilostomose. Estes dados corroboram os achados de Roche e Patrzed (1966), que demonstraram uma relação direta entre o tempo de infecção e a proporção de fêmeas:machos. Visto que os machos são eliminados mais prematuramente que as fêmeas devido a uma migração mais rápida pelo intestino, em infecções crônicas a proporção fêmeas e machos seriam diferentes (Roche e Patrzed 1966).

Foi observado também que a quantidade de ovos liberados nas fezes foi proporcional ao inóculo recebido, demonstrando que o tamanho do inóculo utilizado não afetou o estabelecimento, sobrevivência ou a fecundidade dos vermes. Em relação ao estabelecimento das larvas de *A. ceylanicum* nossos resultados corroboram os de Norozian-Amiri e Behnke (1993). Estes autores observaram uma correlação negativa o número de larvas que conseguem se estabelecer e o inóculo administrado, quando esse é superior a 250 L3. Neste trabalho foram utilizados inóculos de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 L3 e os hamsters (machos e fêmeas) foram sacrificados aos 7 dpi. O sucesso de recuperação foi de 56% no grupo infectado com 1000 L3 a 84% no grupo infectado com 100 L3.

No presente trabalho as fêmeas do grupo 250 L3 apresentaram redução significativa em diversos parâmetros morfométricos avaliados, provavelmente um mecanismo de compensação frente à redução de recursos disponíveis. Tompkins e Hudson (1999) identificaram uma correlação negativa entre o tamanho das fêmeas de nematódeos (*Heterakis gallinarum*) e a carga parasitária em infecções naturais, onde observaram um menor número de ovos postos por estas fêmeas. Estes autores sugeriram que o tamanho dos vermes é um bom preditor da fecundidade das fêmeas.

Fecundidade reduzida em vermes com alteração de tamanho tem sido relatada em vários modelos de hospedeiros e nematódeos (Michael e Bundy, 1989; Goater, 1992; Gulland, 1992; Stear, *et al.*, 1996). Marcogliese (1997) observou uma relação direta entre comprimento e fecundidade em *Pseudoterranova decipiens* que infectavam focas cinzentas.

Um possível mecanismo para explicar a deficiência no crescimento dos vermes foi detalhado por Stear e colaboradores (1995), que encontraram uma correlação negativa entre carga parasitária e fecundidade causada pela inibição do crescimento dos vermes devido à produção local de IgA contra *Ostertagia circumcincta* infectando ovelhas. Uma das funções previstas para IgA na mucosa intestinal seria atingir o parasito através de mecanismos, como neutralização de moléculas secretadas e indução da degranulação de eosinófilos, interferindo com a alimentação do parasito e sobrevivência (Bungiro *et al.* 2008). Além disso, Davey e colaboradores (2013) demonstraram que a resposta IgG, IgM e IgA frente a antígenos de ancilóstomos adultos parece ser mais robusta em comparação às respostas a antígenos de larvas e que os padrões de expressão de anticorpos estão associados com a magnitude do inóculo e com o intervalo de tempo de exposição às larvas. Além disso, em cães, sem raça definida, infectados com *A. caninum* e *A. braziliense*, Dias e colaboradores (2013) viram que a resposta humoral contra antígenos excretados e secretados por vermes adultos foi mais sensível e específica do que a resposta induzida pelo antígeno bruto. No presente trabalho, foi demonstrado que mesmo um baixo inóculo (25 L3) foi suficiente para estimular a produção de anticorpos. No entanto, não houve uma correlação com o número de vermes, pois o inóculo mais elevado não causou uma maior produção de IgG quando comparado com os grupos 125 L3 e 75 L3.

Não foi observado redução da fecundidade das fêmeas nos grupos analisados. Este resultado é diferente do encontrado por Yazima e Machida (1958), e Sowemimo e Asaolu (2008), cujos trabalhos demonstraram que a carga parasitária foi inversamente

proporcional ao número de ovos produzidos pelas fêmeas de *A. caninum* em cães infectados experimentalmente. O presente trabalho teve como fator limitante o reduzido volume fecal produzido por hamster, conseqüentemente os exames de fezes tiveram que ser realizados em pool, perdendo os dados em relação às variações individuais. Desta forma impedindo as análises estatisticamente significativas.

A competição interespecífica é muito comum, considerando que os hospedeiros podem estar coinfectados naturalmente por diversos parasitos ao mesmo tempo (Petney e Andrews, 1998; Cox, 2001; Fenton *et al*, 2014.). A associação entre espécies diferentes no mesmo hospedeiro pode resultar em efeitos sinérgicos ou antagonistas para os parasitos envolvidos. Blackwell e colaboradores (2013) observaram a inibição da população de *Giardia lamblia* quando ancilostomídeos estavam coinfectando o mesmo hospedeiro. Eles analisaram amostras de fezes de 3.275 pessoas durante seis anos. Após o tratamento com mebendazol os ancilostomídeos foram eliminados. Como consequência houve o aumento da população de *G. lamblia*. Uma associação negativa entre *Eimeria* sp e nematodas (*Heligmosomoides polygyrus*, *Syphacia stroma*, *Capillaria americana*, *Aonchotheca murissylvatici* e *Aspiculuris* sp) foi observada por Fenton e colaboradores (2014) em roedores das espécies *Apodemus sylvaticus*, *Peromyscus leucopus* e *Peromyscus maniculatus* infectados naturalmente. No estudo os animais foram capturados, identificados e em seguida libertados. Os animais foram subdivididos em dois grupos: tratados com ivermectina e não tratados. Uma amostra de fezes foi coletada para identificar quais espécies infectavam esses roedores. Após a recaptura dos animais foi observado que as populações de *Eimeria* sp aumentaram após o tratamento com o anti-helmínticos. Os autores consideraram que o estudo forneceu uma clara evidência de interações antagonistas entre os nematodas e *Eimeria* sp.

Considerando-se o comprimento total e largura dos vermes, os machos de *A. ceylanicum* não apresentaram reduções significativas no tamanho, apesar de viver no mesmo ambiente das fêmeas e receber a mesma pressão do sistema imune do hospedeiro. Em comparação, o efeito da densidade da população foi mais evidente nas fêmeas, que apresentaram reduções em vários parâmetros avaliados. Nossa hipótese é que devido às demandas energéticas mais elevadas nas fêmeas, especialmente relacionadas ao processo de produção de ovos e como não observamos alteração na fertilidade, assumimos que o metabolismo energético das fêmeas foi direcionado para a produção de ovos, à custa do desenvolvimento do corpo

6. Conclusões

1) O aumento na carga parasitária de *A. ceylanicum* afeta o hospedeiro e o parasito. As alterações de peso, hematológicas e histopatológicas são causadas diretamente pelo verme durante espoliação sanguínea e agravadas com o aumento da carga parasitária.

2) O elevado número de vermes, parasitando o intestino delgado de hamsters também afeta o seu próprio desenvolvimento, principalmente nas fêmeas devido à competição intraespecífica.

CAPÍTULO 2 - COINFECÇÕES

6. OBJETIVOS

6. Objetivos

6.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos da coinfeção, de hamster por *Ancylostoma ceylanicum* e *Schistosoma mansoni* analisando parâmetros parasitológicos, hematológicos e imunológicos.

6.2. Objetivos específicos

6.2.1. Avaliar parâmetros hematológicos em hamster infectados por *A. ceylanicum* e *S. mansoni* individualmente e coinfectados pelas duas espécies;

6.2. 2. Avaliar a influência da coinfeção por *A. ceylanicum* no curso da infecção por *S. mansoni*;

6.2.3. Avaliar a influência da coinfeção por *S. mansoni* no curso da infecção por *A. ceylanicum*,

6.2.4. Avaliar os níveis de IgG total produzidas frente ao extrato bruto de *A. ceylanicum*, e antígenos ES de *A. ceylanicum*, SWAP e SEA de *S. mansoni*, nos grupos infectados por *A. ceylanicum*, *S. mansoni*, e coinfectados pelas duas espécies.

6.2.5. Analisar histologicamente granulomas no intestino delgado de hamsters infectados com *S. mansoni*, coinfectados com *A. ceylanicum* e previamente infectados por *A. ceylanicum* com posterior infecção por *S. mansoni*;

6.2.6. Realizar análises histopatológicas do intestino delgado de animais infectados por *A. ceylanicum*, por *S. mansoni*, e coinfectados pelas duas espécies.

7. Material e Métodos

7.1. Delineamento experimental

Para a avaliação dos efeitos da coinfeção por *A. ceylanicum* e *S. mansoni* foram realizados dois experimentos, alternando a sequencia de infecção. Experimento 1: hamsters foram subdivididos em grupos: não infectados (NI-1), infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-1), infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1), infectados inicialmente com 50 L3 de *A. ceylanicum* e após 20 dias coinfectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm). Os grupos infectados e controle negativo foram acompanhados por 75 dias.

Experimento 2: hamsters foram subdivididos em grupos: não infectados (NI-2), infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-2), infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2), infectados inicialmente por *S. mansoni* e após 65 dias coinfectados com *A. ceylanicum* (Sm+Acey). Os grupos infectados e controle foram acompanhados por 90 dias.

Foram avaliados os efeitos da infecção e da coinfeção utilizando parâmetros parasitológicos, clínicos hematológicos, histopatológicos. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número 52/2011 (Anexo II).

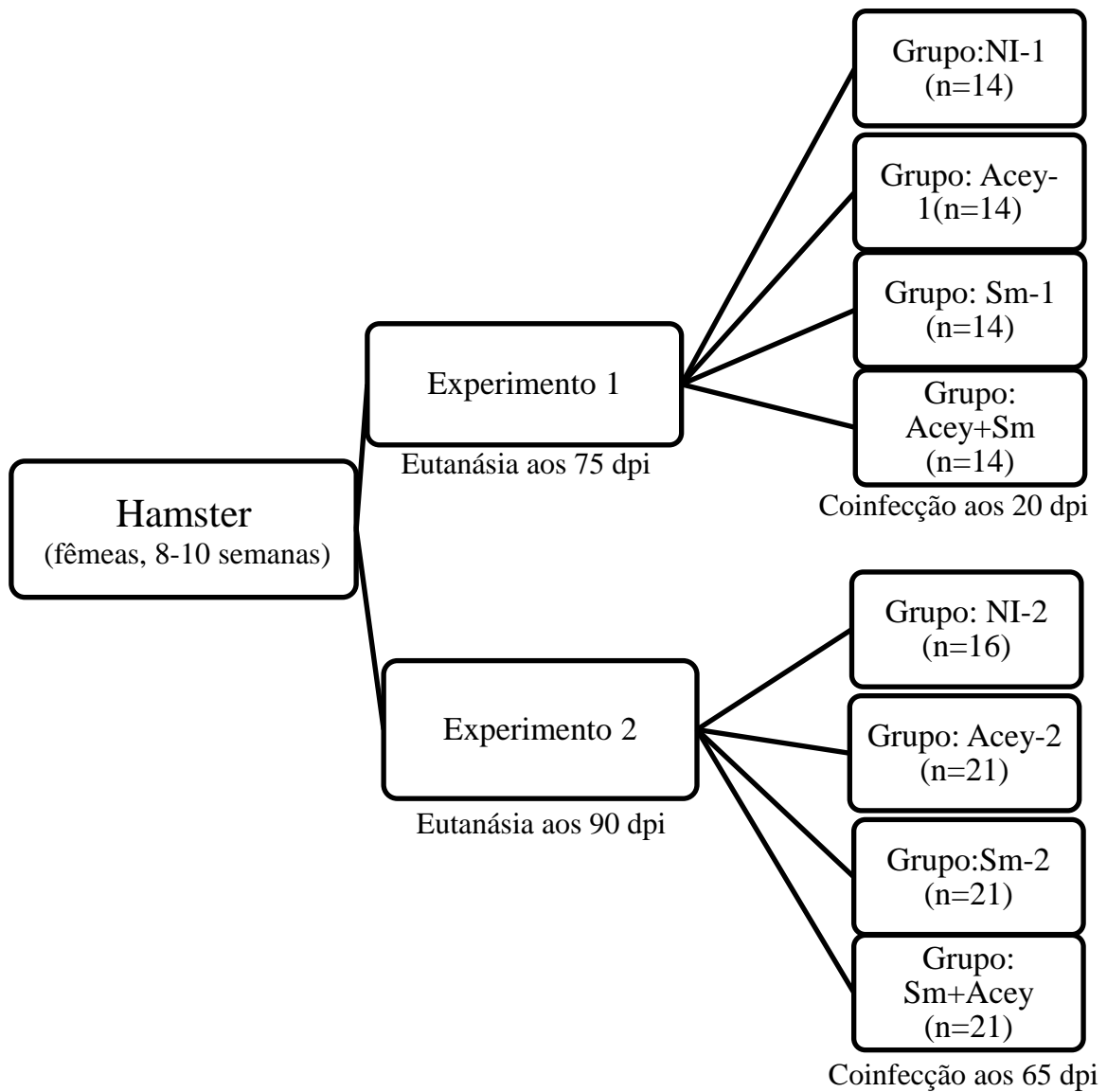


FIGURA 3: Esquema delineamento experimental das coinfeções.

7.2. Infecção experimental

7.2.1.. Infecção por *Schistosoma mansoni*

Os hamsters dos grupos Sm-1, Sm-2, Acey+Sm e Sm+Acey foram infectados com cercárias da cepa LE, cedidas pelo Moluscário Lobato Paraense/CpqRR/FIOCRUZ/René Rachou. As cercárias foram trazidas para o LPM e visualizadas em microscópio estereoscópico quanto a sua integridade (cabeça e cauda) e motilidade. A e a contagem foi feita por estimativa. Os hamsters foram infectados via subcutânea, no pescoço, com 30 cercárias, em um volume máximo de 100 µl (Peters e Warren, 1969).

7.2.2. Infecção por *Ancylostoma ceylanicum*

O inóculo foi preparado com 50 L3 e a infecção foi realizada como descrito no item 3.2.1 (capítulo 1).

7.3. Coleta de sangue

As coletas de sangue foram realizadas conforme descrito no Tópico 3.3 (capítulo 1). As coletas do experimento 1 ocorreram nos dias 0, 30, 60, e 75 dpi (eutanásia). No experimento 2 as datas de coleta foram 0, 30, 60 e 90 dpi (eutanásia).

7.4. Aferição de peso

Os animais foram pesados a cada 7 dias em balança semi-analítica até o término do experimento.

7.5. Exame parasitológico de fezes

7.5.1. Fórmol-éter

As fezes dos animais infectados com *S. mansoni* foram coletadas a partir de 30 dpi e realizado a técnica de formol-éter (Ritchie, 1948). Foram coletados dois gramas de fezes por grupo. As fezes foram homogeneizadas em 15 ml de salina 0,85%. A solução fecal obtida foi filtrada em gaze dobrada sobre um cálice e o conteúdo transferido para um tubo de 15 ml. Este foi centrifugado a 2400 g, 3 min., temperatura ambiente. O

sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 10 ml de salina e adicionado 5 ml de éter etílico (Synth). O tubo foi agitado vigorosamente em vórtex por 1 min. e centrifugado novamente a 2400 g, por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 ml de solução de formaldeído 3,7% tamponado. Foram retiradas alíquotas de 50 µl e a leitura realizada em quadruplicatas. Para facilitar a contagem foi acrescentada solução de lugol. A quantidade total de ovos foi estimada a partir da média de ovos obtidos nas leituras e o valor estimado para o volume de 1 ml.

7.5.2. O.P.G.

Realizado conforme descrito no item 3.5. (capítulo 1). Para os animais coinfetados (Acey+Sm e Sm+Acey) foram realizadas as duas técnicas já citadas. Os exames parasitológicos de fezes foram realizados até o dia anterior a eutanásia dos grupos experimentais.

7.6. Necropsia e recuperação dos vermes adultos

7.6.1. Recuperação de *S.mansoni*

Após a eutanásia os hamsters infectados com *S. mansoni* tiveram a cavidade abdominal e torácica abertas e as vísceras expostas para a visualização do sistema porta. Após ligadura do reto, a veia porta foi seccionada na região de fusão de seus aferentes mesentéricos. Uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D.) foi introduzida na aorta torácica para a realização da perfusão com solução salina contendo EDTA (NaCl a 0,85% e EDTA 5M 0,05%). O líquido contendo os vermes que extravasaram pela veia porta rompida de cada animal foi recolhido em cálices individuais. A perfusão foi repetida introduzindo a agulha no seio hepático. O material recolhido de cada animal foi decantado por 30 minutos. O sobrenadante aspirado, descartado e, ao cálice, foi adicionado mais solução salina. O procedimento foi repetido até que o sobrenadante apresentou-se límpido. Os vermes presentes em cada cálice foram vertidos em placas de Petri e observados em microscópio estereoscópico, separados por sexo e contados (Pellegrino e Siqueira, 1956 e Valadares *et al.*, 1981).

7.6.2. Recuperação de *A. ceylanicum*

Realizado conforme descrito no item 3.6. (capítulo 1).

7.7. Quantificação de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado

A quantificação de ovos retidos no fígado foi determinada de acordo com a técnica descrita por Cheever (1968). Após a perfusão foi retirado o lóbulo maior do fígado dos animais infectados por *S. mansoni*. Estes foram pesados em balança analítica e transferidos para tubos individuais de poliestireno de 50 ml contendo solução de hidróxido de potássio (KOH) a 5%. A digestão ocorreu à temperatura de 50 °C por 90 minutos ou até que não se observasse a presença de fragmentos de tecido. O conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de 15 ml e centrifugados por 1 min. a 200 g. O sobrenadante foi retirado por sucção e desprezado, permanecendo 1ml do produto da digestão. Foram adicionados 14 ml de solução salina 0,85% e o tubo agitado manualmente, seguido da repetição da centrifugação. O procedimento de lavagem foi repetido por cinco vezes. Após a última lavagem foi adicionado 5 ml de formaldeído 3,7% tamponado. A contagem dos ovos foi realizada em duplicata e a contagem total dos ovos estimada.

7.8. Processamento histológico das amostras obtidas durante as necropsias

Realizado conforme descrito no item 3.8. (capítulo 1).

7.9. Avaliação histopatológica de intestino delgado

As imagens das lâminas foram visualizadas em microscópio de luz com aumento de 400 vezes e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B. As imagens obtidas foram analisadas com auxílio do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Os cortes de intestino delgado foram avaliados qualitativamente quanto às alterações da mucosa (hipercelularidade da lâmina própria e hipersecreção das células de Paneth, hiperplasia de células caliciformes e erosão), da submucosa e muscular, e,

Morfométricamente, para obtenção de medidas das vilosidades (altura e espessura) e criptas (altura). Foram analisados 10 vilosidades hamster/grupo.

Os granulomas presentes nos cortes foram avaliados qualitativas e morfológicas quanto ao processo inflamatório, à área média dos granulomas e o seu estágio evolutivo de acordo com o seu componente predominante: Necrótico-exudativa, produtiva, produtiva a cura por fibrose e cura por fibrose (Raso *et al.* 2012).

7.10. Preparação de antígenos

7.10.1.. Antígeno de Excreção e secreção de verme adulto de *A. ceylanicum*

Preparado conforme descrito no item 3.11. (capítulo 1).

7.10.2. Antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e Antígeno de ovo de *S. mansoni* (SEA)

Os antígenos SWAP e SEA foram gentilmente cedidos pela Dra. Cíntia Fagundes, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG e foram preparados segundo protocolo abaixo.

Camundongos C57BL/6 foram infectados por via subcutânea com 120 cercárias do *S. mansoni*. Após 45 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e seu sistema porta-hepática perfundido usando solução NaCl 1,7% (solução salina) contendo heparina 0,05 U/mL (Smithers e Terry, 1965). Os vermes recuperados foram lavados exaustivamente em solução salina tamponada com fosfato, PBS, sendo então estocados a -20°C em volume mínimo de tampão (Goes *et al.*, 1989). Após a perfusão, os fígados e intestinos foram coletados.

Para a preparação de SWAP cerca de 20 mL de vermes congelados foram triturados em Potter e ultracentrifugados a 37.000 rpm, por 1 hora, a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall OTD5B). No sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteína, segundo Bradford (1976). Alíquotas foram armazenadas a -70°C, até o uso. O sedimento da primeira centrifugação foi levado a uma segunda extração, seguindo o mesmo procedimento.

A luz intestinal foi lavada com solução salina 1,7% e os dois órgãos foram incubados separadamente por 48 horas, a 4°C, em salina 1,7% e, nova incubação a 37°C

foi realizada. Fígados e intestinos foram triturados, separadamente, em liquidificador, a fim de liberar os ovos do parasito dos tecidos do animal. Os ovos, lavados em solução salina 1,7%; Os ovos foram concentrados em cálices de decantação e o sobrenadante aspirado e descartado. Este procedimento foi repetido até que os ovos se encontrassem límpidos. Os ovos foram filtrados em tela de Kato (poro de 0,09 mm) e lavados em PBS 0,15 M. Essa suspensão de ovos, em volume mínimo de tampão, foi processada segundo técnica modificada a partir de Carter e Colley (1978). Após ser triturada em Potter, em banho de gelo, o macerado resultante foi incubado por 18 horas a 4°C, antes de ser centrifugado a 37.000 rpm, por 1 hora, a 4°C (ultracentrífuga Sorvall OTD5B). No sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteína, segundo Bradford (1976). Alíquotas foram armazenadas a -70°C, até o uso.

7.11. Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas presentes nas amostras de extrato proteico total de vermes adulto de *A. ceylanicum*, SWAP e SEA foram estimadas conforme descrito no Tópico 3.12.

7.12. ELISA

Placas de microtitulação de poliestireno (BD Falcon) foram sensibilizadas com 100 µl/poço da solução de extrato proteico total de *A. ceylanicum* (1 µg/ml) ou de ES (5 µg/ml) ou SWAP (1 µg /ml) ou SEA (3 µg /ml) em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M NaHCO₃ pH 9,6). A metodologia para ELISA foi feita conforme descrito no Tópico 3.13.

7.13. Análise estatisticamente significativa

Para a análise estatisticamente significativa dos dados gerados foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov.

As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não pareado (dados paramétricos) e Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney (dados não paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram

submetidos aos testes ANOVA ou Repeated Measures ANOVA seguido do de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do teste de Dunns (dados não paramétricos). Foi utilizado o teste de Grubbs para detectar outliers (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Todos os resultados analisados testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS EXPERIMENTO 1

8. Resultados experimento 1

8.1. Aferição do peso

Os animais foram pesados no dia 0 dpi e posteriormente a cada sete dias até o término dos experimentos. Os grupos NI-1 e Sm-1 apresentaram ganho de peso em todas as datas de aferição. Os animais do grupo Acey-1 e Acey + Sm apresentaram oscilação de peso durante o experimento, alternando períodos de ganho e perda de peso (Gráfico 7). Foi observada diferença estatisticamente significativa a partir de 28 dpi entre os grupos NI-1 e Acey-1 ($p < 0,05$); NI-1 e Acey+Sm ($p < 0,01$); Sm e Acey-1 ($p < 0,01$); Sm-1 e Acey+ Sm ($p < 0,01$), mantendo esta diferença em todas as datas analisadas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa na comparação dos grupos NI-1 e Sm-1 ou Acey-1 e Acey+Sm durante o experimento.

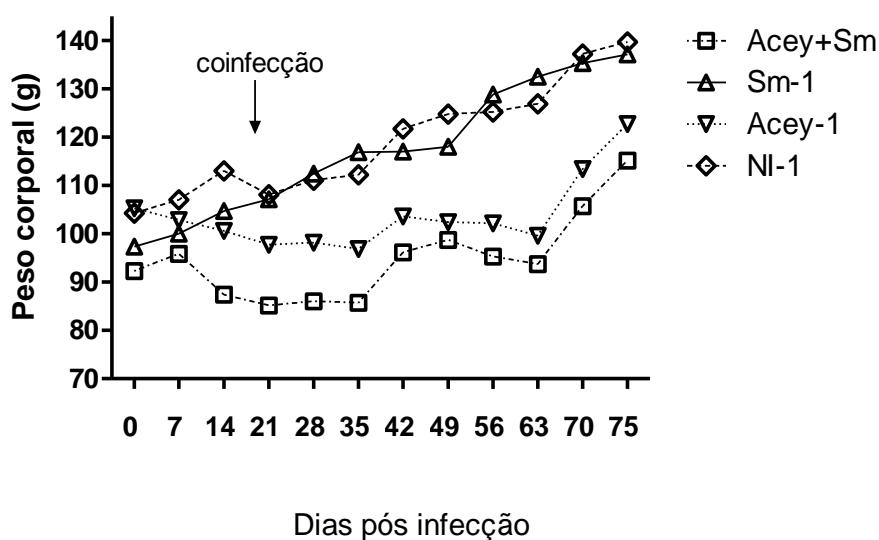


GRÁFICO 7- Peso médio dos grupos ao longo do experimento. Não infectado (NI-1), Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-1), Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1). Infecção por *A. ceylanicum* e posteriormente por *S. mansoni* (Acey+Sm).

8.2. Exame parasitológico de fezes

8.2.1. O.P.G

A cinética de eliminação de ovos de *A. ceylanicum* nas fezes dos grupos Acey-1 e Acey+Sm está representada no gráfico 8. A patência observada foi de 16 dias. O pico de eliminação ocorreu aos 26 dpi para o grupo Acey-1 e 32 dpi para Acey+Sm.

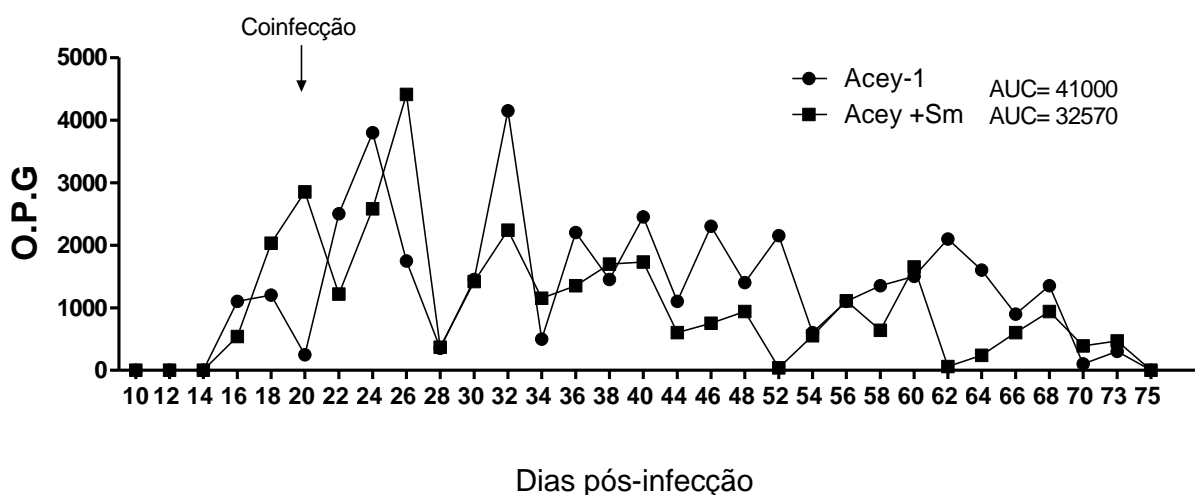


GRÁFICO 8- Eliminação de ovos de *A. ceylanicum*. Ovos por grama de fezes (O.P.G.). Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-1). Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e aos 20 dpi coinfestado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm). AUC= Area abaixo do gráfico.

8.2.2. Eliminação de ovos de *S. mansoni*

Foram observados ovos de *S. mansoni* nas fezes do grupo Sm-1 e Acey+Sm aos 42 dpi. O pico de eliminação ocorreu aos 46 dpi para ambos os grupos (Gráfico 9)

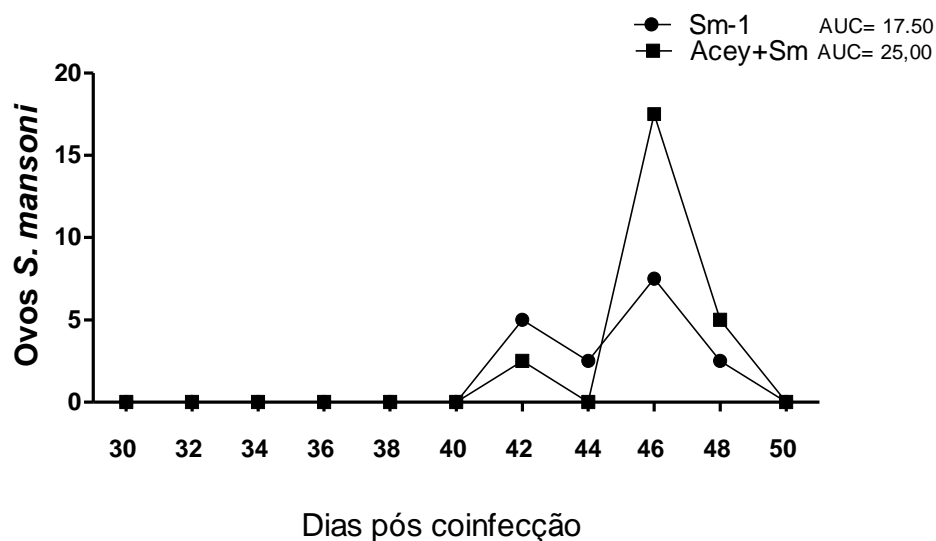


GRÁFICO 9- Eliminação de ovos de *Schistosoma mansoni* em fezes de hamster infectados. Média de eliminação por grupo. Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e coinfectados após 20 dias com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1).

8.3. Recuperação dos vermes adultos de *A. ceylanicum* e *S. mansoni*

Após 75 dias de acompanhamento os animais foram eutanasiados para a recuperação dos vermes adultos. Do grupo Acey-1 (7 animais) foram recuperados do intestino delgado o total de 49 vermes adultos de *A. ceylanicum*. Destes 23 machos e 26 fêmeas. Do grupo Sm-1 (10 animais) foram recuperados 35 vermes, sendo 18 machos e 13 fêmeas de *S. mansoni*. No grupo Acey+Sm (6 animais) foram recuperados no intestino delgado 47 vermes, sendo 21 machos e 26 fêmeas de *A. ceylanicum*. Dos vasos mesentéricos, após a realização da perfusão, foram recuperados 11 vermes adultos de *S. mansoni*. Destes 7 eram machos e 4 fêmeas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados. A média de recuperação de vermes adultos por grupo está ilustrada no gráfico 10.

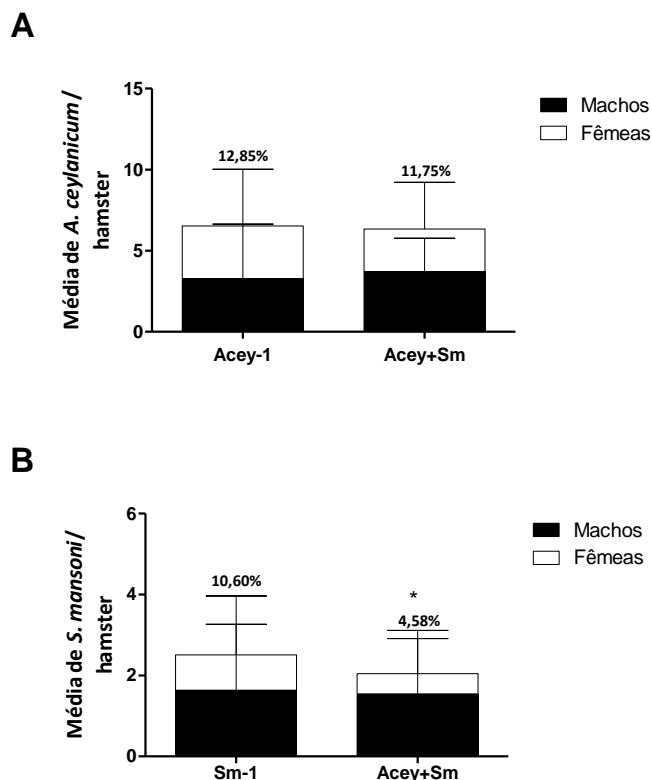


GRÁFICO 10- A: Média de recuperação de vermes adultos de *A. ceylanicum* do intestino delgado de hamster. B: Média de recuperação de vermes adultos de *S. mansoni* dos vasos mesentéricos de hamster. Eutanásia realizada aos 75 dias de experimento. Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-1) (n=7). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1) (n=10). Infectado por 50 L3 de *A. ceylanicum* e aos 20 dpi coinfestado por 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm) (n= 6), porcentagem de recuperação média dos vermes adultos em relação ao inóculo $p > 0,05$.

8.4. Quantificação de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado

O número de ovos retidos no fígado de animais infectados e coinfetados estão apresentados no gráfico 11. O peso médio do lóbulo do fígado do grupo Sm-1 foi $2,66 \pm 0,64$ g e do grupo Acey+Sm foi $2,15 \pm 0,29$ g. Na comparação entre os grupo Sm-1 e Acey+Sm não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

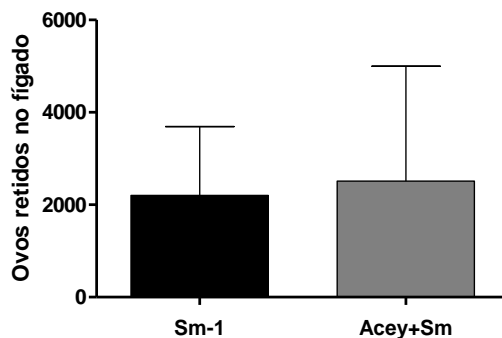


GRÁFICO 11- Ovos de *S. mansoni* retidos no fígado. Necropsia realizada aos 75 dias de experimento. Infectado com 30 cercárias, Sm-1 (n=10). Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e posteriormente por com 30 cercárias de *S. mansoni* aos 20 dpi, Acey+Sm (n= 6). Dados mostrados como média+ desvio padrão. $p > 0,05$.

8.5. Exames hematológicos

8.5.1. Série vermelha

O hemograma realizado aos 30 dpi (Gráfico 12A-C) apresentou alteração dos níveis de hemácias, hemoglobina e hematócrito nos grupos Acey-1 e Acey+Sm. Houve redução significativa do número de hemácias para os grupos Acey-1 ($p < 0,01$) e Acey+Sm ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo NI-1. Os níveis de hemoglobina e hematócrito também se apresentaram reduzidos, com diferença significativa para os grupos Acey-1 ($p < 0,001$) e Acey+Sm ($p < 0,01$) quando comparados com o grupo NI-1. Na comparação entre os grupos Acey-1 e Acey+Sm não foi observada diferença estatisticamente significativa. O grupo Sm-1 não apresentou alteração significativa em relação ao grupo NI-1 em nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, todos os grupos apresentaram as médias abaixo dos valores fisiológicos para hamster fêmeas.

O gráfico 13 mostra as alterações observadas para os grupos Acey-1 e Acey+Sm dos níveis de hemácias, hemoglobina e hematócrito aos 60 dpi. O número de hemácias circulantes está reduzido para os grupos Acey-1 ($p < 0,05$) e Acey+Sm ($p < 0,05$) em relação ao NI-1. Os valores destes grupos estão abaixo do fisiológico determinado para hamsters fêmeas. O grupo Sm-1 não apresentou alteração nos níveis de hemácias, hemoglobina ou hematócrito em relação ao grupo NI-1. Os níveis de hemoglobina apresentaram alteração significativa para os grupos Acey-1 ($p < 0,05$) e Acey+Sm ($p < 0,05$) em relação ao NI-1. Na avaliação dos níveis de hemoglobina todos os grupos

apresentam valores abaixo do fisiológico. Em relação ao hematócrito não é observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI-1 e infectados.

Aos 75 dpi (gráfico14, A-C) foi observado aumento dos níveis de hemácias, hemoglobina e hematócrito em todos os grupos em comparação aos hemogramas realizados aos 30 e 60 dpi. Em relação ao número de hemácias o grupo Acey-1 ($p < 0,01$) apresenta valores mais baixos que os demais grupos, com diferença estatisticamente significativa em relação o NI-1. Também se observa diferença entre o grupo Acey+Sm ($p < 0,05$) e o NI-1. Vale resaltar que todos os grupos apresentaram valores compatíveis com os fisiológicos. Em relação aos níveis de hemoglobina foi observada diferença significativa ao comparar o grupo NI-1 com o grupo Acey-1 ($p < 0,001$) e Sm-1 ($p < 0,01$). Para os valores de hematócrito houve diferença entre os grupos na comparação dos grupos NI-1 e Acey-1 ($p < 0,01$); Acey-1 e Acey+Sm ($p < 0,05$).

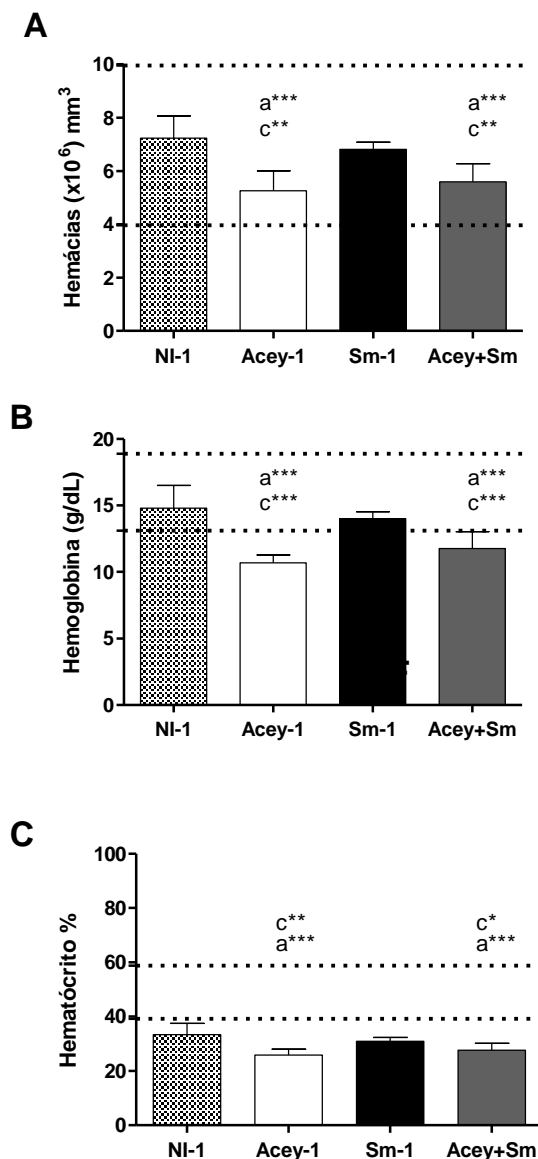


GRÁFICO 12- Hemograma realizado aos 30 dpi. Contagem global de hemácias em milímetros cúbicos (A); Níveis de hemoglobina em grama por decilitro (B); Hematócrito em porcentagem (C). Não infectado (NI-1)(n=12). Infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-1)(n=12); Infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=8). Infectado previamente com *A. ceylanicum* e aos 20 dpi infectado com *S. mansoni* (Acey+Sm)(n=14). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1. ^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo Acey-1, ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-1. *= p < 0,05; **= p < 0,01; *= p < 0,001.**

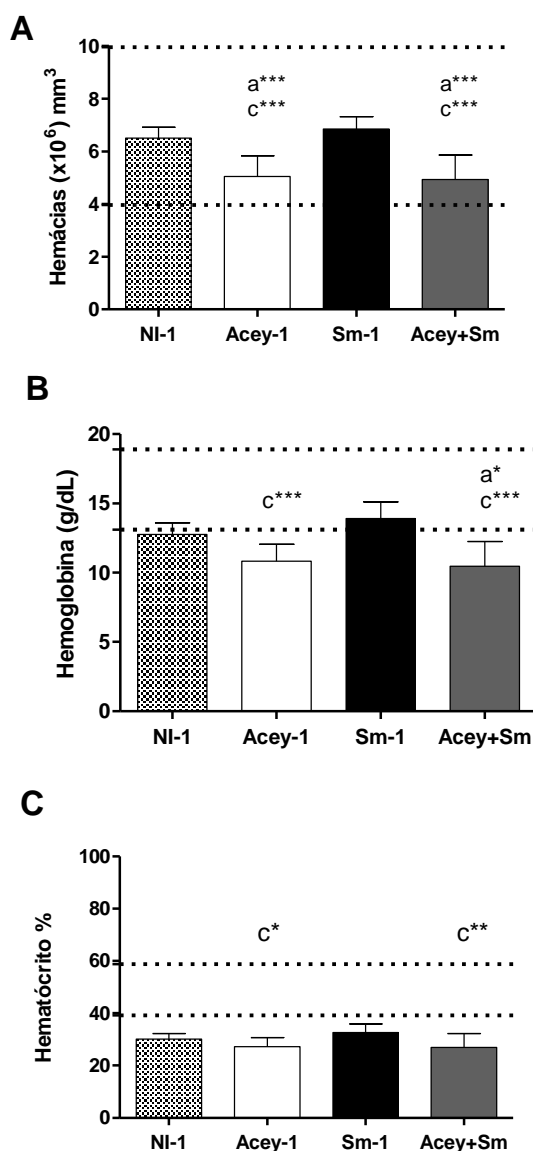


GRÁFICO 13 - Hemograma realizado aos 60 dpi. Contagem global de hemácias em milímetros cúbicos (A); Níveis de hemoglobina em grama por decilitro (B); Hematócrito em porcentagem (C). Não infectado (NI-1)(n=9); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-1)(n=8); Infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=10). Infectado previamente com *A. ceylanicum* e aos 20 dpi infectado com *S. mansoni* (Acey+Sm)(n=11). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).)^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1. ^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo Acey-1, ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-1. *= p < 0,05; **= p < 0,01; *= p < 0,001.**

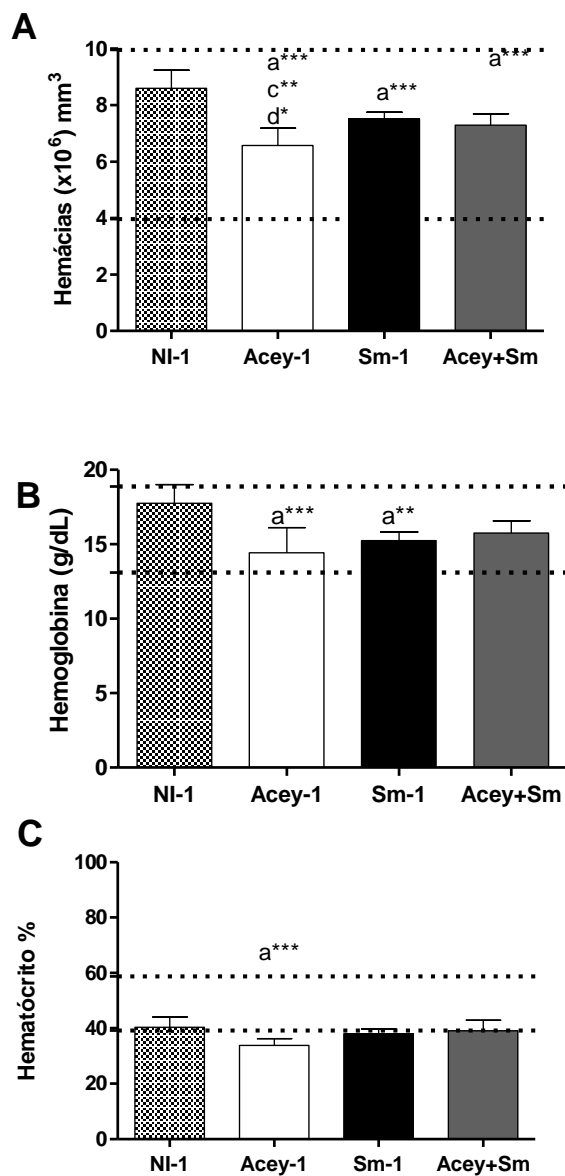


GRÁFICO 14 - Hemograma realizado aos 75 dpi (A-C). Contagem global de hemácias em milímetros cúbicos (A); Níveis de hemoglobina em grama por decilitro (B); Hematócrito em porcentagem (C). Não infectado (NI-1)(n=10); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-1)(n=7); Infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=11). Infectado previamente com *A. ceylanicum* e aos 20 dpi infectado com *S. mansoni* (Acey+Sm)(n=7). Linha pontilhada: valores

fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1.^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo Acey-1,^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-1. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

8.5.2. Leucograma

No leucograma realizado aos 30 dpi (gráfico 15) não foi observado alteração de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos totais ou eosinófilos na comparação realizada entre os grupos infectados e NI-1. O mesmo é observado aos 60 dpi (gráfico 16).

Aos 75 dpi (gráfico 17) o leucograma realizado apresenta alteração na contagem de linfócitos com diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos NI-1 e Sm-1 ($p < 0,01$) e entre os grupos infectados Sm-1 e Acey+Sm ($p < 0,01$), onde o grupo Sm-1 apresenta valores mais elevados. Os demais parâmetros avaliados não apresentam alteração com diferença estatisticamente significativa.

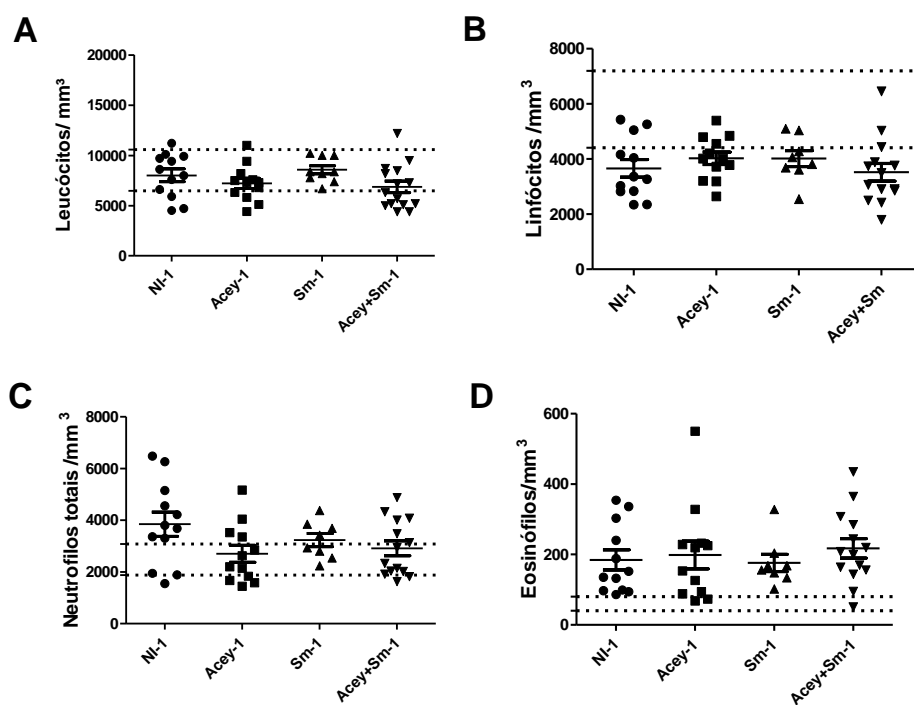


GRÁFICO 15- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 30 dpi. **A:** Leucócitos totais. **B:** Linfócitos totais. **C:** Neutrófilos totais. **D:** Eosinófilos. Valores em milímetro cúbico. Não infectado (NI-1)(n=12); grupo infectado com *A. ceylanicum*, via oral com 50 L3 (Acey-1)(n=12), grupo infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=8). Infectado primariamente com *A. ceylanicum* e após 20 dias foram infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm)(n=14). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster fêmeas de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).

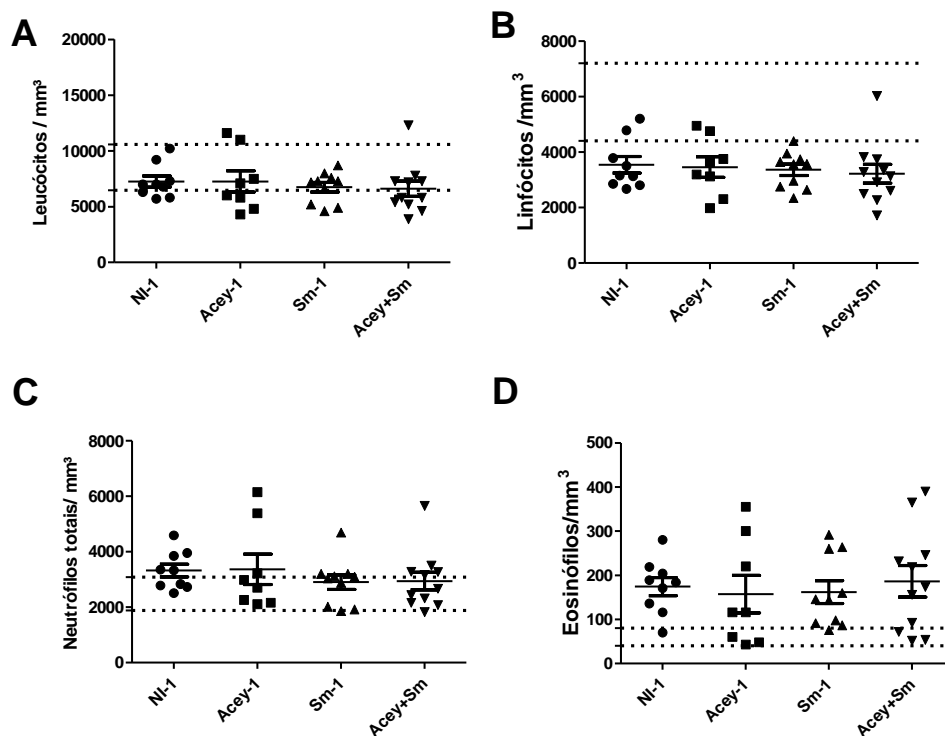


GRÁFICO 16- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 60 dpi **A:** Leucócitos totais. **B:** Linfócitos totais. **C:** Neutrófilos totais. **D:** Eosinófilos. Valores em milímetro cúbico. Não infectado (NI-1)(n=9); grupo infectado com *A. ceylanicum*, via oral com 50 L3 (Acey-1)(n=8), grupo infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=10). Infectado primariamente com *A. ceylanicum* e após 20 dias foram infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm)(n=11). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster fêmeas de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981).

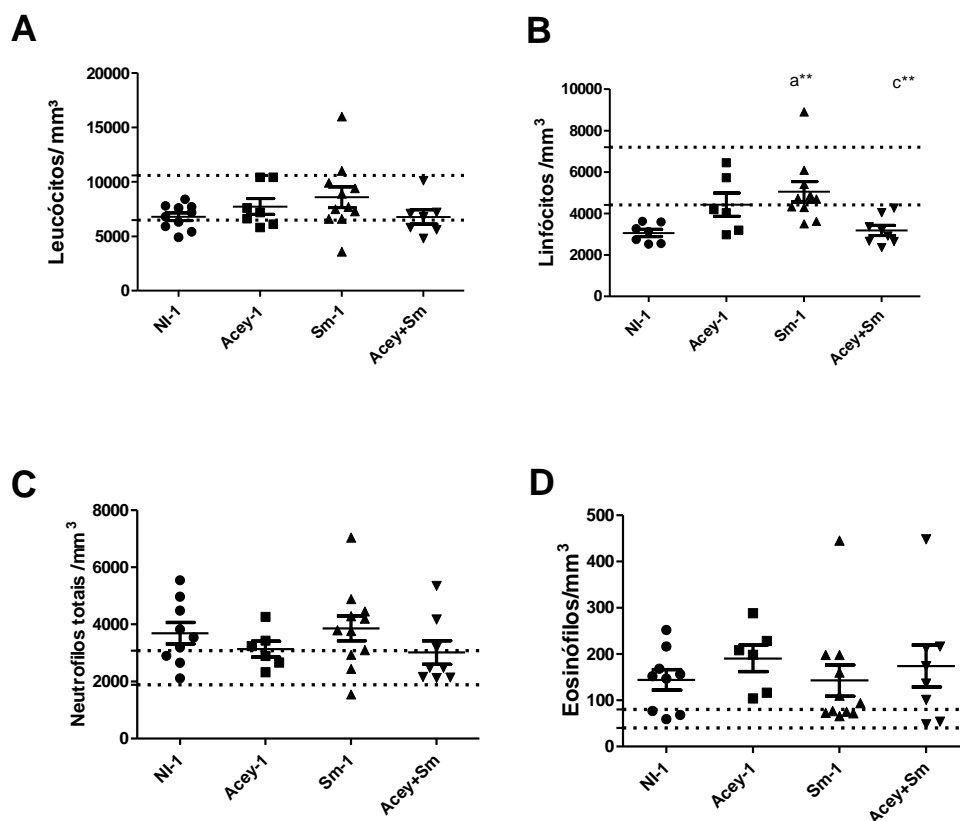


GRÁFICO 17- Leucócitos totais e contagem diferencial em sangue de hamsters aos 75 dpi. A: Leucócitos totais. B: Linfócitos totais. C: Neutrófilos totais. D: Eosinófilos. Valores em milímetro cúbico. Não infectado (NI-1)(n=7); grupo infectado com *A. ceylanicum*, via oral com 50 L3 (Acey-1)(n=6), grupo infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=10). Infectado primariamente com *A. ceylanicum* e após 20 dias foram infectados com 30 cercárias de *S. mansoni*(Acey+Sm)(n=8). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster fêmeas de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1. ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-1. **= p < 0,01

8.6. ELISA

Os plasmas dos hamsters obtidos aos 30, 60 e 75 dpi foram testados para avaliar os níveis de IgG total frente aos antígenos SEA, SWAP, Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES.

Aos 30 dpi (Gráfico 18) o grupo Sm-1 e Acey+Sm apresentaram a média de absorvância abaixo do valor de cut-off frente ao antígeno SWAP e sem diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo NI-1. Embora o grupo Acey+Sm tenha apresentado animais positivos no teste, quando comparados ao grupos

Sm, também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Não foi observado reação dos grupos Sm-1 e Acey+Sm frente ao antígeno SEA.

Os grupos Acey-1 e Acey+ Sm apresentaram valores de absorvância acima do cut-off frente aos antígenos Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES, com diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo NI-1 ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos Acey-1 e Acey+Sm. Demonstrando que a coinfeção por *S. mansoni* não interferiu na resposta imune humoral contra a infecção por *A. ceylanicum*.

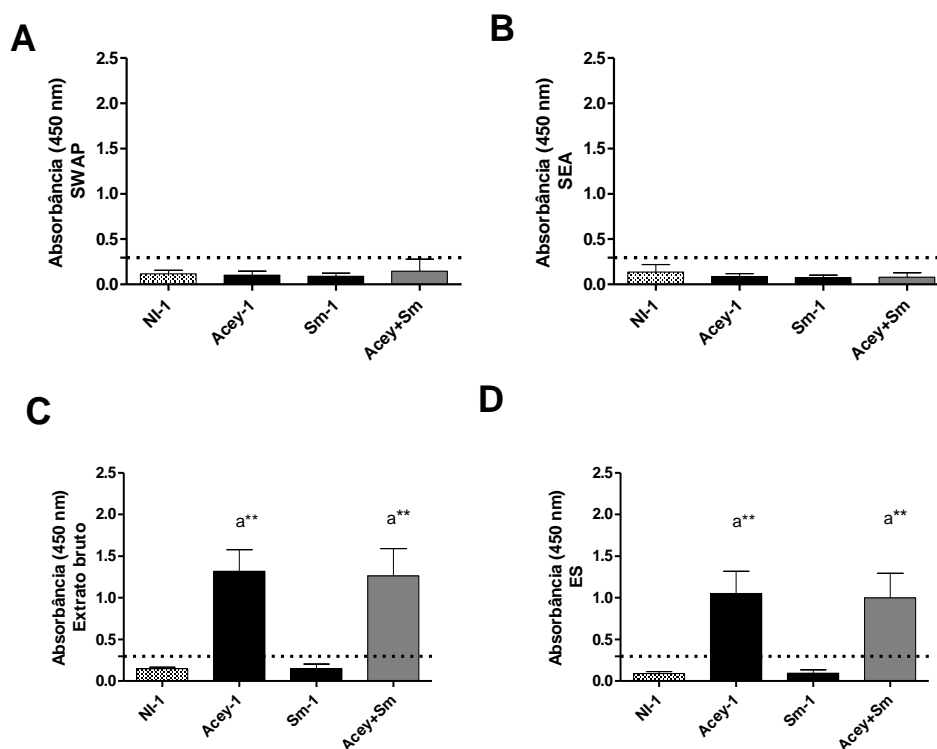


GRÁFICO 18- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos antígenos aos 30 dpi frente aos antígenos: A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de *A. ceylanicum*; D: ES. Não infectado (NI-1)(n=6); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-1)(n=11); infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-1)(n=11) Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e posteriormente infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* aos 20 dpi (Acey+ Sm)(n=13). Linha pontilhada: cut-off. hamsters por grupo, respectivamente. ^a Estatisticamente significante comparado ao grupo NI-1. ^{**}= $p < 0,01$.

Aos 65 dpi (Gráfico 19) o grupo Sm-1 e Acey+Sm apresentaram a média de absorvância abaixo do valor de cut-off frente ao antígeno SWAP e sem diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo NI-1. Também não foi

observado reação dos grupos Sm-1 e Acey+Sm frente ao antígeno SEA, com exceção de um animal.

Os grupos Acey-1 e Acey+ Sm apresentaram valores de absorvância acima do cut-off frente aos antígenos Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES, com diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo NI-1 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos Acey-1 e Acey+Sm

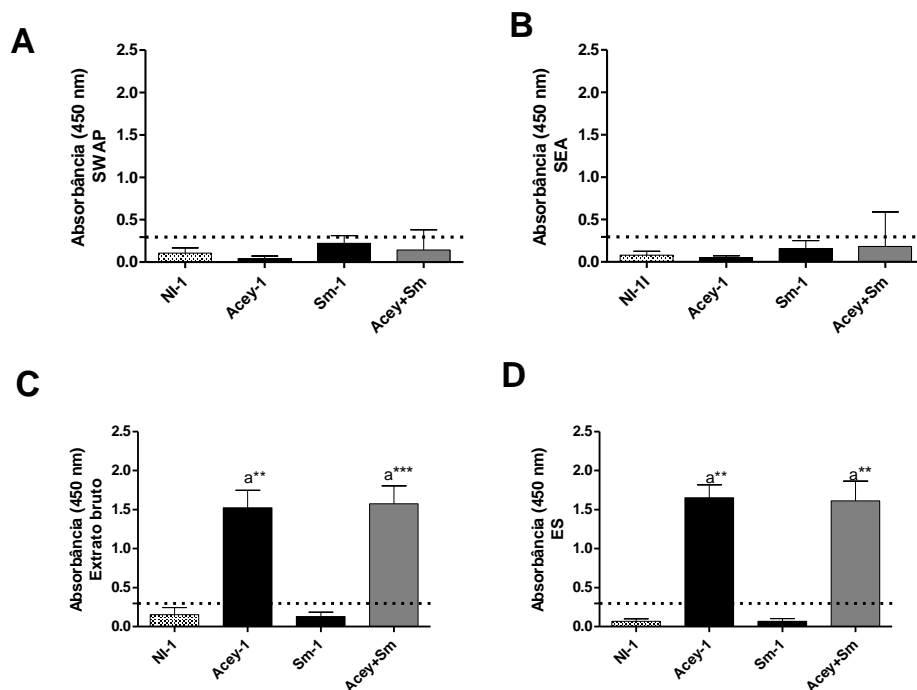


GRÁFICO 19- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos 60 dpi frente aos antígenos: A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de *A. ceylanicum*; D: ES. Não infectado (NI-1) (n=10); infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum*, via oral (Acey-1) (n=10); Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum*; infectado com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Sm-1) (n=10) e infectado aos 20 dpi com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Acey+ Sm) (n= 11). Linha pontilhada: cut-off. hamsters por grupo, respectivamente. ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1. **= $p < 0,01$.

Aos 75 dpi (gráfico 20) todos os plasmas dos grupos Sm-1 e Acey+Sm apresentavam absorvância acima do valor de cut-off frente ao SWAP. Foi observado

diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos infectados Sm-1 ($p < 0,01$), Acey +Sm ($p < 0,05$) e o grupo NI-1. Também observamos diferença na comparação entre os grupos Sm-1 e Acey+Sm ($p < 0,05$). Embora todos os animais infectados com *S.mansoni* tenham reconhecido SWAP, o mesmo não ocorreu para o SEA (gráfico 20B). Observamos diferença estatisticamente significativa na comparação do grupo NI-1 com os grupos infectados Sm-1 ($p < 0,01$) e Acey+Sm ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação entre Sm-1 e Acey+Sm na resposta a antígenos de SEA. .

Os valores de absorvância dos grupos Acey-1 e Acey+ Sm persistiram elevados frente aos antígenos Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES (gráfico 20C e 20D), com diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo NI-1 ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos Acey-1 e Acey+Sm na resposta a esses antígenos. Estes dados sugerem que a resposta humoral frente à infecção por *A. ceylanicum* não sofreu alteração pela coinfeção por *S. mansoni*. Já em animais infectados inicialmente por *A. ceylanicum* e coinfectados por *S. mansoni*, a resposta frente ao antígeno SWAP se mostrou alterada, com redução significativa dos níveis de IgG anti-SWAP.

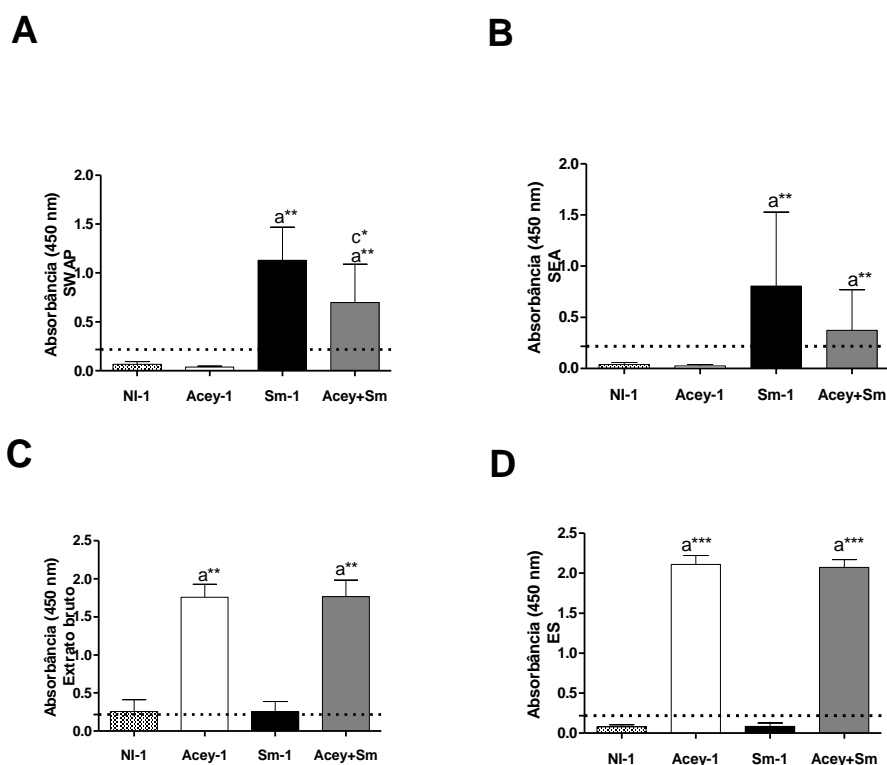


GRÁFICO 20- Níveis de IgG total em plasma de hamsters aos 75 dpi frente aos antígenos A: SWAP; B: SEA; C: Extrato bruto de *A. ceylanicum*; D: ES. Não

infectado (NI-1) (n=6); infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum*, via oral (Acey-1) (n=6); Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum*; infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (n=10), infectado aos 20 dpi com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Acey+Sm). Linha pontilhada: cut-off. ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-1. ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-1. *= p < 0,05; **= p < 0,01.

8. 7. Análise histológica

Os resultados das análises histopatológicas e morfométricas dos cortes de intestino delgado corados por HE estão representados na figura 4 e no gráfico 21. Os cortes foram avaliados qualitativamente para análise das alterações da mucosa (hipercelularidade da lâmina própria e hipersecreção das células de Paneth, hiperplasia de células caliciforme e erosão), da submucosa e muscular, e, Morfométricamente, para obtenção de medidas das vilosidades (altura e espessura), criptas (altura) e razão vilosidade-cripta.

A mucosa dos hamsters do grupo NI-1 apresentou aspecto histológico normal, com estruturas íntegras, e razão vilosidade-cripta média de 3:1. As células de Paneth e caliciformes se apresentaram em quantidade normal. Em todos os grupos infectados foram observadas alterações na arquitetura do intestino delgado como perda do epitélio intestinal, redução da altura das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas de Lieberkün. Foram observadas reduções na altura das vilosidades nos grupos Acey-1 (p< 0,05), e Sm-1 (p<0,05) na comparação com o grupo NI-1. Não foram observadas alterações significativas na comparação entre o grupo Acey+Sm com o grupo NI-1 ou os demais infectados.

Em relação à hipertrofia das criptas ela somente foi significativa no grupo Acey+Sm. A razão vilosidade/cripta dos grupos infectados apresentou redução significativa quando comparadas ao NI-1.

As análises dos granulomas foi realizada somente para o intestino delgado, em função de ser o sítio de localização do *A. ceylanicum*. O número de granulomas formados no intestino delgado foi semelhante nos grupos Sm-1 e Acey+Sm. A coinfeção não alterou a composição do granuloma ou tamanho (gráfico 17). e o resultado pode ser visualizado no tabela 3. Não foram observados granulomas na fase de cura por fibrose devido ao tempo de infecção.

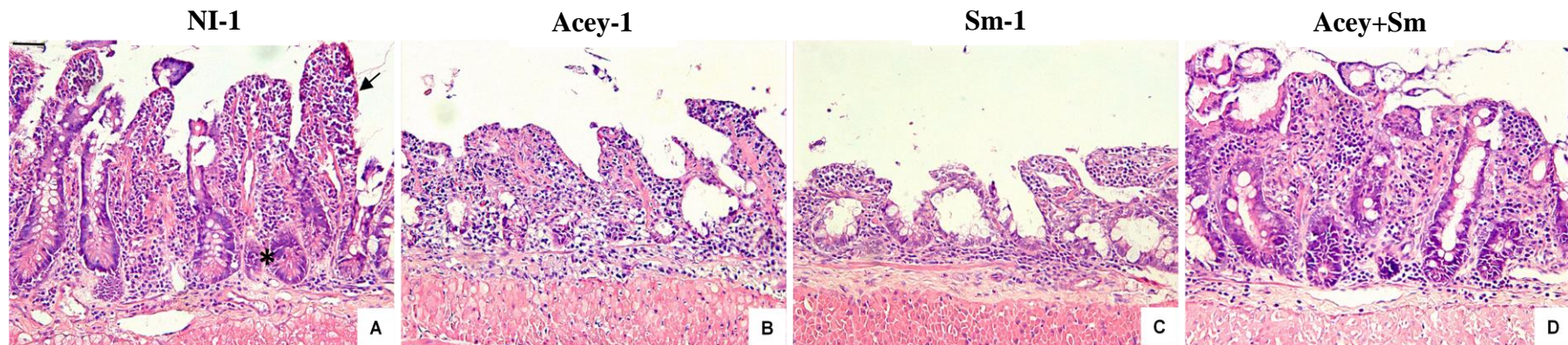


Figura 3: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters. Grupo não infectado (NI-1), infectados com 50 L3 de *Ancylostoma ceylanicum* (Acey-1), infectados com 30 cercárias de *Schistosoma mansoni* (Sm-1) e infectados por 50 L3, após 20 dpi coinfectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Acey+Sm). A: Aspecto histológico normal evidenciando vilosidades (seta) e criptas de Lieberkühn íntegras (asterisco); B, C: comprometimento da arquitetura tecidual evidenciando áreas com redução na altura das vilosidades e (D): hipertrofia das criptas de Lieberkühn. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50mm.

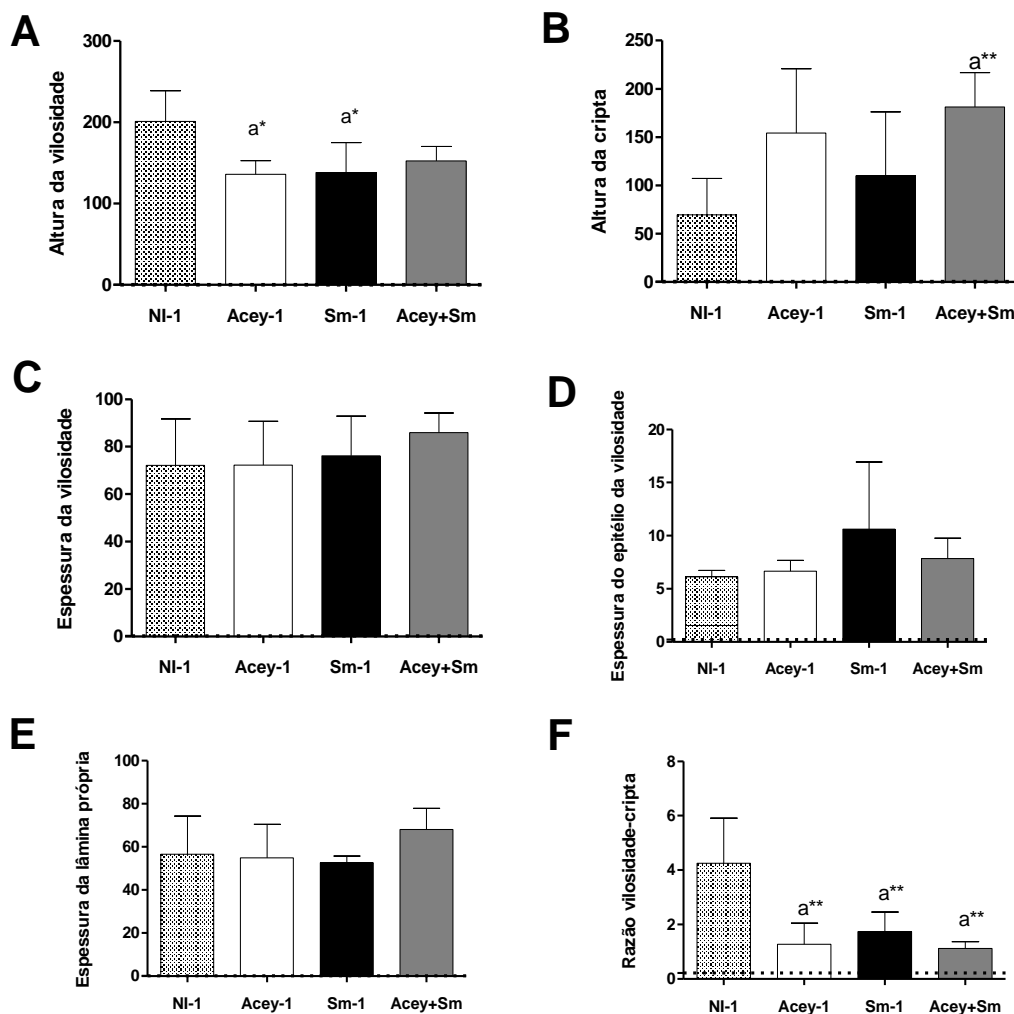


GRÁFICO 21 - Avaliação Morfométrica da mucosa do intestino delgado de hamsters. A- Altura vilosidade. B- Altura das criptas de Lieberkün. C- Espessura das vilosidades. D- Espessura do epitélio da vilosidade. E- Espessura da lâmina própria. F- Razão vilosidade:cripta. Valores em micrometros. Não infectado (NI-1); infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum*, via oral (Acey-1); infectado com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Sm-1). Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e coinfectado aos 20 dpi com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Acey+ Sm). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Dados mostrados como média+ erro padrão.

Tabela 3: Análise do estágio evolutivo nos granulomas do intestino delgado

Grupo	Granuloma				total
	necrótico-exsudativa	produtiva	por fibrose	cura por fibrose	
Sm-1	3	5	0	0	8
Acey+Sm	3	4	0	0	7

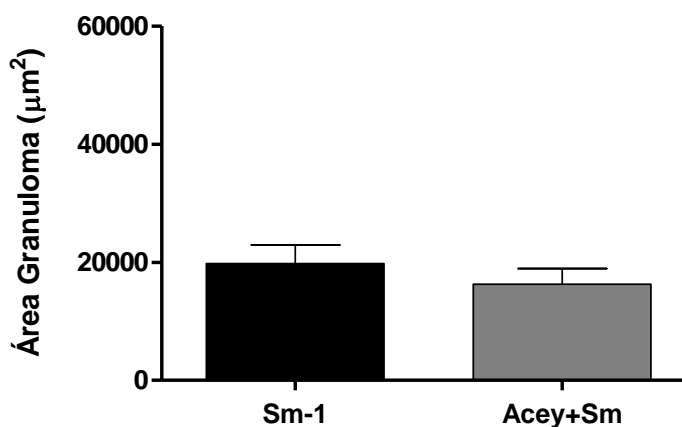


GRÁFICO 22: Área média dos granulomas no intestino delgado de hamsters. Infectados com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Sm-1). Infectados inicialmente com 50 L3 de *A. ceylanicum* e coinfestado aos 20 dpi com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Acey+ Sm).

9. RESULTADOS EXPERIMENTO 2

9. Resultados experimento 2

9.1. Aferição do peso

Os animais foram acompanhados com pesagens semanais até o término do experimento aos 90 dpi. Nas comparações realizadas entre os grupos NI-2 e infectados (Acey-2, Sm-2 e Sm+Acey) e dos infectados entre si, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, em todas as datas analisadas (gráfico 23).

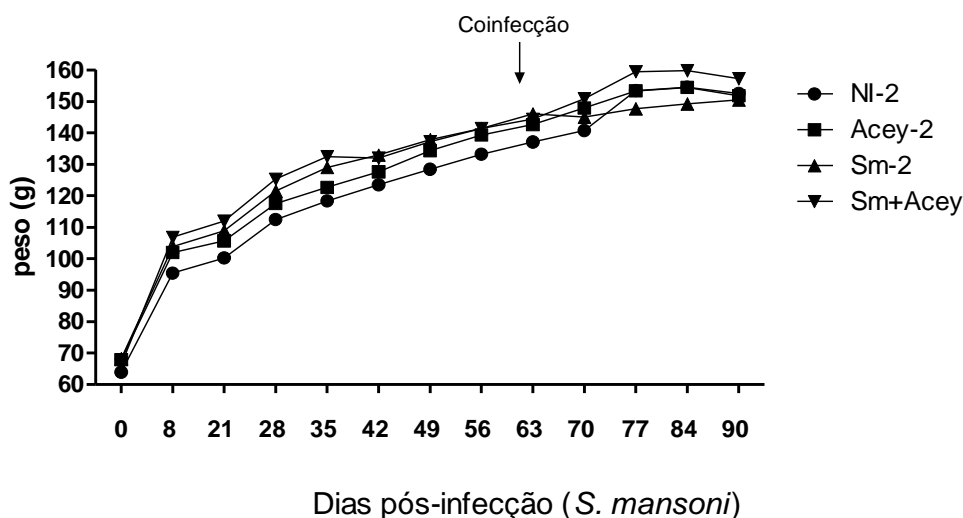


GRÁFICO 23- Aferição de peso dos grupos experimentais. Valores em gramas. Não infectado (NI-2), infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-2), Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* e após 60 dias infectado com *A. ceylanicum* (Sm+Acey). $p > 0,05$.

9.2. Exame parasitológico de fezes

9.2.1. Contagem de ovos de *S. mansoni*

Foram observados ovos de *S. mansoni* nos grupos Sm-2 e Sm+Acey a partir dos 43 dpi. O pico de eliminação ocorreu aos 71 dpi (Sm-2), e aos 82 dpi no grupo (Sm+Acey) (gráfico 24), demonstrando, como no experimento anterior, que a coinfecção por *A. ceylanicum*, mesmo que posterior à infecção por *S. mansoni* alterou o pico de eliminação de ovos.

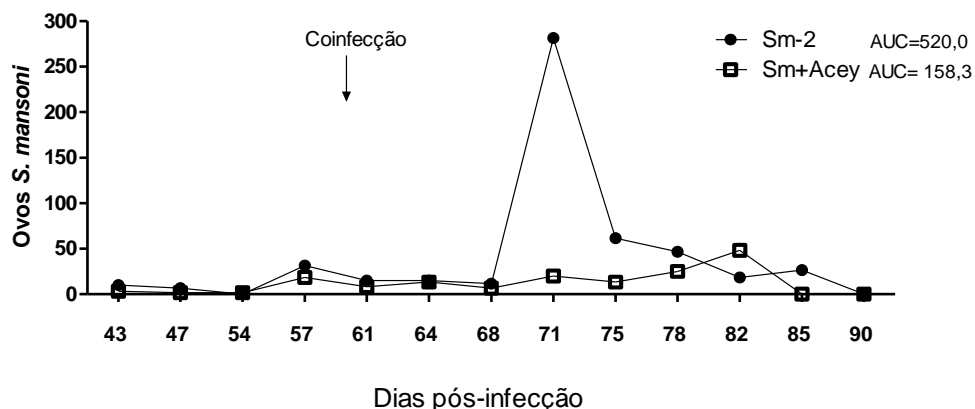


GRÁFICO 24- Exame Parasitológico de Fezes (Formol-Éter). Média de eliminação por grupo. Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Sm-2). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* e coinfestado aos 60 dpi com 50 L3 de *A. ceylanicum*, via oral. AUC= Area abaixo do gráfico.

9.2.2. O.P.G

A coleta de fezes foi iniciada aos 10 dpi. A patência dos grupos Acey-2 e Sm+Acey ocorreu aos 17 dpi.

9.3. Recuperação dos vermes adultos de *A. ceylanicum* e *S. mansoni*

Foram recuperados 227 vermes adultos de *A. ceylanicum* do intestino delgado do grupo Acey-2 (21 animais). Destes 115 machos e 112 fêmeas. A recuperação média do grupo foi de aproximadamente 22% em relação ao inóculo de 50 L3 utilizado.

Do grupo Sm-2 (7 animais) foram recuperados 80 vermes adultos de *S. mansoni* após a perfusão. Destes 52 eram machos e 28 eram fêmeas. A recuperação média do grupo foi de 40% em relação ao inóculo de 30 cercárias.

No grupo Sm+Acey (7 animais) foram recuperados no intestino delgado 52 vermes adultos de *A. ceylanicum*, sendo 30 machos e 22 fêmeas. A recuperação média foi de 12%. Dos vasos mesentéricos foram recuperados 65 vermes adultos, destes 42 machos e 23 fêmeas, apresentando uma média de recuperação de 24 %.

Ao comparar os grupos Acey-2 e Sm+Acey não houve diferença estatisticamente significativa na recuperação dos vermes adultos de *A. ceylanicum* ou *S. mansoni*. O mesmo foi observado ao comparar Sm e Sm+Acey.

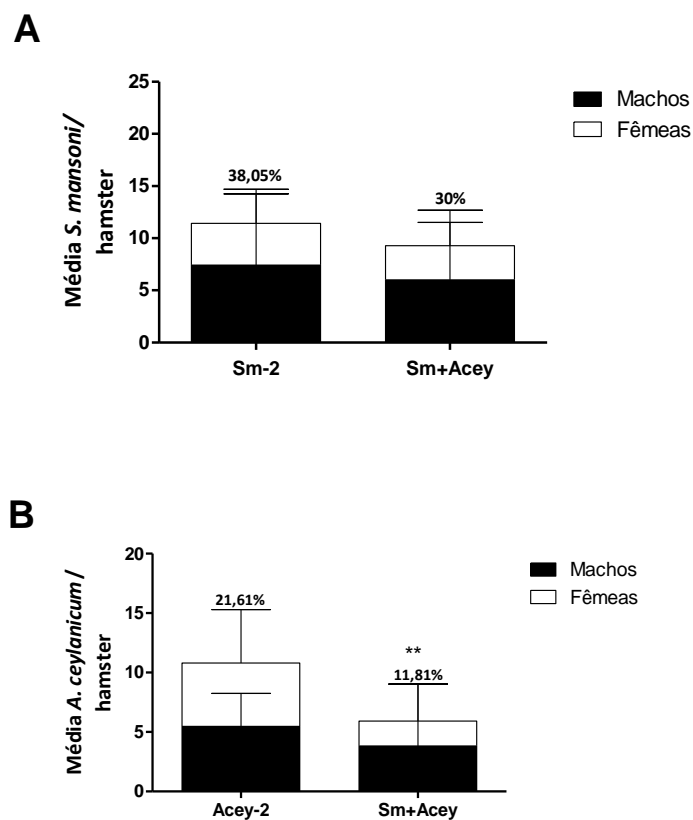


GRÁFICO 25- Recuperação de vermes. A: Média de recuperação de vermes adultos de *S. mansoni* dos vasos mesentéricos de hamster. B: Média de recuperação de vermes adultos de *A. ceylanicum* do intestino delgado de hamster. Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey-2) (n=21). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2) (n= 7). Infectado por 30 cercárias de *S. mansoni* e após 60 dias por 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey+Sm). Em porcentagem a recuperação total de vermes em relação ao inóculo. $p > 0,05$.

9.4. Quantificação de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado

Após o sacrifício dos hamsters, o lóbulo maior do fígado foi pesado e colocado em solução de KOH 5% para realizar a digestão do tecido. A contagem dos ovos foi realizada em quadruplicatas em microscópio óptico em alíquotas de 50 μ l. O valor obtido pode ser visto no gráfico 26. O peso médio do lóbulo escolhido foi de $3,9 \pm 1,36$ g para o grupo Sm+Acey (n=11) e $3,9 \pm 1,29$ g para o grupo Sm-2 (n=10). O grupo Sm-

2 apresentou maior número de ovos retidos no fígado em comparação ao grupo coinfestado Sm+Acey ($p < 0,05$), demonstrando que a coinfeção pode ter ativado a resposta imunológica do hospedeiro, fazendo com que menos ovos fossem colocados pelas fêmeas ou que menos ovos fossem retidos no fígado do hospedeiro.

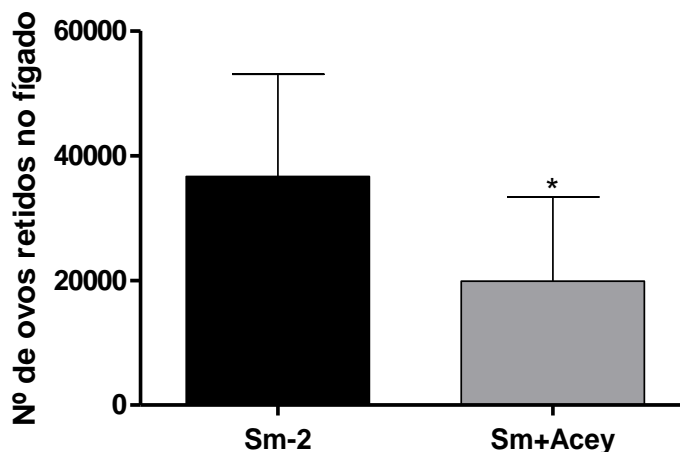


GRÁFICO 26- Número de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado. Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2) (n= 8). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* e posteriormente infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* aos 65 dpi ,Sm+Acey (n=10). Média e Desvio padrão. * = $p < 0,05$.

9.5. Exames hematológicos

9.5.1. Série vermelha

O hemograma realizado aos 90 dpi (gráfico 27) apresentou alteração dos níveis de hemácias, hemoglobina, hematócrito. Houve redução significativa do número de hemácias para os grupos Acey-2 ($p < 0,001$) e Sm+ Acey ($p < 0,05$) em relação ao grupo NI-2. Esta redução também pode ser observada nos níveis de hemoglobina e valores de hematócrito. Não há diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos infectados Acey-2 e Sm+Acey nos parâmetros já mencionados. Também não é observada diferença na comparação entre o grupo Sm-2 e o grupo NI-2. Todos os grupos apresentam valores abaixo do fisiológico.

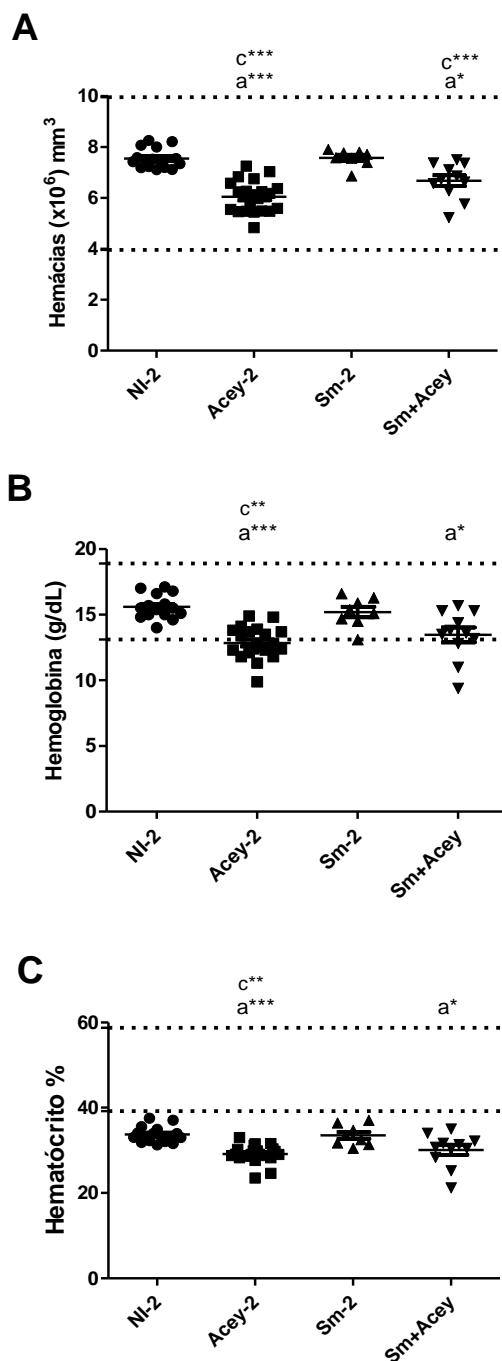


GRÁFICO 27- Hemograma de hamster fêmeas. A: Contagem global de hemácias em milímetros cúbicos; B: Níveis de hemoglobina em grama por decilitro; C: Hematócrito em porcentagem. Não infectado (NI-2)(n= 15); grupo infectado com *A.ceylanicum*, via oral com 50 larvas de terceiro estágio (Acey-2)(n= 21), grupo infectados com 30 cercárias de *Schistosoma mansoni* (Sm-2)(n= 8). Grupo infectado primariamente com *S. mansoni* e após 65 dias foram infectados com *A. ceylanicum*. Coleta de sangue realizada aos 90 dias após primoinfecção (Sm+Acey)(n= 10). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-2, ^c Estatisticamente significativo comparado ao grupo Sm-2. *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001.

9.5.2. Leucograma

Aos 90 dpi (gráfico 28) o leucograma realizado apresentou alteração na contagem de linfócitos com diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos NI-2 e Sm+Acey ($p < 0,01$). Os demais parâmetros avaliados não apresentam alteração com diferença estatisticamente significativa.

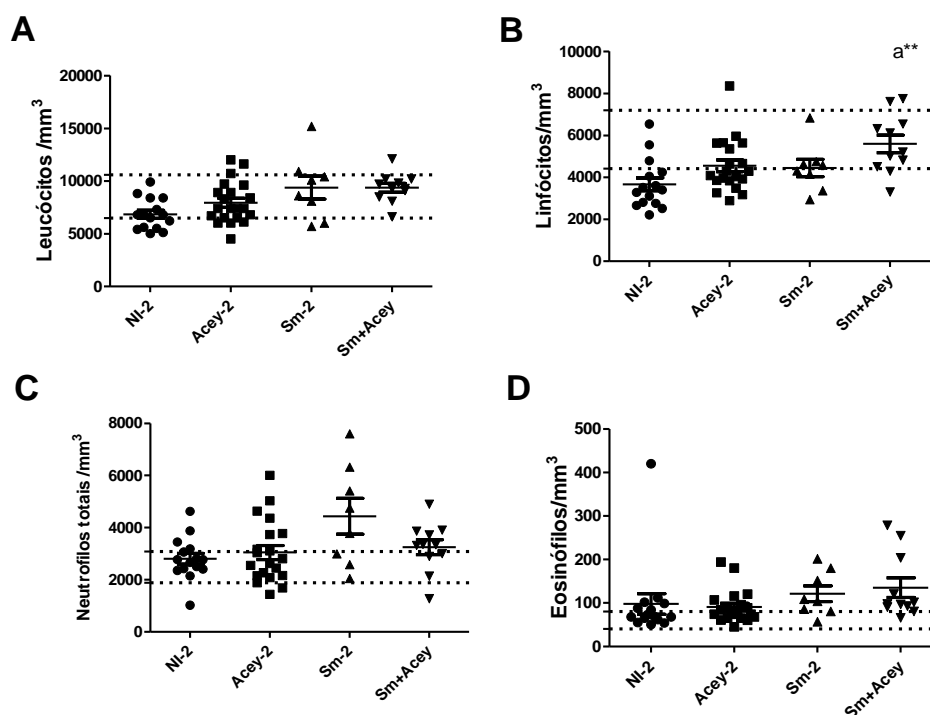


GRÁFICO 28- Hemograma. A: Contagem global de leucócitos ; B: Linfócitos; C: Neutrófilos totais; D: Eosinófilos por milímetro cúbico de sangue de hamsters aos 90 dpi. Não infectado (NI-2) (n= 9); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-2) (n= 6); Infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2) (n=11). Infectado previamente com *S. mansoni* e aos 65 dpi infectado com *A. ceylanicum* (Acey+Sm) (n= 8). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-2. **= $p < 0,01$.

9.6. ELISA

Os plasmas dos hamsters, infectados e Não infectado, obtidos aos 90 dpi foram testados para avaliar os níveis de IgG total frente aos antígenos SEA, SWAP, Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES. Os valores de absorvância obtidos podem ser visualizados no gráfico 29.

O grupo Acey-2 apresentou reação para os antígenos de Extrato bruto e ES de *A. ceylanicum*, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NI ($p < 0,001$) e grupo Sm-2 ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o grupo Acey-2 e Sm+Acey frente aos antígenos Extrato bruto e ES de *A. ceylanicum*. Não houve reação cruzada.

O grupo Sm-2 apresentou reação para os antígenos de SEA e SWAP de *S. mansoni*. Foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NI-2 ($p < 0,01$) e grupo Acey-2 ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o grupo Sm-2 e Sm+Acey frente aos antígenos de SEA e SWAP de *S. mansoni*. Não houve reação cruzada.

O grupo Sm+Acey apresentou reação para todos os antígenos testados. Foi observada diferença estatisticamente significativa somente entre o grupo Sm+Acey e o NI-2 ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos monoinfectados (Acey-2 ou Sm-2) e o grupo coinfectado (Sm+Acey) frente aos antígenos SEA, SWAP, Extrato bruto de *A. ceylanicum* e ES.

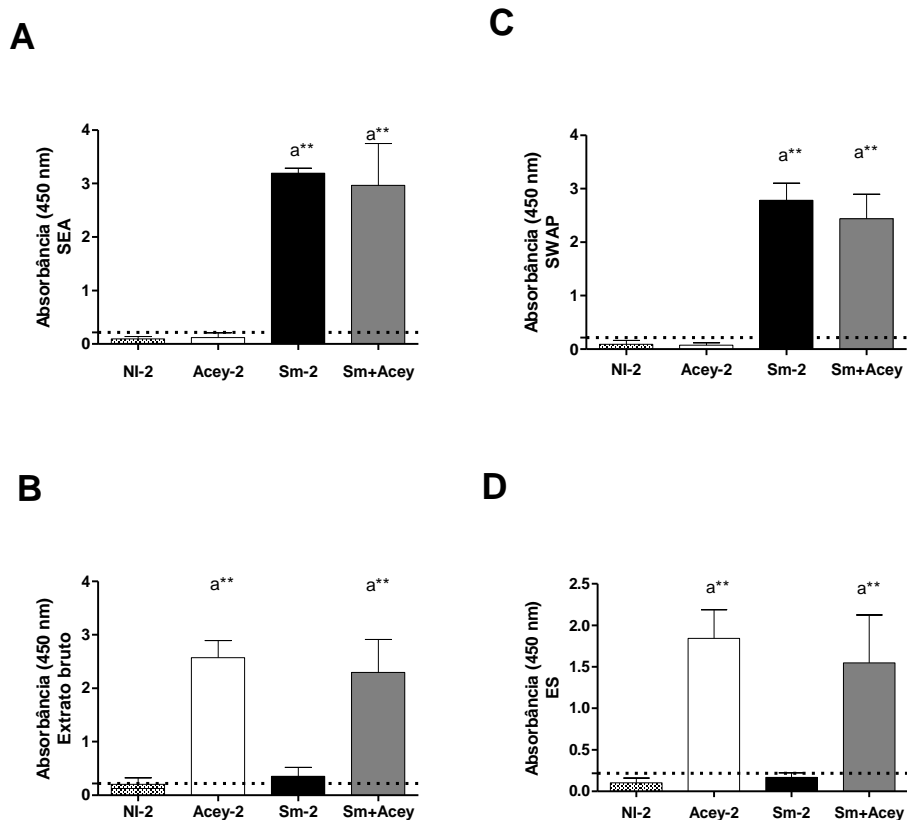


GRÁFICO 29- Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente aos antígenos. A: SEA; B: SWAP; C: Extrato bruto de *A. ceylanicum*; D: ES. Não infectado (NI) (n=6); infectados com *A. ceylanicum*, por via oral 50 L3 (Acey-2) (n= 20); Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* (Sm-2) (n= 7). Infectado com 30 cercárias de *S. mansoni* e posteriormente infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* aos 65 dpi (Sm+Acey) (n= 11). Linha pontilhada: cut-off. Plasma obtido aos 90 dpi. ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-2. *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001.

9.7. Análise histopatológica

Os hamsters do grupo NI-2 apresentaram aspecto histológico normal da mucosa, com estruturas íntegras e razão vilosidade-cripta média de 3:1. As células de Paneth e caliciformes se apresentaram quantitativa e qualitativamente normais. Nas avaliações morfométricas não foram observadas alterações significativas em relação à altura da vilosidade na comparação entre os grupos infectados com o grupo NI-2 ou entre si. Observamos hipertrofia nas criptas de Liberkün significativa somente na comparação entre o grupo coinfectado Sm+Acey (P<0,01) e o grupo NI-2.

Em todos os grupos infectados foram observadas alterações na arquitetura do intestino delgado como perda do epitélio intestinal, redução da altura das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas de Lieberkün. Não foram observadas alterações significativas na comparação entre o grupo Sm+Acey com o grupo NI-2 ou os demais grupos infectados. Todos os grupos infectados apresentaram alteração da razão vilosidade-cripta para 1:1.

O número de granulomas formados no intestino delgado foram semelhantes nos grupos Sm-2 e Sm+Acey. O resultado pode ser observado na tabela 4. A coinfeção não alterou a composição do granuloma, evolução ou tamanho.

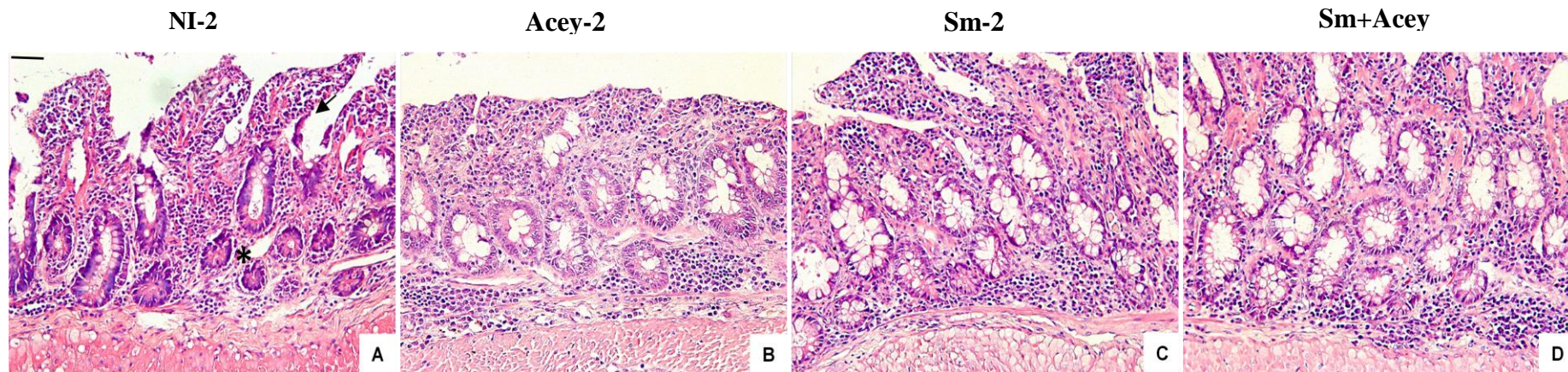


Figura 4: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters. Grupo não infectado (NI-2), infectados com 50 L3 de *Ancylostoma ceylanicum* (Acey-2), infectados com 30 cercárias de *Schistosoma mansoni* (Sm-2), infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* e após 65 dpi coinfectados com 50 L3 de *A. ceylanicum* (Acey+Sm). A: Aspecto histológico normal evidenciando vilosidades (seta) e criptas de Lieberkühn íntegras (asterisco); B, C e D: comprometimento da arquitetura tecidual evidenciando áreas com redução na altura das vilosidades e hipertrofia das criptas de Lieberkühn. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm.

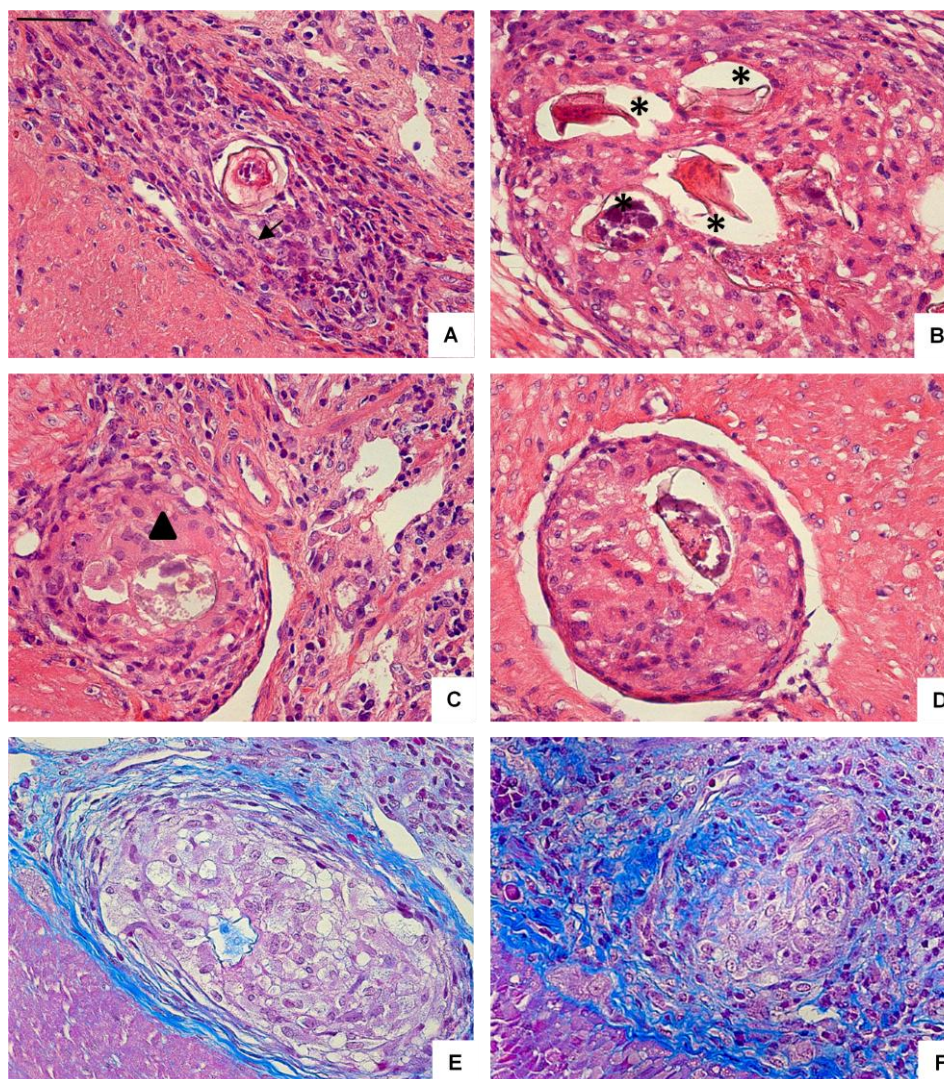


FIGURA 5: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado de hamsters infectados com *Schistosoma mansoni* e *Ancylostoma ceylanicum*, evidenciando granulomas epitelióides em diferentes fases evolutivas: granuloma em fase exsudativa ao redor de ovo de *S. mansoni* embrionado, com presença de células epitelióides (seta) (A); granuloma em fase exsudativa ao redor de ovos de *S. mansoni* em diferentes estádios (B); granulomas em fase produtiva ao redor de ovos necróticos (asterisco) evidenciando células gigantes (seta) (C e D); granulomas em fase de cura por fibrose em processo inicial da periferia para o centro (E) ou mais tardia (F). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm.

Tabela 4: Análise da fase evolutiva do granuloma

Grupo	Granuloma				total
	necrótico- exsudativa	produtiva	produtiva a cura por fibrose	cura por fibrose	
Sm-2	22	26	5	3	56
Sm+Acey	20	29	13	3	65

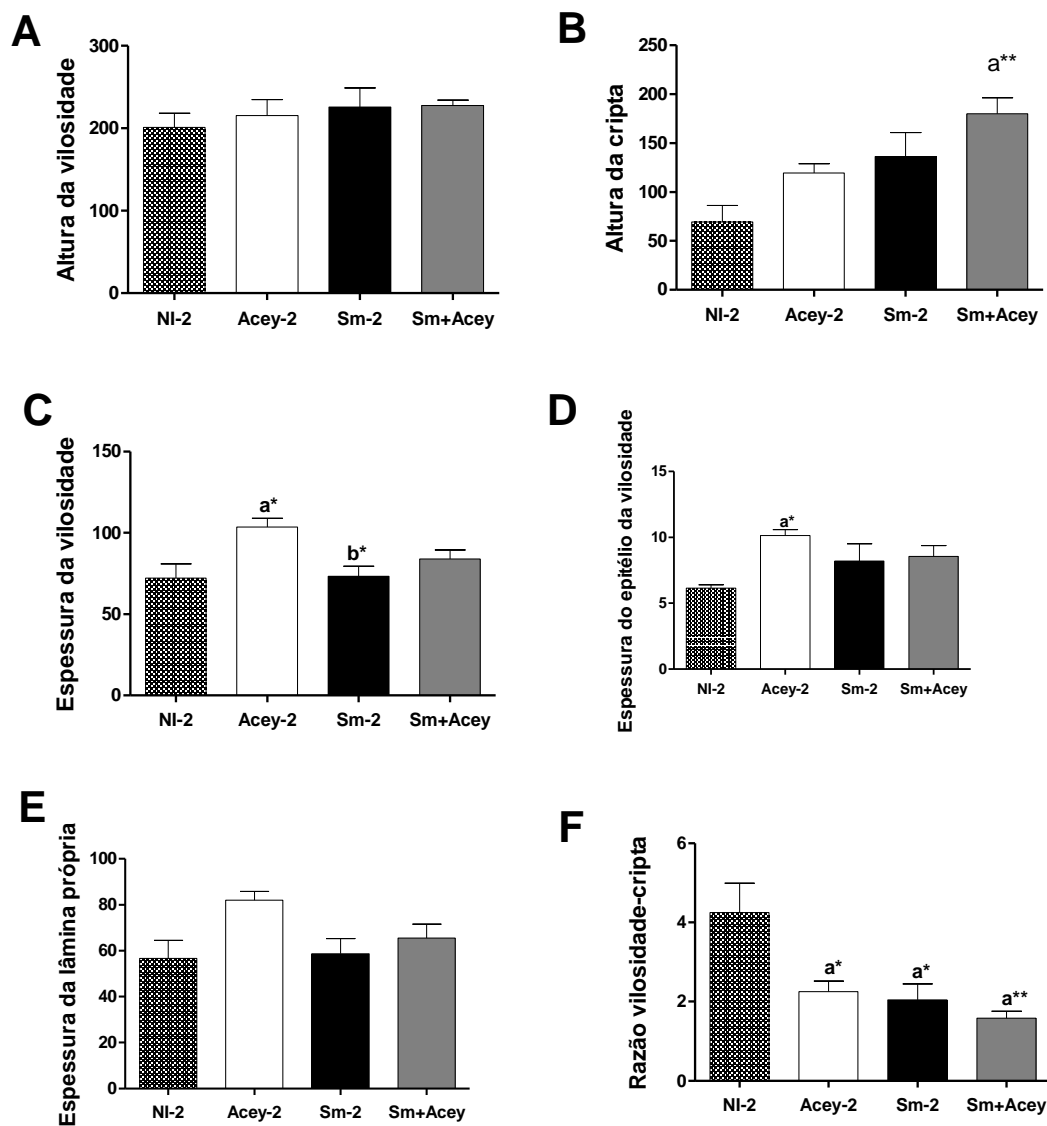


GRÁFICO 30 - Avaliação Morfométrica do intestino delgado de hamsters. A- Altura vilosidade. B- Altura das criptas de Lieberkүн. C- Espessura das vilosidades. D- Espessura do epitélio da vilosidade. E- Espessura da lâmina própria. F- Razão vilosidade:cripta. Valores em micrometros. Não infectado (NI-2); infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum*, via oral (Acey-2); Infectado com 50 L3 de *A. ceylanicum* e infectado aos 20 dpi com 30 cercárias de *S. mansoni*, via subcutânea (Sm+Acey). ^a Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI-2. ^b Estatisticamente significativo comparado ao grupo Acey-2. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Dados mostrados como média+ erro padrão.

10. Discussão

O resultado das interações entre as espécies de parasitas que coinfectam o mesmo hospedeiro determinam o fitness de seu hospedeiro, a gravidade da doença acarretada, a contaminação do ambiente e por último a epidemiologia de cada parasito dentro da população dos hospedeiros. Desta forma a compreensão dos mecanismos que interferem na interação dos parasitos é fundamental para a concepção de programas de controle da doença e tratamentos mais eficazes (Feton *et al* 2014). Trabalhos usando modelos experimentais de coinfeção apontam evidencias de imunidade cruzada, imunossupressão, competição intraespecífica e interespecífica durante as coinfeções (Clark, 2001; Carmo *et al*, 2009; Fenton *et al.* 2014)

Nas infecções por ancilostomídeos são relatados quadros de anemia ferropriva, hipoprotenemia, diarreia e a perda de peso tanto em humanos como no hamster (Bundy *et al.*, 1995; Hotez and Pritchard, 1995; Stoltzfus *et al.*, 1997). Além disso, a hipofagia e a perda de peso são comumente observadas nas infecções gastrointestinais (Sykes, 1987; Worthington *et al.* 2013). Em nosso trabalho observamos que animais infectados com *A. ceylanicum* apresentam diminuição da sua atividade, aumento da prostração e redução da ingestão de ração. Nas análises histopatológicas os animais infectados com *A. ceylanicum* apresentaram redução no tamanho da vilosidade intestinal, o que é compatível com o que já foi descrito na literatura, inclusive do nosso grupo (Alkazmi *et al.*, 2006, 2008; Alkazmi and Behnke, 2013; Dias *et al*, 2013). e também observados em nosso experimento com diferentes cargas parasitárias.

Naturalmente associamos a perda de peso observada à diminuição da ingestão da ração e de sua absorção devido aos danos no intestino delgado já mencionado. Para Worthington e colaboradores (2013) a hipofagia e a perda de peso comum às infecções gastrointestinais têm papel importante na resolução da infecção. Os autores avaliaram a influência da hipofagia e perda de peso em camundongos infectados com *Trichinella spiralis* e deficientes em colecistocinina, receptores de TNF- α , células T e B. Esse nematoda apresenta uma parte do seu desenvolvimento na luz do intestino delgado e posteriormente migra para o músculo esquelético. Nesse modelo os autores puderam estudar os mecanismos que controlam a alimentação do hospedeiro, durante a inflamação intestinal e periférica. Eles observaram que a hipofagia ocorre devido a dois mecanismos imunes distintos. A hipofagia inicial ocorre pelo mediador colecistocinina, sendo induzida por linfócitos T CD4⁺ durante as enterites. O segundo responsável seria a citocina TNF- α que atuaria durante a inflamação extra-intestinal. Após uma cascata de

eventos iniciada pelos linfócitos T CD4⁺ ocorre a hiperplasia das células intestinais com indução da hipofagia que leva a perda de peso e conseqüentemente leva a redução dos níveis de leptina (uma adipocina pró-inflamatória) que por sua vez aumenta a influencia da resposta Th2, elevando a mastocitose, auxiliando na expulsão do parasito. Observamos em nosso trabalho que a cronologia da infecção influenciou os resultados em relação à perda de peso nos grupos coinfectados. Quando o *A. ceylanicum* antecede a infecção por *S. mansoni* os animais do grupo Acey+Sm apresentam a mesma redução de peso observada no grupo Acey-2. No entanto não foram observadas alterações significativas de peso quando a infecção por *A. ceylanicum* é precedida por *S. mansoni*.

O *A. ceylanicum* se prende às vilosidades do intestino delgado através da cápsula bucal e se alimenta de sangue. Indivíduos que apresentam ingestão inadequada de ferro ou que apresentam uma demanda fisiológica maior são os mais afetados pela hematófaga do verme (Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et al.* 2004). A carga parasitária, presença de outros fatores clínicos e reservas de ferro podem determinar a ocorrência ou não de anemia durante a ancilostomose (Stoltzfus *et al.* 1997; Fleming 2000). Estudos sugerem que a anemia causada pela infecção das principais espécies do gênero *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*) pode ocorrer por quatro possíveis mecanismos: deficiência de ferro, retenção de eritrócitos pelo baço, hemólise autoimune e anemia em decorrência da inflamação (Friedman *et al.* 2005). Butler e colaboradores (2012) realizaram um estudo epidemiológico no Kênia com 2750 crianças de nove a doze anos. Os autores concluíram neste estudo que o principal mecanismo causador de anemia na esquistossomose está associado à inflamação desencadeada pela infecção. Foram analisados os níveis de hemoglobina, associados aos níveis séricos de ferritina e o seu receptor na célula. Desta forma puderam ser excluídos os mecanismos ligados a anemias por ingestão ou absorção inadequada de ferro. Para que não ocorresse influencia de outros parasitos no resultado foram também excluídos do estudo todos os participantes coinfectados por *Plasmodium* sp e Ancilostomídeos (Butler *et al* 2012).

Inicialmente levantamos a hipótese de que a presença simultânea de dois vermes hematófagos levaria a uma maior espoliação do hospedeiro, pois ocorreria um sinergismo e conseqüentemente um agravamento no quadro de anemia nos animais dos grupos coinfectados (Acey+Sm e Sm+Acey). Em nossos resultados observamos a redução no número de eritrócitos, níveis séricos de hemoglobina e hematócrito nos grupos Acey-1 e Acey-2 em todos os períodos da infecção analisados com diferença

estatisticamente significativa na comparação com o grupo controle. Somente observamos redução no número de eritrócitos no grupo Sm em relação ao controle aos 75 dpi do experimento 1 (capítulo 2). Holtfreter e colaboradores (2010) determinaram em experimentos *in vitro* que a principal fonte nutricional para os esquistossômulos é a albumina, enquanto os vermes adultos alimentam-se de eritrócitos e suplementam sua nutrição com albumina do hospedeiro. De acordo com Clegg (1965) o verme inicia a ingestão de eritrócitos a partir da segunda semana de infecção. Ao analisar o consumo de hemácias pelos machos e fêmeas de *S. mansoni*, ele observou que o consumo diário dessas células pelas fêmeas é maior que o observado em machos, sendo também mais rápido. Das alterações hematológicas observadas, no presente trabalho, todas estariam relacionadas à hematofagia exercida pelo *A. ceylanicum* uma vez que os valores obtidos foram semelhantes ao grupo Acey. Não foram observados agravamentos do quadro de anemia durante a coinfeção.

Evidências das interações interespecíficas em coinfeções foram apresentadas por Lello e colaboradores (2004). Eles coletaram amostras de coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*). As espécies de helmintos mais frequentes por órgão foram nematodas *Graphidium strigosum* (estômago); *Trichostrongylus retortaeformis* (intestino delgado); *Passalurus ambiguus* (intestino grosso e cólon) cestoda *Mosgovoyia pectinata* (intestino delgado) e *Cittotaenia denticulata* (intestino delgado). Análises destes autores identificaram uma rede de interação entre estes helmintos. Baseado em sua biologia os autores postularam que a interação poderia ser devido a uma ação direta dos parasitos, através de produtos secretados no meio, por manipulação da fisiologia do intestino e/ou por competição ou efeito “crowding”. Enquanto que outras interações estariam provavelmente estariam relacionadas com o sistema imunitário do hospedeiro.

Embora o habitat dos vermes adultos de *A. ceylanicum* seja a luz intestinal e dos vermes adultos *S. mansoni* seja os vasos mesentéricos do sistema porta, observamos interações entre as duas espécies. Observamos também que a cronologia e a ordem das infecções influenciaram nos resultados obtidos. Quando os hamsters foram previamente infectados por *A. ceylanicum* (experimento 1) este não interferiu no estabelecimento da segunda infecção por *S. mansoni* uma vez que a patência da segunda infecção ocorreu simultaneamente com o seu respectivo controle. Durante o acompanhamento da eliminação dos ovos de *A. ceylanicum* observamos oscilações similares nos grupos Acey e Acey+Sm. A média de eliminação de ovos de *S. mansoni* foi maior aos 46 dpi no grupo Acey+Sm (Experimento 1). Como os exames de fezes foram realizados em

pool as análises estatisticamente significativas não puderam ser realizadas, limitando as análises de variação de fertilidade individual das fêmeas.

A recuperação de vermes adultos de *A. ceylanicum* foi similar no grupo Acey-1 e Acey+Sm. Não foram observadas alterações na proporção fêmeas e machos ou interações sinérgicas que prolongariam o período de permanência destes helmintos no intestino delgado. A baixa porcentagem de recuperação estaria associada ao prolongado tempo de infecção, uma vez que os hamsters podem eliminar espontaneamente vermes adultos de *A. ceylanicum* na fase crônica. No experimento para determinar a influência da carga parasitária (efeito “crowding”) observamos que a proporção de machos e fêmeas foi similar, contrariamente aos achados de Roche e Patzted (1966), que observaram que vermes machos são eliminados mais rapidamente em cães. A possível explicação para os nossos achados, seria que a eutanásia ocorreu com apenas 21 dias de infecção, durante a fase aguda. No entanto nos grupos Acey e Acey+Sm acompanhamos os animais por 75 dias (fase crônica) e a proporção fêmea e macho permaneceu similar nos dois grupos avaliados. A eliminação foi proporcional nos dois gêneros avaliados. Diferente do que foi encontrado por Roche e Patzted (1966). Provavelmente os mecanismos que levam a eliminação do verme adulto no hamster sejam diferentes daquele encontrado em cães. Apenas a migração mais rápida do macho não seria o suficiente para explicar as diferenças observadas.

Com relação à recuperação de *S. mansoni* após a coinfeção foi observado uma redução estatisticamente significativa no número de vermes adultos recuperados durante a perfusão do grupo Acey+Sm. Quando *S. mansoni* precedeu o *A. ceylanicum* observamos o mesmo tipo de alteração com redução do número de adultos recuperados da segunda infecção no grupo Sm+Acey. Resultado similar foi encontrado por Yoshida e colaboradores (1999). No modelo de coinfeção utilizado, a infecção prévia por *S. mansoni* levou a redução significativa do número de vermes adultos de *S. venezuelensis* recuperados do intestino delgado. Segundo os autores a ação protetiva da infecção prévia ocorreu pela destruição das larvas em migração de *S. venezuelensis*.

Nas coinfeções envolvendo *S. mansoni* e protozoários os resultados são variados. A infecção prévia por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 e BALB/c não teve efeito sobre *Leishmania major* (Yoshida *et al.*, 1999), enquanto La Flamme e colaboradores (2002) demonstraram que ocorre a exacerbação da leishmaniose na coinfeção com *S. mansoni*. No presente trabalho observamos que a patência ocorreu simultaneamente nos grupos monoinfectados e nos coinfectados.

Em relação à resposta humoral não foram observadas reações cruzadas entre os antígenos de *A. ceylanicum* e *S. mansoni*. Nos grupos infectados com *S. mansoni* todos os hamsters apresentaram IgG contra SWAP, mesmo os animais que não conseguimos recuperar vermes adultos de *S. mansoni*. Acreditamos que a redução da população da segunda infecção ocorreu após os vermes se tornarem adultos, e não na fase de larvas como proposto por Yoshida e colaboradores (1999). Não observamos também uma correlação linear entre a quantidade de ovos retidos no fígado e a produção de IgG anti-SEA nem foi possível correlacionar essa resposta com a eliminação de ovos nas fezes. Entretanto, No grupo Sm+Acey houve menor produção de IgG, podendo indicar que a coinfeção diminuiu a resposta ao *S. mansoni*.

Barros e Coelho (1995) classificaram morfológica o granuloma em três fases de acordo com os tipos celulares observados. O granuloma de primeira fase apresenta histólise focal e fenômenos exudativos da inflamação. O de segunda fase apresenta um estágio produtivo ou reação histiocitária encistante. O estágio de reparação ou de cicatrização e substituição fibrosa do granuloma com formação do nódulo colágeno é a terceira fase no estágio de evolução dos granulomas. Essa classificação considera os tipos celulares. Já a classificação de Raso e Neves (1965) considera a morfologia e o tempo de infecção para definir a fase evolutiva do granuloma.

Avaliamos os granulomas formados no intestino delgado por ser uma região onde as duas espécies apresentariam maior interação. No entanto não observamos qualquer influência da infecção por *A. ceylanicum* sobre a formação, evolução ou desenvolvimento dos granulomas no intestino delgado. Desta forma a coinfeção não atuou como fator protetivo ou de exarcebação considerando como parâmetro o diâmetro do granuloma e sua classificação evolutiva. Na coinfeção entre *H. poligirus* e *S. mansoni*, Bazzone e colaboradores (2008) observaram uma redução significativa da imunopatologia desencadeada pelo ovo no fígado de camundongos CBA. A redução na gravidade da doença foi acompanhada pela redução dos níveis de IL-17, IFN- γ e TNF- α e aumento de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , assim como a expressão de CCL11. Indicando que houve uma modificação da resposta Th1/Th17 para Th2. No entanto os autores não observaram alteração do número de ovos ou fecundidades dos vermes adultos.

Além das coinfeções a dieta também pode influenciar a formação dos granulomas como observados por Alencar e colaboradores (2012). Os autores avaliaram a influencia de uma dieta hiperlipidica sobre a morfologia do intestino e delgado em camundongos infectados com *S. mansoni*. Após seis meses da indução da dieta os

animais foram infectados. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da esquistossomose (9 semanas) e crônica (17 semanas de infecção). Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram granulomas em diferentes estágios, enquanto o grupo controle possuía apenas granulomas na fase exudativa. O número de ovos retidos no fígado e o tamanho do granuloma foram maiores na fase crônica no grupo submetido à dieta hiperlipídica em comparação a fase aguda.

Embora os hamsters sejam excelentes hospedeiros para inúmeros patógenos sua utilização em estudos imunológicos enfrentam sérias restrições. Para estes animais não existe a mesma abundância de kits, imunoglobulinas e citocinas disponíveis comercialmente como observado para outros roedores (camundongos e ratos). Alguns autores, baseados na conservação dos genes entre os mamíferos recorrem ao uso de imunoglobulinas de outras espécies. No entanto, os resultados destes trabalhos devem ser analisados com cautela como demonstrado por Zivcec e colaboradores (2011). Eles testaram kits para ELISA e painéis Luminex® disponíveis comercialmente com o objetivo de sua validação em ensaios imunológicos em hamster dourado (*M. auratus*). Considerando que vários genes são conservados entre as diferentes espécies de roedores, os autores utilizaram anticorpos de camundongos e ratos para testar sua reação cruzada com antígenos de hamsters. O estudo foi expandido usando anticorpos de outros mamíferos como suínos e canídeos. Dos 64 anticorpos testados, apenas 14 apresentaram uma reatividade cruzada limitada, no entanto de baixa confiabilidade. Os autores concluíram que os kits para ELISA utilizando anticorpos heterólogos de outras espécies não seriam confiáveis para o monitoramento de respostas imunes em hamsters

Em nosso laboratório tentamos utilizar a técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para analisar as citocinas dos hamster, uma vez que as sequências já estão disponíveis. No entanto até o presente momento não obtivemos sucesso.

11. Conclusões

1) A coinfeção não alterou o estabelecimento ou patência da infecção. No entanto, a recuperação dos helmintos da segunda infecção é menor.

2) Embora ambos os helmintos sejam hematófagos, utilizando como parâmetros o número de eritrócitos, níveis de hemoglobina e porcentagem do hematócrito, não foi observado agravamento de anemia. Portanto a coinfeção entre *A. ceylanicum* e *S. mansoni* não exarceba o quadro de anemia.

3) O número de granulomas e o seu desenvolvimento também não foram alterados durante a coinfeção.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Referências Bibliográficas

ALBONICO, M.; SMITH, P.G.; ERCOLE, E. Rate of reinfection with intestinal nematodes after treatment of children with mebendazole or albendazole in a highly endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.89, p.538-541, 1995.

ALBONICO, M.; STOLTZFUS, R.J.; SAVIOLI, L.; TIELSCH, J.M.; CHWAYA, H.M.; ERCOLE, E.; CANCRINI, G.; Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* or *Necator americanus*, on iron status of children. *Int. J. Epidemiol.* v. 27, p. 530-570,1998.

ALENCAR AC, NEVES RH, DE OLIVEIRA AV, MACHADO-SILVA JR. BAUMGART, M.; TOMPKINS, F.; LENG, J.; HESSE, M.; Naturally occurring CD4+Foxp3+regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol*; v. 176, p. 5374–5387, 2006.

ALENCAR, A.C.; NEVES R.H.; DE OLIVEIRA, A.V.; MACHADO-SILVA, J.R.. Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice fed a high-fat diet. *Parasitology.* v.139, n. 6, p. 716-725, 2012.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M.; The effect of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* on the mucosal architecture of the small intestine in hamsters. *J Helminthol* v. 80, p. 397- 407, 2006.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M. The mucosal cellular response to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. *J Helminthol* v. 82, p. 33-44, 2008.

ALKAZMI, L.M.; BEHNKE, J.M.; The mucosal response of hamsters exposed to weekly repeated infections with the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *J Helminthol* v. 87, p. 309-317, 2013.

ANDRADE, Z.A.; WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.58, p. 53-57, 1964.

ANDREASSEN J, BENNET-JENKINS EM, BRYANT C. Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology* v. 42, p. 223–275, 1999.

ANDREASSEN, J., BENNET-JENKINS, E.M.; BRYANT, C. Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology* , v. 42, p. 223–275 ,1999.

ARAUJO, M. I.; BLISS, S. K.; SUZUKI, Y.; ALCARAZ, A.; DENKERS, E. Y.; PEARCE E. J. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* V. 69, n. 3, p. 1454-62, 2001.

BARÇANTE JM, BARÇANTE TA, DIAS SR, VIEIRA LQ, LIMA WS, NEGRÃO-CORRÊA D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res.* Jan; v. 89, n. 2, p.89-93, 2003.

BAZZONE, L.E.; SMITH, P.M.; RUTITZKY, L.I.; SHAINHEIT, M.G.; URBAN J.F.; SETIAWAN, T.; BLUM AM, WEINSTOCK JV, STADECKER, M.J. infection with the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* markedly reduces hepatic egg-induced immunopathology and proinflammatory cytokines in mouse model of severe schistosomiasis *Infect Immun.* ;76(11):5164-72, 2008

BEASLEY, M.; BROOKER, S.; NDINAROMTAN, M.; MADJIOUROUM, E. M.; BABOGUEL, M.; DJENGUINABE, E.; BUNDY, D. A. First nationwide survey of the health of schoolchildren in Chad. *Trop Med Int Health*, v. 7, p. 625-630, 2002.

BETHONY, J.; CHEN, J.; LIN, S. Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, people's Republic of China. *Clin. Infec. Dis*, v.35, p.1336-1344, 2002.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 93 Suppl 1, p.95-101, 1998.

BHOPALE, M.K.; MENON, S.; KULKARNI, L. *Necator americanus* in infant rabbits: complete development, humoral antibody, leukocyte response and serum protein changes following infection. *J Helminthol.* v. 54, n. 2, p.97-104, 1980.

BLACKWELL AD , MARTIN M, KAPLAN H, GURVEN M. Antagonism between two intestinal parasites in humans: the importance of co-infection for infection risk and recovery dynamics.

BOOTH, M.; VENNERVALD, B. J.; BUTTERWORTH, A. E.; KARIUKI, H. C.; AMAGANGA, C.; KIMANI, G.; MWATHA, J. K.; OTEDO, A.; OUMA, J. H.; DUNNE, D. W.. Exposure to malaria affects the regression of hepatosplenomegaly after treatment for *Schistosoma mansoni* infection in Kenyan children. *BMC Med*, v.2, p.36, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAILSFORD, T.J.; BEHNKE, J.M.; The dynamics of trickle infections with *Ancylostoma ceylanicum* in inbred hamsters. *Parasitology* 1992; **105**: 247–253

BRITO, L. L.; BARRETO, M. L.; SILVA, R. D. E. C.; ASSIS, A. M.; REIS, M. G.; PARRAGA, I. M.; BLANTON, R. E. Moderate- and low-intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, n. 5, p. 939-944, Nov 2006.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C. Spatial heterogeneity of parasite co-infection: Determinants and geostatistical prediction at regional scales. *Int J Parasitol*, v. 39, n. 5, p. 591-597, 2009.

BUNDY DA, CHAN MS, SAVIOLI L (1995) Hookworm infection in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:521-522

BUNGIRO RD JR, GREENE J, KRUGLOV E, CAPPELLO M. Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. *J Infect Dis* 183:1380–1387, 2001

BUNGIRO, R.D.; SUN, T.; HARRISON, L.M.; SHOEMAKER, C.B.; CAPPELLO, M. Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. *Parasite Immunol* v. 30, p. 293–303, 2008.

BUSH, A.O.; LOTZ, J. M. The ecology of “crowding”. *J Parasitol*, V. 86, p.212–213, 2000

BUTLER SE, MUOK EM, MONTGOMERY SP, ODHIAMBO K, MWINZI PM, SECOR WE, KARANJA DM. Mechanism of anemia in *Schistosoma mansoni*-infected school children in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* v.87, n. 5, p. 862-867, 2012.

CAPRON, A.; RIVEAU, G. J.; BARTLEY, P. B.; MCMANUS, D. P. Prospects for a schistosome vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, v. 2, p. 281-290, 2002.

CARNEIRO-SANTOS, P.; MARTINS-FILHO, O; ALVES-OLIVEIRA, L.; SILVEIRA, A. M. S.; COURA-FILHO, P.; VIANA, I. R. C.; WILSON, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol.*, v. 22, p. 267-277, 2000.

CARMO AM, VICENTINI MA, DIAS AT, ALVES LL, ALVES CC, BRANDI JS, DE PAULA ML, FERNANDES A, BARSANTE MM, SOUZA MA, TEIXEIRA HC, NEGRÃO-CORRÊA D, FERREIRA AP. Increased susceptibility to *Strongyloides venezuelensis* in mice due to *Mycobacterium bovis* co-infection which modulates production of Th2 cytokines. *Parasitology*. Sep;136(11):1357-65, 2009

CHANDLER, A.C The effects of number and age of worms on development of primary and secondary infections with *Hymenolepis diminuta* in rats, and an investigation into the true nature of “premonition” in tapeworm infections. *Amer. J. Hyg.* V. 29, p. 121-130.

CHITSULO, L; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

CHRISTENSEN, N.O.; NANSEN, P.; FAGBEMI, B.O.; MONRAD, J. Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitol Res.* n. 73, v.5, p. 387-410, 1987.

CLEGG, J. A. In vitro cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasit* 16:133-147. 1965.

COOPER, P.J.; CHICO, M. E.; LOSONSKY, G.; SANDOVAL, C.; ESPINEL, I.; SRIDHARA, R.; AGUILAR, M.; GUEVARA, A.; GUDERIAN, R. H.; LEVINE, M. M.; GRIFFIN, G. E.; NUTMAN, T. B. Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis*, v. 182, n. 4, p. 1199-1206, Oct 2000.

Cox FEG . Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122:S23–S38. 2001.

CURRY, A. J.; ELSE, K. J.; JONES, F.; BANCROFT, A.; GRENCIS, R. K.; DUNNE, D. W. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. *J. Exp. Med*, v. 181, p. 769-774, fev. 1995.

Davey D, Manickam N, Simms BT, Harrison LM, Vermeire JJ, Cappello M (2013) Frequency and intensity of exposure mediate resistance to experimental infection with the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *Exp Parasitol* 133:243-249

DIAS SR, DA COSTA AF, GAZZINELLI-GUIMARÃES PH, ROATT BM, DA SILVA FONSECA K, DE PAIVA NC, GIUNCHETTI RC, CARNEIRO CM, FUJIWARA RT, RABELO ÉM. Prednisolone and cyclosporine A: effects on an experimental model of ancylostomiasis. *Exp Parasitol*. V. 133, n. 1, p. 80-88, 2013.

DOENHOFF, M. J.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 4, p.199-210, 2006.

DONDJI B, BUNGIRO RD, HARRISON LM, VERMEIRE JJ, BIFULCO C, MCMAHON-PRATT D, CAPPELLO M Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. *Infect Immun* 76:2560–2567. 2008.

DE SILVA NR, BROOKER S, HOTEZ PJ, MONTRESOR A, ENGELS D, SAVIOLI L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* v. 19, p. 547–551, 2003.

DIAS, SR; DA COSTA, AF; GAZZINELLI-GUIMARÃES PH, ROATT BM, DA SILVA FONSECA K, DE PAIVA NC, GIUNCHETTI RC, CARNEIRO CM, FUJIWARA RT, RABELO ÉM. Prednisolone and cyclosporine A: effects on an experimental model of ancylostomiasis. *Exp Parasitol*. V.133, n1, p.80-88. 2013.

DIAS SR, CUNHA DE, DA SILVA SM, DOS SANTOS HA, FUJIWARA RT, RABELO EM. Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed dogs. *Parasitol Res*. v. 112, n. 6, p. 2151-217, 2013.

EKKENS, M. J.; SHEDLOCK, D. J.; JUNG, E.; TROY, A.; PEARCE, E. L.; SHEN, H.; PEARCE, E. J. Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses. *Infect Immun*, v. 75, n. 5, p. 2291-2296, 2007.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L.. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*, v. 82, p. 139-146, 2002.

FALCÃO, P. L.; MALAQUIAS, L. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVEIRA, A. M.; PASSOS, V. M.; PRATA, A.; GAZZINELLI, G.; COFFMANN, R. L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulate the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol*, v. 20, p. 447-454, 1998.

FENTON A, KNOWLES SCL, PECHEY OL, PEDERSEN AB. The reliability of observational approaches for detectin interspecific parasite interactions: comparison with experimental results. *Int J Parasitol* 44:437–445, 2014.

FIDEL JR, P.L.; BOROS, D.L. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. IV. Antigen-induced suppressor T cells down-regulate proliferation and IL-2 production. *J. Immunol*, v.145, n. 4, p. 1257-1264, 1990.

FLEMING, A. F. Iron deficiency. In: Strickland GT, editor. *Hunter's Tropical Medicine*. 8th edn. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 32–60.

FLORES-VILLANUEVA, P.O.; CHIKANGO S.M.; HARRIS, T.S.; STADECKER, M.J. IL-10 inhibits macrophage co-stimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Immunology*, v. 151, p.1224-1243, 1993.

FRIEDMAN S. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* 1997;32:424–30.

GANDHI, N.S.; JIZHANG, C.; KHOSHNOOD, K.; FUYING, X.; SHANWEN, L.; YAORUO, L.; BIN, Z.; HAECHOU, X.; CHONGJIN, T.; YAN, W.; WENSEN, W.; DUNGXING, H.; CHONG, C.; SHUHUA, X.; HAWDON, J.M.; HOTEZ, P.J. Epidemiology of *Necator americanus* hookworm infections in Xiulongkan Village, Hainan Province, China: high prevalence and intensity among middle-aged and elderly residents. *J. Parasitol*, v. 4, n.87, p.739-743, 2001.

GARSIDE P, BEHNKE, J. M.; ROSE RA. Acquired immunity to *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters. *Parasite Immunol*; 12: 247–258. 1990

GARSIDE, P.; BEHNKE, J. M.; *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: bservations on the host-parasite relationship during primary infection. *Parasitology* v. 98, p.283-289. 1989.

GOATER, C.P. Experimental population dynamics of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) in toads (*Bufo bufo*): density-dependence in the primary infection. *Parasitology* 104 Pt 1:179-187, 1992.

GOES, A. M.; ROCHA, R. S.; GAZZINELLI, G.; DOUGHTY, B. L. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* . v. 11, n. 6, p. 695-711, 1989.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for courting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council of Science and Industry Research in Australia*, v.12, p.50-52, 1939.

GOYAL, P.K.; JOHRI, G.N.. Experimental infection of *Ancylostoma caninum* in chickens: immunization through transfer of sensitized bursal cells. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*;v. 30, n.4, p.425-429, 1986.

GRAHAM, A. L. When T-helper cells don't help: immunopathology during concomitant infection. *Q Rev Biol*, v. 77, n. 4, p. 409-434, 2002.

GRAHAM, A. L. Ecological rules governing helminth-microparasite coinfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 2, p. 566-570, 2008.

GRAY D. J, DONALD P MCMANUS, YUESHENG LI, GAIL M WILLIAMS, ROBERT BERGQUIST, ALLEN G ROSS Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future, *Lancet Infect Dis*. v. 10, n. 10, p.733-736.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, v.368, p.1106-1118, 2006.

GULLAND., F.M. The role of nematode parasites in Soay sheep (*Ovis aries* L.) mortality during a population crash. *Parasitology* v. 105, p. 493-503, 1992.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T.L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, v. 6, p. 1123–1132, 2005.

HOLMES, J.C. Effects of concurrent infections on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). I. General effects and comparison with “crowding”. *Journal of Parasitology* v. 47, p. 209–216, 1961.

HOLTFRETER, M.C.; LOEBERMANN, M.; FREI, E., RIEBOLD, D., WOLFF, D.;HARTUNG G.; KINZELBACH R.; REISINGER E.C. Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin in vitro and in vivo: implication for a drug-targeting model. *Parasitology*. Sep; v. 137, n. 11, p. 1645-1652, 2010.

HOLMES, J.C. Effects of concurrent infections on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). I. General effects and comparison with “crowding”. *J Parasitol* v. 47, p.209–216, 1961.

HOTEZ, P.; RAFF, S.; FENWICK, A.; RICHARDS, F.; JR.; MOLYNEUX, D. H. Recent progress in integrated neglected tropical disease control. *Trends Parasitol*, v. 23, p. 511-514, 2007.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M. E.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; LOUKAS, A.. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol*, v. 22, p. 327-331, 2006a.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M.; OLIVEIRA, S. C.; BRINDLEY, P. J.; LOUKAS, A.. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. *Expert Rev Vaccines*, v.7, p. 745-752, 2008 a.

HOOPER LV, GORDON JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut *Science* v. 292, p. 1115–1118, 2001.

HOOPER, L.V.; LITTMAN, D.R.; MACPHERSON, A.J.; Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* v. 336, p. 1268–1273, 2012.

HOTEZ, P.J.; BROOKER, S.; BETHONY, J.M.; BOTTAZZI, M.E.; LOUKAS, A.; XIAO, S. Hookworm Infection. *N Engl J Med* v. 351, p. 799–807, 2004.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M.E.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; LOUKAS, A. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol* v. 22, p. 327-331, 2006.

HOTEZ, P. J.; BRINDLEY, P. J.; BETHONY, J. M.; KING, C. H.; PEARCE, E. J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*, v.118, p. 1311-1321, 2008 b.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; EHRlich SACHS, S.; SACHS, J. D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med*, v.3, p.102, 2006b.

HOTEZ, P. J.; PRITCHARD, D.I. Hookworm infection. *Sci Am* v. 272, p. 68-74, 1995.

HUMASON, G. L. Animal tissue techniques. (1972) San Francisco: W.H. Freeman. 641p

JANKOVIC, D.; CHEEVER, A. W.; KULLBERG, M. C.; WYNN, T. A.; YAP, G.; CASPAR, P.; LEWIS, F. A.; CLYNES, R.; RAVETHC, J. V.; SHER, A. CD4+ T cell-mediated Granulomatous pathology in Schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *J. Exp. Med*, v. 187, n. 4, p. 619-629, 1998.

KALINKOVICH, A.; WEISMAN, Z.; GREENBERG, Z.; NAHMIAS, J.; EITAN, S.; STEIN, M.; BENTWICH, Z. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin. Exp. Immunol.*, v.3, n.114, p.414-21, 1998.

KATZ, N. Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 32, p. 705-711, 1999.

KENNEDY, C. R. Interspecific interactions between larval digeneans in the eyes of perch, *Perca fluviatilis* *Parasitology* v. 122 , Supplement S1, p S13 S22. 2001.

LA FLAMME AC, SCOTT P, PEARCE EJ. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol.* 2002 Jul; v. 24, n. 7, p. 339-345.

LAMB, T. J.; GRAHAM, A.L.; LE GOFF, L.; ALLEN, J. E. Co-infected C57BL/6 mice mount appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Leishmania sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. *Parasite Immunol*, v. 27, n. 9, p. 317-24, Sep 2005.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. *Clin. Microbiol. Rev.* v.4, n.14, p.689-703, 2001.

LOUKAS, A.; CONSTANT, S.L.; BETHONY, J.M. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v. 43, p. 115–124. 2005.

LOUKAS, A.; BETHONY, J.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* v.11, n.6, p.733-741, 2006.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, v. 441, p. 231–234, 2006.

MARCOGLIESE, D.J. Fecundity of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infecting grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada: lack of density-dependent effects. *Int J Parasitol* v. 27, p. 1401-1409, 1997.

MARSHALL, A. J.; BRUNET, L. R.; VAN GESSEL, Y.; ALCARAZ, A.; BLISS, S. K.; PEARCE, E. J.; DENKERS, E. *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF- α and early death in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* v. 163, p. 2089-2097, 1999.

MCKEE, A.S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol*, v. 173, p.1224–1231, 2004.

MICHAEL, E.; BUNDY, D.A. Density dependence in establishment, growth and worm fecundity in intestinal helminthiasis: the population biology of *Trichuris muris* (Nematoda) infection in CBA/Ca mice. *Parasitology* v. 98, p.451-458, 1989.

MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and humans. (1981) New York: Masson Publishing 413 p.

NOROZIAN-AMIRI, S.M.B.; BEHNKE, J. M. Density-dependent effects on establishment of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum*. *J Helminthol* v.67, p. 151-157. 1993.

NOOKALA, S.; SRINIVASAN, S.; KALIRAJ, P.; NARAYANAN, R. B.; NUTMAN, T. B. Impairment of tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human lymphatic filariasis. *Infect Immun.*, v. 72, n.5, p. 2598-2604, 2004.

ONYEMELUKWE, C.G.; MUSA, B.O. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *Afr.J.Med.Med.Sci*, v. 30, p.255-259, 2001.

PACANARO, C.P.; DIAS, S.R.; SERAFIM, L.R.; COSTA, M.P.; AGUILAR, E.; PAES, P.R.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; RABELO, E.M. Evaluation of biochemical, hematological and parasitological parameters of protein-deficient hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. *PLoS Negl Trop Dis.* 25;8(9):e3184. 2014

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O.; CHANG, S. H.; NURIEVA, R.; WANG, Y. H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p.1133-1141, Nov 2005

PATERSON, S. VINEY, M.E. Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. *Parasitology* 125, 283–292, 2002.

PANSKY, B.; JACOBS, M.; HOUSE, E. L.; TASSONI, J. P. The orbital region as a source of blood samples in the golden hamster. *Anatomical Record* v. 139, p. 409-412. 1961.

PATERSON, S.; VINEY, M.E. Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. *Parasitology* 125: 283–292, 2002.

PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses a parasite helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med*, v. 173, p.159-166, 1991.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para coleta de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Doenças Trop*, v. 8, p. 589-597, 1956.

PETERS, P. A.; WARREN, K. A rapid method of infecting mice and other laboratory animals with *Schistosoma mansoni*: subcutaneous injection. *J Parasitol* p. 55:558, 1969

PETNEY, T. N.; ANDREWS, R.H. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol*, v. 28, p.377–393, 1998.

PIT, D.S.; POLDERMAN, A.M.; BAETA, S.; SCHULZ-KEY, H.; SOBOLSLAY, P.T. Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. *Paras. Res*, v.87, p.722-729, 2001.

PRITCHARD, D.I.; HOOI, D.S.; BROWN, A.; BOCKARIE, M.J.; CADDICK, R.; QUINNELL, R. J. Basophil competence during hookworm (*Necator americanus*) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, n.77. v.5, p.860-865, 2007.

PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. *Lancet*, v.335, p.1299-1302, 1990.

PULLAN, R. L.; BETHONY, J. M.; GEIGER, S. M.; CUNDILL, B.; CORREIA-OLIVEIRA, R. QUINNELL, R. Q.; BROOKER, S. Human helminth co-infection: analysis of spatial patterns and risk factor in Brazilian community. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 2, n.12, p. 352, 2008.

PULLAN, R. L.; BETHONY, J. M.; GEIGER, S. M.; CUNDILL, B.; CORREIA-OLIVEIRA, R.; BROOKER, QUINNELL, R. Q. Human helminth co-infection: no evidence of common genetic control of hookworm and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian community. *Int J Parasitol*, v. 40, n. 3, p. 299-306, Mar 2010.

QUINNELL, R.J.; STATER, A.F.; TIGHE, P.; WALSH, E.A.; KEYMER, A.E.; PRITCHARD, D.I. Reinfection with hookworm after chemotherapy in Papua New Guinea. *Parasitology*, v.106, p.379-385, 1993.

RASO, P.; NEVES, J. Contribuição Ao Conhecimento Do Quadro Anatômico Do Fígado Na Forma Toxêmica Da Esquistossomose Mansoni Através De Punções Biópsias. *Anais. Fac. Med. Univ. Fed. Minas Gerais*, 22: 147, 1965.

RASO, P. RASO, L. A.; MELO FDE A, TAFURI WL. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 45, n. 5, p. 627-632, 2012.

READ, C. P. The ““crowding” effect” in tapeworm infections. *Journal of Parasitology* n. 37, p. 174–178, 1951.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department.*; v.8, p.326. 1948

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, v.1, p.99-102, 1950.

ROBERTS, L.S.; INSLER, G.D. Developmental physiology of cestodes. XVII. Some biological properties of putative ““crowding” factors” in *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* v. 68, p. 263–269.1982.

ROBERTS, L. S. The “crowding” effect revisited. *J Parasitol* v. 86, n. 2, p. 209-211, 2000.

ROCHE M, LAYRISSE M. The nature and causes of “hookworm anemia”. *Am J Trop Med Hyg*, v.15, p.1029–1102. 1966.

ROCHE M, PATRZED D. The female to male ratio (FMR) in hookworm.

J Parasitol 52:117–121, 1966.

RUMBLEY, C. A.; ZEKAVAT, S.A.; SUGAYA, H.; PERRIN, J.P.; RAMADAN, M. A.; PHILLIPS, S. M. J. The *Schistosoma* Granuloma: characterization of Lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *J. Immunol*, v. 161, p. 4129-4137, 1998.

SAKAGUCHI S, ONO M, SETOGUCHI R, YAGI H, HORI S, FEHERVARI Z, SHIMIZU J, TAKAHASHI T, NOMURA T. Foxp3CD25CD4 natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, v. 212, p. 8–27. 2006

SCHRAMM, G.; HAAS, H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes and Infection* v. 12, p. 881-888, 2010.

SINGH, K. P.; GERARD, H. C.; HUDSON, A.P.; REDDY, T. R.; BOROS, D. L. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*, v. 114, p. 410–417, 2005.

SOLOMON, J. S.; NIXON, C. P.; MCGARVEY, S. T.; ACOSTA, L. P.; MANALO, D.; KURTIS, J. D. Expression, purification, and human antibody response to a 67 kDa vaccine candidate for schistosomiasis japonica. *Protein Expr Purif*, v. 36, p. 226-231, 2004.

SOULSBY, E. J. L. **Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Volume I Helminths.** Oxford, Blackwell, 1965.

SOWEMIMO OA, ASAOLU SO. Epidemiology of intestinal helminth parasites of dogs in Ibadan, Nigeria. *J Helminthol* 82:89–93. 2008

SPECHT, S.; HOERAUF, A. Does helminth elimination promote or prevent malaria? *Lancet*, v. 369, n. 9560, p.446-447, 2007 .

STADECKER, M.J. The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. *Parasitol Today*, v. 8, p. 199-204, 1992.

STEAR MJ, BISHOP SC, DOLIGALSKA M, DUNCAN JL, HOLMES PH, IRVINE J, MCCRIRIE L, MCKELLAR QA, SINSKI E, MURRAY M. Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 17:643–652, 1995.

STEARMJ, PARK M, BISHOP SC The key components of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Parasitol Today* , v.12, n. 11, p. 438–441, 1996.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*, v.6, p. 411-425, 2006.

STOLTZFUS, R.J.; DREYFUSS, M.L.; CHWAYA, H.M.; ALBONICO, M. Hookworm control as a strategy to prevent iron deficiency. *Nutr Rev.* v. 55, n. 6, p. 223-232. 1997.

SYKES AR. Endoparasites and herbivore nutrition. In: Hacker JB, Thernouth JH(eds) Nutrition of herbivores. Academic, Australia, pp 211–233. 1987

TAYLOR, J. J.; MOHRS, M.; PEARCE, E. J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J. Immunol.* v. 176, p. 5839–5847, 2006.

TOMPKINS DM, HUDSON PJ. Regulation of nematode fecundity in the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): not just density dependence. *Parasitology* 118:417–423. 1999.

VALADARES, T.E.; COELHO, P. M.; PELLEGRINO, J.; SAMPAIO, I. B. - *Schistosoma mansoni*: comparação da oviposição entre as cepas LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Liberia) em camundongos. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 23, p. 1-5, 1981.

VAN DER WERF, M. J.; DE VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* v. 86, p. 125-139, 2003.

WEBSTER, M.; CORREA, O. R.; GAZZINELLI, G.; VIANA, I. R. C.; FRAGA, L. A. D. O.; SILVEIRA, A. M. S.; DUNNE, D. W. Factors affecting high and low human IgE responses to schistosome worm antigens in an area of Brazil endemic for *Schistosoma mansoni* and hookworm. *Am J Trop Med Hyg.* v. 57, p. 487–494, 1997.

WEINSTOCK, J.V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: Interactions between the *Schistosoma* ova and the host. *Immunol Invest.* v. 2, p.455-475, 1992.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, Suppl 1, p. 13-20, 2006.

WU, J. F.; HOLMES, E.; XUE, J.; XIAO, S.H.; SINGER, B. H.; TANG, H. R.; UTZINGER, J.; WANG, Y. L. Metabolic alterations in the hamster co-infected with *Schistosoma japonicum* and *Necator americanus*. *Int J Parasitol* . [Epub ahead of print] Nov 2009.

YAZIMA F, MACHIDA K. On the ecological relations of parasite state of *Ancylostoma caninum*, especially on the density effect of population. *Jpn J Parasitol* 7:631–640. 1958.

YOSHIDA, A.; MARUYAMA, H.; YABU, Y.; AMANO, T.; KOBAYAKAWA, T.; OHTA, N. Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Int.*v. 48, p. 73-79, 1999.

WHO, 2012. Hookworm Disease: Disease Burden. In: Research, I.f.V., (Ed.), Parasitic


Diseases, pp. prevalence stats for hookworm worldwide.

WORTHINGTON, J. J.; SAMUELSON, L. C; GRENCIS, R. K.;MCLAUGHLIN, J.T.Adaptive immunity alters distinct host feeding pathways during nematode induced inflammation, a novel mechanism in parasite expulsion. *PLoS Pathog.* v. 9, n. 1, 2013.

ZIVCEC, M.; SAFRONETZ, D.; HADDOCK, E.; FELDMANN, H.; EBIHARA H.Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Immunol Methods* v. 368 p. 24–35, 2011.

13. ANEXOS

13. ANEXOS

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p style="text-align: center;">CEUA</p> <p style="text-align: center;">COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Senhor(a) Professor(a) ÉLIDA MARA LEITE RABELO,</p>	
<p>Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação dos efeitos da superpopulação de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>), submetido a esta comissão pelo protocolo 73 / 2012, a CEUA decidiu aprovar a sua solicitação.</p>	
<p>Justificativa: Aprovado na reunião do dia 25/04/2012.</p>	
<p>Para acessar ao seu projeto clique no link: http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ Belo Horizonte, 26/04/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 52/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação dos efeitos da coinfeção por *Ancylostoma Ceylanicum* e *Schistosoma Mansoni* usando o Hamsters (*Mesocricetus Auratus*) como modelo experimental**", que tem como responsável(is) **Elida Mara Leite Rabelo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 06/2011**.

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

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 52/2011**, related to the project entitled "**Evaluation of the coinfection effects by *Ancylostoma Ceylanicum* and *Schistosoma Mansoni* in hamsters (*Mesocricetus Auratus*)**", under the supervisors of **Elida Mara Leite Rabelo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 22, 2011**.

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

Belo Horizonte, 27 de Junho de 2011.


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

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