

Vanessa Fernandes Rodrigues

Efeito da infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis* na evolução da colite experimentalmente induzida pela ingestão de Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos BALB/c.

Belo Horizonte, MG - Brasil

Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

2015

Vanessa Fernandes Rodrigues

**Efeito da infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis*
na evolução da colite experimentalmente induzida pela
ingestão de Sulfato de Sódio Dextrano em camundongos
BALB/c.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como pré-requisito para obtenção de grau de
Mestre em Parasitologia.**

**Área de Concentração:
Imunoparasitologia**

Orientação: Prof^a Dr^a Deborah A. Negrão-Corrêa

Belo Horizonte, MG - Brasil

2015

LABORATÓRIO ENVOLVIDO

Imunologia de Helmintos – ICB/UFMG – Prof^a. Dra. Deborah Ap. Negrão-Corrêa

APOIO FINANCEIRO

Programa de Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

*Dedico esse trabalho a Celso
Fernandes Rodrigues e Lázara das Graças
M.S. Rodrigues, pais exemplares que
sempre me apoiaram.*

AGRADECIMENTOS

“Deus, eu te agradeço de todo o coração, proclamando todas as tuas maravilhas”. Sl 9,2

Aos meus amados pais Celso e Lázara, por terem sonhado comigo e permitido que eu viesse ao mundo. Por sempre incentivarem os meus sonhos, não me deixando desistir, estando ao meu lado em todos os momentos.

Às minhas amadas irmãs, Amanda e Alexandra, por todo carinho, apoio, força, auxílio em todas as minhas caminhadas. Pela oportunidade de ser tia dos sobrinhos mais lindos: Karen e Matheus.

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

À minha orientadora Deborah Negrão-Corrêa, exemplo de ética, pela orientação e por tornar esse trabalho possível. Agradeço ainda, por todo incentivo, por acreditar em meu trabalho e me indicar os pontos positivos.

Aos meus grandes amigos de laboratório: Vinícius, Laura, Jailza, Emília, Cíntia, Michelle, João, Paula, Izabella, Fernanda, Maria Fernandina, Raquel, Ana Terezinha (*in memoriam*), Fernando, Núbia, Márcia e todos que tiveram uma passagem ainda que breve. Por todo auxílio e parceria, por tornar esse caminho menos árduo e bem alegre.

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

À minha tão querida e divertida turma de mestrado: Laura, Michelle, Thayse, Denise, Gabriel, Jordana, Camila e Luiza. Aos alunos de doutorado Ramon, Andressa e Daniela.

Às minhas amigas de graduação que acompanharam toda a minha trajetória profissional: Andrea, Zélia, Camila, Aline, Raquel e Vinícius.

Aos meus grandes amigos: Juliana Santos, Lorena, Denise, Natália, Érika, Leandro, Juliana, Mércia, Fernanda, Weverson, Beth, Érick, Eweton, Fabrício, Yandra, Anderson, Sarah e Lutiane, amigos da Aliança de Misericórdia e da igreja São Pedro. Por todo carinho, companheirismo, incentivo e prazerosa convivência.

Aos meus tios e tias, primos e primas e a minha doce avó Stela Fernandes. Por todo apoio e carinho.

À família Almeida, pela acolhida e carinho.

A todos os meus professores do ensino fundamental e médio, pela formação escolar e social.

A todos os meus professores da graduação, sem os quais eu não teria a formação acadêmica que tenho.

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

Aos órgãos financiadores Capes e CNPq pela concessão da bolsa e todo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“A esperança tem duas filhas lindas, a indignação e a coragem; a indignação nos ensina a não aceitar as coisas como estão; a coragem, a mudá-las”.

Santo Agostinho

RESUMO

A partir da segunda metade do século XX, doenças inflamatórias do intestino (DII), como doença de Crohn e colite ulcerativa, tiveram um grande aumento de prevalência na população da América do Norte e na Europa que coincide com melhorias nas condições médicas e de higiene. Estudos indicam que múltiplos fatores possam atuar no estabelecimento e evolução das DII, culminando na indução de uma resposta imune inapropriada a antígenos intestinais com subsequente estabelecimento da inflamação intestinal. Estudos epidemiológicos e infecções experimentais indicam que a resposta imune induzida por helmintos parasitos pode reduzir a gravidade de doenças inflamatórias intestinais. Entretanto, os mecanismos que atuam na modulação da inflamação intestinal ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo verificadas diferenças relacionadas com a espécie de helminto estudada e com a fase da infecção. No presente estudo foi avaliado o efeito da infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis* na evolução clínica da colite ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrano (DSS). Para tanto, camundongos BALB/c infectados ou não por *S. venezuelensis* foram tratados oralmente com solução aquosa de 4% de DSS durante 7 dias. Durante o tratamento com DSS, animais dos diferentes grupos experimentais foram comparativamente avaliados com relação à intensidade dos sinais clínicos relacionados com a gravidade da colite e da inflamação intestinal. Os dados mostram que a infecção aguda por *S. venezuelensis* foi capaz de reduzir significativamente o escore clínico da colite induzida pelo tratamento com DSS. A melhora clínica dos animais infectados e tratados com DSS foi acompanhada por reversão do encurtamento do colón e redução das lesões macroscópicas na mucosa do intestino grosso. Também foi verificado que camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS apresentaram inicialmente uma redução significativa da concentração de IL-4, INF- γ e IL-17 no homogenato do intestino grosso e com a manutenção do tratamento com DSS houve aumento de IL-4 e IL-10 em relação aos animais somente tratados. A infecção por *S. venezuelensis* também resultou em redução significativa da atividade de EPO e MPO e reversão da depleção de células caliciformes e produção de muco observada no colón de camundongos somente tratados com DSS. Nossos dados demonstram que a infecção aguda por *S. venezuelensis* modula a evolução da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos. Este efeito é possivelmente mediado por um balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, resultando em menor recrutamento e ativação de granulócitos no colón.

Palavras-chave: Colite ulcerativa induzida por DSS, *Strongyloides venezuelensis*, imunomodulação.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease and ulcerative colitis, showed increasing prevalence among North American and European population that was associated with better medical and hygiene conditions. Currently, IBD affect millions of people worldwide. The etiology of these inflammatory diseases is not fully understood; however, studies indicate that several factors can act in the induction of an inappropriate immune response to intestinal antigens with subsequent establishment of the intestinal inflammation. Epidemiological studies and experimental evidences indicate that the immune response induced by helminth parasites can reduce the severity of inflammatory bowel disease. However, the mechanisms that operate in the modulation of inflammatory bowel disease are not fully understood, and mechanistic differences among the studies would be related to different helminth species and stage of infection. In the present study we evaluated the effect of *Strongyloides venezuelensis* acute infection on the clinical course of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). *S. venezuelensis* infected or not infected BALB/c mice were treated orally with 4% DSS aqueous solution during 7 days. During the treatment with DSS, animals of the different experimental groups were comparatively evaluated for the clinical signs related to the severity of colitis and intestinal inflammation. The data showed that the acute infection with *S. venezuelensis* was able to significantly reduce the clinical score of colitis induced by DSS treatment. Clinical improvement of animals infected and treated with DSS was followed by reversal of the colon shortening and reduction of macroscopic lesions in large intestine. It was also shown that mice previously infected by *S. venezuelensis* and treated with DSS initially showed an initial reduction of IL-4, INF- γ and IL-17 and later increasing in IL-4 and IL-10 concentration in the colon homogenate as compared to animals treated only. Infection with *S. venezuelensis* also resulted in significant reduction eosinophil and neutrophil activation, but goblet cells and mucus production in colon mucosa was preserved in this experimental group. Our data demonstrate that *S. venezuelensis* acute infection modulates DSS-induced ulcerative colitis in mice. This effect is possibly mediated by initial suppression of pro-inflammatory cytokines local production and granulocyte migration and subsequent increase of anti-inflammatory cytokines in colon.

Keywords: Ulcerative colitis DSS-induced, *Strongyloides venezuelensis*, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental 1.	35
Figura 2. Número de vermes intestinais e de ovos eliminados nas fezes.....	43
Figura 3. Evolução clínica da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos somente tratados com DSS e em camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e tratados com DSS..	45
Figura 4 Comprimento total do cólon e alterações macroscópicas na mucosa intestinal.	46
Figura 5. Aspecto microscópico do cólon proximal de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus controles..	48
Figura 6. Aspecto microscópico do cólon distal e <i>score</i> microscópico da inflamação em camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus controles..	50
Figura 7. Análise da produção de muco na mucosa do cólon distal de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus controles..	52
Figura 8. Concentração de citocinas pró-inflamatórias no homogenato do cólon de camundongos infectados por <i>S venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles..	54
Figura 9. Concentração de citocinas do perfil Th-2 no homogenato do cólon de camundongos infectados por <i>S venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles.....	58
Figura 10. Concentração de citocinas regulatórias no homogenato do cólon de camundongos infectados por <i>S venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles.....	56
Figura 11. Estimativa de peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO) no homogenato do cólon de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles.....	57

LISTA DE SIGLAS

μL - Microlitro

Abs - Absorbância

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA - Análise de variância

AW – Extrato bruto de verme adulto

BSA - Albumina de soro bovino

CETEA - Comitê de ética em experimentação animal

cm - Centímetro

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

DII - Doenças Inflamatórias do Intestino

DMSO - dimetilsulfóxido

DNBS - Ácido dinitrobenzeno sulfônico

dpi - Dia após infecção

DSS - Sulfato de Sódio Dextrano

dt – Dias de tratamento

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme-linked immuno sorbent assay*

EPO - Peroxidase de Eosinófilos

ES - *extract and excreted/secreted*

Fig - Figura

Foxp3 - *Forkhead Box P3*

GITR -glucocorticoid-induced TNFR family related gene

H & E - Hematoxilina e Eosina

HTAB - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

HTLV-1 - Vírus Linfotrópico para Células T Humanas Tipo 1

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IL-10^{-/-} - Camundongo deficiente para IL-10

IL-4R α ^{-/-} - Camundongos deficientes para Receptor do tipo alfa de interleucina 4

INF- γ - Interferon Gama
KDa - Kilodalton
L₁ - Larvas rabditóides de primeiro estágio
L₃ - Larvas filarioides infectantes de terceiro estágio
LPS - Lipopolissacarídeo
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MPO- Mieloperoxidase
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
nM - Nanometro
OPD - O-phenylenediamtnadihydrochloride
PAS - Ácido Periódico de Schiff
PBS – Tampão Fosfato
pg - Picograma
SCID - SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*
STAT6^{-/-} - Camundongo deficiente para *Signal Transducers and Activators of a Transcription*
TGF- β - *Transforming growth factor Beta*
Th-1 - Linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 1
Th-2 - Linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 2
Th-17 - Linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 17
TMB - 3,3'-5,5'-tetramethylbenzine
TNBS - Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α - *Tumor Necrosis Factor Alpha*
T-reg- Linfócitos T regulatórios
TSLP - Thymic Stromal Lymphopoietin
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UI - Unidade Internacional
USA - *United States of America*
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 – Aspectos do desenvolvimento de espécies de <i>Strongyloides</i>	17
2.1.2 – Aspectos patológicos e imunológicos	20
2.2 – Doenças Inflamatórias do Intestino (DII)	24
2.2.3 - Associação entre doenças inflamatórias crônicas e infecção por helmintos ...	28
3 – JUSTIFICATIVA	30
4 – OBJETIVOS	32
4.1 – Objetivo geral	32
4.2 – Objetivos específicos	32
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 –Animais Experimentais.....	33
5.2 - Infecção por <i>Strongyloides venezuelensis</i>	33
5.3 - Indução a colite.....	33
5.4 - Delineamento experimental.....	34
5.5 –Análise parasitológica.....	36
5.6–Análise clínica e macroscópica da colite ulcerativa induzida por DSS	36
5.7 - Análise histopatológica	37
5.8-Infiltração Celular no Tecido.....	39
5.9 - Quantificação da concentração de citocinas no homogenato de cólon	40
5.10 - Análise estatística	40
6 - RESULTADO	42
6.1 - Avaliação parasitológica	42
6.2 - Análise da colite ulcerativa induzida por DSS	43
6.3 – Análise histopatológica.....	47
6.4.1 – Perfil Imunológico - Quantificação de citocinas no homogenato do cólon....	53
6.4.1 – Perfil Imunológico – Infiltração celular no homogenato do cólon.....	56
7 - DISCUSSÃO.....	58
8 - CONCLUSÕES.....	63
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1- INTRODUÇÃO

Infecções por nematódeos intestinais são altamente prevalentes em humanos e em animais, especialmente em criações intensivas. Na população humana, estudos estimam que aproximadamente um quarto da população mundial possa estar infectado por nematódeos parasitos intestinais, sendo que a maioria das pessoas infectadas vive em países em desenvolvimento localizados em regiões tropicais e subtropicais (Chan 1997; Khan & Collins 2004; Stepek *et al.* 2006; Hotez *et al.* 2008). A infecção crônica por estes nematódeos, especialmente em crianças expostas a altas cargas parasitárias, pode acarretar diversos problemas de saúde, por diferentes mecanismos, que em muitos casos resultam em deficiência no desenvolvimento físico e cognitivo do indivíduo (Stephenson *et al.* 2000).

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

eliminados ainda na fase aguda da infecção, entre 12 e 14 dpi (dias após infecção), não desenvolvendo a infecção crônica de longa duração, que é característica da infecção humana (Sato & Toma 1990; Negrão-Corrêa 1990; Fernandes *et al.* 2008). A infecção por *Strongyloides*, assim como de outros nematódeos gastrintestinais, induz em seu hospedeiro uma resposta imunológica de perfil Th-2, com produção de citocinas do tipo-2 resultando em aumento de ativação de eosinófilos e mastócitos, níveis de IgE e IgG4, macrófagos alternativamente ativados e produção de muco pelas células caliciformes da mucosa intestinal. Essas alterações auxiliam na eliminação do parasito e na renovação do epitélio intestinal (revisto por Urban *et al.* 1992; Onah & Nawa 2000; revisto por Anthony *et al.* 2007; Jenkins & Allen 2009). Em infecções helmínticas também tem sido caracterizado a indução de células T-regulatória (T-reg), as quais exercem um papel de controle da resposta imune, favorecendo a sobrevivência dos vermes e a cronificação da infecção (Wilson *et al.* 2005; Maizels *et al.* 2009; Grainger *et al.* 2010). Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a resposta imune induzida por helmintos parasitos, onde ocorre predomínio da resposta do tipo 2 modificada por uma forte resposta modulatória, pode alterar a evolução de outros processos inflamatórios a que o hospedeiro esteja sujeito, entre os quais doenças crônicas auto-imunes e alérgicas (Wilson & Maizel 2004).

Um grupo importante de doenças imunes que impactam a saúde pública são as doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, que são doenças inflamatórias crônicas e recidivantes do trato gastrointestinal, e acometem principalmente pessoas jovens residentes em países desenvolvidos (revisto por Xavier & Podolsky 2007; Ponder & Long 2013). Múltiplos fatores são determinantes no estabelecimento e evolução das DII, sendo verificada que a interação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos pode levar à resposta imune exacerbada à microbiota intestinal característica destas doenças (Podolsky *et al.* 2002; revisto por Geremia *et al.* 2014). A partir da segunda metade do século XX, as DII se tornaram muito comuns na Europa e na América do Norte, enquanto que as taxas de infecções provocadas por helmintos declinaram rapidamente em residentes destas regiões, em consequência da melhoria das condições sanitárias e ambientais, revelando uma relação inversa entre a prevalência de DII e a frequência da infecção por helmintos (Elliott 2000; Weinstock & Elliott 2009). Uma possível justificativa para a diferença da incidência e prevalência de DII entre as nações desenvolvidas e em desenvolvimento começou a ser testada com a “Hipótese da Higiene”, que foi inicialmente postulada por

Strachan a mais de 20 anos atrás, e relaciona o aumento da alergia e doenças autoimunes com a falta de exposição a agentes infecciosos na primeira infância (Strachan 1989).

Corroborando com os dados epidemiológicos, estudos clínicos e com modelos experimentais demonstraram que a exposição aos helmintos ou produto dos mesmos, como *Heligmosomoides polygyrus*, *Hymenolepis diminuta*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Schistosoma mansoni*, *Ancylostoma caninum*, *A. ceylanicum*, *Echinococcus granulosus* podem prevenir ou melhorar os sinais clínicos da colite ulcerativa (Elliott *et al.* 2000, 2004 e 2008; Reardon *et al.* 2001; Khan *et al.* 2002; Summers *et al.* 2003; Smith *et al.* 2007; Ruysers *et al.* 2009; Cançado *et al.* 2011; Soufli *et al.* 2015). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa proteção não estão totalmente esclarecidos, e as vias imunológicas envolvidas nesse processo foram diferentes nos variados modelos de indução da colite e espécies de helmintos. Além disso, os dados experimentais também indicam que não são todas as infecções helmínticas que são capazes de produzir modulação da colite ulcerativa. Neste sentido, Wang *et al.* (2010) relataram que a infecção por *H. diminuta* levou ao agravamento da colite ulcerativa induzida por oxazolona.

A maioria desses trabalhos utilizou helmintos que podem levar a infecções crônicas em seus hospedeiros e sugerem que a indução da resposta imune regulatória seja essencial para o controle do processo inflamatório. Diante disso, esse trabalho visou investigar o papel da infecção por *S. venezuelensis* na modulação da colite experimentalmente induzida por DSS em camundongos BALB/c, bem como as alterações imunológicas e histopatológicas envolvidas nesse mecanismo.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Aspectos do desenvolvimento de espécies de *Strongyloides*

O gênero *Strongyloides* pertence à Classe Secernentea, Ordem Rhabditida e família Strongyloididae (Adamsom, 1987). Entretanto, estudos filogenéticos baseados na análise de genes da subunidade do RNA ribossomal de mais de 300 espécies de nematódeos propõem nova classificação do filo Nematoda, sendo o gênero *Strongyloides* agora incluído na Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Panagrolaimomorpha, Superfamília Strongyloidoidea e Família Strongyloididae (Blaxter *et al.* 1998). Dentre as 52 espécies descritas no gênero *Strongyloides*, duas foram naturalmente encontradas parasitando o intestino delgado de seres humanos: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A espécie *S. fuelleborni* é um parasito de primatas não humanos, porém ele tem sido responsável pela infecção de humanos em algumas áreas da África e Papua Nova Guiné, Zambia, Filipinas, Rhodesia e Peru (Siddiqui & Berk 2001; Speare 1989; Vadlamudi *et al.* 2006). A espécie *S. stercoralis* é a responsável pela quase totalidade dos casos de infecção humana. Estima-se que 30 – 100 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por *S. stercoralis* (Genta *et al.* 2005, Siddiqui & Berk 2001). Em áreas endêmicas, onde o contato com fezes humanas contendo larvas deste nematódeo e as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento, como ocorre em partes da África Ocidental, Caribe, Sudeste da Ásia, regiões tropicais do Brasil, Camboja e algumas regiões da Espanha, a prevalência da infecção pode chegar a 50% (Glinz *et al.* 2010, revisto por Puthiyakunnon *et al.* 2014). No Brasil, entre os anos de 1990 e 2009 a prevalência média da estrogiloidose foi estimada em 5,5%, porém a distribuição do nematódeo não é uniforme entre as regiões brasileiras, sendo sua prevalência de 5,3% na região Norte, 7,9% no nordeste, 6,6% no Centro-Oeste, 3,9% no Sudeste e 4,0% na região Sul. Estas taxas de prevalência são consideradas como subestimadas devido à dificuldade de diagnóstico (revisto por Paula & Costa-Cruz 2011).

As espécies do gênero *Strongyloides* apresentam em seu ciclo biológico alternância de gerações de vida livre e vida parasitaria, sendo que larvas rhabditóides de primeiro estágio (L₁) presentes no ambiente, em condições ideais de umidade e temperatura, podem sofrer quatro mudas formando machos e fêmeas, que se reproduzem dando origem a novas gerações de vida livre e/ou larvas infectantes que, após penetrarem no hospedeiro vertebrado, completam seu desenvolvimento. Este tipo de desenvolvimento

é denominado de ciclo heterogônico ou indireto (Yamada *et al.* 1991; Viney & Lok 2007). Alternativamente, o desenvolvimento destes parasitos pode se processar de maneira direta (ciclo homogônico), no qual as larvas L₁ evoluem para larvas filarioides de terceiro estágio (L₃) infectantes, que penetram ativamente na pele ou mucosa e alcançam a circulação sanguínea do hospedeiro, com o auxílio de proteases que são secretadas pelo parasito (Mckerrow *et al.* 1990). As larvas filarioides oriundas do desenvolvimento direto ou indireto são morfologicamente semelhantes. Estudos sugerem que a espécie *S. stercoralis*, apresenta apenas uma geração de vida livre, e as larvas provenientes da reprodução sexuada se desenvolvem em L₃ infectante que precisa infectar um hospedeiro suscetível para completar seu desenvolvimento pelo ciclo indireto (Schad *et al.* 1989; Yamada *et al.* 1991). Entretanto, algumas espécies do gênero *Strongyloides*, como *S. fuelleborni*, podem apresentar várias gerações de vida livre em condições laboratoriais, mas ainda não se sabe se o mesmo ocorre na natureza (Streit 2008).

Os mecanismos responsáveis pela determinação do tipo de desenvolvimento entre as espécies do gênero *Strongyloides* não estão completamente descritos. Estudos iniciais realizados por Graham (1938) sugeriram que o tipo de desenvolvimento (direto ou indireto) era influenciado por diferenças inerentes as cepas de *S. ratti*. Posteriormente, Chang e Graham (1957) estudando a espécie *S. papillosus* relatam diferenças no número de cromossomos nos diferentes estágios evolutivos e sugeriram que as fêmeas partenogênicas seriam triplóides (3n), e ao se reproduzir gerariam três tipos de larvas rhabditóides, uma triplóide (3n) que desenvolveriam em larvas filarióides infectantes; larvas diploides (2n) que evoluiriam para fêmeas de vida livre; e larvas haploides (n) que dariam machos de vida livre. Entretanto, a diferença de ploidia não foi confirmada em estudos posteriores com *S. ratti*, onde foi mostrado que todas as formas evolutivas do ciclo de vida de *Strongyloides* são diplóides (Harvey & Viney 2001).

Estudos subsequentes demonstraram que fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade de nutrientes, são decisivos na determinação do ciclo de vida livre. O grau de diluição das fezes e a temperatura da coprocultura foram determinantes para evolução de *S. stercoralis* em larvas filarióides infectantes ou fêmeas de vida livre, mas não influenciaram no surgimento de machos de vida livre, sugerindo que a determinação do sexo ocorre no ovo enquanto que fatores ambientais influenciam na determinação da vida parasitária ou livre das fêmeas (Shiwaku *et al.* 1988). Bereznaia *et al.* (1991) relataram que cepas de algumas espécies de *S. stercoralis* provenientes de

regiões tropicais desenvolvem predominantemente pelo ciclo indireto, e de regiões temperadas pela forma direta, principalmente em temperaturas mais baixas. A importância da temperatura na determinação do ciclo de vida livre foi confirmada por Viney (1996), que verificou que larvas de *S. ratti* se desenvolvem preferencialmente em fêmeas de vida livre em ambientes com temperaturas mais altas em relação a temperatura do hospedeiro que a liberou. Estudos posteriores mostraram que todas as formas evolutivas de *S. ratti* são diplóides e que a determinação sexual é genética; sendo verificado que as fêmeas apresentam seis cromossomos, dos quais 2 cromossomos são sexuais ($2n=6$, XX), e os machos apresentam 5 cromossomos, pois recebem apenas um dos cromossomos sexuais ($2n=5$, X0) (Harvey & Viney 2001). É provável que a diferenciação entre fêmeas de vida livre aconteça devido à diferenciação na expressão gênica, que pode ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes e temperatura ambiental, entre outros fatores (Viney, 1999). Corroborando com essa hipótese Viney e Lok (2007) mostraram que larvas de *S. ratti* provenientes de fêmeas paternogênicas que parasitam hospedeiro com resposta imunológica já estabelecida davam origem ao maior número de fêmeas de vida livre do que fêmeas parasitas.

As larvas filarióides (L_3) de *Strongyloides* oriundas do desenvolvimento direto ou indireto infectam seu hospedeiro por penetração ativa. Após a penetração no hospedeiro humano, *S. stercoralis* migra pela pele para os pulmões, preferencialmente através da corrente sanguínea e/ou linfática, e ascende à árvore brônquica e em seguida são deglutidas e então atingem o intestino delgado (Grove 1996; Genta 2005; Viney & Lok 2007). Semelhante ao *S. stercoralis*, as larvas L_3 de *S. Venezuelensis* penetram pela pele de ratos ou camundongos -hospedeiros naturais- e migram, pela musculatura e tecidos subcutâneos ou circulação, até atingir os pulmões (Hasegawa *et al.* 1988; Negrão-Corrêa 1990). Quarenta e oito horas pós-infecção é encontrado o maior número de larvas no pulmão, o que causa intensa hemorragia neste órgão. Em seguida, essas larvas deixam o órgão, gradualmente, passando pela traqueia, esôfago e estômago até atingir o intestino delgado, se instalando na porção inicial do duodeno (Dawkins *et al.* 1983; Negrão-Corrêa 1990, Takamura 1995). No intestino delgado, as larvas completam seu desenvolvimento atingindo o amadurecimento sexual, em que fêmeas partenogênicas produzem ovos. No modelo murino, as fêmeas do nematódeo começam a produzir ovos após cinco dias de infecção, e ao 7º dia pós-infecção, encontramos maior quantidade de fêmeas adultas partenogênicas na superfície mucosa

do intestino delgado, onde invadem o espaço intercelular das células epiteliais e se movem ativamente entre elas, deixando túneis por onde migraram (Dawkins *et al.* 1983; Negrão-Corrêa 1990; Takamure 1995). As fêmeas de *Strongyloides* não penetram na lamina própria através da membrana basal, sugerindo que os vermes se movem para dentro e para fora da camada epitelial repetidamente durante o curso da infecção (Dawkins *et al.* 1989). Neste mesmo período, grande parte dos ovos, produzidos partenogeneticamente, é eliminada nas fezes do hospedeiro. No décimo dia de infecção mais de 50% dos vermes já foram eliminados do intestino delgado, ocorrendo autocura entre 12 e 14 dias em camundongos (Sato & Toma 1990) e em ratos após 30 – 45 dias (Baek *et al.* 2003). Dessa forma a estrogiloidose em modelo murino é uma infecção aguda que não evolui para uma fase crônica.

No caso de *S. stercoralis*, larvas L₁ eclodem dos ovos eliminados pelas fêmeas ainda no intestino delgado, sendo que o hospedeiro infectado elimina larvas do parasito nas fezes. No entanto, parte das L₁ sofre muda e transforma em L₃ ainda no intestino grosso, penetram na mucosa intestinal levando a autoinfecção interna (Grove & Northern 1989). Esse fenômeno de autoinfecção interna pode levar a uma hiperinfecção ou infecções persistentes que apresentam diferentes manifestações clínicas (Concha *et al.* 2005).

2.1.2 – Aspectos patológicos e imunológicos

Apesar de outros parasitos gastrintestinais possuírem maior prevalência mundial, a estrogiloidose mostra-se uma parasitose importante para a saúde pública devido à dificuldade de diagnóstico e de controle da infecção e pela cronicidade resultante do processo de autoinfecção que ocorre no ciclo de *S. stercoralis* (Liu & Weller 1993; Qu *et al.* 2008). A evolução clínica da estrogiloidose é bastante variada em cada paciente infectado com *S. stercoralis*, sendo que a carga parasitária e a resposta imunológica do hospedeiro são fatores fundamentais nesse processo. Assim como na grande maioria das infecções produzidas por helmintos, em cerca de 50% dos indivíduos infectados a infecção evolui para uma parasitose crônica e assintomática de difícil diagnóstico (Concha *et al.* 2005; Olsen *et al.* 2009). A maioria dos pacientes sintomáticos apresenta uma série de sintomas cutâneos ou gastrintestinais pouco específicos (Siddiqui & Berk 2003). O encontro de altos níveis de anticorpos específicos contra *S. stercoralis* no soro de habitantes de área endêmica também indica a possibilidade de casos humanos de

erradicação espontânea do parasito e proteção contra reinfecções (Genta 1986). Além de evidências de casos de erradicação espontânea da infecção, existem também os casos sintomáticos graves associados à hiperinfecção e/ou disseminação do parasito passível de ocorrer em pacientes imunossuprimidos, que podem evoluir para óbito do paciente (Bradley *et al.* 1978; Genta 1986; Siddiqui & Berk 2003; Concha *et al.* 2005).

Na estrogiloidose aguda pode-se observar sintomas relacionados a migração das larvas, como urticária, irritação da pele e tosse; e alguns sintomas gastrointestinais como dores abdominais, náusea, anorexia, inchaço abdominal, prurido anal, alternância de períodos de constipação e diarreia. Pacientes infectados também podem apresentar má absorção de gordura e vitamina B₁₂ e perda de peso (Siddiqui & Berk 2003; Vadlamudi *et al.* 2006; Ramanathan *et al.* 2008). Como as manifestações clínicas intestinais iniciais são parecidas com de outras doenças, é muito comum o diagnóstico não apontar para a estrogiloidose, e dessa forma não tratar a infecção, levando ao hospedeiro permanecer abrigando o parasito por meses ou anos, levando ao estado crônico da doença (Stephenson *et al.* 2000; Costa-Cruz 2003; Vadlamudi *et al.* 2006).

No caso da estrogiloidose crônica, embora possa ser assintomática em indivíduos imunocompetentes, em 75% das pessoas leva ao aumento da eosinofilia periférica e dos níveis séricos de imunoglobulina-E (IgE) (Nutman *et al.* 2007). Eventualmente pode resultar em manifestações atípicas, incluindo obstrução duodenal, lesões hepáticas, síndrome nefrótica e artrite (revisito por Ramanathan *et al.* 2008).

Entretanto, um dos maiores problemas da estrogiloidose é a autoinfecção, que em pacientes com o sistema imune comprometido pode levar à hiperinfecção. É estimado que a síndrome da hiperinfecção ocorra em 1,5 a 2,5% dos pacientes com estrogiloidose (Milder *et al.* 1981). Em alguns casos de hiperinfecção pode ocorrer disseminação das larvas para o fígado, pulmão, coração e sistema nervoso central (Siddiqui & Berk 2003). Como consequência da migração das larvas durante o processo de autoinfecção, o órgão extra intestinal mais acometido é o pulmão causando a síndrome de Löffler: cujos sinais clínicos incluem tosse, diminuição da taxa de respiração, chiado e intenso infiltrado pulmonar, podendo os pacientes apresentar asma bronquial, bronquite crônica e broncopneumonia (Concha *et al.* 2005). Pode ocorrer intensa dor de garganta, grande perda de peso e sintomas intestinais intensos devido a ulcerações e sangramento no intestino delgado causado pela perfuração das larvas (Keiser *et al.* 2004; Csermely *et al.* 2006). A maioria dos pacientes (83%-87%) com

estrongiloidose disseminada vai a óbito (Link *et al.* 1999). Nesses casos os níveis de eosinófilos podem ser normais ou até mesmo reduzidos (Keiser *et al.* 2004).

O aumento da carga parasitária e a potencial ameaça de disseminação das larvas para todos os órgãos internos são frequentemente relatadas em indivíduos com função comprometida do sistema imune, que pode ser decorrente de uso continuado de drogas imunossupressoras, ou por infecções que afetem a resposta imune do hospedeiro, tais como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e infecção pelo Vírus Linfotrópico para Células T Humanas Tipo 1 (HTLV-1) (Grove 1996; Porto *et al.* 2002; Concha *et al.* 2005; Rogers *et al.*, 2005; Vadlamudi *et al.* 2006). Nestes pacientes tem sido relatado um grande aumento da carga parasitária com disseminação das larvas infectantes do parasito pelo hospedeiro, sendo que nesses casos a infecção é fatal em até 87% dos pacientes (Siddiqui & Berk 2003; Concha 2005). Há relatos, ainda, de transmissão de *S. stercoralis* por transplante de órgão (Bem-Yossef *et al.* 2005; Patel *et al.* 2007).

Fica evidente que a evolução clínica da estrongiloidose humana está diretamente associada à capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imunológica protetora. Por isso o estudo da relação parasito-hospedeiro é importante para a busca de alternativas de tratamentos e diagnóstico para essa helmintose. Como o *S. stercoralis* não completa seu ciclo em modelos experimentais, diversos estudos são feitos com utilizando a espécie *S. venezuelensis*.

No modelo murino, a infecção por *S. venezuelensis*, assim como a maioria dos helmintos, induz no hospedeiro uma resposta imune do tipo 2, que é caracterizada pela produção das citocinas interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, produzidas principalmente por células T que expressão o antígeno de superfície CD4 (Células Th2). Atualmente, tem sido demonstrado que a infecção por nematódeos pode induzir a produção destas citocinas por outras células associadas ao sistema imunológico, como células B, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e basófilos, bem como outras citocinas como IL-21, IL-25 e IL-33 também podem contribuir para o desenvolvimento da resposta imune do tipo-2. A produção de citocinas do tipo-2 induz diferenciação, migração e ativação de eosinófilos para o sítio inflamatório, diferenciação de células caliciformes com aumento de produção de muco, mastocitose, diferenciação de macrófagos alternativamente ativados e aumento de níveis séricos de IgE e IgG1 (Finkelman *et al.* 1997; Finkelman *et al.* 2004; Patel *et al.* 2009, revisto por Anthony *et al.* 2007). As citocinas do tipo-2 também agem diretamente em células epiteliais

intestinais e na musculatura resultando em alterações fisiológicas e funcionais do órgão (Jenkins & Allen 2009). Esse tipo de resposta é importante para mediar a eliminação e controle das infecções por nematódeos gastrintestinais.

No caso específico da infecção por espécies do gênero *Strongyloides*, a associação da resposta Th2 com proteção tem sido verificada tanto na infecção humana como em modelos experimentais. Na estrogiloidose humana, pacientes co-infectados por HTLV-1, vírus que promove uma alta produção de IFN- γ e desvio da resposta imune para o tipo Th1, apresentam aumento da carga parasitária e disseminação do nematódeo que coincide com a redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, componentes participantes do mecanismo de defesa contra *S. stercoralis* (Porto *et al.* 2001, Porto *et al.* 2002). A participação da resposta imune do tipo-2 no mecanismo de controle da infecção por nematódeos do gênero *Strongyloides* foi confirmada por estudos de infecção experimental utilizando *S. venezuelensis* em camundongos geneticamente deficientes no receptor de IL-4 e no fator de transcrição induzido por esta via (IL-4R $\alpha^{-/-}$ ou STAT6 $^{-/-}$), onde ficou demonstrado que animais deficientes no estabelecimento da resposta do tipo-2 tiveram um retardo no período de eliminação dos vermes quando comparado ao período de eliminação da infecção em camundongos selvagens (Sasaki *et al.* 2005; Negrão-Corrêa *et al.* 2006). Neste modelo experimental a produção de IL-4, mas não de IL-13 é essencial para eliminação dos vermes intestinais (Ferreira *et al.* 2010).

Apesar da importância da resposta do tipo-2 no controle de nematódeos parasitos, na grande maioria dos pacientes infectados, os vermes têm uma sobrevivência prolongada e a infecção é assintomática. Evidências experimentais indicam que helmintos parasitos, além de induzir uma resposta Th-2, podem estimular células T com perfil regulatório (T-Regs), macrófagos com fenótipo de ativação alternativa e células TCD4+ que são elementos que participam de mecanismos de imunoregulação, principalmente através da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , e expressão de altos níveis das moléculas co-estimulatórias GITR e CTLA-4, (revisito por Maizels *et al.* 2004). A resposta imune detectada durante infecções por helmintos, que apresenta características efectoras do tipo 2 associadas com mecanismos modulatórios, tem sido designada de resposta do tipo-2 modificada (Anthony *et al.* 2007).

Além de afetar a sobrevivência do parasito, a indução de mecanismos moduladores pode influenciar a evolução de doenças inflamatórias crônicas originadas por uma resposta imunológica exacerbada, como no caso de doenças alérgicas e doenças

inflamatórias do intestino (DII). Este mecanismo tem sido utilizado como possível justificativa de estudos epidemiológicos que mostram que populações humanas expostas a infecções crônicas por helmintos apresentam uma baixa prevalência de doenças inflamatórias (Weinstock & Elliott, 2009).

No caso específico de *Strongyloides* foi demonstrado que a infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de inibir a hiperreatividade brônquica em modelo murino de asma alérgica (Negrão-Corrêa *et al* 2003). Apoiando esse papel regulatório desse helminto, foi visto que na co-infecção de *S. venezuelensis* e *Micobacterium bovis* ocorre o aumento da suscetibilidade do hospedeiro a ambos parasitos, que foi associado ao aumento da expressão de moléculas regulatórias CTLA-4 e IL-10 e supressão de IL-17 (Carmo *et al.* 2009; Dias *et al.* 2011). Mais recentemente foi demonstrado que a infecção prévia por esse parasito preveniu a diabetes do tipo I, experimentalmente induzida em camundongos, e essa prevenção foi acompanhada do aumento de IL-5 e IL-10 produzidas no baço (Peres *et al.* 2013). Em outro estudo, foi visto ainda uma relação inversa entre a infecção por *S. stercoralis* e diabetes do tipo II em população humana (Hays *et al* 2015). Entretanto, seu possível efeito sobre as DII ainda não foi estudada.

2.2 – Doenças Inflamatórias do Intestino (DII)

As Doenças Inflamatórias do Intestino (DII) constituem um estado de inflamação crônica do trato intestinal que é principalmente representada pela colite ulcerativa e doença de Crohn. As DII são caracterizadas por diarreia, dor abdominal, hemorragia, perda de peso e febre, apresenta recidivas frequentes, impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes (Shils *et al.* 2006; Motomura *et al.* 2008).

A doença de Crohn pode atingir qualquer parte do trato intestinal, mas geralmente as lesões ocorrem com maior frequência na mucosa do íleo, a inflamação pode estender-se da mucosa até a serosa. Microscopicamente é caracterizada pela agregação de macrófagos formando granulomas, geralmente sem necrose. Quando as lesões atingem o cólon, ocorre diarreia sem muco ou sangue, e é de difícil diagnóstico. Por outro lado, as lesões da colite ulcerativa atingem inicialmente o reto e estendem-se ao colo proximal. Na fase ativa é caracterizada por abscessos, perda das criptas e ulcerações que afetam a mucosa e submucosa, as quais podem causar um intenso infiltrado inflamatório e estresse oxidativo no cólon. Os sinais clínicos da colite

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

Estas doenças atingem preferencialmente pessoas jovens residentes em países desenvolvidos, apresentando alta prevalência na Europa e na América do Norte. Na América do norte a prevalência da colite ulcerativa chega a 249 casos por 100.000 habitantes, e 319 casos por 100.000 habitantes para doença de Crohn. Na Europa essas prevalências são ainda maiores, sendo que para colite ulcerativa pode alcançar a 505 casos por 100.000 habitantes, e para doença de Crohn, 322 casos por 100.000 habitantes. Além da prevalência de DII ser alta nessas áreas, a sua incidência anual tem aumentado, podendo atingir a 19,2 novos casos de colite ulcerativa por 100.000 habitantes e 20,2 para doença de Crohn na América do Norte. Na Europa essas incidências anuais chegam a 24,3 novos casos de colite ulcerativa por 100.000 habitantes e 12,7 novos casos de doença de Crohn (Molodecky *et al.* 2012). Ainda não há estudos epidemiológicos sobre a prevalência e incidência dessas doenças no Brasil.

A etiologia das DII ainda é pouco conhecida, mas a hipótese mais aceita é de que seja resultado de uma resposta imune inapropriada e descontrolada desenvolvida pelo indivíduo contra antígenos da microbiota intraluminal, sendo fortemente influenciada por fatores genéticos e/ou ambientais (Weinstock & Elliott 2009). A influência genética nas DII pode ser corroborada pela alta taxa de concordância em gêmeos idênticos - 50 % para doença de Crohn e 10% para colite ulcerativa. Somando-se a isso entre 15 e 30 % dos pacientes tem histórico dessas doenças intestinais na família (Halfvarson *et al.* 2003; Loftus 2004; Leonel 2012). Diversos fatores ambientais também foram associados as DII, entre os quais tabagismo, dieta, drogas e stress (Danese *et al.* 2004).

Além do impacto direto das lesões intestinais, as DII são doenças cujo controle do processo inflamatório depende de uso prolongado de corticoides ou imunossupressores de largo espectro, que afetam significativamente a qualidade de vida e a produtividade do paciente (Motomura *et al.*, 2008). Recentemente, muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de aumentar e melhorar o arsenal terapêutico para DII, sendo testado tratamento neutralizante de TNF e de moléculas anti-integrina (Danese *et al.* 2015). Entretanto, as alternativas terapêuticas não funcionam em todos os casos e para escolha terapêutica mais adequada ou mesmo desenvolver novas estratégias

faz-se necessário conhecer os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução dessas doenças.

Os aspectos imunológicos envolvidos na evolução destas patologias são mais bem caracterizados para doença de Crohn, onde a evolução da lesão tem sido associada à produção aumentada de citocinas Th-1, como INF- γ , TNF- α e IL-2, e de citocinas Th-17, como IL-17A, IL-21, IL-23 na mucosa intestinal dos pacientes (Breese *et al.* 1993; Fuss *et al.* 1996; revisto por Xu *et al.* 2014). Já para colite ulcerativa a literatura é contraditória; inicialmente a colite ulcerativa foi associada à resposta Th-2, uma vez que pacientes com colite ulcerativa apresentam níveis aumentados de IL-5 e IL-13, porém a concentração de IL-4, citocina característica da resposta do tipo Th-2, não se encontra aumentada nos pacientes com colite ulcerativa (Fuss *et al.* 2004, revisto por Xu *et al.* 2014). Dados obtidos em modelos murino de colite demonstram que a resposta do tipo Th-17, caracterizada pela elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, IL-6 e TNF- α , também participa da gênese dessa patologia (Weinstock & Elliott, 2009).

As citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , ajudam a manter a homeostase imune do intestino, suprimindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata (Elliott *et al.* 2008). Camundongos deficientes na produção de IL-10 ou TGF- β , ou tratados com anti-IL-10 ou anti-TGF- β , desenvolvem colite mais grave (Kuhn *et al.* 1993; Fahlen *et al.* 2005), e os animais deficientes na produção do fator de transcrição Foxp3, via de sinalização envolvida na diferenciação de células Treg, tem predisposição a desenvolver colite fatal (Liu *et al.* 2006; Chaudry *et al.* 2011). Em contrapartida, infecções por helmintos, que induzem a produção de citocinas regulatórias, apresentam redução dos sinais clínicos da colite ulcerativa (revisto por Whelan *et al.* 2012).

Dada a gravidade da doença, a dificuldade de tratamento, o restrito conhecimento sobre as DII e a dificuldade de estudo em humanos faz-se necessário a padronização de modelos experimentais que permitam conhecer melhor a gênese da colite ulcerativa. Entre os modelos experimentais mais utilizados estão o tratamento intra-retal com ácido di- ou tri-nitrobenzeno sulfônico (DNBS, TNBS), responsável pelo rompimento da camada epitelial do cólon e indução de um processo inflamatório caracterizado por estimulação de células Th-1/Th-17, dependente de IL-12/23 e TNF- α e da ativação de macrófagos (revisto por Whelan *et al.* 2012). Camundongos deficientes na produção de IL-10 (IL-10^{-/-}) desenvolvem espontaneamente colite ulcerativa, por isso também são utilizados no estudo experimental dessa doença. É importante salientar

que a colite observada em camundongos IL-10^{-/-} não se desenvolve se os camundongos forem mantidos em condições *germ-free*. Nesse modelo, a inflamação se estabelece com a participação de células Th-1/Th-17, sendo verificado que o bloqueio de IL-12 e/ou a co-transferência de células T-reg inibe o desenvolvimento da colite nesses camundongos (revisto por Whelan *et al.* 2012). Outro modelo experimental que tem sido muito estudado é a indução da colite ulcerativa pelo tratamento com Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) em água. A ingestão de DSS (Peso Molecular = aproximadamente 40 kDa) lesa o epitélio da mucosa do cólon permitindo a translocação de bactérias e indução de processo inflamatório. A inflamação intestinal induzida por DSS ativa a resposta Th-1, Th-17 e Th-2, sendo verificado a participação de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos. O tratamento com antibiótico e bloqueio de IL-12/23 e TNF- α levam a melhora na inflamação do cólon nesse modelo (revisto por Whelan *et al.* 2012). A importância da microbiota na colite induzida pelo tratamento com DSS é controversa, sendo relatada que a colite foi mais branda em camundongos BALB/c “*germ free*” que convencionais (Hudcovi *et al.* 2001); entretanto, camundongos C57Bl/6 “*germ free*” tratados por DSS desenvolveram colite mais grave e ao serem colonizados pela flora intestinal tiveram melhora na inflamação do cólon (Maslowski *et al.* 2009).

No presente trabalho, a colite ulcerativa foi induzida através do tratamento oral com DSS em camundongos BALB/c. A colite ulcerativa induzida por DSS assemelha-se patológica e imunologicamente à observada em humanos, causando hematoquezia, perda de peso corporal, retração do intestino, úlceras nas mucosas e infiltração de neutrófilos (Jurjus *et al.* 2003), sendo a região distal do cólon a mais acometida (Yan *et al.* 2009). Dieleman *et al.* (1998) demonstraram que a administração de DSS em camundongos Swiss-Webster resulta em colite aguda, seguida de lenta regeneração do epitélio do cólon e estabelecimento de inflamação crônica da mucosa e aumento focal de INF- γ e IL-4. A colite induzida por DSS não possui um perfil típico Th1/Th-17 e sua cronicidade se deve a uma ativação imune na qual atuam citocinas de perfil Th1 e Th2. Na colite ulcerativa induzida pelo tratamento com DSS ocorre infiltração/ativação de neutrófilos e macrófagos, acúmulo de células T e B e aumento da permeabilidade trans-mucosa no cólon (Yan *et al.* 2009; Hall *et al.* 2011). Os eosinófilos também são importantes no processo inflamatório do cólon, uma vez que foi visto que camundongos deficientes para a maturação de eosinófilos desenvolvem colite menos grave quando tratados com DSS que os camundongos selvagens (Vieira *et al.* 2009).

2.2.3 - Associação entre doenças inflamatórias crônicas e infecção por helmintos

A partir de 1940 estudos tem demonstrado que as taxas de infecções provocadas por helmintos declinaram rapidamente em países desenvolvidos (Elliot *et al.* 2008). Este decréscimo está diretamente relacionado com a disponibilidade de tratamento antiparasitário mais eficaz e com a melhoria das condições sanitárias nestes locais. Concomitantemente, constatou-se um acréscimo significativo na ocorrência de doenças imuno-mediadas como asma, esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e doenças inflamatórias do intestino (DII). A verificação de uma associação entre baixa prevalência de infecções parasitárias com alta prevalência de doenças imuno-mediadas em países desenvolvidos levou a proposição da Teoria da Higiene, que sugere que a falta de exposição a agentes infecciosos na infância poderia influenciar o desenvolvimento do sistema imune, predispondo o desenvolvimento de doenças imuno-mediadas na fase adulta do indivíduo (Elliott *et al.* 2000; Weinstock & Elliott 2009; Ruysers *et al.* 2009).

Um estudo clínico apresentado por Summers *et al.* (2003) relatou que pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa expostos a ovos de *Trichuris suis* por tempo prolongado apresentaram melhora dos sintomas da doença inflamatória, sugerindo a possibilidade de regular a inflamação exacerbada do intestino em humanos com infecção por helmintos. Estudos em modelos experimentais também demonstram que a exposição à *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis diminuta* ou *Heligmosomoides polygyrus* pode modular a colite do tipo-1 induzida pela administração de TNBS (revisto por Ruysers *et al.* 2009). Entretanto, a modulação da doença inflamatória pela infecção por helminto não foi detectada em todos os modelos experimentais (Weinstock & Elliott 2009).

Os mecanismos pelos quais helmintos parasitos gastrintestinais modulam DII e outras doenças inflamatórias crônicas ainda não são completamente conhecidos e parece variar em diferentes modelos experimentais. Em alguns desses modelos tem sido proposto que o aumento de IL-4 induzido pelo helminto modula a inflamação do tipo-1 associada à colite. No modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS existe evidências experimentais de que citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , induzidas pela presença do helminto possam participar na modulação da resposta inflamatória da colite. Por outro lado, vários trabalhos experimentais mostram que a melhora da

gravidade da colite ulcerativa induzida por TNBS ou DNBS pela co-infecção por helmintos ou por tratamento com antígenos dos mesmos foi acompanhada de aumento de citocinas Th-2 no cólon (Khan *et al.* 2002, Sutton *et al.* 2008, Motomura *et al.* 2008, Du *et al.* 2011).

Também não foi experimentalmente confirmado que citocinas regulatórias sejam responsáveis na modulação induzida pela infecção por *Schistosoma* em animais com colite induzida por DSS (Weinstock & Elliott 2009). Produtos de *Ancylostoma ceylanicum*, *Trichinella spiralis* e antígenos da vesícula de cisto hidático de *Echinococcus granulosus* também foram capazes de melhorar os sinais clínicos da colite induzida pelo tratamento com DSS através da supressão de citocinas Th1 e Th17 (Cançado *et al.* 2011; Yang *et al.* 2014; Soufli *et al.* 2015). Entretanto, apenas no caso da infecção por *T. spiralis*, a redução da concentração de citocinas Th-1 e Th-17 induzidas por DSS foram acompanhadas por aumento de citocinas T-reg, mas neste modelo experimental os autores não relatam diferenças nas citocinas Th-2 no cólon (Yang *et al.* 2014). Estes dados mostram claramente a necessidade de maiores estudos que visem esclarecer os mecanismos envolvidos na modulação de DII por helmintos.

Com base nestas informações, o presente trabalho visa verificar se a infecção de camundongos por *S. venezuelensis* pode interferir na evolução da colite induzida por DSS. A espécie de nematódeo *S. venezuelensis* se estabelece na mucosa do intestino delgado de roedores e induz a produção local de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-13, bem como de citocinas regulatórias como IL-10, de maneira transitória. A cinética da resposta imunológica e sua participação no controle desta infecção têm sido amplamente estudadas em nosso laboratório, permitindo a associação desta infecção ao modelo de colite proposto. A partir dos dados obtidos, espera-se contribuir para o esclarecimento de mecanismos induzidos por helmintos gastrintestinais envolvidos no controle de inflamação intestinal crônica, como colite e em demais doenças imuno-mediadas de perfil semelhante, permitindo o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento desta doença.

3 – JUSTIFICATIVA

Um dos maiores desafios para a clínica médica é tratar daquelas doenças em que não se sabe com exatidão a sua etiologia, como é o caso das Doenças Inflamatórias do Intestino (DII). A doença de Crohn e a colite ulcerativa são as duas principais formas das DII, e apesar de serem doenças distintas, apresentam alguns sinais clínicos semelhantes (Danese & Fiocchi 2006). Os pacientes com DII sofrem com dores abdominais, diarreia, hemorragias, perda de peso e febre, e sua evolução é crônica. Apesar das novas medidas terapêuticas disponíveis, as opções de tratamento dependem basicamente do uso prolongado de glicocorticoides, imunossupressores e antibióticos, porém nem todos os pacientes respondem bem a esses tratamentos (Motomura *et al.* 2008, revisto por Nielsen 2014). Desta forma, o melhor conhecimento da gênese destas doenças inflamatórias e a descoberta de novas alternativas terapêuticas são necessários.

Dados epidemiológicos mostram que há uma correlação inversa entre a prevalência de DII e doenças parasitárias, principalmente as causadas por helmintos, sendo observado que a prevalência de DII é maior em países desenvolvidos em relação aos países em desenvolvimento, onde a prevalência de helmintos parasitos é alta, corroborando com a “Hipótese da Higiene” que relaciona a diminuição de doenças infecciosas observada em crianças de países desenvolvidos com o aumento da incidência de alergia (Strachan 1989, Elliott *et al.* 2000). As DII apresentam um perfil de resposta imunológica polarizada para Th-1/Th17 e em alguns casos também para Th-2, enquanto a resposta induzida por helmintos gastrintestinais é de perfil Th-2 e T-reg. A maioria dos trabalhos experimentais sugerem que a exposição à infecções crônicas por helmintos parasitos possa modular o processo inflamatório observado em DII e conseqüentemente levar a uma melhora dos sinais clínicos (revisto por Whelan 2012). Entretanto, a maioria dos estudos realizados utilizou infecções crônicas provocadas por helmintos para a modulação da DII. Além disso, os mecanismos imunológicos associados à modulação da colite ulcerativa por helmintos foram variados nos estudos realizados.

Strongyloides venezuelensis é um nematódeo de roedores, que se estabelece na mucosa do intestino delgado do hospedeiro induzindo uma resposta de perfil Th-2. Em camundongos ocorre auto cura entre 12dpi e 14dpi, o que a caracteriza como uma infecção aguda (Sato & Toma 1990; Negrão-Corrêa *et al.* 1990 e 2004; Onah *et al.* 2000). A curta duração do ciclo biológico desse nematódeo, sua fácil manutenção e

manipulação laboratorial, associado ao tipo de resposta imune por ele induzido, torna esse parasito promissor ao estudo do efeito modulatório promovido pelas infecções helmínticas na evolução da colite ulcerativa em modelo murino.

Nossa hipótese é que a infecção *S. venezuelensis*, mesmo sendo um processo agudo, possa produzir alterações capazes de modular a gravidade da colite experimentalmente induzida pelo tratamento com DSS. Para tanto, avaliamos os sinais clínicos da colite ulcerativa e a inflamação tecidual induzida pelo tratamento com DSS em camundongos infectados ou não com *S. venezuelensis*. Nossos dados confirmam que a infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de modular a resposta pró-inflamatória induzida pelo tratamento por DSS, resultando em significativa melhora clínica.

4 – OBJETIVOS

4.1 – Objetivo geral

Avaliar o efeito da infecção aguda por *Strongyloides venezuelensis* na evolução da colite experimentalmente induzida por Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) em camundongos BALB/c.

4.2 – Objetivos específicos

1. Verificar o efeito do tratamento com DSS na carga parasitária e na cinética da infecção experimental por *S. venezuelensis* em camundongos BALB/c.
2. Avaliar comparativamente a evolução e a gravidade dos sinais clínicos da colite ulcerativa em camundongos BALB/c apenas tratados com DSS e camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados.
3. Analisar comparativamente as alterações histopatológicas no intestino grosso de camundongos BALB/c apenas tratados com DSS e em camundongos previamente infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS.
4. Analisar comparativamente a produção de citocinas e a infiltração celular no intestino grosso de camundongos BALB/c apenas tratados com DSS e em camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Animais Experimentais

Camundongos BALB/c fêmeas, com 8 semanas de idade, foram fornecidas pelo Biotério Central da UFMG e mantidos no Biotério de Imunohelminologia do Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG, durante o período de experimentação. Neste período, os animais foram mantidos em “*racks*” ventiladas, alimentados com ração comercial para camundongos (Labina, Primor, Brasil) e tiveram acesso livre a água. Os experimentos aqui descritos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal – UFMG protocolo N°. 129/2011.

5.2 - Infecção por *Strongyloides venezuelensis*

O nematódeo *S. venezuelensis* foi isolado inicialmente de *Rattus norvegicus* (Brenner & Chaia 1967) e tem sido mantido no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG, através de infecções sucessivas em ratos da linhagem Wistar. A infecção dos animais foi feita conforme descrito por Negrão-Corrêa *et al.* (2006). Resumidamente, as larvas filarióides infectantes (L₃) de *S. venezuelensis* foram obtidas através da coprocultura de fezes de rato Wistar infectados. Após 48-72 de cultura, as larvas infectantes foram isoladas através da técnica de Baermann modificada por Moraes (1948), filtradas e então lavadas em solução fisiológica (0,85% NaCl). Setecentas larvas L₃ foram inoculadas subcutaneamente na região abdominal de cada camundongo dos diferentes grupos experimentais. Para isso o número de larvas em solução foi estimado sob microscópio estereoscópio e sua concentração foi ajustada para 700L₃/200 µL de solução 0,85% NaCl.

5.3 - Indução a colite

A colite ulcerativa foi induzida por meio da ingestão de solução aquosa contendo 4% de Sulfato de Sódio Dextrano (DSS –TdBConsultancy, peso molecular de

40.000 dalton), administrada em água *ad libitum*, durante 7 dias consecutivamente (Cooper, 1993). Animais controle receberam somente a água.

5.4 - Delineamento experimental

Nesse estudo os animais foram divididos em quatro grupos experimentais com 12 animais cada, exceto o grupo controle que continha 6 animais, conforme esquema da Fig 1A. O primeiro grupo foi designado de grupo controle, e os animais não foram infectados e receberam apenas água sem adição de DSS. O segundo grupo experimental, designado de grupo infectado, os camundongos foram infectados individualmente com 700 L3 *S. venezuelensis* pela via subcutânea. No terceiro grupo experimental (DSS) os camundongos receberam água contendo 4 % de DSS por 7 dias consecutivos, entre o 5^o e 12^o dia do início do procedimento experimental; e no quarto grupo experimental (infectado-DSS), os camundongos foram infectados subcutaneamente com 700 L3 de *S. venezuelensis* e, a partir do 5^o dia da infecção, receberam água contendo 4% de DSS.

Durante o experimento, os camundongos dos diferentes grupos experimentais foram avaliados diariamente em relação ao peso corporal, aparência clínica e consistência das fezes, conforme detalhado a seguir. Metade dos animais dos grupos infectados e/ou tratados foram anestesiados e eutanasiados após 9 dias da infecção e 4 dias de tratamento (9dpi/4dt) com DSS, e a outra metade dos animais foram anestesiados e eutanasiados ao final do tratamento com DSS para avaliação da carga parasitária e do processo inflamatório na mucosa do intestino grosso. Todos os camundongos do grupo controle foram eutanasiados no final do experimento (Fig. 1A).

Para as necropsias os animais foram anestesiados via intraperitoneal com solução anestésica/analgésica (10 mg/kg xilazina e 80mg/kg de ketamina, ambas da marca Agener União Saúde Animal), foi retirado o amostra de sangue do plexo braquial para obtenção de soro, o qual foi congelado a -20°C para posterior análises. Em seguida esses animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O cólon de cada animal foi retirado e seu tamanho mensurado e em seguida foi aberto longitudinalmente para análise macroscópica da lesão da mucosa. A parte distal do cólon, região mais afetada pelo tratamento com DSS (Yan et al. 2009; Serpe *et al.* 2010), foi congelada a -20°C para posteriormente ser homogeneizada para a avaliação das atividades enzimáticas, Peroxidase de Eosinófilos (EPO) e Mieloperoxidase (MPO), e para quantificação de citocinas. A parte proximal do intestino delgado de cada animal dos

5.5 –Análise parasitológica

A infecção por *S. venezuelensis* foi avaliada conforme rotineiramente realizada em nosso laboratório (Silveira *et al.* 2002; Negrão-Corrêa *et al.* 2004; Fernandes *et al.* 2007). Para tanto, a metade anterior do intestino delgado dos animais infectados, aos 9dpi e aos 12dpi, foi separada, aberta longitudinalmente e incubada em solução fisiológica (0,85 % NaCl) por 4h a 37°C. Os vermes recuperados foram quantificados em microscópio estereoscópico. O número de ovos do parasito eliminados por 0,1 grama de fezes foi quantificado em fezes coletadas aos 7dpi, 9dpi e 12dpi, que foram pesadas, homogeneizadas em volume conhecido de formalina tamponada e contadas em microscópio óptico (Nikon E200).

5.6–Análise clínica e macroscópica da colite ulcerativa induzida por DSS

A gravidade da colite experimental induzida por 4% DSS foi estabelecida baseado na avaliação da aparência geral do animal e sua atividade, mudança de peso, aspecto das fezes e sangramento retal. Uma pontuação clínica foi estimada de acordo com *score* proposto por Taylor *et al.* (2009) e detalhado na tabela 1.

Tabela 1
Alterações clínicas utilizadas para *score* clínico

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

Nos animais necropsiados aos 9dpi/4dt e aos 12dpi/7dt o cólon foi inteiramente retirado e seu tamanho foi medido com régua milimétrica, sendo o comprimento total do colón de cada animal experimental registrado em centímetros.

Para análise macroscópica da lesão da mucosa, o cólon desses animais foi aberto longitudinalmente e analisados segundo Ilan *et al.* 2000, para determinar uma pontuação macroscópica da lesão, detalhada na tabela 2.

Tabela 2
Alterações macroscópicas da inflamação da mucosa

Características		Pontuação
1. Aderências	Normal	0
	Moderado	1
	Severo	3
2. Pontos hemorrágicos	Normal	0
	Moderado	1
	Severo	3
3. Edema	Normal	0
	Moderado	1
	Severo	3
4. Ulcerações	Normal	0
	Moderado	1
	Severo	3

5.7 - Análise histopatológica

Aos 12dpi/7dt, aproximadamente 5 cm da metade proximal e distal do cólon de cada camundongo foi aberta longitudinalmente e lavada com solução fisiológica. Após a retirada dos detritos, a amostra de intestino grosso foi transferida para um papel de filtro com a superfície da mucosa voltada para cima e o tecido foi embebido em tampão fosfato (PBS - 13,7mM de NaCl, 0,27mM de KCl, 0,14mM de KH₂SO₄ e 0,43mM de Na₂HPO₄.7H₂O) contendo 10% de formalina. O material foi enrolado em um palito de madeira e amarrado com uma linha formando um rolo, que foi então fixado em tampão fosfato contendo 10% de formalina, por 24 h. Em seguida as amostras de intestino fixadas foram lavadas por 3-4 h em água corrente e armazenada em álcool 70% até o processamento. Posteriormente, todo material foi desidratado em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em xilol e emblocados em parafina. O tecido foi

seccionado (5µm) e corado com Hematoxilina e Eosina (H & E) ou Ácido Periódico de Schiff (PAS). Os cortes histológicos do cólon proximal corados em HE foram analisados apenas de forma qualitativa. Para análise das alterações histológicas observadas na porção distal do cólon, área onde o tratamento com DSS provocou alterações mais intensas e extensas, o material foi fotografado no aumento de 400X com câmara Olympus DP12 acoplada ao microscópio óptico Olympus BX41. As fotos foram obtidas de maneira aleatória, sendo fotografado um campo a cada cinco, com um mínimo de 15 campos por tratamento. As fotos foram codificadas e analisada sem conhecimento prévio do tratamento, seguindo os parâmetros descritos por McCaffert *et al.* (2000) detalhados na tabela 3.

Tabela 3
Score Microscópico

Características		Pontuação
1. Destruição da arquitetura da mucosa	Normal	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Severa	3
2. Infiltração celular	Normal	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Severa	3
3. Presença de abscesso nas criptas	Ausente	0
	Presente	1
4. Espessamento da musculatura	Normal	0
	Leve	1
	Moderado	2
	Severo	3

Para analisar as células produtoras de muco nos cortes de cólon dos diferentes tratamentos experimentais, as lâminas coradas com PAS também foram aleatoriamente fotografadas, sendo obtido uma foto a cada 2 campo e um mínimo de 30 fotos examinadas por tratamento. A produção de muco no tecido foi estimada utilizando-se o programa ImageJ de domínio público (<http://imagej.nih.gov/ij/>), que calcula a área corada em relação a área total examinada e os resultados foram expressos em porcentagem de muco presente na área total de tecido de cada fotomicrografia.

5.8-Infiltração Celular no Tecido

A infiltração e/ou ativação de eosinófilos e neutrófilos no cólon foram indiretamente estimadas através da atividade enzimática em amostras de homogenato de cólon dos animais experimentais. Para eosinófilos, foi quantificada a atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO), conforme padronização de Strath (1985) detalhadamente descrita com modificações por Silveira *et al.* (2002), e para neutrófilos foi medida a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO), conforme descrito por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). Para estas análises, 100 mg de tecido da parte distal do colón de cada animal foi homogeneizado em 1 ml de tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases (0,01 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina A) utilizando um homogeneizador de tecido (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburg, PA). O homogenato resultante foi centrifugado (10.000 rpm por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante foi guardado a -70°C para posterior quantificação de citocinas, conforme detalhamento a seguir. As hemácias presentes no sedimento foram então lisadas através da adição de solução hipotônica (1,5 ml de solução de NaCl a 0,2 %) e, após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de igual volume (1,5 ml) de solução 1,6 % de cloreto de sódio contendo 5 % de glicose, foram divididos em partes iguais para o ensaio de EPO e de MPO e então foram centrifugados (10.000 rpm por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante foi descartado.

Para quantificar a atividade de EPO, o material foi ressuspensionado em PBS pH 7,4 contendo 0,5 % de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB), homogeneizado e submetido a congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes, com o objetivo de romper as vesículas que contêm peroxidase. As amostras foram, novamente centrifugadas (10.000 rpm por 15 min. A 4°C) e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático feito em placas de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, Inc. USA). Este ensaio constituiu da adição de 75 µl de cada amostra ou diluente (sem amostra) a 75 µl de solução de substrato (O-phenylenediamnadihydrochloride, OPD - 1,5 mM, em tampão Tris-HCl - 75 mM, pH 8 suplementado com H₂O₂ - 6,6 mM). Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de solução 1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sendo a intensidade colorimétrica estimada através da leitura da absorbância no leitor de ELISA em comprimento de onda de 492nm.

Para quantificar a atividade de MPO, o sedimento foi homogeneizado com 200

μL de solução contendo 0,1M de NaCl, 0,02M de Na_3PO_4 , e 0,015M de Na_2EDTA pH 4,7 e em seguida centrifugado (10.000 rpm por 10 min. A 4°C). O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspensionado em 800 μL de solução 0,05 M de Na_3PO_4 , pH 6,4 contendo 0,5% de HTAB. Após ser submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, para lise de vesículas, foi centrifugado (10.000 rpm por 15 min. a 4°C) e o sobrenadante utilizado em método colorimétrico para atividade de mieloperoxidase. Para tanto, 25 μL da amostra foram acrescentados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, inc. USA) contendo 25 μL de substrato composto por 1,6 mM de 3,3'-5,5'-tetramethylbenzine (TMB) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) seguindo-se à incubação a 37°C por 5 min. Após este período foram adicionados 100 μL de tampão de diluição (0,05 M de Na_3PO_4 , pH 6,4 contendo 0,5% de HTAB) acrescido de 0,5 mM H_2O_2 e o material foi incubado a 37°C por 5 min. A reação foi então parada por adição de 100 μL de solução 0,5 mM de H_2SO_4 e a absorbância estimada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm.

5.9 - Quantificação da concentração de citocinas no homogenato de cólon

A metade distal retirada do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais foi homogeneizada em tampão de extração de citocina, como descrito no item anterior. O tecido homogeneizado foi centrifugado a 10000g por 15 min. a 4°C , o sobrenadante foi estocado a -70°C para posterior teste de Imunoensaio Enzimático (ELISA). As concentrações de interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, gama interferon ($\text{INF-}\gamma$), *Transforming Growth Factor Beta* ($\text{TGF-}\beta$) e *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF) foram mensuradas através do kit de ELISA sanduíche para citocinas (R & D Systems) seguindo as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi estimada em leitor de EILSA (VersaMax , Molecular Devices) a 450 nm e a concentrações de citocina foi obtida por interpolação em curva padrão construída com valores conhecidos da proteína recombinante, utilizando o software SOFT max Pro 5.2 (Molecular Devices) e os resultados finais foram expressos em pg/mL.

5.10 - Análise estatística

Os dados com distribuição normal foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) e analisados utilizando o teste t de Student, quando comparado apenas dois grupos experimentais, ou de uma análise unidirecional da variância (ANOVA) para mais de dois grupos. Na última análise, os valores de P foram atribuídos utilizando o teste de comparação múltipla de Neuman-Keuls. Para os dados com distribuição não-normal, foi realizado o teste de Mann-Whitney não-paramétrico para comparar dois grupos experimentais; o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn para comparações múltiplas. Os valores $P > 0,05$ foram considerados significativos.

6 - RESULTADO

6.1 - Avaliação parasitológica

Para verificarmos se o tratamento com DSS interfere na infecção por *S. venezuelensis*, avaliamos o número de vermes adultos recuperados no intestino delgado e o número de ovos por gramas de fezes. Os resultados revelaram que não houve diferença estatística na recuperação de vermes no intestino delgado entre os animais infectados e infectados e tratados, sendo que aos 9 dias de infecção foram recuperados $19,9 \pm 9,3$ vermes no intestino dos camundongos somente infectado e $22,00 \pm 11,52$ vermes do intestino de camundongos infectados e tratados com DSS. Aos 12dpi/7dt, ambos os grupos não apresentaram vermes adultos no intestino delgado (Fig. 2A).

Além do número de vermes adultos recuperados, o tratamento por DSS também não alterou o número de ovos de *S. venezuelensis* eliminados nas fezes. O grupo apenas infectado apresentou uma média de 7.596 ± 2.901 de ovos em 100mg de fezes após 7dpi, reduzindo para 900 ± 247 aos 9dpi e 138 ± 65 aos 12dpi. Semelhantemente, o grupo infectado e tratado apresentou 9.137 ± 1.698 ovos em 100 mg de fezes aos 7dpi/2dt, caindo para 1.797 ± 290.8 aos 9dpi/4dt e 50.47 ± 44.85 aos 12dpi/7dt, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Fig. 2B).

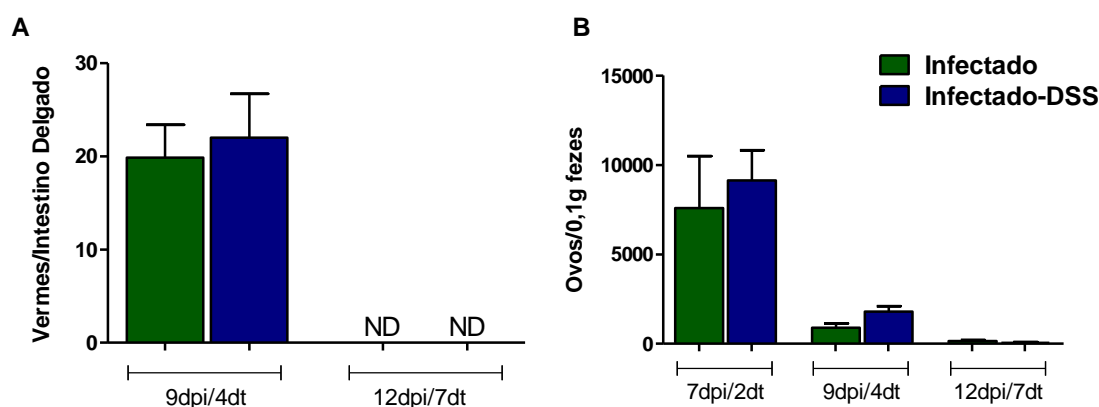


Figura 2. Número de vermes intestinais (A) e de ovos eliminados nas fezes (B) de camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* e em camundongos infectados pelo nematódeo e tratado com DSS. Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 700 L3 de *S. venezuelensis*, e após 5 dias da infecção iniciou-se o tratamento com 4% DSS diluído em água *ad libitum* ao grupo infectado e tratado com 4% DSS (infectado-DSS). (A) Número médio de vermes recuperados do intestino delgado dos grupos apenas infectado (infectado) e infectado-DSS aos 4 dias de tratamento (4dt) que correspondiam a 9 dias de infecção (4dt/9dpi) e aos 7dt/12dpi. (B) Contagem de ovos por 0,1 grama de fezes dos grupos Infectado e Infectado-DSS aos 2dt/7dpi, 4dt/9dpi e 7dt/12dpi. ND= Não detectado. Cada ponto representa média \pm erro padrão (SEM), n= 6 camundongos/grupo.

6.2 - Análise da colite ulcerativa induzida por DSS

Os animais que receberam tratamento com DSS apresentaram sinais clínicos de colite, como perda de peso, mudança na aparência geral, diarreia e sangramento retal. Esses parâmetros foram utilizados para pontuar a gravidade da colite, seguindo critérios apresentados na tabela 1, gerando o *score* clínico que reflete a gravidade das alterações clínicas. Aos 9dpi/4dt, a aparência geral dos animais do grupo controle e do grupo somente infectado com *S. venezuelensis* foi normal e não houve perda de peso. As fezes dos animais destes grupos experimentais também não apresentaram alterações. No grupo tratado com DSS 33,3 % dos animais apresentaram pelos arrepiados e fezes pastosas e o restante (66,7%) apresentaram fezes líquidas. Neste grupo experimental 66,7 % tiveram uma perda de peso de até 5% do peso inicial e em 16,6% dos animais a perda de peso foi de 6 a 10%, sendo que 16,7% deles ainda apresentaram sangramento retal. Neste mesmo período, todos os animais infectados e tratados com DSS apresentaram aparência normal, 66,7 % apresentaram fezes pastosas e os demais apresentaram fezes com aparência normal; com relação a perda de peso 16,7 % dos animais infectados e tratados tiveram perda de até 5% do peso inicial, 16,7% perderam

entre 6 a 10% do peso inicial e os demais não perderam peso, bem como não foi detectado sangramento retal nos animais deste grupo experimental. Baseado nesta análise foi possível verificar que a infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de reduzir significativamente o escore clínico da colite induzida por DSS, de $5,17 \pm 0,7$ nos animais apenas tratados com DSS para $1,83 \pm 0,4$ nos animais do grupo infectado por *S. venezuelensis* e tratado com DSS (Fig. 3A).

Aos 12dpi/7dt os animais dos grupos controle e infectado não apresentaram sinais clínicos da colite, ou seja, estavam com aparência normal, sem sangramento retal, fezes normais e não tiveram perda significativa de peso. Todos os animais do grupo DSS apresentaram pelos arrepiados; com relação à consistência das fezes, 66,6 % desses apresentaram fezes pastosas semi-formadas e 33,3% fezes líquidas. Neste grupo 66,6% dos animais apresentaram sangue visível no pelo e 16,66% sangue visível somente na região perianal. Além disso, 33,3% desses animais apresentaram perda de peso de até 5 % do peso inicial, 50% perderam de 6 a 10% e 16,66% de 11 a 20%. Já os animais do grupo infectado-DSS, 33,33 % apresentaram pelos arrepiados, 16,6 % sangue visível no pelo e todos os animais desse grupo apresentaram fezes pastosas; em relação à perda de peso 33,33% apresentaram perda de peso de até 5% do peso inicial, 33,33% sofreu perda de 6 a 10% e 33,33% perda de 11 a 20%. Dessa forma, nesse período analisado a infecção por *S. venezuelensis* também foi capaz de reduzir significativamente o *score* clínico da colite induzida por DSS de $7 \pm 0,6$ no grupo DSS para $4,66 \pm$ no grupo infectado-DSS (Fig. 3A). O único sinal da colite que a infecção por *S. venezuelensis* não foi capaz de reverter foi a perda de peso (Fig. 3B).

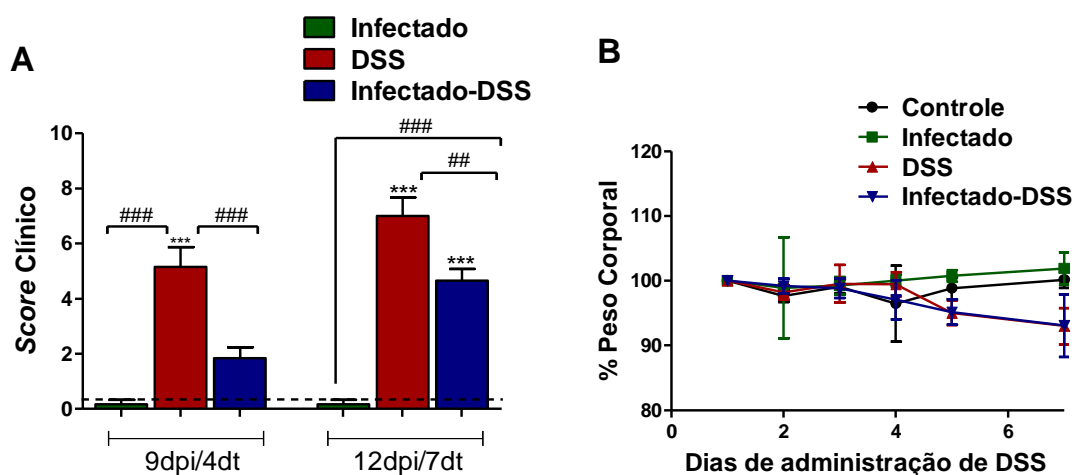


Figura 3. Evolução clínica da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos somente tratados com DSS e em camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS. (A) *Score* clínico da colite ulcerativa induzida pelo tratamento com DSS estimado de acordo com a tabela 1 para os grupos experimentais: camundongos BALB/c infectados com *S. venezuelensis* (grupo infectado); infectados e tratados (grupo infectado-DSS) aos 4 dias de tratamento (4dt) com 4% DSS que correspondiam a 9 dias de infecção (9dpi/4dt) e aos 12dpi/7dt; animais não infectados e tratados (grupo DSS) aos 4dt e aos 7dt; e não infectados e não tratados com DSS (grupo controle); representado pela linha pontilhada. (B) Perda de peso de todos os animais representada em porcentagem, onde o peso do dia 0 de tratamento é equivalente a 100%. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (SEM), $n = 6$ camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de P ; $*** P < 0,001$ e $** P < 0,01$ em comparação ao grupo controle; $## P < 0,01$ e $\# P < 0,05$ em comparação entre os demais grupos experimentais.

Outra característica clínica da colite ulcerativa é a redução do comprimento do cólon. Após 4 dias do início do tratamento com DSS, o comprimento médio do intestino de camundongos somente infectados foi de $11,21 \pm 0,5$ cm, enquanto que no grupo DSS foi de $10,21 \pm 0,3$ e no grupo infectado-DSS $10,71 \pm 0,6$ cm, não sendo observada diferença estatística entre eles (Fig 4A). Ao final do experimento (12dpi/7dt) os animais do grupo controle e do grupo somente infectado por *S. venezuelensis* também não houve alteração do comprimento do intestino grosso, momento em que o comprimento médio do intestino grosso foi de $11,20 \pm 0,3$ cm no grupo controle e de $11,92 \pm 0,25$ cm no grupo somente infectado por *S. venezuelensis*. Entretanto, os camundongos tratados com DSS apresentaram uma redução significativa do comprimento do cólon neste período, atingindo $8,92 \pm 0,2$ cm. A infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de prevenir o encurtamento do cólon, sendo verificado que colón dos camundongos tratado com DSS e infectado com *S. venezuelensis* mediu $11,33 \pm 0,18$ cm (Fig 4A).

A lesão intestinal induzida pelo tratamento com DSS propicia o aparecimento de aderências, pontos hemorrágicos, edemas e ulcerações que podem ser identificados macroscopicamente. As análises realizadas aos 9dpi/4dt não mostram alterações expressivas e não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Ao final do procedimento experimental (12dpi/7dt), o tratamento com DSS resultou em um *score* macroscópico de $4,6 \pm 2,3$. Mais uma vez a infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de minimizar as alterações macroscópicas observadas no intestino grosso após o tratamento com DSS, reduzindo o *score* macroscópico para $2,3 \pm 0,3$ no grupo infectado-DSS, diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Nesse período o grupo somente infectado apresentou poucas alterações macroscópicas e o grupo controle não apresentou lesões macroscópicas na mucosa do cólon (Fig 4B).

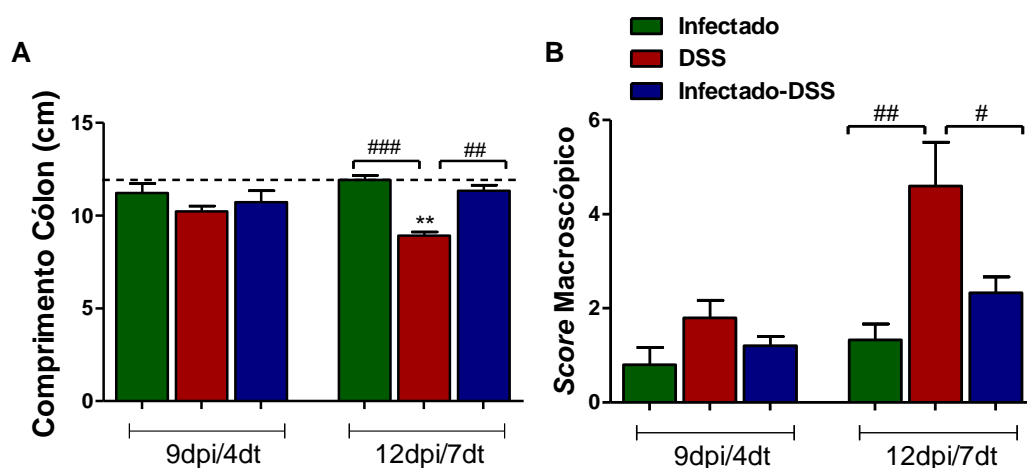


Figura 4 Comprimento total do colón (A) e alterações macroscópicas na mucosa intestinal (B) de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus controles. Grupo Infectado: Camundongos BALB/c infectados com 700 L3 de *S. venezuelensis* e examinados aos 9 e 12 dias após a infecção; Grupo DSS: Camundongos BALB/c sem infecção, que foram tratados com 4% de DSS em água entre o 5^o e 12^o dias do procedimento experimental e foram examinados após 4 e 7 dias do tratamento; Grupo infectado-DSS: Camundongos BALB/c infectados com 700 L3 de *S. venezuelensis* e após 5 dias da infecção foram tratados com 4% de DSS em água até o 12 dpi, sendo avaliados aos 9dpi/4dt e aos 12dpi/7dt; Grupo Controle: não infectados e não tratados com DSS, sendo representado pela linha pontilhada. (A) Comprimento do cólon em centímetros (cm) mensurada em cada grupos experimentais. (B) *Score* macroscópico das lesões do intestino grosso, estimado segundo a tabela 2; o grupo controle não obteve *score* macroscópico, não mostrado no gráfico. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (SEM), n= 6 camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de *P*; *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ em comparação ao grupo controle; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ em comparação entre os demais grupos experimentais.

6.3 – Análise histopatológica

Ao final do procedimento experimental (12dpi/7dt), a análise histopatológica confirmou que o tratamento com 4% de DSS foi efetivo na indução da colite ulcerativa, e que a infecção por *S. venezuelensis* foi capaz de amenizar esse processo. Inicialmente foram feitas análises histopatológicas de cortes do cólon proximal de animais de todos os grupos experimentais, sendo verificado que nos animais controles a mucosa do cólon encontra-se íntegra e sem infiltrado celular ou outras alterações aparentes (Fig. 5A). A infecção por *S. venezuelensis*, nematódeo que coloniza o intestino delgado do hospedeiro, não alterou significativamente a aparência da mucosa do cólon proximal (Fig. 5B). Nos animais tratados com DSS foi possível verificar áreas com deformação da arquitetura da mucosa e infiltração de células inflamatórias (Fig. 5C). Estas alterações não foram tão evidentes no cólon proximal dos camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS, não sendo verificadas áreas com intensa infiltração celular ou destruição da arquitetura tecidual (Fig. 5D).

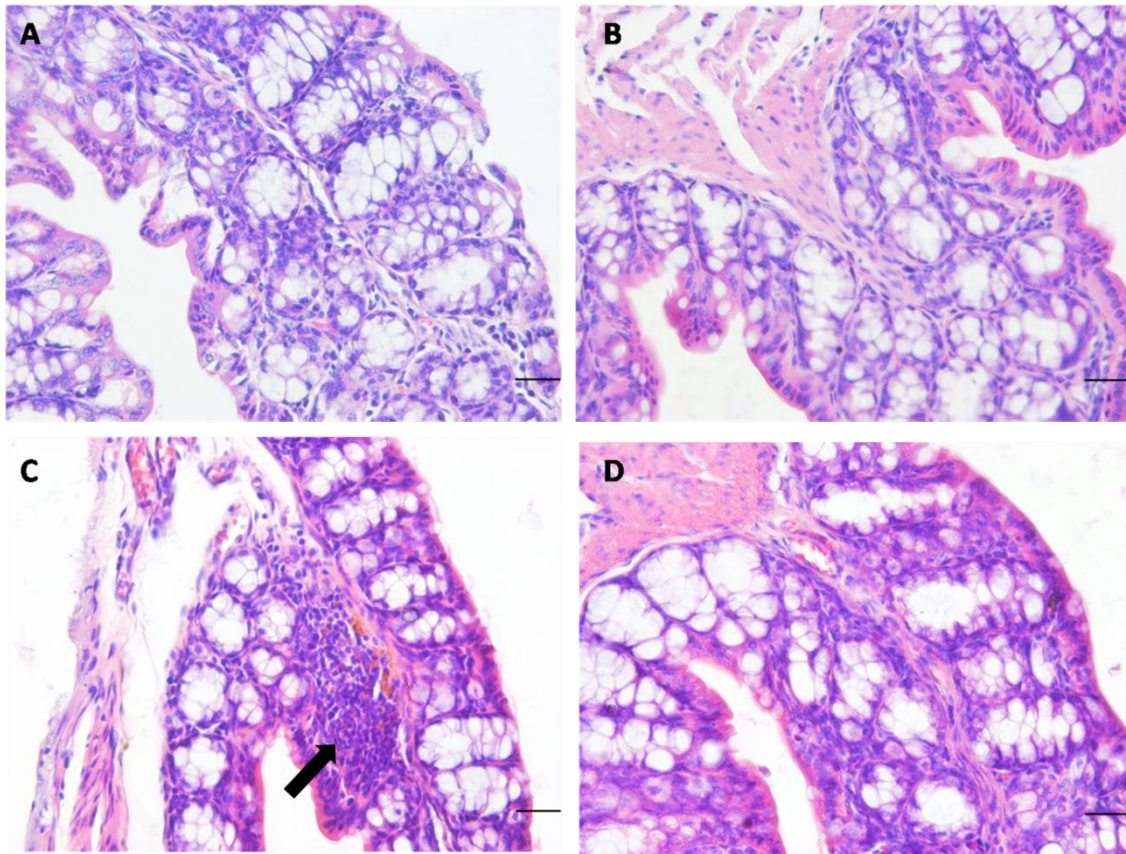


Figura 5. Aspecto microscópico do colón proximal de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus controles. Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H & E da região proximal do colón de (A) animais não infectados e não tratados (grupo controle); (B) animais infectados por 12 dias com *S. venezuelensis* (grupo infectado); (C) animais não infectados e tratados por 7 dias com 4% DSS (grupo DSS); (D) infectados e tratados com 4% DSS (grupo infectado-DSS). Camundongos BALB/c dos grupos experimentais ao final do procedimento experimental (7dt/12dpi), evidenciando a infiltração celular e destruição da arquitetura tecidual (seta) em C, aos 7 dias de tratamento com DSS. As barras de escala nas fotomicrografias A, B, C e D equivalem a 30µm de tecido.

Apesar da avaliação histopatológica da região proximal do cólon revelar que o tratamento com DSS induz um processo inflamatório lesivo, que foi modulado pela infecção por *S. venezuelensis*, as alterações observadas no cólon proximal não foram tão intensas. Desta forma, também foi analisado as alterações no cólon distal, que segundo Yan *et al.* (2009) corresponde a região mais afetada pelo tratamento com DSS.

A figura 6 ilustra o aspecto histopatológico da região distal do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais, corados em H&E. Mais uma vez é possível verificar que camundongos do grupo controle apresentam mucosa intestinal com arquitetura normal, com as criptas preservadas e sem infiltrado celular (Fig 6A) e os camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* apresentam características histológicas do cólon semelhante ao grupo controle (Fig 6B). Nos camundongos tratados com DSS, foi possível verificar muitas áreas de intensa infiltração de células inflamatórias na mucosa do cólon distal, erosão do epitélio intestinal e deformação da arquitetura normal do tecido, com presença de abscessos nas criptas, e espessamento da camada muscular (Fig 6C). As alterações histopatológicas induzidas pelo tratamento com DSS no cólon distal foram reduzidas nos camundongos do grupo infectado-DSS, sendo verificado menor infiltrado celular e poucas áreas de erosão do epitélio, preservando a arquitetura da mucosa intestinal na maior parte do tecido (Fig 6D). Essas alterações pontuadas de acordo com a tabela 3, gerando um *score* microscópico de $6.8 \pm 0,5$ no grupo apenas tratado com DSS, que reduziu significativamente para $5,2 \pm 0,4$ ($P < 0,05$) no grupo infectado-DSS. O *score* microscópico do grupo somente infectado foi de $1,2 \pm 0,3$ e não foram detectadas alterações no cólon distal dos camundongos do grupo controle (Fig. 6E).

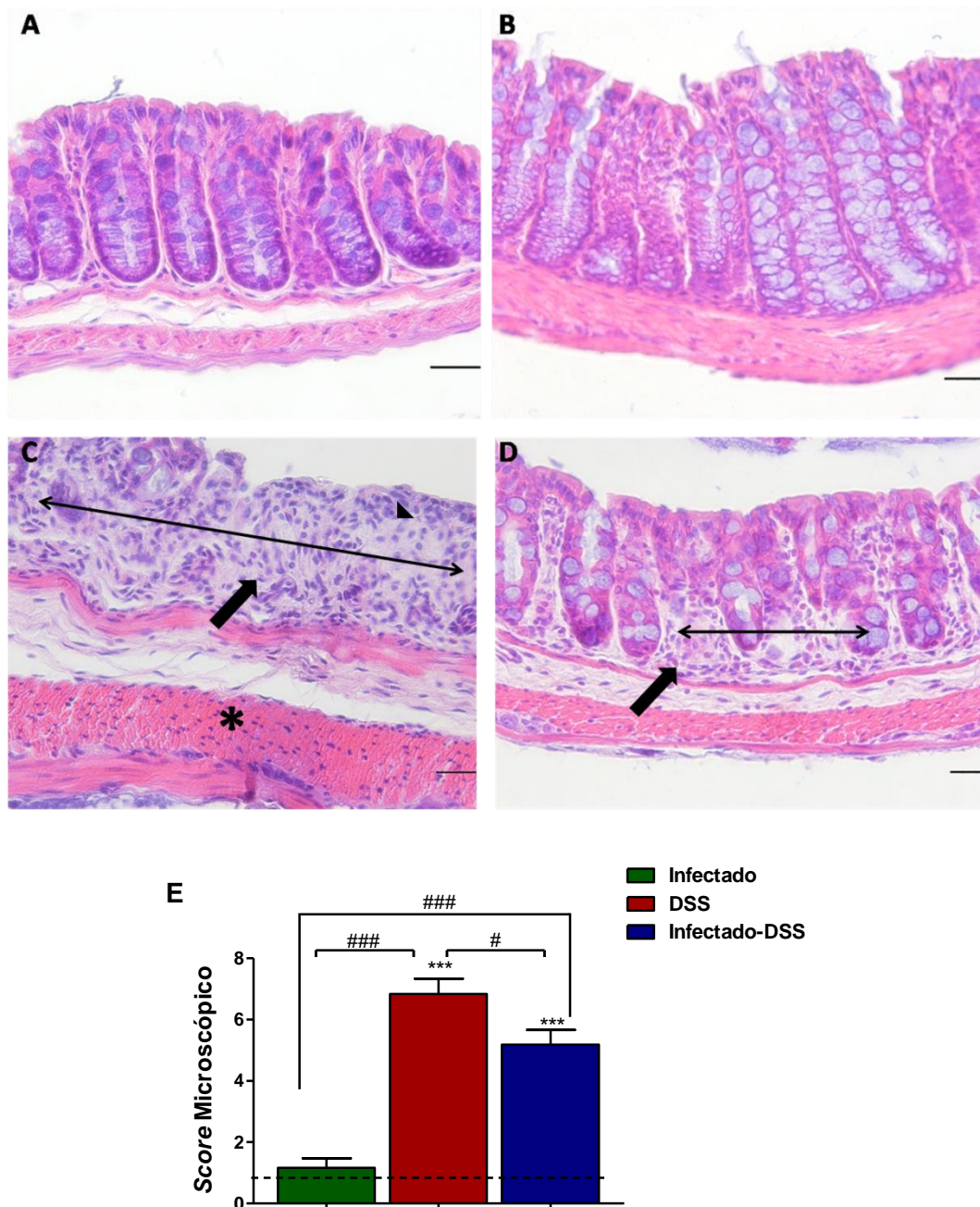


Figura 6. Aspecto microscópico do colón distal e score microscópico da inflamação em camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus controles. Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H & E da região distal do colón de camundongos BALB/c dos grupos experimentais ao final do procedimento experimental (7dt/12dpi), evidenciando a infiltração celular (seta) e destruição da arquitetura tecidual (seta dupla), erosão (cabeça de seta) e espessamento da camada muscular (asterisco) em C, aos 7 dias de tratamento com DSS. (A) animais não infectados e não tratados (grupo controle); (B) animais infectados por 12 dias com *S. venezuelensis* (grupo infectado); (C) animais não infectados e tratados por 7 dias com DSS (grupo DSS); (D) infectados e tratados com 4% DSS (grupo infectado-DSS). As barras de escala nas fotomicrografias A, B, C e D equivalem a 30µm de tecido. (E) Score microscópico da inflamação do colón nos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (SEM), n= 5 camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de P; *** P<0,001 em comparação ao grupo controle (grupo controle representado pela linha pontilhada); ### P<0,001 e # P<0,05 em comparação entre os demais grupos experimentais.

Como foi identificada lesão tecidual no cólon distal dos animais tratados com DSS, os cortes histológicos também foram corados com PAS para analisar a produção de muco na parte distal do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais. Através dessa coloração específica, na qual células produtoras de muco se coram fortemente de rosa, foi verificado que a mucosa do cólon de animais controles, sem infecção e tratamento, apresenta grande quantidade de células produtoras de muco (Fig.7A), padrão semelhante foi observado no colón de camundongos do grupo infectado (Fig.7B).Entretanto, a análise histológica do colón distal dos camundongos do grupo apenas tratado com DSS revelou várias áreas com perda de células produtoras de muco(Fig.7C). A infecção prévia por *S.venezuelensis* reduziu as áreas com perda de células produtoras de muco na mucosa do colón distal de camundongos do grupo infectado e tratado no período 7dt/12dpi (Fig.7D). Como as alterações na diferenciação de células produtoras de muco na mucosa do colón distal dos animais tratados com DSS concentra-se em focos inflamatórios, a perda células produtoras de muco foi quantificada através do programa ImageJ (Fig. 7E). A porcentagem de área ocupada por células produtoras de muco na mucosa do colón distal dos camundongos dos grupos infectado e infectado-DSS não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Fig. 7E). Por outro lado, o tratamento com DSS levou a uma redução significativa ($P<0,001$) na porcentagem de área de células produtoras na mucosa do colón distal destes animais, tanto em relação ao grupo controle como em relação ao grupo DSS-infectado. Os dados confirmam que o tratamento por DSS reduz a produção de muco no colón e que a infecção restaurou esta alteração.

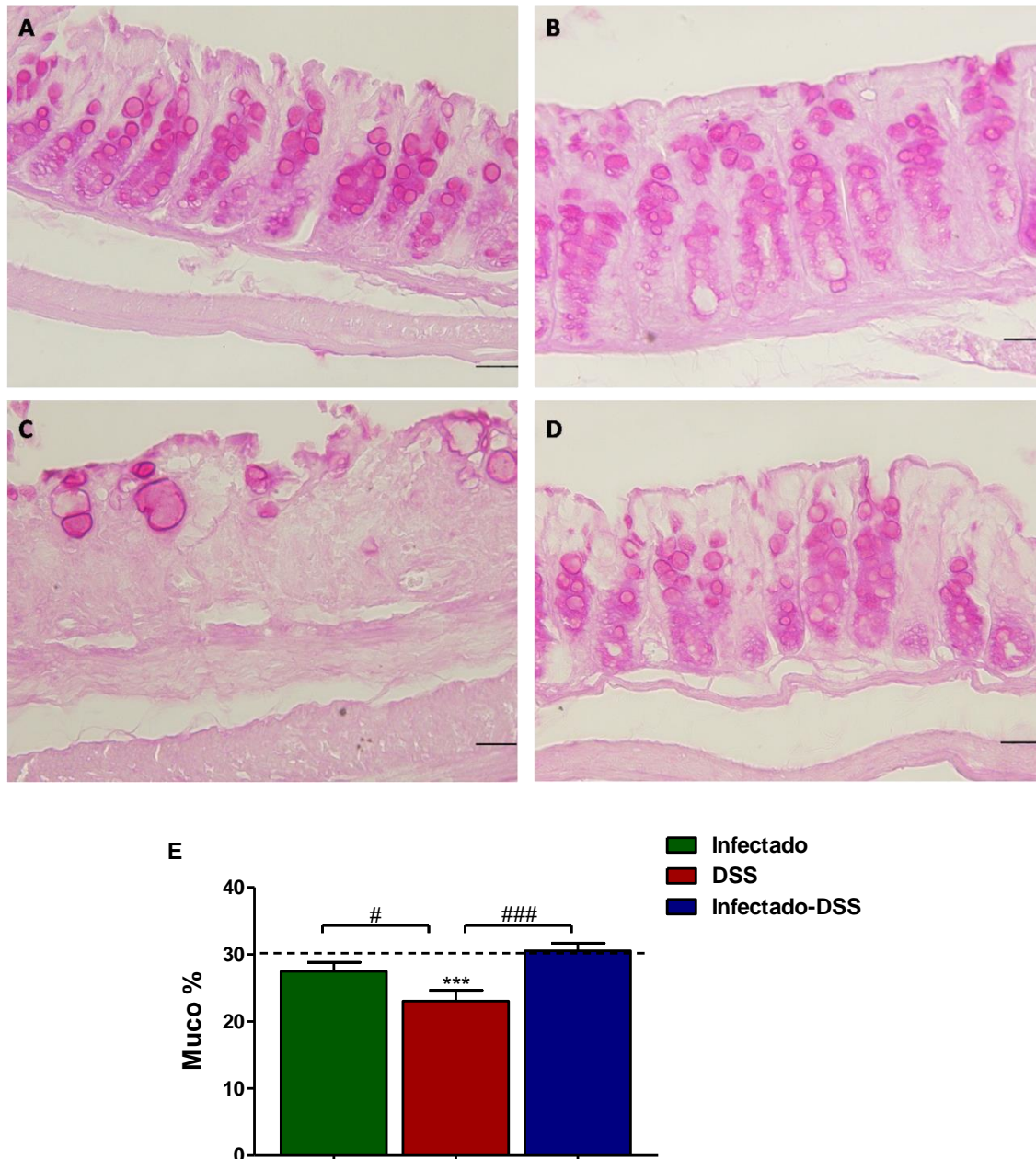


Figura 7. Análise da produção de muco na mucosa do cólon distal de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus controles. Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon distal de camundongos dos diferentes grupos experimentais corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) evidenciando a produção de muco (pontos púrpura-magenta) aos 7 dias de tratamento (7dt) que correspondiam a 12 dias de infecção (7dt/12dpi). (A) animais não infectados e não tratados (grupo controle); (B) animais infectados por *S. venezuelensis* e não tratados (grupo infectado); (C) não infectados e tratados com 4% DSS (grupo DSS); (D) infectados e tratados (grupo infectado-DSS). As barras de escala nas fotomicrografias A, B, C e D equivalem a 30μm de tecido. (E) Quantidade de muco no cólon dos grupos experimentais, expressa em porcentagem de muco presente na área total de tecido de cada fotomicrografia. Os dados do gráfico são apresentados como média ± erro padrão (SEM), n= 5 camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de *P*; *** *P*<0,001 em comparação ao grupo controle (grupo controle representado pela linha pontilhada); ### *P*<0,001 e # *P*<0,05 em comparação entre os demais grupos experimentais.

6.4.1 – Perfil Imunológico - Quantificação de citocinas no homogenato do cólon

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th-1 e Th-17 no homogenato do cólon apresentaram alterações no decorrer do tratamento com DSS. No início do tratamento com DSS (9dpi/4dt) houve grande aumento ($P < 0,001$) da concentração da citocina INF- γ no homogenato de intestino grosso dos camundongos do grupo apenas tratado com DSS em comparação aos grupos que não receberam tratamento com DSS, grupos controle e grupo infectado. De maneira interessante, a infecção por *S. venezuelensis* reduziu significativamente ($P < 0,01$) os níveis dessa citocina no grupo infectado-DSS. Aos 7dt/12dpi, a concentração de INF- γ no homogenato intestinal de todos os grupos experimentais foi semelhante ao do grupo controle, sendo verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) da concentração desta citocina no grupo tratado com DSS em relação ao grupo controle; entretanto não houve diferença nos demais grupos experimentais (Fig. 8A). Padrão de resposta semelhante foi observado com relação a concentração de IL-17, que mostra um aumento significativo no início do tratamento com DSS, que é modulado nos animais infectados e tratados (Fig. 8B). Não foi detectado diferenças significativas na concentração de TNF- α no homogenato intestinal dos diferentes grupos experimentais

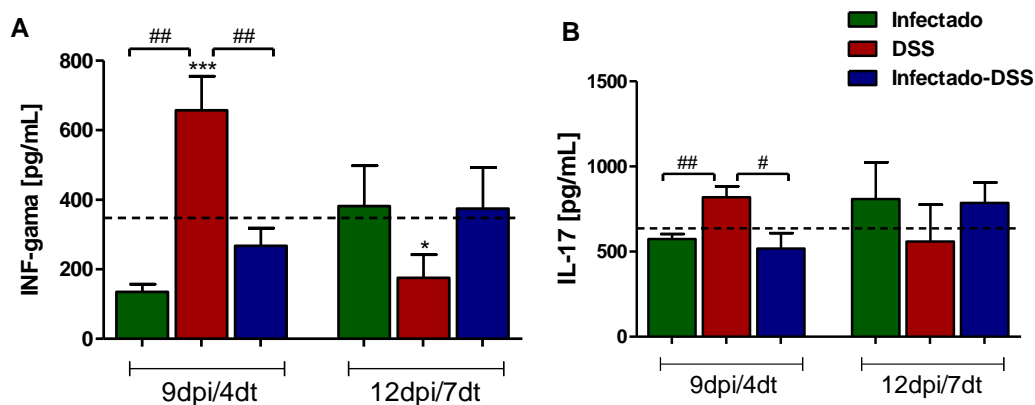


Figura 8. Concentração de citocinas pró-inflamatórias no homogenato do cólon de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles. A concentração de INF- γ (A) e IL-17 (B) foram estimadas por ELISA em amostras de homogenato do intestino grosso de camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* (grupo Infectado), camundongos somente tratados com DSS (grupo DSS) e camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS (grupo Infectado-DSS). A concentração das citocinas foi estimada em amostras de intestino grosso coletada aos 9 dias de infecção (9dpi) e/ou 4 dias de tratamento (4dt) com 4% DSS (9dpi/4dt) e aos 12dpi/7dt. A linha pontilhada representa a concentração de citocina obtida no homogenato intestinal de camundongos não infectados e não tratados (controle). Os dados dos gráficos são apresentados com média \pm erro padrão, $n = 6$ camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de P ; *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ na comparação entre os demais grupos experimentais.

Também foi quantificada a concentração de citocinas de perfil Th-2, como IL-4, IL-5 e IL-13, no homogenato do cólon. A concentração de IL-4 no homogenato intestinal dos animais infectados e/ou tratados com DSS foi estatisticamente superior que os controles não infectados. Aos 9dpi/4dt o grupo apenas tratado (DSS) apresentou níveis significativamente ($P < 0,05$) maiores de IL-4 em relação ao grupo infectado-DSS. O contrário foi observado aos 12dpi/7dt, onde o grupo infectado-DSS teve um aumento significativo ($P < 0,05$) de IL-4 em relação ao grupo apenas tratado (Fig. 9A). Em relação à concentração de IL-13, aos 9dpi/4dt foi verificado um aumento significativo da concentração de IL-13 no homogenato intestinal de camundongos dos grupos somente infectado ($P < 0,001$) e infectado-DSS ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle. A concentração de IL-13 no homogenato intestinal dos camundongos apenas tratados com DSS não foi significativamente maior que dos animais controle. No entanto, não houve diferenças estatísticas na concentração de IL-13 no homogenato intestinal dos diferentes grupos experimentais aos 12dpi/7dt (Fig 9B). Nos períodos examinados não

foi verificada diferença estatística na concentração de IL-5 no homogenato intestinal dos diferentes grupos experimentais.

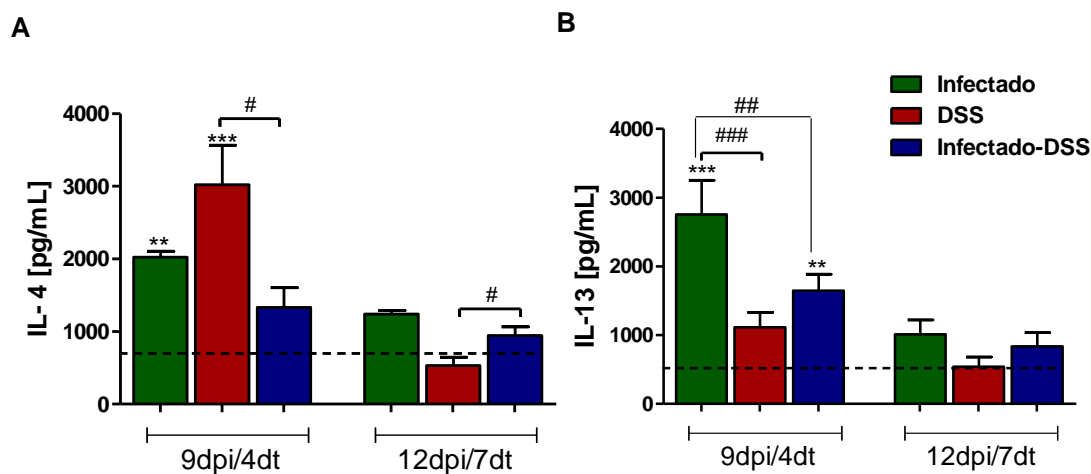


Figura 9. Concentração de citocinas do perfil Th-2 no homogenato do cólon de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles. A concentração de IL-4 (A) e IL-13 (B) foram estimadas por ELISA em amostras de homogenato do intestino grosso de camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* (grupo Infectado), camundongos somente tratados com DSS (grupo DSS) e camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS (grupo Infectado-DSS). A concentração das citocinas foi estimada em amostras de intestino grosso coletada aos 9 dias de infecção (9dpi) e/ou 4 dias de tratamento (4dt) com 4% DSS (9dpi/4dt) e aos 12dpi/7dt. A linha pontilhada representa a concentração de citocina obtida no homogenato intestinal de camundongos não infectados e não tratados (controle). Os dados dos gráficos são apresentados com média \pm erro padrão, $n = 6$ camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de P ; *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ em comparação ao grupo controle; ### $P < 0,001$ e # $P < 0,05$ na comparação entre os demais grupos experimentais.

Por fim, avaliamos os níveis de citocinas regulatórias no homogenato do cólon. Não houve diferenças significativas nos níveis de IL-10 aos 9dpi/4dt entre os grupos experimentais. Aos 12dpi/7dt o grupo apenas tratado reduziu significativamente ($P < 0,05$) os níveis de IL-10 em relação ao grupo controle, no entanto, o grupo infectado-DSS aumentou significativamente ($P < 0,05$) a produção dessa citocina em relação ao grupo DSS. O grupo infectado não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle e aos demais grupos experimentais nos níveis de IL-10 (Fig. 10A). Outra citocina regulatória avaliada no homogenato do cólon foi TGF- β . Os dados revelaram aumento significativo de TGF- β no grupo infectado em relação aos outros grupos aos 9dpi/4dt. Já aos 12dpi/7dt não houve diferenças significativas entre todos os grupos experimentais (10B).

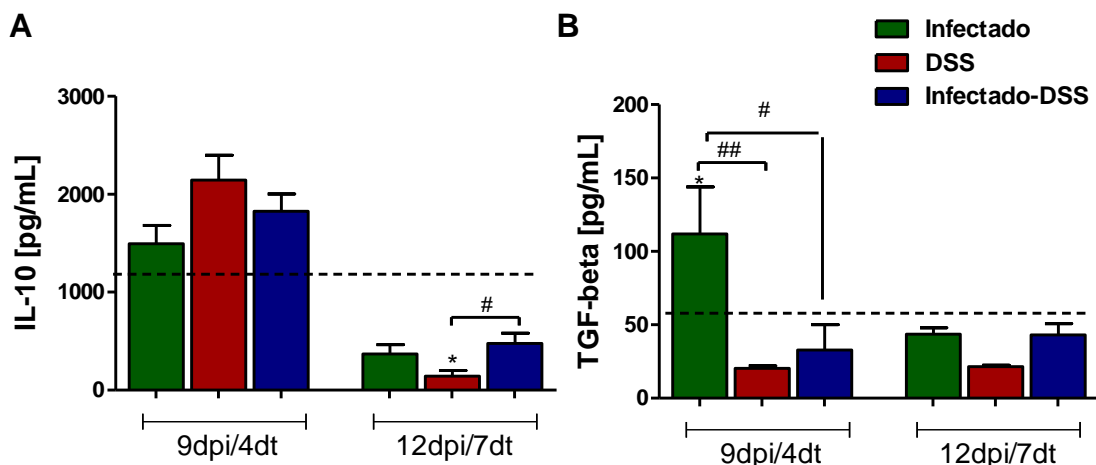


Figura 10. Concentração de citocinas regulatórias no homogenato do cólon de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles. A concentração de IL-10 (A) e TGF- β (B) foram estimadas por ELISA em amostras de homogenato do intestino grosso de camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* (grupo Infectado), camundongos somente tratados com DSS (grupo DSS) e camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS (grupo Infectado-DSS). A concentração das citocinas foi estimada em amostras de intestino grosso coletada aos 9 dias de infecção (9dpi) e/ou 4 dias de tratamento (4dt) com 4% DSS (9dpi/4dt) e aos 12dpi/7dt. A linha pontilhada representa a concentração de citocina obtida no homogenato intestinal de camundongos não infectados e não tratados (controle). Os dados dos gráficos são apresentados com média \pm erro padrão, $n = 6$ camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de $*P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; $## P < 0,01$ e $\# P < 0,05$ na comparação entre os demais grupos experimentais.

6.4.1 – Perfil Imunológico – Infiltração celular no homogenato do cólon

Para qualificar o tipo de infiltrado celular na mucosa do intestino grosso foi estimada a atividade de Eosinófilo Peroxidase (EPO) e Mieloperoxidase (MPO), como medidas indiretas da infiltração/ativação de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente. Aos 9dpi/7dt os níveis de EPO do grupo apenas tratado com 4%DSS foram significativamente ($P < 0,001$) maiores do que os grupos controle e infectado-tratado, e maior ($P < 0,01$) do que o grupo infectado. Já aos 12dpi/7dt, os níveis de EPO no grupo tratado com DSS foram estatisticamente maiores em relação ao grupo infectado ($P < 0,001$), mas não houve diferença estatística em relação aos grupos controle e infectado-DSS. Nesse período, os níveis de EPO foram significativamente ($P < 0,05$) menores no grupo infectado em relação ao grupo controle (Fig. 11A).

Em relação aos níveis de MPO, tanto no experimento realizado aos 9dpi/4dt e o realizado aos 12dpi/7dt, o grupo apenas tratado com DSS teve níveis significativamente aumentados em relação a todos os outros grupos experimentais. Não houve diferenças

significativas entre os grupos infectado e infectado-DSS, e entre esses e o grupo controle nos dois períodos analisados (Fig. 11B).

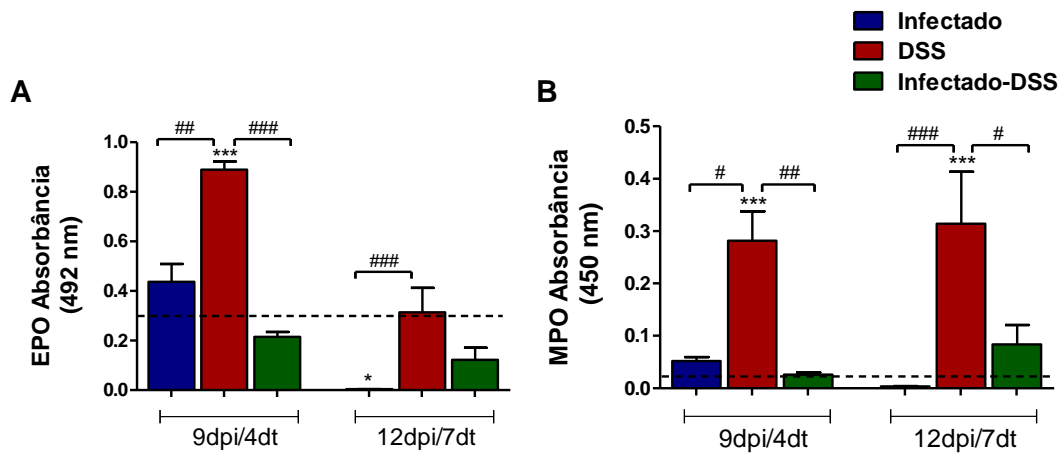


Figura 11. Estimativa de peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO) no homogenato do cólon de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e/ou tratados com DSS e seus respectivos controles. A concentração de EPO (A) e MPO (B) foi estimada por teste colorimétrico em amostras de homogenato do cólon de camundongos somente infectados por *S. venezuelensis* (grupo Infetado), camundongos somente tratados com DSS (grupo DSS) e camundongos infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS (grupo Infectado-DSS). A concentração de EPO e MPO foi estimada em amostras de intestino grosso coletada aos 9 dias de infecção (9dpi) e/ou 4 dias de tratamento (4dt) com 4% DSS (9dpi/4dt) e aos 12dpi/7dt. A linha pontilhada representa a concentração de EPO ou MPO de camundongos não infectados e não tratados (controle). Os dados dos gráficos são apresentados com média \pm erro padrão, $n = 6$ camundongos/grupo. As diferenças estatísticas são indicadas em cada gráfico com valores significativos de P ; *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ em comparação ao grupo controle; ### $P < 0,001$; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ em comparação entre os demais grupos experimentais.

7 - DISCUSSÃO

Trabalhos prévios têm demonstrado a influência da infecção por helmintos nas doenças inflamatórias intestinais (Whelan *et al.* 2012). Neste estudo investigamos se a progressão da colite ulcerativa pode ser modulada pela infecção prévia e aguda por *S. venezuelensis* e as possíveis alterações imunológicas que poderiam estar associadas ao mecanismo de modulação neste modelo experimental.

Esse é o primeiro trabalho que avalia o papel da infecção por *S. venezuelensis* na colite experimentalmente induzida por DSS em camundongos. Acreditamos que este modelo permita avaliar aspectos antes não avaliados, pois camundongos são susceptíveis a infecção experimental, o parasito ocupa um nicho distinto das principais alterações induzidas pela colite ulcerativa e, principalmente, a infecção por *S. venezuelensis* não cronifica no camundongo.

A infecção prévia por *S. venezuelensis* reduziu os sinais clínicos da colite ulcerativa, preveniu o encurtamento do cólon e as lesões da mucosa do cólon no decorrer do tratamento. Esses dados sugerem que a infecção prévia desse helminto ameniza a morbidade causada pela colite ulcerativa. Outros trabalhos mostraram que infecções por helmintos como *Trichinella spiralis* (Khan *et al.* 2002), *Trichuris muris* (Wilson *et al.* 2011), *Acanthocheilonema viteae* (Schnoeller *et al.* 2008), *Anisakis simplex* (Cho *et al.* 2011), *Ancylostoma caninum* (Ruyssers *et al.* 2009), *Ancylostoma ceylanicum* (Cançado *et al.* 2011), *Heligmosomoides polygyrus* (Elliot *et al.* 2004, 2008; Hang *et al.* 2010) ou seus extratos tiveram efeitos protetor ou preventivos na evolução da colite ulcerativa.

O efeito protetor da infecção por *S. venezuelensis* na evolução da colite ulcerativa também foi observado microscopicamente, uma vez que o intestino grosso dos camundongos do grupo infectado-DSS apresentou poucas áreas de erosão do epitélio intestinal e de perda da arquitetura de criptas intestinal, a infiltração celular na mucosa foi menor e não foi verificado o espessamento da musculatura em comparação com o observado em camundongos grupo apenas tratado com DSS. Dados semelhantes foram observados em outros trabalhos, onde o tratamento com extratos de verme (AW) de *A. ceylanicum*, e antígenos excreta/secretado (ES) de *T. spiralis* levaram a redução dos danos histológicos do cólon causados pelo tratamento com DSS (Cançado *et al.* 2011; Yang *et al.* 2014). Coerentemente com a literatura, nesse trabalho o cólon distal dos grupos tratados com DSS apresentou-se com mais danos do que o cólon proximal

(Yan et al. 2009). Além de afetar a arquitetura da mucosa do cólon, o tratamento com DSS também resultou em depleção de células caliciformes e conseqüentemente houve menor produção de muco. Resultados semelhantes foram anteriormente verificados por Leonel *et al.* (2012) e Soufli *et al.* (2015) que relataram que a o tratamento com DSS levou a depleção de células caliciformes. Mais uma vez a infecção aguda por *S. venezuelensis* reduziu a intensidade de redução de produção de muco. Em concordância com os nossos dados, Soufli *et al.* (2015) revelaram que a inoculação de antígenos da vesícula de cisto hidático de *E. granulosus* também levou a redução da depleção de células caliciformes induzida pelo tratamento com DSS. A manutenção da produção de muco no cólon dos animais infectados por *S. venezuelensis* e tratados com DSS é possivelmente um fator de proteção contra danos causados pelo tratamento com DSS.

Uma das causas das doenças inflamatórias do intestino é uma resposta imune exacerbada à microbiota local e o conseqüente desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Round *et al.* 2009). Nesse estudo, a melhora clínica da colite ulcerativa no grupo infectado-DSS foi acompanhada da redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias INF- γ e IL-17, bem como de IL-4, na mucosa do intestino grosso no início do desencadeamento do processo inflamatório em relação ao grupo apenas tratado. Neste período não foi verificadas diferenças estatísticas nos níveis de TNF- α , IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β . Aos 12dpi/7dt, momento em que colite ulcerativa está bem estabelecida e o nematódeo já foram eliminados, a melhora clínica no grupo infectado-DSS foi acompanhada de um aumento da concentração local de IL-4 e de IL-10 em relação ao grupo apenas tratado, não sendo verificada diferença significativa nos níveis de IL-5, IL-13, TGF- β , INF- γ e IL-17 entre esses dois grupos. Portanto, a melhora clínica observada na colite induzida por DSS induzida pela infecção previa por *S. venezuelensis* pode estar relacionada ao balanço entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, sendo verificada uma supressão inicial de citocinas pró-inflamatórias no pico da infecção pelo nematódeo e no começo da colite aguda, e posteriormente aumento de citocinas Th-2 e T-reg, quando a colite aguda já está completamente estabelecida e não há presença do verme. Estudos anteriores mostraram proteção aos sinais clínicos da colite induzida por DSS em camundongos tratados com extratos de *A. ceylanicum* ou *T. spiralis*, essa proteção foi associada à diminuição dos níveis de citocinas Th-1 e Th-17 no cólon, mas não houve aumento de citocinas Th-2, no entanto no tratamento com *T. spiralis* houve o aumento de IL-4 e IL-13 no baço e linfonodos mesentéricos e aumento de citocinas T-reg no cólon (Cançado *et al.* 2011;

Yang *et al.* 2014). Em outros trabalhos com nematódeos prevenindo ou curando a colite induzida por TNBS e DNBS, ou em camundongos IL-10 ^{-/-} essa prevenção foi associada ao aumento de citocinas de perfil Th-2, IL-4 e IL-13, além de citocinas T-reg, IL-10 e TGF- β , e diminuição de citocinas Th-1, INF- γ , TNF- α , IL-12p40 e IL-6 (Khan *et al.* 2002, Elliott *et al.* 2004; Setiawan *et al.* 2007; Sutton *et al.* 2008, Motomura *et al.* 2009, Du *et al.* 2011).

É importante salientar que a caracterização da resposta imune na doença de Crohn tem um perfil predominante de Th-1, sendo relatado que células da mucosa do cólon de pacientes com doença de Crohn tiveram níveis aumentados de citocinas IL-2 e INF- γ . Entretanto, a resposta imune relacionada com colite ulcerativa, tanto em pacientes, como no modelo experimental, não é claramente estabelecida. Pacientes com colite ulcerativa apresentaram elevados níveis de IL-5 e IL-13, mas sem alteração significativa de citocinas do perfil Th-1 (Breese *et al.* 1993; Fuss *et al.* 1996; Fuss *et al.* 2004). Fuss e colaboradores (2004) estipularam que a colite ulcerativa poderia ter uma resposta Th-2 atípica, uma vez que células Natural Killer T humanas, estimuladas com LPS, produziam IL-13 e apresentaram potencial citotóxico para células epiteliais. Mais recentemente, a colite ulcerativa foi relacionada a um perfil de células Th-17 (Kobayashi *et al.* 2008). De fato, pacientes com colite ulcerativa apresentam níveis aumentados de IL-13 e IL-17 no soro e uma correlação positiva entre os níveis séricos de IL-17 e a gravidade da doença (Boldeanu *et al.* 2014). Estes dados sugerem que na colite ulcerativa humana, bem como no modelo experimental induzido pelo tratamento com DSS em camundongos, a gravidade da doença não está associada exclusivamente ao perfil Th1 e/ou Th-17, sendo compatível com os nossos resultados.

Coerentemente com a redução da inflamação tecidual observada nas análises histológicas, o grupo infectado-DSS apresentou menores níveis de atividade de EPO aos 9dpi/4dt, e de MPO aos 4dt/9dpi e 7dt/12dpi em relação ao grupo apenas tratado com 4% de DSS, sugerindo que a infecção reduziu a infiltração de eosinófilos e neutrófilos, corroborando com efeito protetor da infecção por *S. venezuelensis* no processo inflamatório do cólon induzido por DSS. Essa menor atividade de EPO no colón dos camundongos infectados e tratados com DSS pode estar relacionada com o fato do parasito induzir o recrutamento de eosinófilos para o intestino delgado. Além disso, o balanço de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias induzido pela infecção pode ter levado ao menor recrutamento de eosinófilos e neutrófilos para o intestino grosso. Na literatura, a regulação, através de IL-10, do recrutamento de eosinófilos foi visto por

Wilson *et al.* (2011), em que camundongos re-infectados com *S. mansoni* e tratados com anti IL-10R tiveram aumento no número de eosinófilos circulantes. IL-10 também é importante na regulação de neutrófilos, uma vez que, a ausência dessa citocina em camundongos IL-10^{-/-} resultou em aumento de infiltração patológica de neutrófilos no cérebro de animais infectados com citomegalovírus (Mutnal *et al.* 2010).

Semelhante aos nossos dados, Caçado *et al.* (2011), mostrou que a inoculação intraperitoneal de AW de *A. ceylanicum* diminuiu os níveis de EPO no homogenato do cólon de camundongos tratados com DSS. Dados semelhantes para MPO foram obtidos em estudos que utilizaram antígenos de *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *T. spiralis* (Ruysers *et al.* 2009; Caçado *et al.* 2011 e Yang *et al.* 2014), onde a inoculação do extrato desses helmintos reduziram os níveis de MPO no homogenato do cólon de animais tratados com DSS.

Em humanos, a colite ulcerativa induz maiores níveis de EPO no fluido de perfusão colorretal (Carlson *et al.* 1999) e nos eosinófilos de sangue periférico (Coppi *et al.* 2007). O acúmulo da atividade de EPO é de suma importância na indução da colite por DSS, visto que a retirada dessa enzima por manipulação genética ou por supressores em modelo murino suprime essa inflamação intestinal (Forbes *et al.* 2004). Vieira e colaboradores (2009) relataram que camundongos deficientes na maturação de eosinófilos ($\Delta db1GATA$) desenvolvem colite induzida por DSS menos grave em relação à camundongos selvagens. Nesse trabalho foi visto ainda que a transferência de leucócitos da medula óssea, de camundongos selvagens para camundongos $\Delta db1GATA$, agravou o desenvolvimento de colite, o que foi acompanhado do aumento do nível de EPO no cólon. Modelos murinos de colite ulcerativa induzida por DSS e TNBS também evidenciaram a infiltração de neutrófilos através da atividade de MPO, sendo que na colite ulcerativa aguda os níveis de MPO foram maiores do que na crônica (Alex *et al.* 2009).

Esse trabalho mostra que a infecção por *S. venezuelensis* induziu efeitos protetores que modulou a colite ulcerativa induzida por DSS e que a melhora clínica observada é resultado da supressão de citocinas pró-inflamatórias no pico da infecção e posteriormente a um aumento de citocinas anti-inflamatórias no período quando a inflamação intestinal esta bem estabelecida. Estudos, como o nosso, investigando o papel da resposta imune associada à interação entre helmintos e os mecanismos inflamatórios de doenças intestinais podem ser relevantes na busca de medidas

terapêuticas visando a melhora clínica e a redução da morbidade crônica dessas doenças.

8 - CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que: i) o tratamento com DSS não afeta a susceptibilidade do camundongo à infecção experimental por *S. venezuelensis*; ii) a infecção aguda por *S. venezuelensis* reduziu significativamente o *score* clínico da colite induzida por tratamento com DSS, reduzindo diarreia e sangramento retal; iii) a infecção aguda por *S. venezuelensis* modulou a intensidade da inflamação da mucosa do cólon distal induzida por tratamento com DSS, preveniu o encurtamento do intestino grosso e a perda da diferenciação de células produtoras de muco; iv) A infecção modulou a produção local de IFN- γ , IL-17 e IL-4 no início do tratamento com DSS, e posteriormente induziu aumento de IL-10 e IL-4 reduzindo a infiltração de eosinófilos e neutrófilos no tecido.

Esses dados confirmam que a infecção prévia por *S. venezuelensis* mesmo sendo aguda, previne a colite induzida por DSS em camundongos BALB/c, possivelmente através de um balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, resultando em menor recrutamento e ativação de granulócitos no cólon.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, ML 1987. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. *Canadian Journal of Zoology*:65 1478-1482.
- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin L S, Centola M, LI X. 2009. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBSinduced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 15: 341–352
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JrJF, Stadecker M.J, Gause WC 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews*: 7 975-987.
- Baek BK, Islam MK, Kim BS, Lim CW, Hur J, Oluoch AO, Kim CH, Kakoma I 2003. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Veterinary Parasitology*: 113(3-4) 217-27
- BaileyPJ 1988. Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*: 162 327-334.
- Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD Andrade, S.P.; Teixeira, M.M 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*: 78(2) 352-358.
- Ben-Youssef R, Baron P, Edson F, Raghavan R, Okechukwu O 2005. Strongyloides stercoralis infection from pancreas allograft: case report. *Transplantation*: 80 997–998.
- Berezhnaia VG, Prokhorov AF, Semiashkina LR 1991. The characteristics of the development of different geographical strains of *Strongyloides stercoralis* in a fecal culture. *Meditinskaiia parazitologiiia i parazitarnye bolezni*:2 26-8.
- Bernstein CN, Nugent Z, Longobardi T, Blanchard JF 2009. Isotretinoin is not associated with inflammatory bowel disease: a population-based case-control study. *The American Journal of Gastroenterology*: 104 2774-2778.
- Blankenhaus B, Klemm U, Eschbach ML, Sparwasser T, Huehn J, KühlAA, Loddenkemper C, Jacobs T, Breloer M 2011. *Strongyloides ratti* Infection Induces Expansion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells That Interfere with Immune Response and Parasite Clearance in BALB/c Mice. *The Journal of immunology*: 186 4295-305.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*: 392 71-75.
- Boldeanu MV, Siloși I, Ghiluiși M, Cojocaru M, Biciușcă V, Avrămescu CS, Cojocaru IM, Ciurea T, Albu DF, Siloși CA 2014. Investigation of inflammatory activity in ulcerative colitis. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*: 55(4) 1345–1351.

Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, Macdonald TT 1993. Interleukin-2- and interferon- γ -secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology*: 78 127-131.

Brenner Z, Chaia G 1960. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*: 20 447-451.

Cançado GG, Fiuza JA, de Paiva NC, Lemos Lde C, Ricci ND, Gazzinelli-Guimarães PH, Martins VG, Bartholomeu DC, Negrão-Corrêa DA, Carneiro CM, Fujiwara RT 2011. Hookworm products ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Inflammatory Bowel Diseases*: 17(11) 2275-86.

Carlson M, Raab Y, Peterson C, Hällgren R, Venge P 1999. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. *The American Journal of Gastroenterology*: 94 1876-83.

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 2009. Increased susceptibility to *Strongyloides venezuelensis* in mice due to *Mycobacterium bovis* co-infection which modulates production of Th2 cytokines. *Parasitology*: 136 1357-65.

Chan MS 1997. The global burden of intestinal nematode infections – fifty years on. *Parasitology Today*: 13 428-43.

Chang CH, Grahan GL 1957. Parasitism, parthenogenesis and polyploidy: The life cycle of *Strongyloides papillosus*. *Journal of Parasitology*: 43 13.

Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, Jack RS, Wunderlich FT, Brüning JC, Müller W, Rudensky AY 2011. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*: 34 566-78.

Cho MK, Lee CH, Yu HS 2011. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2. *Parasite Immunology*: 33 265–275.

Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK. 2005. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*: 308 1463-5

Concha R, Harrington WJr, Rogers AI 2005. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. *Journal of Clinical Gastroenterology*: 39 203-211.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation*: 69 238–249.

Coppi LC, Thomazzi SM, DE Ayrizono ML, Coy CS, Fagundes WJ, Goes JR, Franchi GC, Nowill AE, Montes CG, Antunes E, Ferraz JG 2007. Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*: 13211–218.

Costa-Cruz JM 2003. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP (Org.). *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo, p. 247-256.

Csermely L, Jaafar H, Kristensen J, Castella A, Gorka W, Chebli AA, Trab F, Alizadeh H, Hunyady B 2006. *Strongyloides* hyper-infection causing life-threatening gastrointestinal bleeding. *World journal of gastroenterology*: 12 6401–6404

Damião AOMC, Habr-Gama A 1993. Retocolite ulcerativa idiopática. In: Dani R, Castro LP. *Gastroenterologia clínica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;. p. 1037-76.

Danese S, Fiocchi C 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*: 12 4807–4812.

Dawkins HJS, Robertson TA, Papadimitriou JM, Grove DI 1983. Light and electron microscopical studies of location of *Strongyloides ratti* in mouse intestine. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*: 69 357-370.

Dawkins HJS 1989. *Strongyloides ratti* infections in rodents: Value and limitations as model of human strongyloidiasis. In *Strongyloidiasis: A major roundworm infection of man*, Taylor & Francis, Philadelphia, p. 287-332.

Dias AT, de Castro SB, Alves CC, Rezende AB, Rodrigues MF, Machado RR, Fernandes A, Negrão-Corrêa D, Teixeira HC, Ferreira AP 2011. Lower production of IL-17A and increased susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfecting with *Strongyloides venezuelensis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*: 106 617-9.

Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical & Experimental Immunology*: 114385-91.

Ding Y, Liang Y, Deng B, Qiao A, Wu K, Xiao W, Gong W 2014. Induction of TGF- β and IL-10 production in dendritic cells using astilbin to inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 446(2) 529-34.

Du L, Tang H, Ma Z, Xu J, Gao W, Chen J, Gan W, Zhang Z, Yu X, Zhou X, Hu X 2011. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*: 56(10) 2810-7

Elliott DE, Urban JJ, Argo CK, Weinstock JV 2000. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB Journal*: 14 1848–1855.

Elliott DE, Li J, Blum A, Metwali A, Qadir K, Urban JF Jr, Weinstock JV 2003. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS induced colitis. *American journal of physiology*: 284 G385-91.

Elliott DE, Setiawan T, Metwali A, Blum A, Urban JF JR, Weinstock JV 2004. *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice. *European Journal of Immunology* : 34(10) 2690–2698.

Elliott DE, Metwali A, Leung J, Setiawan T, Blum AM, Ince MN, Bazzone LE, Stadecker MJ, Urban JF JR, Weinstock JV 2008. Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *Journal of Immunology*: 181(4) 2414–2419.

Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(±)CD25(±) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 201: 737–746.

Fernandes A, Pereira ATM, Eschenazi PD, Schilter HC, Souza AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2008. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. *Parasite Immunology*: 30 139-149.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JR Jr 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annual Review of Immunology*: 15 505-533.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JFJR 2004. Interleukin-4 and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunology*: 201 139-155.

Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei K I, Lee J J, Lee N A, Foster P S, Hogan S P 2004. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *Journal of Immunology*: 1725664–5675.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of

IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *The Journal Immunology*:157 1261–1270.

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation*: 1131490–1497.

Genta, RM. Strongyloidiasis. In: Guerrant, RL 2005. Tropical Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier: 1274-1282.

Glinz D, Silué KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, Rinaldi L, Cringoli G, N'Goran EK, Utzinger J 2010. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 4(7) e754.

Graham, GL 1938. Studies on Strongyloides. III. The Fecundity of Single *S. ratti* of Homogonic Origin. *The Journal of Parasitology*:24 233-243.

Grove DI, Northern C 1989. Dissociation of the protective immune response in the mouse to *Strongyloides ratti*. *Journal of Helminthology*: 63 307-314

Grove DI 1996. Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*: 38 251-309.

Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G 2003. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124: 1767–1773.

Hall LJ, Faivre E, Quinlan A, Shanahan F, Nally K, Melgar S 2011. Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Digestive diseases and sciences*: 56(1) 79-89

Hang L, Setiawan T, Blum AM, Urban J, Stoyanoff K, Arihiro S, Reinecker HC, Weinstock JV 2010. *Heligmosomoides polygyrus* infection can inhibit colitis through direct interaction with innate immunity. *Journal of Immunology*: 185 3184–3189.

Harvey SC, Vivey ME 2001. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics*: 158 1527-1533.

Hasegawa, H.; Orido, Y.; Sato, Y.; Otsuru, M 1988. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*: 37 429-434.

Hays R, Esterman A, Giacomini P, Loukas A, McDermott R 2015. Does *Strongyloides stercoralis* infection protect against type 2 diabetes in humans? Evidence from Australian Aboriginal adults. *Diabetes research and clinical practice*: 107 355-61.

Heylen M, Ruysers NE, De Man JG, Timmermans JP, Pelckmans PA, Moreels TG, De Winter BY 2014. Worm proteins of *Schistosoma mansoni* reduce the severity of experimental chronic colitis in mice by suppressing colonic proinflammatory immune responses. *Plos One*: 9(10) e110002.

Hotez PJ, Brindley P, Bethony J, King CH, Pearce E, Jacobson J 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*: 118 1311-21.

Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *The Journal of Immunology*: 173 6526 – 6531.

Hudcovic T, Stepankova R, Cebra J, Tlaskalova-Hogenova H 2001. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiologica* 46 565–572.

Ilan Y, Weksler-Zangen S, Ben-Horin S, Diment J, Sauter B, Rabbani E, Engelhardt D, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Goldin E 2000. Treatment of Experimental Colitis by Oral Tolerance Induction: A Central Role for Suppressor Lymphocytes. *The American journal of gastroenterology*: 95 966-73.

Jenkins SJ, Allen JE 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*: 2010 262609.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM 2003. Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*: 50 81-92.

Keiser PB, Nutman TB 2004. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clinical Microbiology Reviews*: 17 208–217.

Maslowski KM, Vieira AT, Aylwin Ng, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR 2012. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461 1282–1286.

Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM 2002. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infection and Immunology*: 70 (11) 5931–5937.

Khan WI, Collins SM 2004. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunology*: 26 319-326.

- Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T 2008. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*:57 1682–1689.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell Press*: 75(2) 263-74.
- Leonel AJ, Teixeira LG, Oliveira RP, Santiago AF, Batista NV, Ferreira TR, Santos RC, Cardoso VN, Cara DC, Faria AM, Alvarez-Leite J 2012. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *British Journal of Nutrition*: 109 1396-407.
- Leonel AJ 2012. Efeitos e mecanismos de ação da Tributirina na proteção da colite ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrano. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais.
- Link K, Orestein R 1999. Bacterial complications of strongyloidiasis: *Streptococcus bovis* meningitis. *South Medical Journal*: 92 728-731.
- Liu LX, Weller PR 1993. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infectious Disease Clinics of North America*: 7 655-682.
- Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4₊CD25⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 103 7048-53.
- Loftus EV Jr 2004. Hunting for the owl's eye in acute severe colitis: the role of cytomegalovirus. *Digestive and Liver Disease*: 36(12) 803-5.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunological Reviews*:201 89-116.
- McBee ME, Zeng Y, Parry N, Nagler CR, Tannenbaum SR, Schauer DB 2010. Multivariate modeling identifies neutrophil – and Th17- related factors as differential serum biomarkers of chronic murine colitis. *PloS one*: 5(10) e13277.
- McCafferty DM, Sihota E, Muscara M, Wallace JL, Sharkey KA, Kubes P 2000. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double deficient mice. *Gastrointestinal and liver physiology* 279: G90–G99.
- Mckerrow, J. H.; Brindley, P.; Brown, M.; Gam, A. A. Staunton, C.; Neva, F. A 1990. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Experimental Parasitology*: 70 134-143.

Milder JE, Walzer PD, Kilgore G, Rutherford I, Klein M 1981. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. *Gastroenterology*: 80 1481-1488.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*: 142 46–54.

Motomura Y, Wang H, Deng Y, El-sharkawy RT, Verdu EF, Khan WI 2008. Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clinical & Experimental Immunology*:155 88-95.

Mutnal MB; Cheeran M C-J; Hu SH; Little MR; Lokensgard JR 2010. Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. *Journal of Neuroimmunology*:227 101-110.

Negrão-Corrêa D 1990. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brump, 1934 e de *Strongyloides spp* isolados de roedores silvestres em infecções de camundongos Swiss. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas.

Negrão-Corrêa D, Pinho V, Souza DG, Barsante MM, Souza AL, Teixeira MM 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity*:72 1135-1142.

Negrão-Corrêa D, Pinho V, Souza DG, Pereira AT, Fernandes A, Scheuermann K, Souza AL, Teixeira MM 2006. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *International Journal for Parasitology*: 36 1185-1195.

Nielsen OH 2014. New strategies treatment of inflammatory bowel disease. *Frontiers in medicine*: 1 3. doi 103389.

Nutman TB 2007. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. *Immunology and allergy clinics of North America*: 27 529–549.

Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Scholmerich J, Gross V, Falk W 1999. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)- induced colitis in mice. *Clinical & Experimental Immunology*116: 238–245.

Onah DN, Nawa Y 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *The Korean journal of parasitology*: 38 209-236.

- Onah DN, Uchiyama F, Nagakui Y, Ono M, Takai T, Nawa Y 2000. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: Mucosal mast cell and serum mouse mast cell protease 1 responses during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcR γ -knockout mice. *Infection and Immunity*: 68 4968-4971.
- Patel G, Arvelakis A, Sauter BV, Gondolesi GE, Caplivski D, Huprikar S 2007. Strongyloides hyperinfection syndrome after intestinal transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*: 10 137-41.
- Patel N, Kreider T, Urban JF Jr, Gause WC 2009. Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal Parasitology*: 39 13-21.
- Paula FM, Costa-Cruz J 2011. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*: 138 331-1340.
- Peres RS, Chiuso-Minicucci F, da Rosa LC, Domingues A, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL, do Amarante AF, Sartori A 2013. Previous contact with *Strongyloides venezuelensis* contributed to prevent insulinitis in MLD-STZ diabetes. *Experimental parasitology*: 134 183-9.
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*: 347 417-29.
- Ponder A, Long MD 2013. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical Epidemiology*: 5 237-47.
- Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcantara L, Carvalho EM 2001. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunology*: 23 503-507.
- Porto MA, Muniz A, Oliveira JJr, Carvalho EM 2002. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 35 641-649.
- Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, Chen X 2014. Strongyloidiasis – an insight into its global prevalence and management. *PLOS Neglected Tropical Diseases*: 8 1-12.
- Qu Z, Kundu UR, Abadeer RA, Wanger A 2008. Strongyloides colitis is a lethal mimic of ulcerative colitis: the key morphologic differential diagnosis. *Human pathology*:40 572-7.
- Ramanathan R, Nutman T 2008. Strongyloides stercoralis Infection in the Immunocompromised Host. *Current infectious disease reports*: 10 105-10.

- Rani R, Smulian AG, Greaves DR, Hogan SP, Herbert DR 2011. TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *European Journal Immunology*: 41(7) 2000-9.
- Reardon C, Sanchez A, Hogaboam CM, McKay DM 2001. Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Infection and Immunity*: 69 4417-23.
- Rogers AI, Concha R, Harrington W Jr 2005. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *Journal of Clinical Gastroenterology*: 39 203-11.
- Round JL, Mazmanian SK 2009. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*: 9: 313-23.
- Ruysers NE, DE Winter BY, De Man JG, Loukas A, Pearson MS, Weinstock JV, Van Den Bossche RM, Martinet W, Pelckmans PA, Moreels TG 2009. Therapeutic potential of helminth soluble proteins in TNBS-induced colitis in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*: 15 (4) 491-500.
- Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegishi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K 2005. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cells-dependent type 2 innate immunity. *The Journal of Experimental Medicine*: 202 607-616.
- Sato Y, Toma H 1990. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *International Journal for Parasitology*: 20 57-62.
- Schad GA, Aikens IM, Smith G 1989. *Strongyloides stercoralis*: is there a canonical migratory route through the host? *Journal of Parasitology*: 75 740-749.
- Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, Hamann A, Hamelmann E, Lucius R, Hartmann S. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10- producing macrophages. *Journal Immunol* 180(6):4265-4272, 2008.
- Setiawan T, Metwali A, Blum AM, Ince MN, Urban JF Jr, Elliott DE, Weinstock JV 2007. *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory t-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. *Infection and immunity*: 75: 4655-63.
- Shiwaku K, Chigusa Y, Kadosaka T, Kaneko K 1988. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology*: 97 129-138.
- Siddiqui AA, Berk SL 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Disease*: 33 1040-1047.

Siddiqui AA, Berk SL 2003. Strongyloidiasis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*: 5 283-289.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, et al 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infection and Immunology*: 70 6263–6272.

Smith P, Mangan NE, Walsh CM, Fallon RE, McKenzie AN, Van Rooijen N, Fallon PG 2007. Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. *The Journal of Immunology*: 178 4557-66.

Soblik H, Younis AE, Mitreva M, Renard BY, Kirchner M, Geisinger F, Steen H, Brattig NW 2011. Life Cycle Stage-resolved Proteomic Analysis of the Excretome/Secretome from *Strongyloides ratti*—Identification of Stage-specific Proteases. *Molecular & Cellular Proteomics*: 10 M111.010157.

Soufli I, Toumi R, Rafa H, Amri M, Labsi M, Khelifi L, Nicoletti F, Touil-Boukoffa C 2015. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *Journal of inflammation*: 17 12-19.

Speare R 1989. Identification of species of *Strongyloides*. In: *Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man* (d.i. Grove, ed). Pp.11-83. London: Taylor & Francis.

Steppek G, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM 2006. Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *International journal of experimental pathology*: 87 325-341.

Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA 2000. Malnutrition and parasitic helminth infection. *Parasitology*: 121 23-28.

Strachan DP 1989 Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*: 299 1259–1260.

Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *The Journal of Immunology Methods*: 83 209-215.

Streit A 2008. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. *Parasitology*: 135 285-294.

Summers RW, Elliot DE, Qadir K, Urban JF Jr, Thompson R, Weinstock JV 2003. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in treatment of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*: 98 2034-2041.

Sutton TL, Zhao A, Madden KB, Elfrey JE, Tuft BA, Sullivan CA, Urban JF Jr, Shea-Donohue T 2008. Anti-Inflammatory mechanisms of enteric Heligmosomoides polygyrus infection against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in a murine model. *Infection and Immunity*: 76(10) 4772-82.

Taylor BC, Zaph C, Troy AE, et al 2009. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of Experimental Medicine*: 206 655–667.

Urban jr JF, Madden KB, Svetic A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, KatonaIM, Filkeman FD 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological reviews*: 127 205-20.

Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G 2006. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy*: 4 8.

Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM 2009. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *The American journal of pathology*: 175(6) 2382-91.

Viney NN 1996. Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proceedings of the Royal Society of London: B Biological Sciences*: 263 201-208.

Viney ME 1999. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitology Today*: 15 231-235.

Viney ME, Lok JB 2007. *Strongyloides* spp. *WormBook*: 23 1-15.

Wang A; Fernando M; Leung G; Phan V; Smyth D; MckayDM 2010. Exacerbation of oxazolone colitis by infection with the helminth *Hymenolepis diminuta*. *The American Journal of Pathology* 177: 2850–2859.

Weinstock JV, Elliott DE. 2009. Helminths and the IBD Hygiene Hypothesis. *Inflammatory bowel diseases*: 15 128-133.

Whelan K 2011. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*: 14(6) 581-7.

Whelan RA, Hartmann S, Rausch S 2012. Nematode modulation of inflammatory bowel disease. *Protoplasma*: 249(4) 871-86.

Wilson MS; Cheever AW; White SD; Thompson RW; Wynn TA 2011. IL-10 Blocks the Development of Resistance to Re-Infection with *Schistosoma mansoni*. *Plos Pathogens*: 7 e1002171.

Xavier RJ, Podolsky DK 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*: 448(7152) 427-34.

Xiong J, Lin YH, Bi LH, Wang JD, Bai Y, Si-De Liu SD 2013. Effects of Interleukin-4 or Interleukin-10 gene therapy on trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *BMC Gastroenterology*: 13 165.

Xu XR, Liu CQ, Feng BS, Liu ZJ 2014. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*: 20(12) 3255-3264

Yamada M, Matsuda S, Nakasawa M, Arizono N 1991. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. *Journal of Parasitology*: 77 592-594

Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D 2009. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS One*: 4e6073.

Yang X, Yang Y, Wang Y, Zhan B, Gu Y, Cheng Y, Zhu X. 2014. Excretory/Secretory Products from *Trichinella spiralis* Adult Worms Ameliorate DSS-Induced Colitis in Mice. *PLoS One*: 5 e96454.