

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA VACINAL E  
IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS DE *Ascaris suum* NA  
ASCARIDÍASE EXPERIMENTAL**

Ana Clara Gazzinelli Guimarães

Belo Horizonte

Fevereiro/2017

Ana Clara Gazzinelli Guimarães

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA VACINAL E  
IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS DE *Ascaris suum* NA  
ASCARIDÍASE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientadora: Prof. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte – MG

Fevereiro/2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

## **COLABORADORES**

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Dra. Mariana Cardoso

MSc. Denise Nogueira

Dr. Fernando Sérgio Barbosa

MSc. Luciana Maria de Oliveira

MSc. Ana Luiza Teixeira Silva

Chiara Amorim

Nacional Institute of Health –NIH

Dr. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

Departamento de Fisiologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Remo Castro Russo

Lucas Kraemer

MSc. Matheus Matos

Departamento de Patologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Marcelo Caliari

**ÓRGÃO FINANCIADOR:** CNPq / CAPES

**Finalmente mais uma etapa cumprida. Dedico este trabalho à minha família e a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado torcendo pela minha vitória e sucesso. O meu mais sincero, muito obrigada!!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar e iluminar sempre meu caminho e minhas escolhas.

Aos meus pais pelo imenso amor, confiança, por sempre acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado em qualquer decisão e momento da minha vida.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram presentes em minha vida e compartilharam dos momentos de vitória e angústia. Agradeço sempre pelo companheirismo e principalmente por todo apoio e torcida de sempre.

Aos meus avós, pela excelente criação, pelo amor insubstituível e por tudo o que vocês representam para mim.

A toda minha família: tios/tias, primos/primas por ser a melhor e mais unida família do mundo.

Às minhas amiguinhas de m. eternas, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso e minha felicidade mesmo me achando maluca no que eu trabalho (risos).

Às amigas da faculdade e a todos os amigos em geral que estiveram presentes nessa trajetória junto comigo, meu mais sincero e de coração: OBRIGADA.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara e minha Co-orientadora Lilian Bueno. Obrigada por todos esses anos de trabalho. É um prazer dividir com vocês momentos de estudo, conquistas, ensinamentos e amizade. Obrigada pela confiança e por acreditar sempre no meu melhor. Espero que essa parceria ainda perdure por muitos anos.

A todos os colaboradores deste projeto, especialmente ao Grupo Ascaris, que formei grandes amigos de verdade que vou levar pra vida comigo. Obrigada pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela ajuda de sempre e pelas sugestões que certamente contribuíram muito para o sucesso do trabalho. E obrigada acima de tudo, por me manterem de pé nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), pelo agradável convívio, carinho, amizade e risadas diárias.

À turma da Roliça, melhor turma de mestrado. Obrigada pela convivência e por tornarem a difícil passagem pelos infinitos créditos da Pós-Graduação, prazerosa e divertida.

Ao Programa Nacional de Incentivo à Pesquisa em Parasitologia Básica desenvolvido pela CAPES pelo recurso e infraestrutura disponível para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial à Sumara e Sibeles, pela oportunidade, pelo apoio e pelo carinho.

Aos animais estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	xv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 A ascaridíase .....	2
1.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial .....	2
1.1.2. Epidemiologia.....	4
1.1.3. Biologia Ciclo Biológico e Transmissão .....	5
1.1.4. Fisiopatologia.....	7
1.1.5. Resposta imunológica na ascaridíase .....	8
1.1.6. Vacina .....	10
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.1.1 Objetivos específicos .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
4.1. Comitê de Ética.....	21
4.2. Parasitos.....	21
4.3. Camundongos .....	21
4.4. Embrionamento dos ovos .....	22

4.5. Indução da eclosão das larvas em cultura.....	22
4.6. Produção de antígenos: bruto de larva (BL), extrato bruto (EXB) e de tegumento (TEG) .....	23
4.7. Protocolo de imunização .....	23
4.8. Infecção experimental .....	24
4.9. Perfil de proteção .....	25
4.10. Avaliação da imunogenicidade .....	25
4.10.1. Avaliação de citocinas teciduais .....	25
4.10.2. Avaliação de citocinas séricas .....	25
4.11. Análise de mecânica pulmonar .....	26
4.12. Avaliação do perfil de leucócitos e a presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar (BAL).....	26
4.13. Avaliação morfométrica e perfil histopatológico dos pulmões .....	27
4.14. Avaliação da antigenicidade .....	27
4.14.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) .....	27
4.14.2. Western Blot .....	28
4.15. ELISA para detecção de produção de IgG específico e suas subclasses.....	28
4.16. Avaliação da proteção humoral da carga parasitária mediada pela transferência passiva de imunoglobulinas purificadas de soros de animais previamente imunizados. 29	
4.17. Análise Estatística .....	30
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
5.1 - Análise da eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e lavado bronco alveolar dos animais imunizados com antígenos de <i>A. suum</i> e desafiados com ovos infectantes do parasito .....	32
5.2 – Análise do perfil leucocitário e presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar de animais imunizados com antígenos de <i>A. suum</i> e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.....	34



5.3 - Caracterização do perfil de citocinas teciduais e sistêmicas dos animais imunizados com antígenos de <i>A. suum</i> , e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito .....	36
5.4 – Análise da mecânica pulmonar em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de <i>A. suum</i> e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito...	39
5.5 – Análise histopatológica em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de <i>A. suum</i> e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito .....	42
5.6 – Níveis séricos de IgG antígeno-específico durante as imunizações dos animais com os antígenos de <i>A. suum</i> e após o desafio com ovos infectantes do parasito.....	45
5.7 – Transferência passiva de anticorpos IgG anti-antígenos de <i>A. suum</i> , purificados de soro de animais imunizados com os antígenos BL, EXB e TEG .....	46
5.8 - Determinação dos subclasses de IgG presentes no soro de animais imunizados com os antígenos BL, EXB e TEG e compará-los com a presença de subclasses de IgGs após a infecção por <i>A. suum</i> nos animais previamente imunizados.....	48
5.9 – Determinação da antigenicidade dos antígenos bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e extrato de tegumento de <i>A. suum</i> .....	51
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
<b>9. ANEXO</b> .....	70
9.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Lavado bronco alveolar
BALB/c	Linhagem de camundongo
BCA	“ <i>Bicinchoninic acid</i> ”
BL	Antígeno de extrato bruto de larva de <i>A. suum</i>
<i>Bp</i> MPLA	Adjuvante Monofosforil lipídio A
BMZ	Benzamidazol
CT	Controle
CCHORD	Complacência estática pulmonar
CDYN	Dinâmica pulmonar
DALYs	“ <i>Disability-adjusted life years</i> ” (Anos de vida ajustados por incapacidade)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima
EXB	Antígeno de extrato bruto de verme adulto de <i>A. suum</i>
FEV100	Volume expiratório forçado das vias aéreas no primeiro segundo
FVC	Capacidade vital forçada do pulmão
HBSS	Solução tampão de Hank
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

ILCs	Células linfóides inatas
L3	Larva infectante de <i>A. suum</i>
Na-GST-1	Glutathione S-Transferase-1 de <i>Necator americanus</i>
Na-APR-1	Aspartic Protease-1 de <i>Necator americanus</i>
Pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
RI	Resistência pulmonar
RPMI	Meio de Cultura (“ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”)
Rpm	Rotação por minuto
TBS-T	Tris Buffer Saline com Tween 20
TEG	Antígeno de extrato de tegumento de verme adulto de <i>A. suum</i>
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral
Th1	Células TCD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células TCD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	“ <i>World Health Organization</i> ” (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1: Carga parasitária em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.**

(A) Número de larvas recuperadas no lavado bronco alveolar dos animais após oito dias de infecção (B) Número de larvas recuperadas no tecido pulmonar dos animais após oito dias de infecção. (C) Número total da carga parasitária (BAL+Pulmão). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle MPLA no qual  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . O valor em percentual apresentado no gráfico indica a taxa de redução da carga parasitária em relação ao grupo controle (MPLA).

**Figura 2: Presença de células inflamatórias no lavado bronco alveolar dos animais após as imunizações com os antígenos de *A. suum* e posterior desafio com ovos infectantes do parasito.**

(A) Leucócitos totais (B) Eosinófilos (C) Neutrófilos (D) Macrófagos (E) Linfócitos (F) Proteína Total (G) Hemoglobina. O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado com PBS e infectado com o parasito. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo imunizado com o adjuvante MPLA no qual  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

**Figura 3: Níveis teciduais de citocinas de camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum* e posteriormente infectados com ovos do parasito.**

(A) IL-5. (B) IL-10. (C) IFN- $\gamma$ . (D) TGF $\beta$ . O pontilhado indica níveis basais da citocina referente ao grupo controle não imunizado e não infectado (PBS CT NI). Diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle infectado PBS ASC foi obtida pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

**Figura 4: Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum*.**

(A) IL-5. (B) IL-13. (C) TNF- $\alpha$ . (D) IL-6. (E) IL-10. (F) IL-2. O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado apenas com PBS. Diferenças estatísticas com o grupo imunizado com o adjuvante MPLA foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

**Figura 5: Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum* e infecção pelo parasito.** O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado com PBS e posteriormente infectado. MPLA+ ASC – grupo imunizado com adjuvante MPLA e infectado. BL+ ASC - grupo imunizado com antígeno bruto de larva e infectado. EXB + ASC - grupo imunizado com extrato bruto de verme adulto de *A. suum* e infectado. TEG + ASC – grupo imunizado com antígeno de tegumento de *A. suum* e infectado. (A) IL-5. (B) IL-13. (C) TNF- $\alpha$ . (D) IL-6. (E) IL-10. (F) IL-2. Diferenças estatísticas em comparação ao grupo MPLA+ASC pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 6: Análise dos parâmetros funcionais dos pulmões de animais imunizados com antígenos de *A. suum* e infectados pelo parasito.** (A) Capacidade total do pulmão (TLC). (B) Capacidade residual funcional (FRC). (C) Complacência dinâmica (C<sub>dyn</sub>). (D) Resistência pulmonar (RI). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle sem infecção (PBS) e controle infectado (*Ascaris*), estão representadas pelo \* na figura no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 7: Avaliação da curva pressão por volume pulmonar através da espirometria em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum*.** (A) Curva pressão por volume após imunização com antígeno EXB. (B) Curva pressão por volume após imunização com antígeno TEG. (C) Curva pressão por volume após imunização com antígeno BL. As diferenças significativas estão representadas de acordo com a legenda presente no gráfico.

**Figura 8: Caracterização da integridade tecidual através do grau de espessamento dos septos interalveolares e da fibrose tecidual nos pulmões dos camundongos BALB/c imunizados com os antígenos de *A. suum*.** Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle infectado PBS+ASC pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 9: Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no pulmão de camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum*.** (A) Ilustração referente ao grupo imunizado apenas com adjuvante (MPLA), com presença moderada de infiltrado inflamatório perivascular (\*), presença de larvas de *A. suum* durante a migração pelo órgão (cabeças de seta) e presença de espaços alveolares livres (a). (B) Ilustração referente ao grupo de animais imunizados com antígeno BL, com aumento significativo do espessamento dos septos interalveolares e presença de hemorragia(\*) e diminuição dos espaços alveolares livres (a). (C) Ilustração referente ao grupo de animais imunizados com antígeno EXB, com aumento significativo do espessamento dos septos interalveolares e presença de hemorragia(\*) e diminuição dos espaços alveolares livres (a). (D) Ilustração referente aos animais imunizados com antígeno TEG, com uma melhora do quadro inflamatório com redução do infiltrado inflamatório (\*) e aumento dos espaços alveolares livres (a). H&E. Barra: 100µm.

**Figura 10: Níveis séricos de IgG específico em camundongos BALB/c.** (A) IgG específico antes da primeira imunização (Tempo 0), após a primeira imunização (Tempo 1), após a segunda imunização (Tempo 2) e após a terceira imunização (Tempo 3). (B) Níveis séricos de IgG específico após as três imunizações mais o desafio com ovos infectantes do parasito (Tempo 4). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 11: Número de larvas recuperadas nos pulmões dos animais oito dias após infecção.** Os animais foram submetidos ao protocolo de transferência passiva de anticorpos IgG anti-antígenos de *A. suum* purificados através da coluna de afinidade de Proteína A. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 12: Determinação de subclasses de IgGs em camundongos BALB/c após imunização com os antígenos de *A. suum*.** Determinação da presença de subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 no soro de animais após a terceira imunização (Tempo 3) com os antígenos de *A. suum*. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 13: Determinação de subclasses de IgGs em camundongos BALB/c após imunização com os antígenos de *A. suum* e o desafio.** Determinação da presença de subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 no soro de animais após as três imunizações mais o desafio com a infecção por *A. suum* (Tempo 4). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 14: Perfil eletroforético dos antígenos de *A. suum*.** (A) Perfil de bandas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) dos antígenos bruto de larva (BL), extrato bruto de verme adulto (EXB) e extrato de tegumento de *A. suum* (TEG).

**Figura 15: Avaliação da antigenicidade dos antígenos de *A. suum*.** (B) Reconhecimento soro-antígeno específico e cruzado entre os antígenos bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e extrato de tegumento de *A. suum* através de Western Blot.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração 1.</b> Distribuição mundial da Ascaridíase. Fonte: WHO,2010 .....	03
<b>Ilustração 2.</b> Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de <i>Ascaris</i> spp. (a) ovo fértil mamilonado, (b) ovo larvado decorticado, (c) larva, (d) porção posterior do verme adulto macho. Fonte: Luciana Maria (Modificado).....	06
<b>Ilustração 3.</b> Ciclo biológico do parasito <i>Ascaris</i> spp. Fonte: CDC, 2012.....	07
<b>Ilustração 4.</b> Painel de citocinas da resposta do tipo Th2 em helmintoses. (Adaptado de Anthony et al., 2007).....	09
<b>Ilustração 5.</b> Delineamento experimental do protocolo de imunização dos animais com os antígenos bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e extrato de tegumento de <i>A. suum</i> e posterior infecção com ovos infectantes do parasito.....	24
<b>Ilustração 6.</b> Delineamento experimental do protocolo de transferência passiva de anticorpos IgG anti- antígeno de <i>A. suum</i> .....	30



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Revisão bibliográfica sobre candidatos vacinais para a ascaridíase.....	13
--	----

## RESUMO

*A ascaridíase humana possui uma distribuição cosmopolita sendo caracterizada também como a doença tropical mais prevalente e negligenciada do mundo. Estudos recentes estimam que aproximadamente 800 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo. Estratégias para intervenções profiláticas contra a ascaridíase humana são limitadas, uma vez que o sistema de educação em saúde e saneamento básico nas regiões endêmicas para a doença são extremamente precários, o que resulta em elevadas taxas de reinfecção mesmo após tratamento específico. Em busca da melhoria da qualidade de vida, de uma menor morbidade principalmente nos indivíduos de áreas endêmicas, buscamos o desenvolvimento de uma vacina que fosse capaz de garantir a proteção a longo prazo contra uma das principais geohelmintoses em questão. Dessa forma, por meio da imunização com diferentes antígenos de Ascaris suum, sendo: <sup>1</sup>extrato bruto de verme adulto; <sup>2</sup>extrato bruto de tegumento de verme adulto; e <sup>3</sup>extrato bruto de larva infectante, o presente estudo objetivou a identificação de novos candidatos vacinais visando o desenvolvimento de uma nova estratégia profilática contra a ascaridíase. Neste estudo avaliou-se a eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e no lavado bronco alveolar dos animais previamente imunizados e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito. Além disso, foram realizados a avaliação da imunogenicidade dos candidatos vacinais por meio do perfil de citocinas sistêmicas e teciduais, além do funcionamento pulmonar e o perfil de leucócitos presentes no lavado bronco alveolar. Por fim, foram também avaliados a participação humoral na proteção vista da carga parasitária e o perfil de produção de anticorpos após as imunizações e após infecção. Nossos resultados demonstraram uma redução significativa da carga parasitária nos animais imunizados com os antígenos de A. suum sendo o antígeno bruto de larva chegando a aproximadamente 61% de proteção, seguido pelo antígeno bruto de tegumento com 59% e por fim o antígeno bruto de verme adulto com 51% de redução da carga. Quanto ao perfil de citocinas sistêmicas foi observado uma relevante regulação da citocina IL-5 nos animais imunizados com os diferentes antígenos de A. suum, e uma significativa produção de IL-10 induzida pelo antígeno TEG em relação aos animais não imunizados. Quanto aos níveis de anticorpos IgG antígeno-específico, foi observado um aumento gradual e progressivo conforme as imunizações com um aumento principalmente das subclasses IgG1 e IgG3. Posteriormente, diante da investigação da participação humoral na redução da carga, observamos que animais submetidos ao protocolo de transferência passiva com anticorpos anti-antígenos de A. suum, apresentaram cerca de 65% de proteção frente a infecção. A partir destes resultados, podemos inferir que os antígenos de A. suum são potenciais candidatos à investigação e nos provam que é viável a utilização e desenvolvimento de uma vacina, visando principalmente o controle e diminuição da carga parasitária nos indivíduos infectados das regiões endêmicas.*

**Palavras-chave:** Ascaridíase, Vacina, Resposta imunológica, *Ascaris suum*, antígenos

## ABSTRACT

*Human ascariasis has a cosmopolitan distribution and is also characterized as the most prevalent and neglected tropical disease in the world. Recent studies estimate that about 800 million people are infected worldwide. Strategies for prophylactic interventions against human ascariasis are limited, since the education system in health and basic sanitation in regions endemic for the disease is extremely precarious, resulting in high reinfection rates even after specific treatment. In order to improve the quality of life and lower morbidity, especially in individuals from endemic areas, we are looking for the development of a vaccine that would guarantee the long-term protection against the main soil transmitted helminths in general. Thus, through immunization with different Ascaris suum antigens, being: 1 crude extract of adult worm; 2 crude extract of adult worm tegument; and 3 crude extract of infective larvae, the present study aimed at the identification of new vaccine candidates aiming the development of a new prophylactic strategy against ascariasis. In this study we evaluated the vaccine efficacy by quantifying the parasite load in the lung and alveolar bronchoalveolar lavage of animals previously immunized and then challenged with infecting eggs of the parasite. In addition, the immunogenicity of the vaccine candidates was evaluated through the systemic and tissue cytokine profile, as well as the pulmonary function and the leukocyte profile present in the bronchoalveolar lavage. Finally, the humoral participation in the protection of parasite load and the profile of antibody production after immunizations and after infection were also evaluated. Our results demonstrated a significant reduction of parasite load in the animals immunized with A. suum antigens with the crude larval antigen reaching approximately 61% protection, followed by the crude tegument antigen with 59% and finally the crude adult worm antigen with 51% load reduction. Regarding the systemic cytokine profile, a significant regulation of the IL-5 cytokine in the animals immunized with the different A. suum antigens and a significant IL-10 production induced by the TEG antigen in relation to the non-immunized animals was observed. As for antigen-specific IgG antibody levels, a gradual and progressive increase was observed according to the immunizations with an increase mainly of IgG1 and IgG3 subclasses. Subsequently, in view of the investigation of the humoral participation in the reduction of the load, we observed that animals submitted to the passive transfer protocol with anti-antigen antibodies of A. suum presented approximately 65% protection against infection. From these results, we can infer that A. suum antigens are potential candidates for research and prove that it is feasible to use and develop a vaccine, mainly aimed at controlling and reducing the parasite burden in infected individuals in endemic regions.*

**Keywords:** Ascariasis, Vaccine, Immune response, *Ascaris suum*, antigens

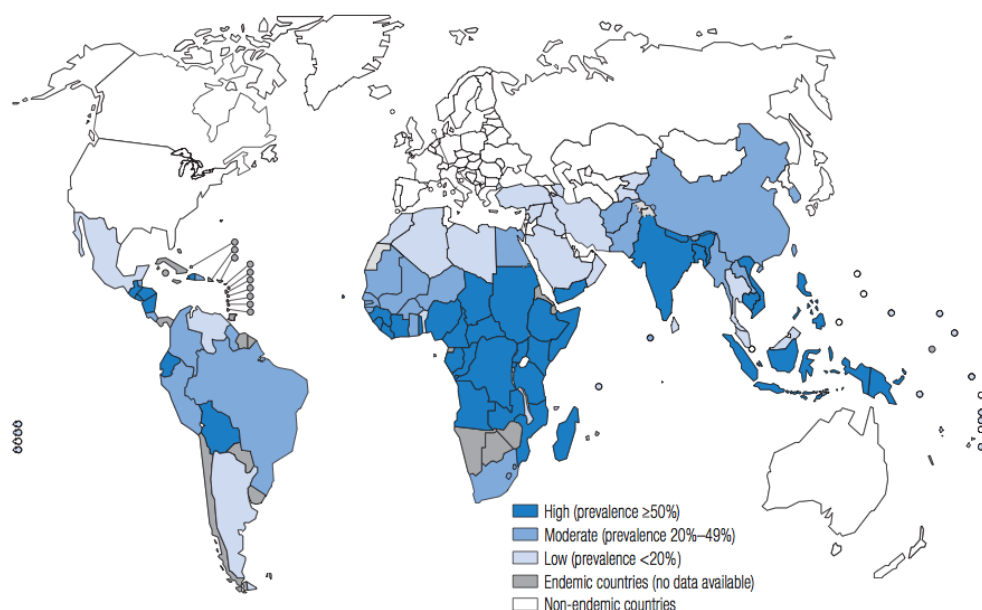
## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 A ascaridíase

### 1.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial

A doença causada pelo helminto nematódeo *Ascaris lumbricoides*, Linnaeus, 1758, pertencente à ordem Ascaridida, família Ascaridae, é conhecida como ascaridíase humana, e possui uma distribuição cosmopolita sendo caracterizada também como a doença tropical mais prevalente e negligenciada do mundo. Dentre as regiões mais afetadas destacam-se as áreas rurais e de baixo desenvolvimento econômico de países localizados na Ásia, América Latina, Caribe e África subsaariana (**Ilustração 1**) (Hotez e Kamath, 2009).

Estudos recentes estimam que aproximadamente 800 milhões de pessoas estejam com ascaridíase em todo o mundo, a qual está diretamente relacionada com a pobreza, falta de saneamento básico e educação em saúde (Hotez et al., 2014). De acordo com Hotez et al., (2008), aproximadamente 84 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 500 milhões vivem em áreas de risco em 27 países da América Latina. Na África subsaariana, aproximadamente 25% da população (173 milhões de pessoas) estão infectadas (Hotez, 2009) e, no sudeste asiático, a prevalência em algumas regiões é superior a 60%. Nos Estados Unidos, quatro milhões de casos já foram registrados, sendo concentrados nos imigrantes de regiões tropicais e subtropicais do globo (Murrell et al., 1997). Na Europa, estudos realizados em adultos e crianças demonstraram que existam áreas cuja prevalência pode variar de 1 a 69%, como a Albânia e a Turquia, respectivamente (Hotez et al., 2011).



**Ilustração 1.** Distribuição mundial da Ascaridíase. Fonte: WHO,2010

Não obstante a elevada endemicidade da doença e dos inúmeros danos provocados pelo *A. lumbricoides* nos indivíduos infectados, desde a década de 1950 existe uma grande preocupação e discussão científica envolvendo outro nematódeo da mesma família Ascaridae, denominado *Ascaris suum* Goeze (1882), causador da ascaridíase suína. *Ascaris suum* apresenta uma elevada distribuição cosmopolita (Fagerholm et al., 1988; Roepstorff et al., 1998) e a infecção com elevada carga parasitária em suínos influencia diretamente na saúde e na performance desses animais, resultando em perda na produção e condenação do fígado que, dependendo da prevalência da infecção no rebanho, repercute em importantes perdas econômicas (Stewart e Hale, 1988).

Em estudos de revisão como de Leles et al. (2012), *Ascaris lumbricoides* e *A. suum* são considerados macroscopicamente, morfológicamente, e “biologicamente” indistinguíveis. Contudo, ao longo da história, esses nematódeos foram considerados espécies distintas, com base em observações epidemiológicas, diferenças em infecções experimentais e principalmente em distinções anatômicas dos dentículos das cápsulas bucais (Sprent, 1952). Entretanto, a discussão que considera essas espécies sinônimas se fortaleceu a partir de inúmeras evidências do caráter antroponótico de *A. suum* (Takata, 1951; Anderson, 1995; Nejsumet al., 2005; Arizono et al., 2010; Nejsum et al., 2012), e do potencial zoonótico confirmado de *A. lumbricoides* (Galvin, 1968). Recentemente, Liu et al., em 2012, forneceram evidências genéticas, a partir da análise de DNA mitocondrial, que *A. lumbricoides* e *A. suum* possivelmente são a mesma espécie.

Atualmente, diversos estudos buscam elucidar a questão de especiação dos ascarídeos *A. lumbricoides* e *A. suum*. Além disso, busca-se analisar o potencial de transmissão cruzada desses parasitos entre humanos e suínos. Existem relatos na literatura que, em áreas indenes para transmissão de *A. lumbricoides* como o norte da América do Norte e Dinamarca, humanos foram diagnosticados com ascaridíase. Após a investigação epidemiológica, foi constatado que se tratava de uma infecção por *Ascaris suum*, indicando que suínos são potenciais reservatórios para parasitos causadores de infecções em humanos (Anderson, 1995; Nejsument al., 2005). Faz-se então necessária, uma profunda análise dessa transmissão para o desenvolvimento de novas intervenções e programas de controle da ascaridíase.

### **1.1.2. Epidemiologia**

Embora a ascaridíase humana seja uma infecção crônica e na maioria dos casos não letal, é considerada um problema de saúde pública mundial, devido as complicações clínicas observadas em indivíduos com alta carga parasitária, que caracterizam a forma grave da doença afetando anualmente cerca de 8 - 15% dos infectados, sendo essa forma associada a um quadro de distensão abdominal, de náuseas, diarreias e pode ser fatal devido a um quadro de obstrução intestinal pelos vermes adultos (Chan, 1997). A cada ano, esse quadro é estimado ser responsável por aproximadamente 20.000 mortes no mundo (Khuroo et al. 1996).

Entretanto, em infecções moderadas a ascaridíase está correlacionada com déficit nutricional, retardo do crescimento e déficit cognitivo, especialmente em crianças e adolescentes (Crompton, 2001). O grau de morbidade avaliada como anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) varia de 1,8 a 10,5 milhões, superando todos os outros geohelmintos e esquistossomoses (Chan, 1997).

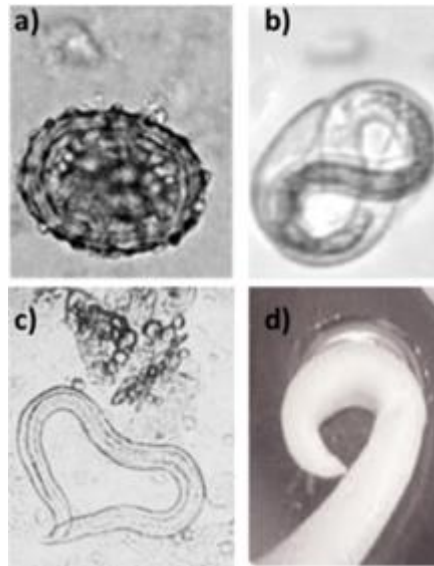
Para hospedeiros humanos, existem três principais estratégias para o controle de geohelmintoses: redução da intensidade parasitária (e conseqüente morbidade) por meio de melhorias no saneamento, educação em saúde e tratamento anti-helmíntico (Dold e Holland, 2011). Um número de características e padrões epidemiológicos do ciclo de vida do parasito podem influenciar a concepção de estratégias de controle para a infecção com *Ascaris* spp. As taxas de produção de ovos combinados com a sua durabilidade e sobrevivência no solo gera um impacto nas taxas de reinfecções. Portanto, o controle em longo prazo e a erradicação da infecção por *A. lumbricoides* se *A. suum* depende de

saneamento para a eliminação segura de fezes humanas. Saneamento básico tem o objetivo de interromper a transmissão, evitar reinfecção e, gradualmente, reduzir as cargas de vermes adultos. A construção de instalações sanitárias pode ser incentivada através de educação para a saúde, que visa estimular mudanças de comportamento relacionadas com o ambiente e a higiene familiar (Dold e Holland, 2011).

### **1.1.3. Biologia Ciclo Biológico e Transmissão**

O parasito apresenta três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e adulto (**Ilustração 2**). Os ovos se coram de marrom na presença da bile e apresentam uma casca formada por três camadas: a membrana vitelina, camada mais interna, delgada e impermeável à água; uma camada intermediária mais espessa, quitinosa e transparente e; membrana mamilonada, camada mais externa, grossa, de superfície irregular e composta por mucopolissacarídeos (Khuroo 1996). No ambiente, as larvas permanecem viáveis dentro dos ovos por longos períodos, sendo que as mesmas eclodem no intestino após a ingestão dos ovos. Larvas de terceiro estágio recuperadas de tecidos de camundongos medem de 271 a 343 mm de comprimento por 17 a 20 mm de espessura. Após duas mudas, as larvas de quarto estágio encontradas nos pulmões medem de 1.357 a 2.400 mm de comprimento por 34 a 71 mm de espessura. Os vermes adultos são grandes, alongados e cilíndricos. Possuem uma camada exterior quitinosa consistindo de cutícula anucleada secretada pelo epitélio adjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui três lábios. Apresentam dimorfismo sexual com os machos apresentando a cauda curvada na direção ventral. Além disso, as fêmeas são geralmente maiores (20 a 49 cm de comprimento por 3 a 6 mm de diâmetro) que os machos (15 a 30 cm de comprimento por 2 a 4 mm de diâmetro). Apresentam longevidade média de um ano, sendo que neste período cada fêmea pode liberar uma média de 240.000 ovos (Khuroo 1996).



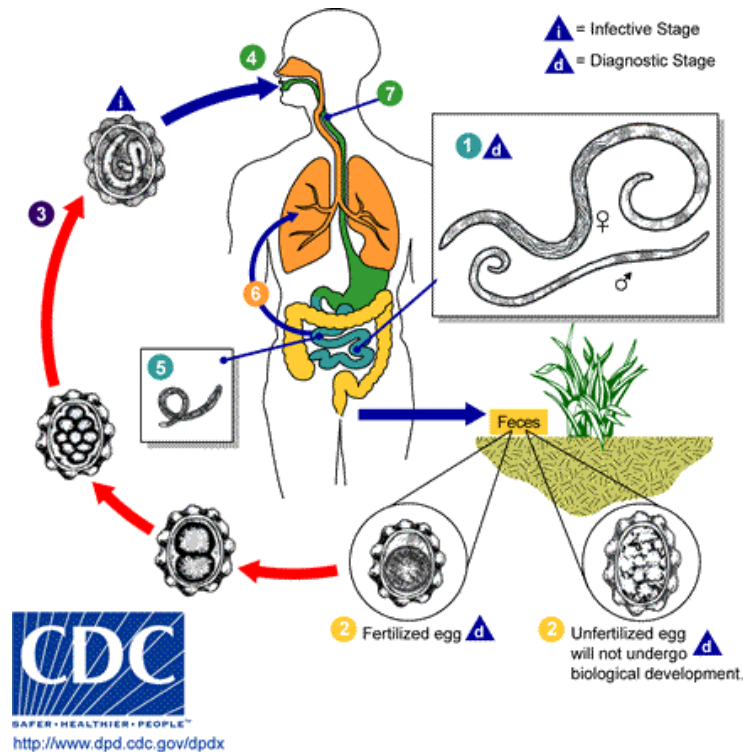


**Ilustração 2.** Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de *Ascaris* spp. (a) ovo fértil mamilonado, (b) ovo larvado decorticado, (c) larva, (d) porção posterior do verme adulto macho. Fonte: Luciana Maria (Modificado).

A ascaridíase humana pode ser dividida em duas fases distintas caracterizadas por aspectos biológicos específicos do agente etiológico. A fase inicial, denominada de ascaridíase larval ou aguda, é causada pela migração hepato-traqueal das formas larvais do parasito. Esta primeira fase evolui para a fase crônica intestinal, causada pelos vermes adultos.

O indivíduo se torna infectado no momento em que ingere ovos de *A. lumbricoides* ou *A. suum* contendo a larva infectante (L3). Após a ingestão, os ovos vão para o intestino delgado, se rompem no intestino grosso e as larvas são liberadas. Após a penetração na mucosa intestinal, as larvas caem na corrente sanguínea e são carreadas inicialmente para o fígado através da circulação portal e posteriormente para o coração e pulmão (Murrell et al., 1997). No pulmão as larvas saem da circulação, penetram no parênquima pulmonar e atingem os espaços alveolares. Instaladas nos alvéolos pulmonares, as larvas sofrem uma muda para L4 e ascendem a árvore brônquica passando pelos bronquíolos, brônquios, traqueia e laringe, onde provocam um efeito de tosse no hospedeiro e então as larvas são expelidas ou novamente deglutidas (Dold e Holland, 2011). Uma vez deglutidas, as larvas atingem o intestino delgado, transformando-se em juvenis, e ao atingirem a maturação sexual tornam-se vermes adultos prontos para a reprodução e as fêmeas iniciam a postura de milhares de ovos que são liberados nas fezes do hospedeiro diariamente. Esses ovos presentes no solo, não embrionados, em condições favoráveis para seu desenvolvimento, embrionam-se e a larva formada sofre duas mudas até

atingirem o estágio infectante (L3) e novamente infectar um hospedeiro. Os vermes adultos presentes no intestino do hospedeiro podem perdurar a infecção por vários anos. (Dold; Holland, 2011, Crompton, 2001).



**Ilustração 3.** Ciclo biológico do parasito *Ascaris* spp. Fonte: CDC, 2012.

#### 1.1.4. Fisiopatologia

Durante a migração das larvas pelas vias aéreas do hospedeiro, conhecida como Ciclo de Loss, é caracterizada como uma fase crucial para o ciclo de vida do parasito, mas ainda pouco estudada. A falta de um diagnóstico específico para a ascariíase larval, a limitação de estudos envolvendo experimentação humana e a falta de um modelo experimental padronizado torna essa doença uma grande incógnita para a parasitologia atual.

Como ocorre na maioria das infecções helmínticas, a migração pulmonar das larvas de *Ascaris* sp. induz uma intensa resposta inflamatória eosinofílica no local da migração, produzindo uma gama de manifestações clínicas, como asma, dispneia, broncoespasmos, tosse, febre e dor substernal, conhecida como síndrome de Loeffler (Chitkara; Krishna, 2006, Hirakawa et al., 2009; Hoenigl et al., 2011). Essa resposta pode

levar a graves distúrbios respiratórios nos indivíduos infectados. (Beaver, 1975; Spillmann, 1975; Pawlowski et al., 1982).

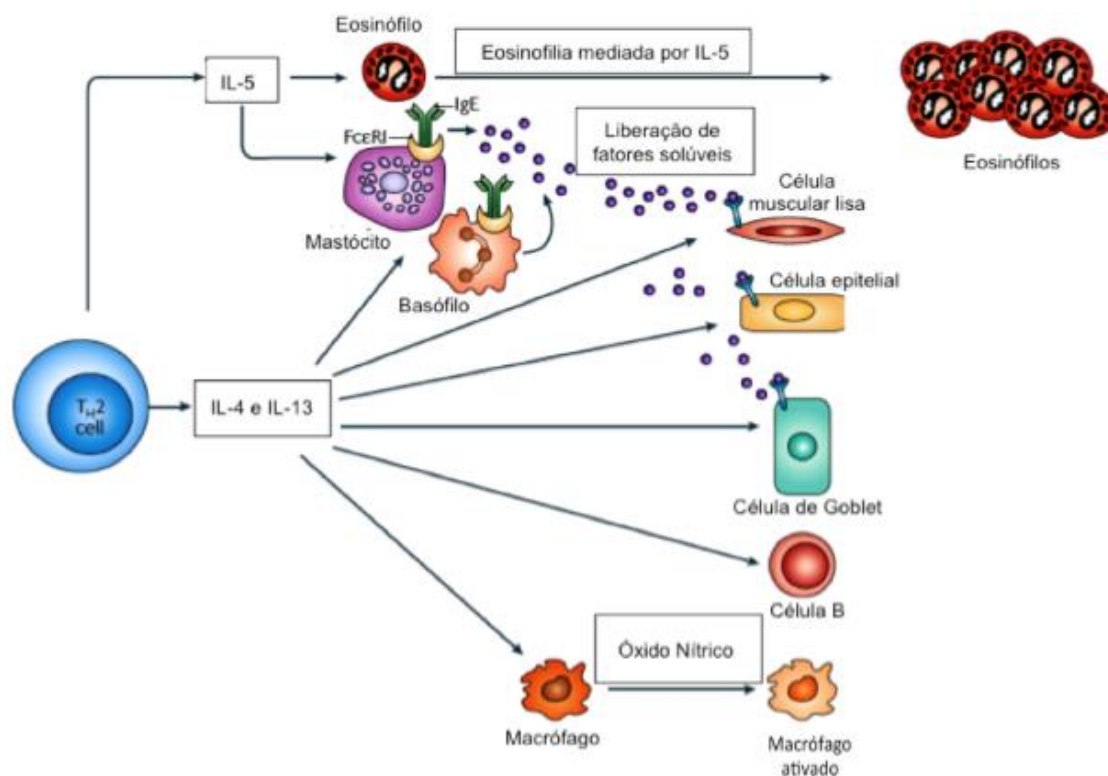
Neste contexto, a literatura médica descreve casos de hematêmese (Ahmad et al 2015), pneumonite eosinofílica (Herrera and Meneses 2005), e patologias associadas a presença do verme adulto como a obstrução intestinal aguda ou subaguda (Louw 1966; de Silva et al 1997b; Mwenda and Ilkul, 2013), apendicite (Louw 1966), abscesso hepático (Chauhan et al 2015), ascaridíase pancreática (Louw 1966; Galzerano et al 2010; Azhar et al 2015) e biliar (Louw 1966; Morano and Morano, 1988; Sanjeev and Lum, 2012; Wang et al 2013; Asif et al 2014; Umetsu et al 2014; Azhar et al 2015; Khuroo et al 2015). Além disso, migração larval “atípica” pode causar raras e graves complicações em órgãos não relacionados ao padrão migratório, como a ascaridíase escrotal (Dey et al 2012).

Com relação à desnutrição, evidências epidemiológicas demonstram que hospedeiros portadores de infecções crônicas e, ou com intenso parasitismo podem apresentar graves consequências nutricionais com impacto no desenvolvimento físico e cognitivo (de Silva et al. 1997a). Um dos fatores que pode contribuir para a desnutrição do hospedeiro é o bloqueio da absorção de nutrientes no intestino delgado pela ação de inibidores de enzimas pancreáticas secretadas por *Ascaris* spp. (Green 1957).

### **1.1.5. Resposta imunológica na ascaridíase**

As infecções helmínticas, incluindo infecções causadas por helmintos gastrointestinais, são caracterizadas pela participação primordial dos monócitos/macrófagos, eosinófilos, linfócitos e seus subtipos (Evengard, 1989). Estudos em sistemas experimentais com modelos animais demonstraram a importância de respostas de citocinas Th2 a helmintos gastrointestinais e da importância das citocinas IL-4, IL-5, IL-33 e IL-13 e regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), envolvidas na ativação de mastócitos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e níveis elevados de anticorpos IgE que diminuem as células inflamatórias do tipo Th1, reduzindo a excreção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 (Maizels, 2003).

Recentemente, foi elucidado por infecção experimental em camundongos que as fases migratórias de larvas de *Ascaris* spp. no pulmão induz uma robusta imunidade inata, caracterizada por uma produção inicial de IL-5 (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013), que, embora não esteja ainda demonstrado na ascaridíase, as células linfóides inatas (ILCs) parecia ser a fonte provável, conforme demonstrado em outras infecções por helmintos (Maizels et al., 2012). No pico da migração das larvas no pulmão (8<sup>o</sup> dia da infecção), observa-se uma alta produção de IL-6, que se correlaciona com a infiltração de neutrófilos proeminente. Quando as larvas começam a sair do órgão e migrar para o intestino delgado, o infiltrado neutrofílico é substituído por células mononucleares e eosinófilos, principalmente, que coincidem com um aumento gradual do TNF no tecido (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). No entanto, apesar de ser muito bem detectável no pulmão durante a migração das larvas, o papel das células da imunidade inata e os seus produtos de anti-helmínticos ou anti / pró-homeostase na ascaridíase precoce, permanece desconhecido.



**Ilustração 4.** Painel de citocinas da resposta do tipo Th2 em helmintoses. (Adaptado de Anthony et al., 2007).

Estudo da resposta imune humoral em camundongos BALB/c demonstrou que anticorpos séricos IgG1 e IgM reagem com antígenos de todas as fases do ciclo de vida

*A. suum*, apesar de IgG1 ser mais reativo contra antígenos do estágio larval (L3). Isotipos IgG1 anafilático e IgE específicos contra antígenos brutos de *Ascaris* spp. também foram detectados no soro dos camundongos (Enobe et al 2006). E, ainda, Pires e colaboradores (2001) produziram um anticorpo monoclonal do isotipo IgG1 kappa contra uma proteína do extrato de verme adulto de *A. suum* com uma constante de afinidade de  $1,7 \times 10^9$  M<sup>-1</sup>.

Diferente da maioria das infecções helmínticas crônicas, caracterizadas pela polarização da resposta imune mediada por células Th2 e regulatórias, na ascaridíase larval, a resposta inflamatória aparece como principal estratégia de resistência do hospedeiro infectado. Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que, a reinfeção sucessiva por ovos embrionados de *Ascaris* spp. induz uma intensa inflamação tecidual eosinofílica, que está associada com uma redução significativa na carga parasitária (Nogueira et al., 2013). Além disso, camundongos da linhagem ST2, deficientes no receptor da citocina IL-33, resultando na exacerbação da resposta inflamatória, novamente apresentaram uma redução significativa no número de larvas circulantes (Nogueira et al., 2016). Por outro lado, estudos demonstram que a ausência de inflamação aguda nos pulmões de animais deficientes em eosinófilos resultou em um aumento da carga parasitária. Somado a isso, camundongos deficientes em óxido nítrico, os quais desenvolvem uma resposta inflamatória reduzida, apresentaram um aumento significativo no número de larvas durante a migração (Cavalcanti et al., 2013).

Dessa forma, propomos que o modelo de proteção na ascaridíase larval seja mediado por uma intensa resposta inflamatória com destaque para as células linfóides inatas, eosinófilos e neutrófilos, assim como seus mediadores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias).

#### **1.1.6. Vacina**

Atualmente, as estratégias disponíveis para intervenções profiláticas contra as geohelmintoses em geral, em especial a ascaridíase humana, são limitadas, uma vez que o sistema de educação em saúde e saneamento básico nas regiões endêmicas para a doença são extremamente precários, o que resulta em elevadas taxas de reinfeção após tratamento específico (Jia et al., 2012). Somado a esse fator, o diagnóstico padrão para a ascaridíase é limitante: até hoje continua baseado na detecção de ovos do parasito por

meio de técnicas de concentração dos exames parasitológicos de fezes (Lutz, 1919; Hoffman et al., 1934; Ritchie, 1948).

Enquanto os anti-helmínticos da classe Benzimidazol são altamente eficazes na remoção de infecções estabelecidas, eles não conferem proteção duradoura contra uma nova infecção. Assim, indivíduos residentes em áreas endêmicas são rapidamente reinfetados, mesmo após tratamento bem sucedido. Por esta razão, o uso extensivo de anti-helmínticos não foi capaz de interromper e, em alguns casos, até mesmo de limitar a transmissão destes parasitos; e devido a estas preocupações, têm-se estimulado esforços para o desenvolvimento de uma vacina com a finalidade de proteção a longo prazo contra as helmintoses (Brent et al., 2011).

Em 1964, Miller et al., mostraram que larvas de *Ancylostoma caninum* poderiam ser atenuadas usando 40.000 röntgens de raios-X. À medida que a quantidade de radiação aumentava, a capacidade de infecção das larvas e sua patogenicidade era reduzida. Ele também observou que as larvas fêmeas irradiadas em 40.000 röntgens ou mais foram consistentemente estéreis. Em uma única vacinação por via subcutânea em cães com 3-4 meses de idade utilizando 1.000 larvas de *A. caninum* expostas a 40.000 röntgens de raios-X, resultou num elevado grau de resistência para carga após o desafio utilizando vermes normais, além de avaliação dos parâmetros hematológicos, de alterações clínicas e coprológicas. Miller, em seguida, realizou uma série de experiências para investigar o efeito da dupla vacinação com larvas irradiadas de *A. caninum* (irL3) e a determinar a via de administração da vacina [subcutânea (SC) ou por via oral]. Ele concluiu que a vacinação por via oral por duas vezes não foi tão eficaz como dupla vacinação em cães de 3-4 meses de idade, ao medir o estabelecimento de ancilostomídeos adultos após o desafio com a infecção. Ambas as rotas de vacinação pareciam igualmente eficazes em termos de resistência aos efeitos patogênicos da infecção, envolvendo observações hematológicas, coprológicas (ovos por grama de fezes), e observações clínicas após o desafio com a infecção com a larva L3. Miller favoreceu a vacinação subcutânea para a versão comercial da vacina irL3 que consiste numa gama de larvas irradiadas de *A. caninum*. A vacina foi testada em campo por cerca de 1.500 médicos veterinários e embora a vacina mostrou ser segura para os cães e até mesmo eficaz (90%), tinha um considerável prazo de validade curto (6 meses) e um conjunto exclusivo de condições de armazenamento. A vacina, portanto, foi suspensa em 1975 devido a uma falha comercial, o qual a maioria dos veterinários não estavam dispostos a incorporá-la em seu programa

de vacinação devido à dificuldade de armazenamento da vacina, sua vida útil curta, e a falta de imunidade esterilizante.

Uma nova geração de vacinas contra os ancilostomídeos foram descritos a partir de mais de 20 potenciais proteínas-alvo envolvidas no processo de alimentação sanguínea durante a ancilostomíase, sendo duas proteínas Na-GST-1 e Na-APR-1, os antígenos candidatos para o desenvolvimento clínico. Cada antígeno da vacina é uma enzima (ou enzima modificada) necessária durante o processo de alimentação do parasito. Quando utilizado como uma vacina, a hipótese é de que irá induzir anticorpos neutralizantes que irão interferir no seu processo de alimentação provocando a morte do parasito (Brent et al., 2011).

Na infecção por *Ascaris* spp., ainda não existem vacinas disponíveis para a sua prevenção e o tratamento é atualmente a principal forma de controle da infecção em seres humanos e suínos. Infelizmente, o tratamento farmacológico persistente resulta em sérios problemas, como os riscos de resistência e de resíduos de medicamentos anti-helmínticos em produtos de origem animal e no ambiente, o que torna urgente a necessidade de descobrir formas alternativas para a prevenção e controle da ascaridíase. Diversos estudos têm mostrado que, proteínas purificadas a partir do antígeno bruto de *A. suum* podem induzir uma imunidade protetora do hospedeiro, o que indica que o mesmo possuem moléculas imunogênicas (Tabela 1). Chen et al., 2012, demonstrou que a enzima enolase pode ser uma possível candidata vacinal contra a ascaridíase pois ela é capaz de desencadear uma resposta imunológica Th1 / Th2 que pode ser importante para a imunidade protetora do hospedeiro contra larvas do parasito. O estudo foi feito a partir de um plasmídeo construído chamado pVAXEnol que expressa o gene da enolase de *A. suum*, onde foi possível avaliar respostas imunológicas celulares e humorais em camundongos imunizados com pVAXEnol, e avaliar a imunidade protetora induzida por pVAXEnol contra a infecção com larvas infectantes de *A. suum*. Já no estudo de Tsuji et al., 2001, foi isolada uma proteína de superfície de 14 Kda de *A. suum* chamada As 14, a qual foi juntamente combinada com uma toxina chamada CTB e utilizadas para imunização em camundongos BALB/c vacinados por via intranasal e apresentaram um aumento significativo no nível das imunoglobulinas IgE e IgG séricas e de IgA de mucosa, sendo este aumento associado a uma redução de 64% no número de larvas recuperadas, em comparação com o grupo não vacinado.

Estudos como estes nos auxiliam na continuação do desenvolvimento de vacina segura e eficaz contra a ascaridíase. Os principais trabalhos publicados na literatura

relacionados com a identificação e desenvolvimentos de candidatos vacinais para a ascaridíase estão apresentados na Tabela 1.



**Tabela 1. Revisão bibliográfica sobre candidatos vacinais para a ascariíase.**

Candidato vacinal/ Adjuvante	Estágio do parasito	Resultado/ nível de proteção	Modelo Experimental	Referência
Antígeno de lipossoma encapsulado	Verme adulto de <i>A. suum</i>	88,9%	Camundongos ICR fêmeas.	Lukes S, 1992.
r-As14 acoplado com toxina B de Cólera / FCA (Freund's)	Larva L3 de <i>A. suum</i>	- 50% quando administrado via subcutânea. - 99% quando administrado via oral. - p < 0,01 quando administrado via intranasal (Mais efetivo).	Camundongos BALB/c fêmeas, 6 semanas de idade.	Tsuji N, et al., 2001
Fração 97 kDa ,42 kDa e 14 kDa de antígeno de verme adulto de <i>A. suum</i>	Verme adulto de <i>A. suum</i>	14kDa – 63% 42 kDa – 93% 97 kDa - 0%	Porcos de 8 a 15 semanas de idade.	Serrano FJ et al., 2001.
r- As 16	Larva L3 de <i>A. suum</i>	- 50% quando administrado via subcutânea. -99% quando administrado via oral. - p<0,01 quando administrado via intranasal	Camundongos BALB/c fêmeas, 6 semanas de idade	Tsuji N, et al., 2003
r-As24 / FCA (Freund's)	Larva L3 de <i>A. suum</i>	- 58% administrado via subcutânea.	Camundongos BALB/c fêmeas, 8 semanas de idade.	Islam MK, Takeharu Miyoshi, Naotoshi Tsuji, 2005.
Extrato bruto de larva de <i>A. suum</i> (AsCE)  As-enol-1 com plasmídeo (pVAX- Enol) /  FCA (Freund's)	Larva L3 de <i>A. suum</i>	- 61,13% de quando utilizado o pVAX-Enol ;  - 88,62% quando utilizado AsCE administrado via muscular.	Camundongos Kunming fêmeas, 8 semanas de idade.	Chen N et al., 2012
As14 As16 As24 As37 As-enol-1 As-GST-1	Larva L3, Adulto, ES. (As14, 16, 24 e 37).  DNA- As-Enol- 1.	64% r-As14 58% r-As16 58% r-As24 69% r-As37 61% As-Enol-1  -	Camundongos BALB/c	Zhan B, et al., 2014

A partir destes dados, mais do que nunca, estudos sobre a biologia da infecção por *Ascaris* spp. fazem-se necessários, principalmente envolvendo diferentes aspectos da resposta imunológica na ascaridíase, com a finalidade de desenvolvimento de novas estratégias imunoproláticas frente a doença, como por exemplo o uso de vacinas, visando o controle e diminuição da carga parasitária nos indivíduos infectados nas regiões endêmicas.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), aproximadamente um quinto da população mundial está infectada por *Ascaris* spp. e mais da metade está sob risco de infecção. O impacto é considerável e reflete em uma perda anual estimada de 1,817 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”, DALYs) desencadeada pela infecção no mundo (Brooker et al., 2010). Considerada como doença tropical negligenciada, a ascaridíase pode ser caracterizada pela cronicidade da infecção, visto que os parasitos têm a capacidade de sobreviver no hospedeiro por muitos anos, mesmo diante de uma forte resposta imune induzida. É também a geohelminose mais frequente no mundo, atingindo na sua maior totalidade comunidades carentes e crianças em idade escolar. Essas crianças frequentemente apresentam desnutrição, déficit de crescimento, cognitivo e educacional (WHO, 2005). Em crianças vermes adultos de *Ascaris* spp. podem aglomerar-se no íleo e causar obstrução parcial e, em casos mais graves, a obstrução completa deste, levando ao infarto e/ou perfuração intestinal (Khuroo et al., 1990).

Estratégias para intervenções profiláticas contra a ascaridíase humana são limitadas, uma vez que o sistema de educação em saúde e saneamento básico nas regiões endêmicas para a doença são extremamente precários, e resulta em elevadas taxas de reinfecção após tratamento específico (Jia et al., 2012). Somado a esse fator, o diagnóstico padrão para a ascaridíase é limitante: até hoje continua baseado na detecção de ovos do parasito por meio de técnicas de concentração dos exames parasitológicos de fezes (Lutz, 1919; Hoffman et al., 1934; Ritchie, 1948).

A partir destes dados, mais do que nunca, estudos sobre a biologia da infecção por *Ascaris* spp. fazem-se necessários, principalmente envolvendo diferentes aspectos da resposta imunológica na ascaridíase, com a finalidade de desenvolvimento de novas estratégias imunoprofiláticas, como por exemplo o uso de vacinas. Nesse sentido, o presente trabalho busca a avaliação da resposta imunológica celular e humoral de camundongos imunizados pelos antígenos de *A. suum*, através da análise da carga parasitária no pulmão durante a migração das larvas pelo órgão bem como aspectos fisiológicos e imunopatológicos teciduais e sistêmicos após as imunizações seguidas do desafio com o parasito.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia vacinal e imunogenicidade de antígenos de *A. suum* na ascaridíase experimental.

#### **3.1.1 Objetivos específicos**

3.1.1.1. Avaliar a eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e lavado bronco alveolar de animais previamente imunizados com antígeno bruto de larva, antígeno bruto de verme adulto e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*, e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.

3.1.1.2. Avaliar a imunogenicidade dos candidatos vacinais por meio do perfil de citocinas sistêmicas e teciduais em animais imunizados com antígeno bruto de larva, antígeno bruto de verme adulto e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*, e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.

3.1.1.3. Avaliar mecânica pulmonar dos animais imunizados com antígeno bruto de larva, antígeno bruto de verme adulto e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*, e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

3.1.1.4. Avaliar perfil histopatológico do pulmão, o perfil de leucócitos, presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar de animais previamente imunizados com antígeno bruto de larva, antígeno bruto de verme adulto e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*, e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.

3.1.1.5. Avaliar a antigenicidade dos antígenos de *A. suum* através do perfil eletroforético e reconhecimento soro-antígeno através da análise pelo Western Blot.

3.1.1.5.1. – Caracterizar o perfil de imunoglobulinas específicas e fracionadas no soro de animais previamente imunizados com os antígenos bruto de verme adulto, antígeno bruto de tegumento, e bruto de larva de *A. suum*.

3.1.1.6. Avaliar a participação humoral na proteção da carga parasitária mediada pela transferência passiva de anticorpos IgG purificados de animais previamente imunizados com os antígenos bruto de verme adulto, bruto de larva e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*.

## **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Comitê de Ética**

A manutenção e o uso de animais foram realizados em suma concordância com as recomendações do COBEA. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil através do protocolo #187/2014.

#### **4.2. Parasitos**

Vermes adultos de *Ascaris suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte (Latitude: 19°51'57.09"S e Longitude 43°55'51.13"O), Minas Gerais, Brasil. Os vermes adultos fêmeas foram mantidos em PBS e levados para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais para serem processados. A identificação e comprovação da espécie em questão foram confirmadas pelo uso de um conjunto de primers espécie-específico desenvolvido pelo nosso grupo no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos e patenteados pela Universidade Federal de Minas Gerais (Composição, Processo, Uso e Kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris* - BR 102013008846).

#### **4.3. Camundongos**

Foram utilizados camundongos BALB/c machos adultos (7 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Durante todo o período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores e água à vontade, com condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ), umidade ( $60 \pm 10\%$ ) e luminosidade (ciclo claro-escuro 12 horas).



#### **4.4. Embrionamento dos ovos**

O embrionamento dos ovos de *A. suum* foi realizado conforme descrito por Boes et al. (1998), modificado por Gazzinelli-Guimarães et al., 2013. Os ovos foram isolados dos úteros dos vermes adultos fêmeas por maceração mecânica, purificados por filtração em telas de nylon 100 µM, colocados em garrafas de cultura com 50 mL de ácido sulfúrico 0,2 M, na concentração de 25 ovos/µL e, mantidos em estufas a 26°C por 400 dias (Eriksen, 1990). Durante a incubação, as garrafas de cultura foram oxigenadas por agitação manual três vezes por semana. O embrionamento dos ovos foi avaliado por microscopia óptica a cada 10 dias, e a partir da análise de três contagens independentes de 10 µL de suspensão de ovos, foi calculado o percentual de embrionamento.

#### **4.5. Indução da eclosão das larvas em cultura**

Para a indução da eclosão das larvas de *A. suum* foi utilizado um método padronizado de eclosão das larvas para *Toxocara canis*, usando HBSS (solução tampão de Hank) (Ponce-Macotela et al., 2011), com algumas modificações. Os ovos mantidos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> após 110 dias de cultura foram centrifugados a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após o descarte do ácido, os ovos foram ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 5% e incubados a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para rompimento da membrana exterior dos ovos. Após a incubação, os ovos totalmente embrionados foram separados dos não embrionados por centrifugação a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os ovos embrionados foram concentrados no sobrenadante, foram lavados três vezes em 20 mL de PBS por centrifugação a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sedimento contendo os ovos embrionados foi ressuspensado em solução de Hank pH 2,0, seguida de incubação durante 30 minutos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, foi adicionado à solução de Hank pH 7,4 e centrifugado em 800g por 10 minutos. O pellet de ovos formado foi ressuspensado em meio RPMI-1640 (SIGMA, EUA), em pH 7,2 suplementado com 4% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, EUA) e distribuído em placas de cultura de 24 wells, para a indução da eclosão in vitro das larvas. A cultura foi mantida durante sete dias.

#### **4.6. Produção de antígenos: bruto de larva (BL), extrato bruto (EXB) e de tegumento (TEG)**

O antígeno bruto de verme adulto foi obtido inicialmente pela maceração mecânica do parasito em solução salina PBS por macerador de tecidos (Tissue Grinder, Fisher Scientific, EUA) e em seguida, intensificada pelo uso de um sonicador. O produto bruto mantido sob resfriamento em gelo foi ultrassonicado a 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos para cada ciclo, totalizando cinco ciclos. Em seguida, o produto bruto solúvel foi purificado por centrifugação a 800 g durante 10 minutos. O sedimento foi então descartado e os sobrenadantes armazenados a -80°C até o seu uso. Para a produção de antígeno bruto de tegumento o protocolo realizado foi o mesmo descrito acima para a produção do extrato bruto de verme adulto, entretanto, no momento do primeiro passo que é descrito pela maceração mecânica do parasito, foi retirada todas as suas estruturas internas do verme adulto deixando apenas o próprio tegumento do parasito para ser macerado.

Já para produção do antígeno bruto de larva, uma vez em cultura de eclosão como descrito no item 4.4, as larvas foram coletadas e transferidas para um tubo Falcon de 50 mL. O conteúdo foi centrifugado a 800 g por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10 mL de PBS. Foi feita uma nova centrifugação e o sobrenadante novamente descartado. O pellet mais uma vez ressuspenso em 5 mL de PBS foi levado para o sonicador a 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos cada ciclo, totalizando 10 ciclos. Após sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 800 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante então foi coletado e dosado.

A quantidade de proteínas em todas as preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

#### **4.7. Protocolo de imunização**

Os animais foram divididos em cinco grupos contendo 15 animais cada. O primeiro grupo (G1) se caracteriza sendo o grupo controle não imunizado e não infectado (PBS NI); o grupo dois (G2) foi composto por animais imunizados somente com PBS; o grupo três (G3) foi o grupo imunizado com o adjuvante *Bp*MPLA (Monofosforil lipídio



contendo 2.500 ovos embrionados com cerca de 150 dias de cultura em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e depois com 0,1 mL de H<sub>2</sub>O para remover os ovos remanescentes na seringa e agulha, como descrita por Lewis et al. (2006).

#### **4.9. Perfil de proteção**

A carga parasitária em todos os grupos foi avaliada com base na recuperação total das larvas nos pulmões somados ao lavado bronco alveolar dos animais após oito dias de infecção. Nesse tempo de infecção, o órgão foi coletado, picotado com tesoura cirúrgica e colocado em um aparato de Baermann modificado por 4 horas em PBS a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As larvas foram recuperadas no pellet do aparato, fixadas em formalina 4% e quantificadas por microscopia óptica.

#### **4.10. Avaliação da imunogenicidade**

##### **4.10.1. Avaliação de citocinas teciduais**

O pulmão trilobado (direito) foi retirado de 7 animais de cada grupo para determinação do perfil de citocina tecidual. Foi feita a pesagem de 100 mg de tecido o qual foi homogeneizado pelo homogeneizador de tecidos Power Gen 125 (Fisher Scientific, EUA) em 1 mL de solução PBS tamponada com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO<sub>4</sub>) suplementada com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween20. O homogenato foi centrifugado à 800 g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação das citocinas IL-5, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF-B por ELISA (R&D, EUA), de acordo com a determinação do fabricante.

##### **4.10.2. Avaliação de citocinas séricas**

Para determinar o perfil de citocinas séricas, 500  $\mu$ L de sangue foram recolhidos de cada animal em todos os tempos do experimento. O sangue foi coletado utilizando uma pipeta capilar Pasteur sem anticoagulante a partir do seio retro-orbital e colocados em microtubos de coagulação, seguido de centrifugação e coleta do soro. A produção de

IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  pelo kit de Milliplex Th1/Th2/Th17 da plataforma Luminex (USA) de acordo com a determinação do fabricante.

#### **4.11. Análise de mecânica pulmonar**

Antes de realizar a eutanásia no 8<sup>o</sup> dia pós infecção, os animais foram pesados e anestesiados por via intra-peritoneal com xilazina (12mg/kg) e ketamina (68mg/kg). A seguir foi realizada uma traqueostomia seguida da introdução de uma cânula traqueal de metal com calibre de 18G acoplada a um ventilador mecânico controlado por computador (FlexiVent, SCIREQ). Os camundongos foram ventilados a uma taxa de 300 respirações por minuto. Após 3 minutos de ventilação, o modelo de fase constante foi usado para medir a capacidade total do pulmão (TLC), a capacidade residual funcional (FRC), a resistência (RI), a complacência dinâmica (Cdyn), assim como o volume expiratório forçado das vias aéreas no primeiro segundo (FEV100) usando o software FlexiVent. Ao término do experimento, foi realizada a eutanásia dos animais e os protocolos para obtenção dos órgãos para posteriores análises.

#### **4.12. Avaliação do perfil de leucócitos e a presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar (BAL)**

Para a análise do perfil inflamatório do lavado bronco alveolar (BAL) durante a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões, os animais foram eutanasiados no oitavo dia de infecção. Animais não infectados foram usados como grupo controle. O lavado bronco alveolar foi coletado por lavagem intratraqueal utilizando 2mL de PBS contendo albumina sérica bovina 0,3% (Sigma, EUA) e inibidores de protease (Mannheim, Alemanha). Em seguida o lavado foi centrifugado à 600 g por 10 min e a quantificação das células inflamatórias foi realizada por microscopia óptica em câmara de Neubauer. A presença de proteínas exsudadas e hemoglobinas no BAL foi medida através do sobrenadante do lavado e a dosagem feita através do kit comercial BCA (Pierce, EUA).

#### **4.13. Avaliação morfométrica e perfil histopatológico dos pulmões**

A quantificação do número de células inflamatórias presente no tecido pulmonar foi realizada por meio da análise morfométrica do pulmão. Basicamente, a análise morfométrica se baseou em imagens de 40 campos randomicamente selecionados (área total:  $1,12 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) dos cortes histológicos de uma lâmina por animal. O infiltrado inflamatório no pulmão foi quantificado pela contagem do número de núcleos presentes nos cortes histológicos.

As alterações histológicas foram avaliadas no pulmão de camundongos BALB/c durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão oito dias após a infecção. Camundongos BALB/c não infectados foram utilizados como grupo controle. O pulmão bilobado (esquerdo) foi retirado dos animais de cada grupo para análise histopatológica, de acordo Junqueira e Junqueira (1983). O órgão foi fixado em solução de formalina 4% e gradualmente desidratado em etanol para depois ser diafanizado no xilol e incluído em blocos de parafina que serão cortado em 4-5 microns de espessura e fixados na lâmina de microscopia. As lâminas com o tecido pulmonar foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação dos danos tecidual, e com o corante Gomori para avaliação do depósito de colágeno no tecido. Todas as imagens dos tecidos foram avaliadas no microscópio óptico de luz (Leica DM 5000).

#### **4.14. Avaliação da antigenicidade**

##### **4.14.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

As amostras dos antígenos foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,4%; persulfato de amônio 0,5% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris HCl 0,5 M pH 6,8. Às amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; azul de Bromofenol 0,05%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glicerol 10%), fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação eletroforética. Foi aplicado nas canaletas 10ug de cada antígeno juntamente com o padrão de peso molecular. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-

HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% e pH 8,3; à voltagem constante de 100 Volts. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. A foto documentação foi realizada com o auxílio do equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, EUA).

#### **4.14.2. Western Blot**

Após a separação eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare) em tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%, pH 8,3) e submetidas a voltagem constante de 100 Volts por 1h a 4°C. Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram posteriormente coradas com solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S em 5% de ácido acético glacial) e descoradas com água. As membranas foram bloqueadas por 16 h, a 4°C, com TBS-T (20 mM de Tris, 200 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20), contendo 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T por 10 minutos e depois incubadas com o soro obtido de camundongo infectado, diluído 1:500 em TBS-T com 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos cada, seguido de incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma), na diluição de 1:5000 em TBS-T com 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e reveladas por quimioluminescência com o reagente ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. A foto documentação foi realizada com auxílio do equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, EUA).

#### **4.15. ELISA para detecção de produção de IgG específico e suas subclasses**

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando o soro de animais após as três imunizações com os antígenos de bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e de tegumento de *A. suum*. Placas de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas

com 100µL de antígeno bruto de verme adulto na concentração de 10µg por well e deixadas overnight a 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 8 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então a placa foi bloqueada com 250µL de PBS acrescido de 3% de BSA durante 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100µL dos soros dos animais dos grupos: PBS, MPLA, BL, EXB e TEG diluídos 1:1.000 em PBS com BSA 3% foram adicionados aos poços e incubados a 4°C overnight. As placas no dia seguinte então foram lavadas 8 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100µL do anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase diluído 1:2.000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação a 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por oito vezes com a solução de lavagem, e foi então adicionado 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

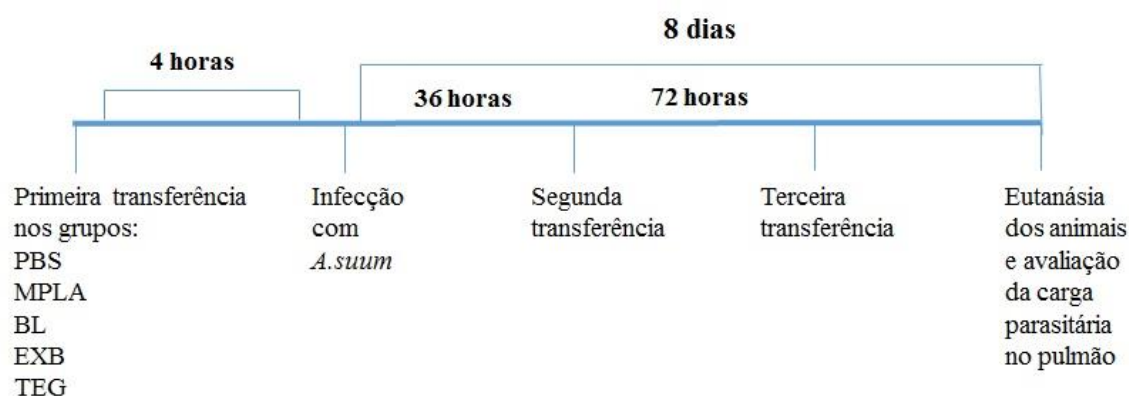
Na ELISA padrão para as subclasses de IgGs, o procedimento realizado foi o mesmo descrito acima, contudo utilizando os respectivos anticorpos secundários anti-IgG1 mouse, anti-IgG2a mouse, anti-IgG2b mouse, anti-IgG2c mouse e anti-IgG3 mouse, todos na diluição 1:1.000 diluídos em PBS-BSA 3%.

#### **4.16. Avaliação da proteção humoral da carga parasitária mediada pela transferência passiva de imunoglobulinas purificadas de soros de animais previamente imunizados**

Para a obtenção das imunoglobulinas purificadas foi realizado um pool de 3mL do soro de animais previamente imunizados com cada antígeno respectivamente. As amostras de soros foram submetidas à cromatografia de afinidade conjugada a proteína A que se liga a porção Fc das imunoglobulinas. A cromatografia se baseou na ligação dos anticorpos a coluna de proteína A em pH 8,6. Após a ligação, a coluna foi lavada utilizando uma solução de Tris HCl 50mM; NaCl 0.5 M, pH 7,5. O conteúdo eluído contendo as frações de imunoglobulinas purificadas foram recuperadas e dosadas pelo kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante. Após a



dosagem, foi delineado o experimento de transferência passiva nos camundongos que foi caracterizado por 6 animais BALB/c machos 8 semanas por grupo, sendo três transferências via intra-peritoneal, totalizando após todas as transferências 52µg de anticorpos de cada antígeno transferidos nos respectivos grupos. No grupo controle foi feita a transferência com PBS. Antes da eutanásia, foi coletado o sangue desses animais para posteriores análises com a obtenção do soro. O delineamento foi seguido como descrito a seguir:



**Ilustração 6.** Delineamento experimental do protocolo de transferência (imunização) passiva de anticorpos anti- antígeno de *A. suum*.

#### 4.17. Análise Estatística

Os resultados encontrados foram estatisticamente analisados pelo software GraphPad Prism 5.0. Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk.

Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Além disso, foram utilizados para determinar diferença significativa entre as médias de pelo menos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunns (dados não-paramétricos).

Além destes, o teste de Grubb's foi utilizado para detectar a presença de possíveis outliers nas amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

## **5. RESULTADOS**

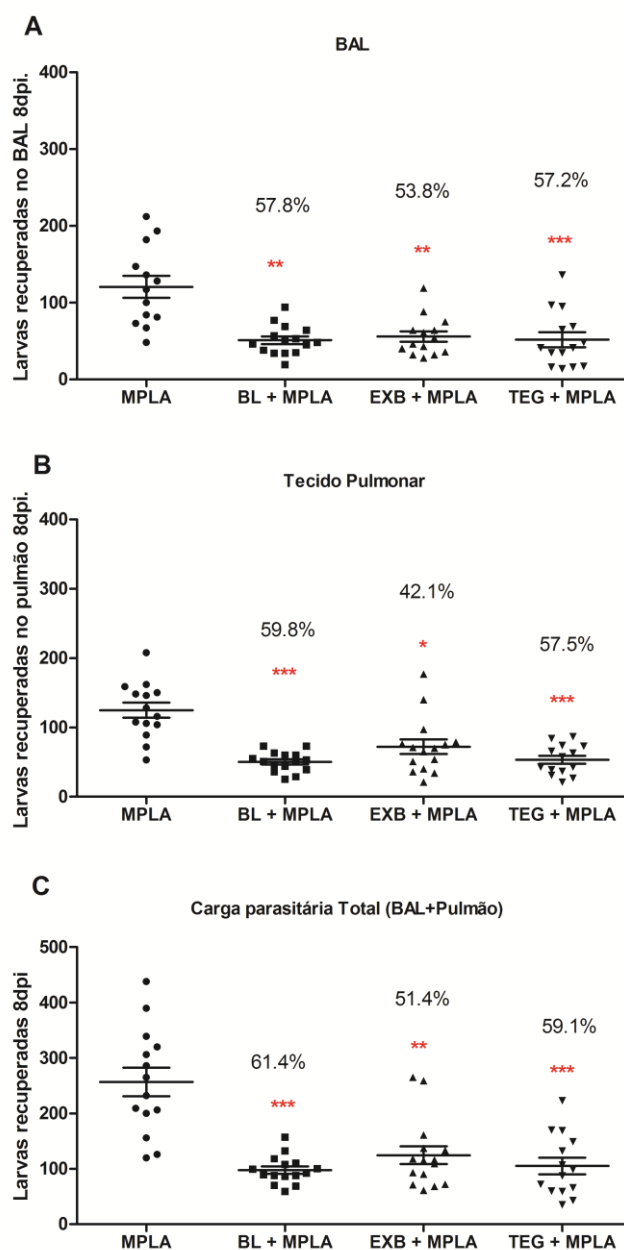
### **5.1 - Análise da eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e lavado bronco alveolar dos animais imunizados com antígenos de *A. suum* e desafiados com ovos infectantes do parasito**

Nesse estudo avaliamos a recuperação de larvas de *A. suum* nos pulmões e no lavado bronco alveolar (BAL) dos animais dos diferentes grupos, após oito dias de infecção. De uma forma geral, a análise dos resultados demonstrou que os animais dos grupos imunizados com os antígenos (BL, EXB e TEG) mais adjuvante apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparado ao grupo MPLA (somente imunizado com adjuvante).

A análise referente à recuperação de larvas no BAL (**Fig. 1A**), demonstrou uma relevante redução do número totais de larvas nos animais imunizados com o antígeno bruto de larva (BL+MPLA) atingindo 57,8% de proteção em relação aos animais controles (MPLA) ( $p<0,01$ ), seguido de 57,2% de proteção ( $p<0,001$ ) para o grupo imunizado com antígeno bruto de tegumento de *A. suum* (TEG+MPLA), e 53,8% de proteção ( $p<0,01$ ) para o grupo imunizado com o antígeno bruto de verme adulto de *A. suum* (EXB+MPLA).

Não obstante, os dados referente a recuperação de larvas no tecido pulmonar (**Fig. 1B**) revelou que o grupo imunizado com o antígeno bruto de larva (BL+MPLA) apresentou novamente uma importante taxa de redução da carga parasitária quando comparado com os animais controles, atingindo 59,8% ( $p<0,001$ ) de proteção, seguido de 57,5% ( $p<0,001$ ) de proteção para os animais imunizados com antígeno bruto de tegumento de *A. suum* (TEG+MPLA) e 42,1% ( $p<0,05$ ) de proteção para os animais imunizados com o antígeno bruto de verme adulto de *A. suum* (EXB+MPLA).

A soma das cargas parasitárias no BAL e no tecido pulmonar foi denominada de carga parasitária total (**Fig. 1C**), e dessa forma, (BL+MPLA) apresentou uma proteção total de 61,4% ( $p<0,001$ ), seguido de 59,1% ( $p<0,001$ ) para (TEG+MPLA), e 51,4% ( $p<0,01$ ) para os animais imunizados com (EXB+MPLA).



**Figura 1: Carga parasitária em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito. (A) Número de larvas recuperadas no lavado bronco alveolar dos animais após oito dias de infecção (B) Número de larvas recuperadas no tecido pulmonar dos animais após oito dias de infecção. (C) Número total da carga parasitária (BAL+Pulmão). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . O valor em percentual apresentado no gráfico indica a taxa de redução da carga parasitária em relação ao grupo controle (MPLA).**

## ***5.2 – Análise do perfil leucocitário e presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar de animais imunizados com antígenos de A. suum e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito***

Após a avaliação e quantificação da carga parasitária no pulmão dos animais dos diferentes grupos, foi analisado o perfil de leucócitos, juntamente com a presença de hemoglobina e proteínas totais no lavado bronco alveolar dos animais com intuito de observar o perfil do recrutamento de células inflamatórias para o pulmão após as imunizações e desafio.

Como resultado, foi observado um intenso recrutamento de células para o tecido pulmonar, principalmente uma intensa resposta caracterizada pela presença de células da resposta imune inata como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos.

Com relação a presença de leucócitos totais (**Fig. 2A**), todos os grupos imunizados com os diferentes antígenos de *A. suum* apresentaram um aumento significativo quanto ao número de células em relação ao grupo controle MPLA.

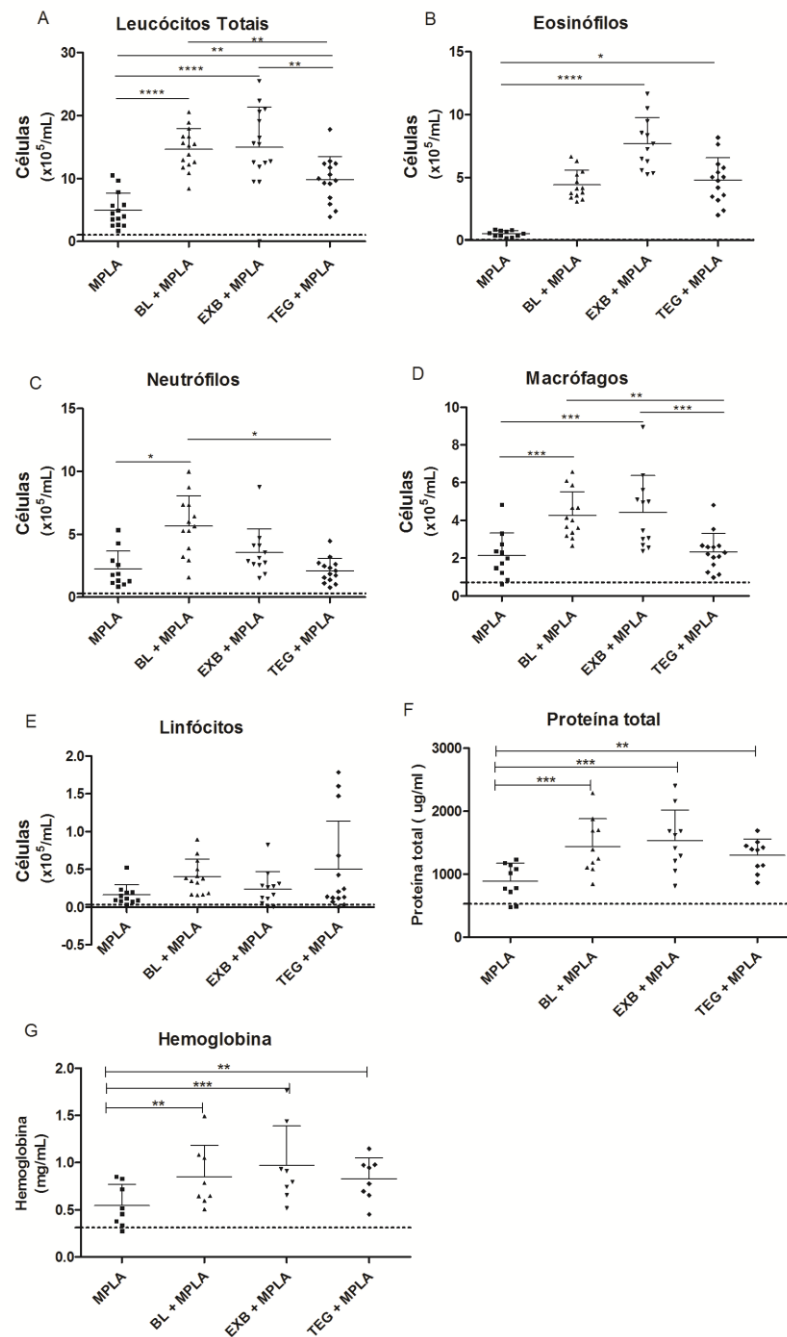
Com relação a análise diferencial dos leucócitos, foi avaliado a presença de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos no lavado bronco alveolar dos animais previamente imunizados e posteriormente desafiados.

A avaliação da presença de eosinófilos (**Fig. 2B**), demonstrou que todos os grupos imunizados apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo imunizado somente com o adjuvante MPLA. Por outro lado, somente o antígeno bruto de larva induziu um aumento do número de neutrófilos no BAL em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), (**Fig. 2C**); e por fim, os antígenos bruto de larva (BL) e extrato de verme adulto (EXB) induziram um aumento considerável no número de macrófagos em comparação aos controles (**Fig. 2D**).

Entretanto, notou-se de forma interessante, que apesar da relevante proteção induzida por meio da imunização ativa com o antígeno TEG, este antígeno induziu um menor número de células inflamatórias para BAL, quando comparado com os outros antígenos ( $p < 0,01$ ), principalmente o extrato bruto de verme adulto.

Em relação ao número de linfócitos presentes (**Fig. 2E**), não houve diferença significativa entre os grupos.

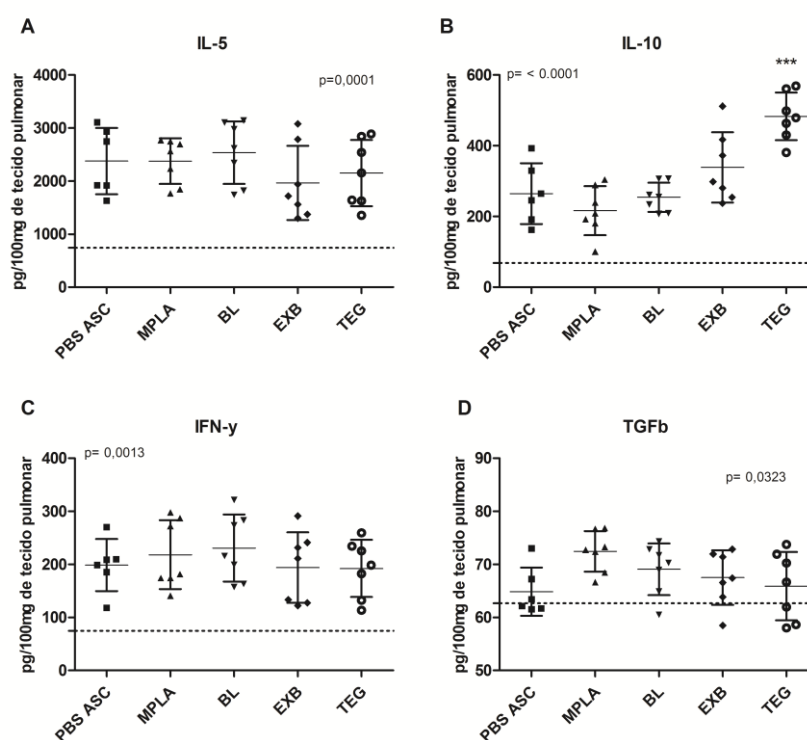
Quanto à presença de proteínas totais e hemoglobina (**Fig. 2F; 2G**), novamente foi observado um aumento destes biomarcadores no BAL dos animais imunizados com os diferentes antígenos, entretanto, com uma menor relevância para os animais imunizados com o antígeno TEG, reforçando a importância deste antígeno como um promissor candidato vacinal.



**Figura 2: Presença de células inflamatórias no lavado bronco alveolar dos animais após as imunizações com os antígenos de *A. suum* e posterior desafio com ovos infectantes do parasito. (A) Leucócitos totais (B) Eosinófilos (C) Neutrófilos (D) Macrófagos (E) Linfócitos (F) Proteína Total (G) Hemoglobina. O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado com PBS e infectado com o parasito. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo imunizado com o adjuvante MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .**

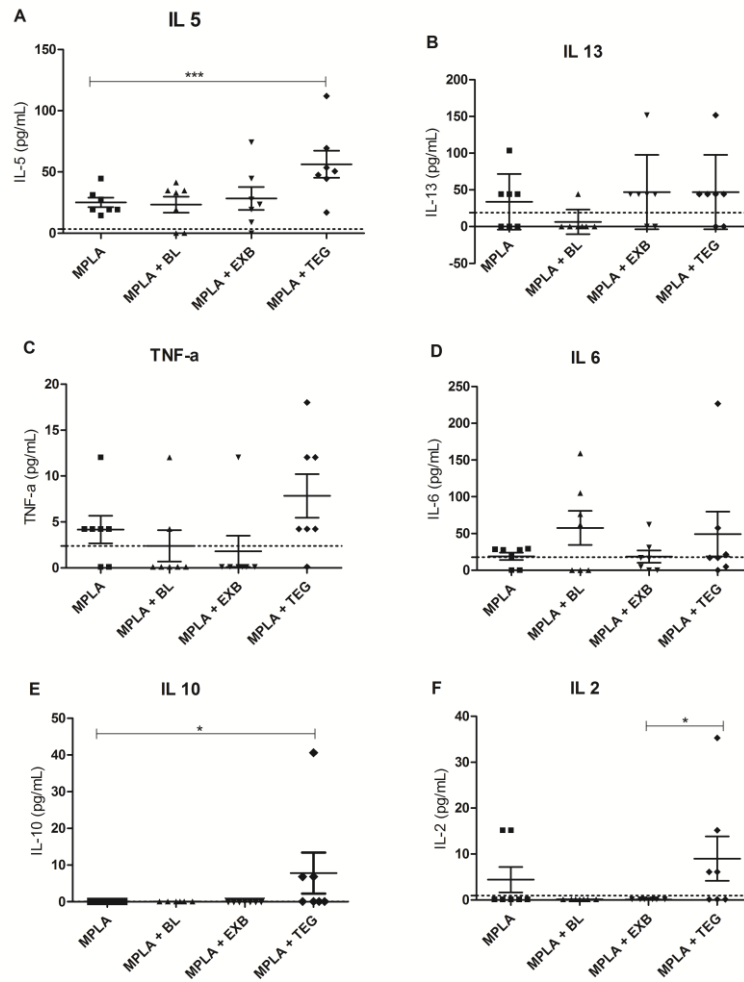
### 5.3 - Caracterização do perfil de citocinas teciduais e sistêmicas dos animais imunizados com antígenos de *A. suum*, e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Para caracterizar a resposta imune tecidual após as imunizações com os diferentes antígenos seguidas do desafio com o parasito, foram quantificadas as citocinas IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e TGF-B (**Fig. 3**) nos pulmões dos animais previamente imunizados e oito dias após infecção. Como observado na figura 3, a infecção por *A. suum* (PBS-ASC) induziu uma mistura de resposta inflamatória inata/T<sub>H</sub>2, com a predominância de uma resposta do tipo 2. Quanto aos níveis de IL-5, IFN- $\gamma$  e TGF-B, não foi possível observar diferença significativa da produção destas citocinas após as três imunizações com os antígenos e após a infecção com o parasito. Quanto a citocina IL-10, quando comparado com o grupo controle infectado (PBS-ASC), apenas o grupo imunizado por TEG apresentou diferença significativa quanto ao aumento da produção dessa citocina.



**Figura 3: Níveis teciduais de citocinas de camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum* e posteriormente infectados com ovos do parasito. (A) IL-5. (B) IL-10. (C) IFN- $\gamma$ . (D) TGFb. O pontilhado indica níveis basais da citocina referente ao grupo controle não imunizado e não infectado (PBS CT NI). Diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle infectado PBS ASC foi obtida pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.**

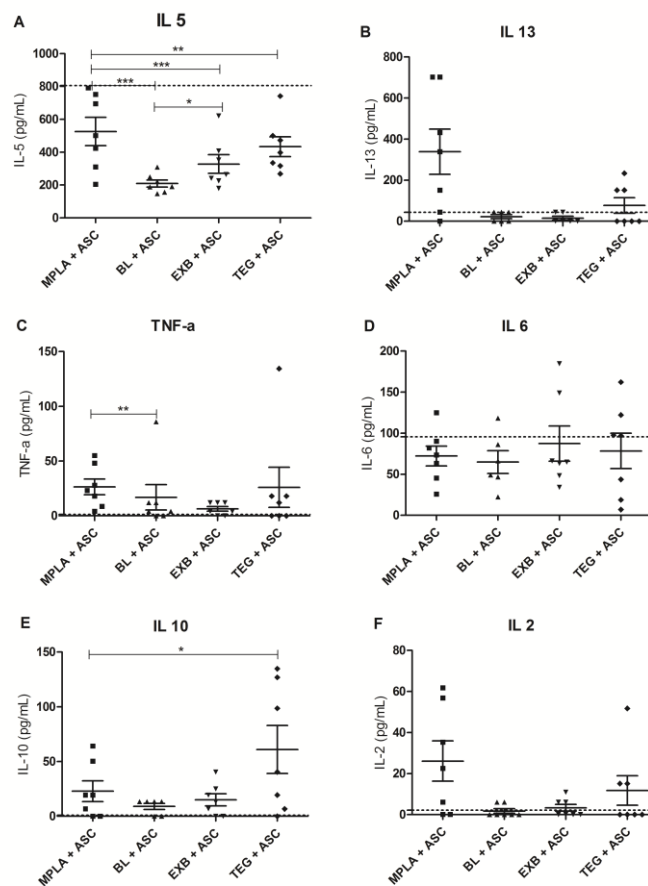
Por outro lado, a resposta imune sistêmica foi avaliada em dois momentos: após as três imunizações com os diferentes antígenos de *A. suum*, e após as imunizações seguida do desafio com o parasito. Em síntese, foi feita a quantificação das citocinas IL-5, IL-6, IL-2, IL-13, IL-10 e TNF-a, no soro dos animais dos diferentes grupos (**Fig.4**). Com base nos resultados da resposta imune sistêmica após as imunizações, foi possível destacar o papel do antígeno TEG em induzir um aumento significativo da produção de IL-5, IL-10 e IL-2 (**Fig. 4A; 4E; 4F**), quando comparado com o grupo controle MPLA. Quanto aos níveis das citocinas IL-13, TNF-a e IL-6 (**Fig. 4B; 4C; 4D**), não foi possível observar diferença significativa da produção destas citocinas quando comparado ao controle MPLA.



**Figura 4: Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum*.** (A) IL-5. (B) IL-13. (C) TNF-a. (D) IL-6. (E) IL-10. (F) IL-2. O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado apenas com PBS. Diferenças estatísticas com o grupo imunizado com o adjuvante MPLA foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



Em paralelo, a caracterização da resposta imune sistêmica após a imunização com antígenos de *A. suum* seguida da infecção pelo parasito (**Fig. 5**), demonstrou uma importante regulação da produção de IL-5 nos grupos imunizados e infectados em relação aos animais controles MPLA e PBS não imunizados porém infectados (**Fig 5A**). Quanto aos níveis das citocinas IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 (**Fig. 5B; 5C; 5D; 5F**), não foi possível observar diferença significativa quanto a produção destas citocinas em relação ao grupo controle MPLA. Por outro lado, foi observado um aumento relevante na produção de IL-10 nos animais imunizados com antígeno TEG e posteriormente infectados quando comparados aos animais não imunizados e infectados (**Fig 5E**).



**Figura 5: Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c após a imunização com antígenos de *A. suum* e infecção pelo parasito.** O pontilhado indica níveis da citocina referente ao grupo controle imunizado com PBS e posteriormente infectado. MPLA+ ASC – grupo imunizado com adjuvante MPLA e infectado. BL+ ASC - grupo imunizado com antígeno bruto de larva e infectado. EXB + ASC - grupo imunizado com extrato bruto de verme adulto de *A. suum* e infectado. TEG + ASC – grupo imunizado com antígeno de tegumento de *A. suum* e infectado. (A) IL-5. (B) IL-13. (C) TNF- $\alpha$ . (D) IL-6. (E) IL-10. (F) IL-2. Diferenças estatísticas em comparação ao grupo MPLA+ASC pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### **5.4 – Análise da mecânica pulmonar em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito**

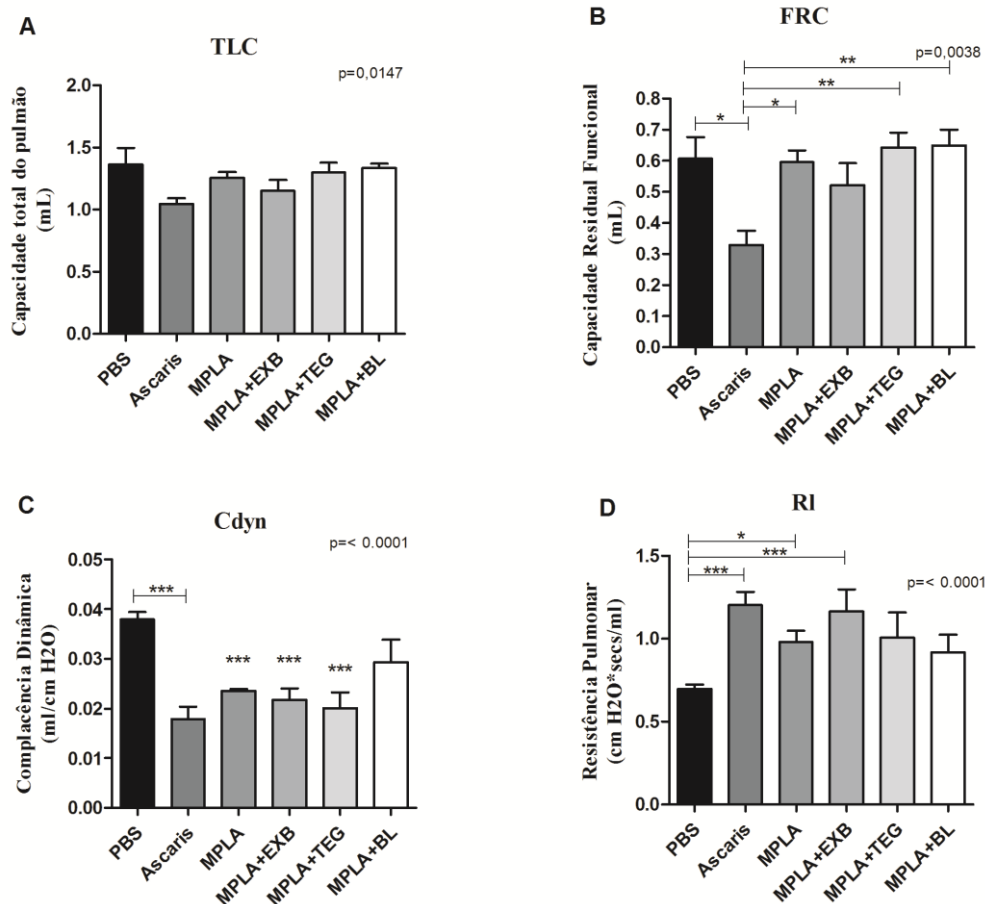
Para avaliar o funcionamento e fisiologia pulmonar dos animais imunizados com os antígenos de *A. suum* e posteriormente infectados com o parasito, foram avaliados parâmetros que medem a capacidade total do pulmão (TLC), a capacidade residual funcional (FRC), a complacência dinâmica (Cdyn), a resistência pulmonar (RI), assim como o volume expiratório forçado das vias aéreas no primeiro segundo (FEV100) por meio da espirometria nos pulmões dos animais (**Fig. 6**).

A análise dos dados da capacidade total do pulmão (TLC), demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos imunizados, o grupo controle infectado e o grupo controle não infectado (**Fig. 6A**).

Em relação a capacidade residual funcional (FRC), os grupos imunizados com antígeno bruto de larva (BL) e antígeno bruto de tegumento (TEG) ( $p < 0,01$ ), apresentaram um perfil dentro da normalidade esperada para um pulmão saudável, não obtendo diferença significativa de função em relação ao controle. (**Fig. 6B**)

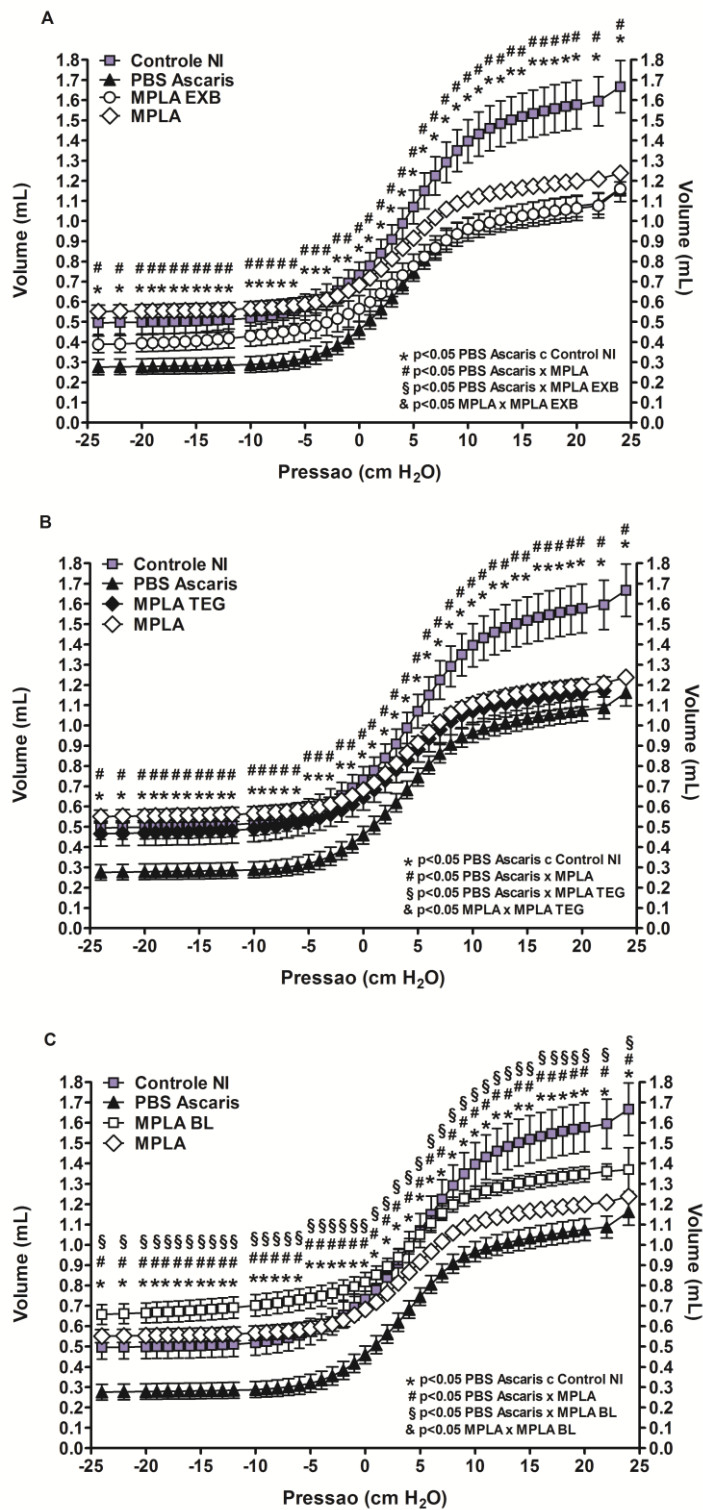
Entretanto, quando avaliada a complacência dinâmica do pulmão (Cdyn) destes animais, foi observada uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) deste parâmetro após a imunização com todos os antígenos, com exceção dos imunizados com antígeno BL (**Fig. 6C**).

E por fim, analisando a resistência pulmonar dos animais (RI), novamente os grupos imunizados com os antígenos BL e TEG apresentaram-se semelhantes ao perfil pulmonar de animais saudáveis não infectados. Por outro lado, os animais não imunizados e infectados, e imunizados com EXB apresentaram um importante aumento na resistência pulmonar caracterizando um mal funcionamento do pulmão (**Fig. D**), quando comparado aos outros grupos avaliados.



**Figura 6: Análise dos parâmetros funcionais dos pulmões de animais imunizados com antígenos de *A. suum* e infectados pelo parasito. (A) Capacidade total do pulmão (TLC). (B) Capacidade residual funcional (FRC). (C) Complacência dinâmica (Cdyn). (D) Resistência pulmonar (RI). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle sem infecção (PBS) e controle infectado (*Ascaris suum* (PBS *Ascaris*), estão representadas pelo \* na figura no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .**

Após a caracterização dos parâmetros fisiológicos descritos acima, foi feita a análise da curva pressão por volume pulmonar dos camundongos imunizados. Todos os grupos imunizados apresentaram uma relativa melhora do aspecto funcional do pulmão quando comparado ao aspecto apresentado pelo grupo controle infectado por *Ascaris suum* (PBS *Ascaris*), entretanto, para este parâmetro, apenas o grupo imunizado com o antígeno bruto de larva (BL), apresentou uma diferença significativa com relação ao grupo controle infectado ( $p < 0,01$ ), atingindo uma melhora considerável da função pulmonar semelhante ao do grupo controle não infectado (Controle NI) (**Fig. 7**).



**Figura 7: Avaliação da curva pressão por volume pulmonar através da espirometria em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum*. (A) Curva pressão por volume após imunização com antígeno EXB. (B) Curva pressão por volume após imunização com antígeno TEG. (C) Curva pressão por volume após imunização com antígeno BL. As diferenças significativas estão representadas de acordo com a legenda presente no gráfico.**

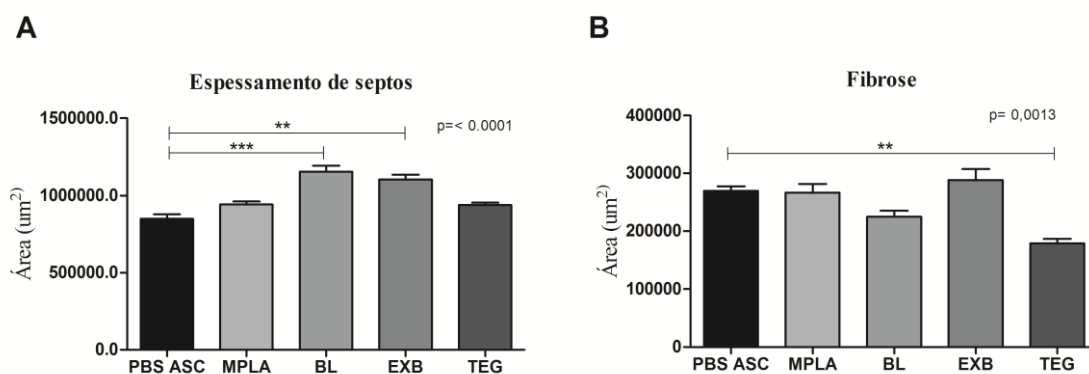
### 5.5 – Análise histopatológica em camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Para identificar a integridade tecidual dos animais imunizados com os antígenos de *A. suum* e posteriormente infectados pelo parasito foi o tecido pulmonar, que foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação dos danos tecidual, e com o corante Gomori para avaliação do depósito de colágeno no tecido (**Fig. 8**).

A análise histopatológica do pulmão dos animais demonstrou um aumento significativo no espessamento de septos nos animais dos grupos imunizados com antígeno BL ( $p < 0,001$ ) e antígeno EXB ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo controle sem imunização porém infectado com o parasito representado no gráfico pela sigla PBS ASC (**Fig. 8A**).

A avaliação da deposição de colágeno no tecido e conseqüentemente fibrose demonstrou de forma interessante que o antígeno TEG apresentou uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) deste marcador, quando comparado com os animais não imunizados porem infectados com *Ascaris* (**Fig. 8B**).

Com base nesses dados, o antígeno TEG se apresentou mais promissor quanto a redução de parâmetros de inflamação pulmonar após as imunizações e infecção com o parasito.

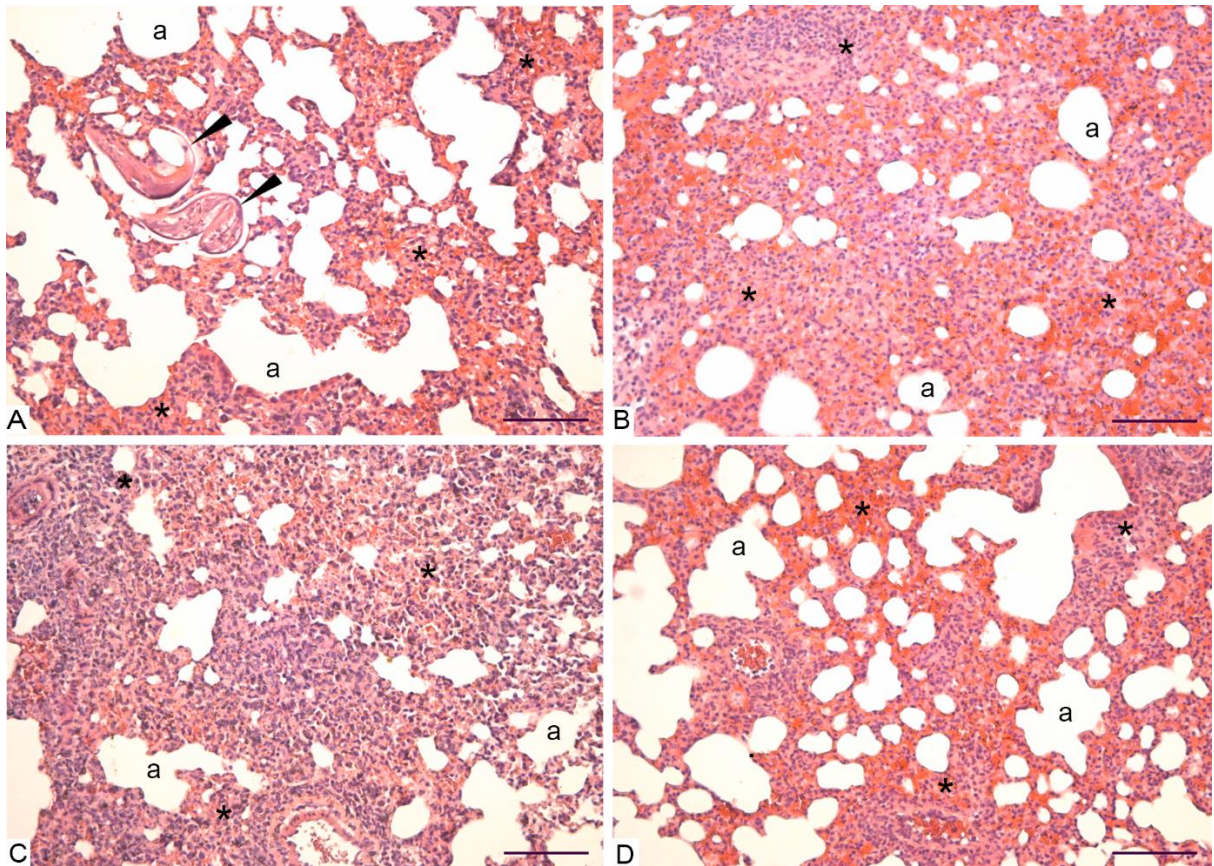


**Figura 8: Caracterização da integridade tecidual através do grau de espessamento dos septos interalveolares e da fibrose tecidual nos pulmões dos camundongos BALB/c imunizados com os antígenos de *A. suum*.** Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle infectado PBS+ASC estão representadas pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

A avaliação histopatológica do pulmão dos camundongos imunizados com PBS e o grupo imunizado com o adjuvante MPLA e posteriormente desafiados com o parasito, não apresentaram diferença significativa quanto ao grau de infiltrado inflamatório e por isso foram representados pela mesma imagem (**Fig. 9A**) na prancha histológica. Nestes animais controles foi observado um moderado infiltrado inflamatório perivascular e pequenos focos de hemorragia decorrentes principalmente do dano tecidual induzido pela migração das larvas no órgão.

Na avaliação histopatológica dos pulmões dos camundongos imunizados com o antígeno BL e EXB (**Fig. 9B e 9C**), já é possível observar um aumento significativo do infiltrado inflamatório, com uma diminuição dos espaços alveolares livres e um aumento significativo da hemorragia causada pelo dano tecidual, sendo mais prevalente no grupo imunizado pelo antígeno bruto de larva.

Por fim, na avaliação histopatológica dos pulmões dos camundongos imunizados com antígeno TEG (**Fig. 9D**), já foi possível observar uma melhora do quadro inflamatório, havendo uma redução do infiltrado perivascular, um aumento dos espaços alveolares livres, chegando a ser semelhante ao pulmão apresentado pelos camundongos apenas infectados pelo parasito.



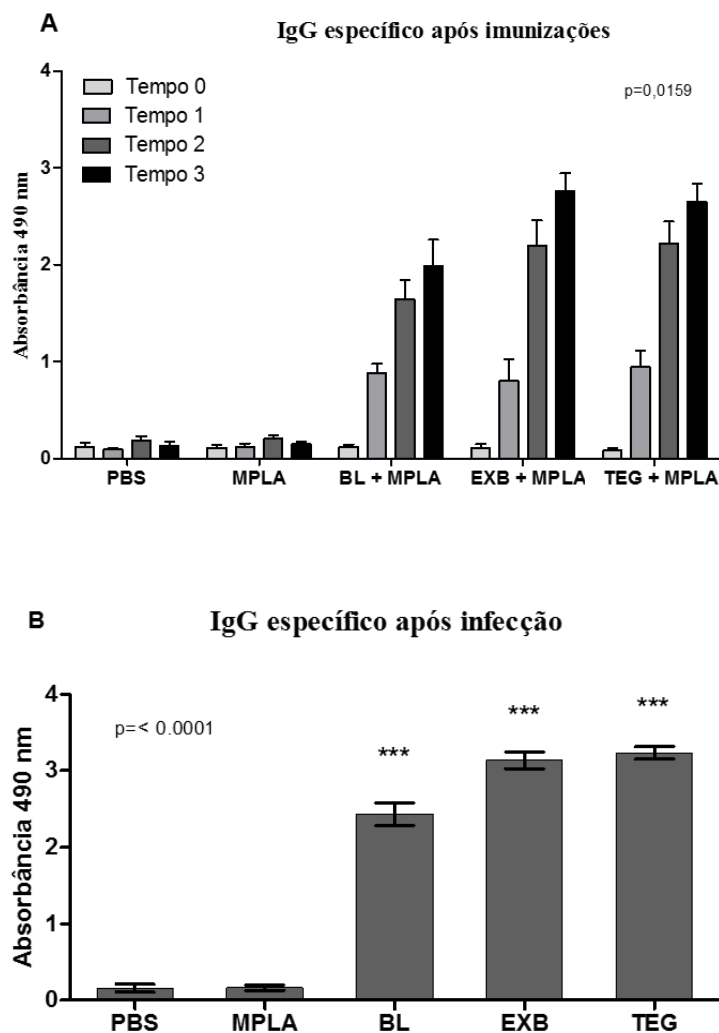
**Figura 9: Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no pulmão de camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *A. suum*.** (A) Ilustração referente ao grupo imunizado apenas com o adjuvante MPLA e infectado com o parasito, com presença moderada de infiltrado inflamatório perivascular (\*), presença de larvas de *A. suum* durante a migração pelo órgão (cabeças de seta) e presença de espaços alveolares livres (a). (B) Ilustração referente ao grupo de animais imunizados com antígeno BL, com aumento significativo do espessamento dos septos interalveolares e presença de hemorragia (\*) e diminuição dos espaços alveolares livres (a). (C) Ilustração referente ao grupo de animais imunizados com antígeno EXB, com aumento significativo do espessamento dos septos interalveolares e presença de hemorragia (\*) e diminuição dos espaços alveolares livres (a). (D) Ilustração referente aos animais imunizados com antígeno TEG, com uma melhora do quadro inflamatório com redução do infiltrado inflamatório (\*) e aumento dos espaços alveolares livres (a). H&E. Barra: 100µm.

### 5.6 – Níveis séricos de IgG antígeno-específico durante as imunizações dos animais com os antígenos de A. suum e após o desafio com ovos infectantes do parasito

Após caracterizarmos toda a imunogenicidade dos antígenos de *Ascaris suum*, avaliamos os níveis séricos de IgG após as imunizações para observarmos como se estabelece a produção de anticorpos frente ao estímulo antigênico (**Fig. 10**). Em síntese, após a caracterização da imunogenicidade dos antígenos, avaliamos a antigenicidade dos mesmos. Em relação aos dados encontrados, observamos um crescimento gradativo e significativo na produção de IgG antígeno-específico ao longo das imunizações (**Fig. 10A**), sendo o Tempo 0 referente ao tempo antes da primeira imunização; Tempo 1, após a primeira imunização; Tempo 2, após a segunda imunização; e Tempo 3, após a terceira imunização. Todos os grupos imunizados com os antígenos apresentaram uma diferença significativa de produção de IgG antígenos-específico quando comparados ao grupo controle PBS, o qual não recebeu nenhum antígeno e ao grupo MPLA, somente imunizado com o adjuvante *BpMPLA*.

Em seguida foi investigado qual seria a influência da infecção por *A. suum* após as imunizações com os diferentes antígenos nos níveis séricos de IgG. (**Fig. 10B**). Como resultado, não foi possível observar diferença entre os níveis de IgG antígeno-específico após a infecção quando comparado aos níveis de IgG encontrados após a terceira imunização.





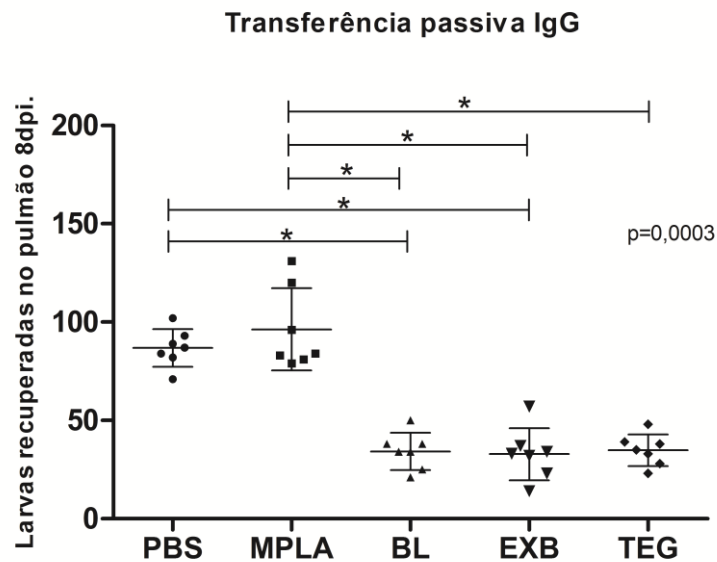
**Figura 10: Níveis séricos de IgG específico em camundongos BALB/c.** (A) IgG específico antes da primeira imunização (Tempo 0), após a primeira imunização (Tempo 1), após a segunda imunização (Tempo 2) e após a terceira imunização (Tempo 3). (B) Níveis séricos de IgG específico após as três imunizações mais o desafio com ovos infectantes do parasito (Tempo 4). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.7 – Transferência passiva de anticorpos IgG anti-antígenos de *A. suum*, purificados de soro de animais imunizados com os antígenos BL, EXB e TEG

Nesse estudo buscamos avaliar a influência da resposta humoral frente a proteção encontrada na redução da carga parasitária dos animais previamente imunizados com os

antígenos bruto de larva, bruto de tegumento e bruto de verme adulto de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.

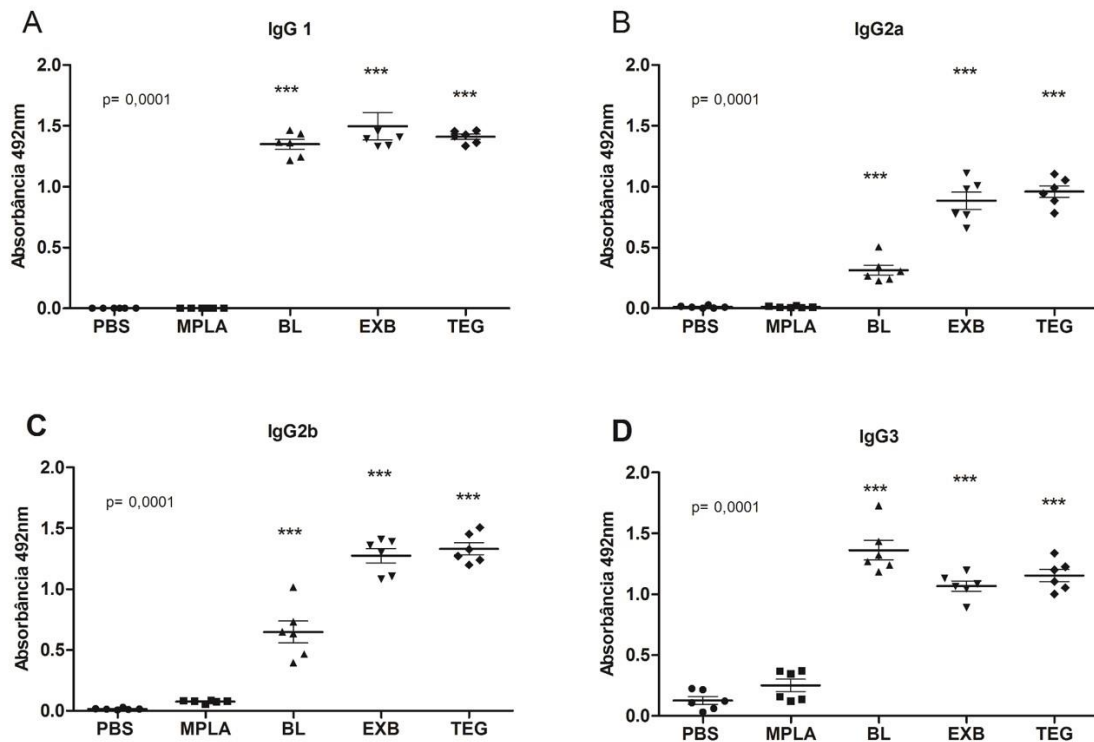
Com base nos dados analisados observamos que os animais que receberam a transferência passiva de anticorpos anti-antígenos de *A. suum* apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparado ao grupo controle PBS e ao grupo apenas imunizado apenas com adjuvante MPLA (Fig. 11). O grupo imunizado com o antígeno bruto de larva (BL) apresentou após a transferência passiva de IgGs uma proteção de 64,5% ( $p<0,05$ ) da carga parasitária, seguido de 65% ( $p<0,05$ ) para o grupo imunizado com antígeno bruto de verme adulto (EXB) e 64% ( $p<0,05$ ), referente a proteção apresentada pelo grupo imunizado com o antígeno bruto de tegumento de *A. suum* (TEG).



**Figura 11: Número de larvas recuperadas nos pulmões dos animais oito dias após infecção.** Os animais foram submetidos ao protocolo de transferência passiva de anticorpos IgG anti-antígenos de *A. suum* purificados através da coluna de afinidade de Proteína A. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

### ***5.8 - Determinação dos subclasses de IgG presentes no soro de animais imunizados com os antígenos BL, EXB e TEG e compará-los com a presença de subclasses de IgGs após a infecção por A. suum nos animais previamente imunizados***

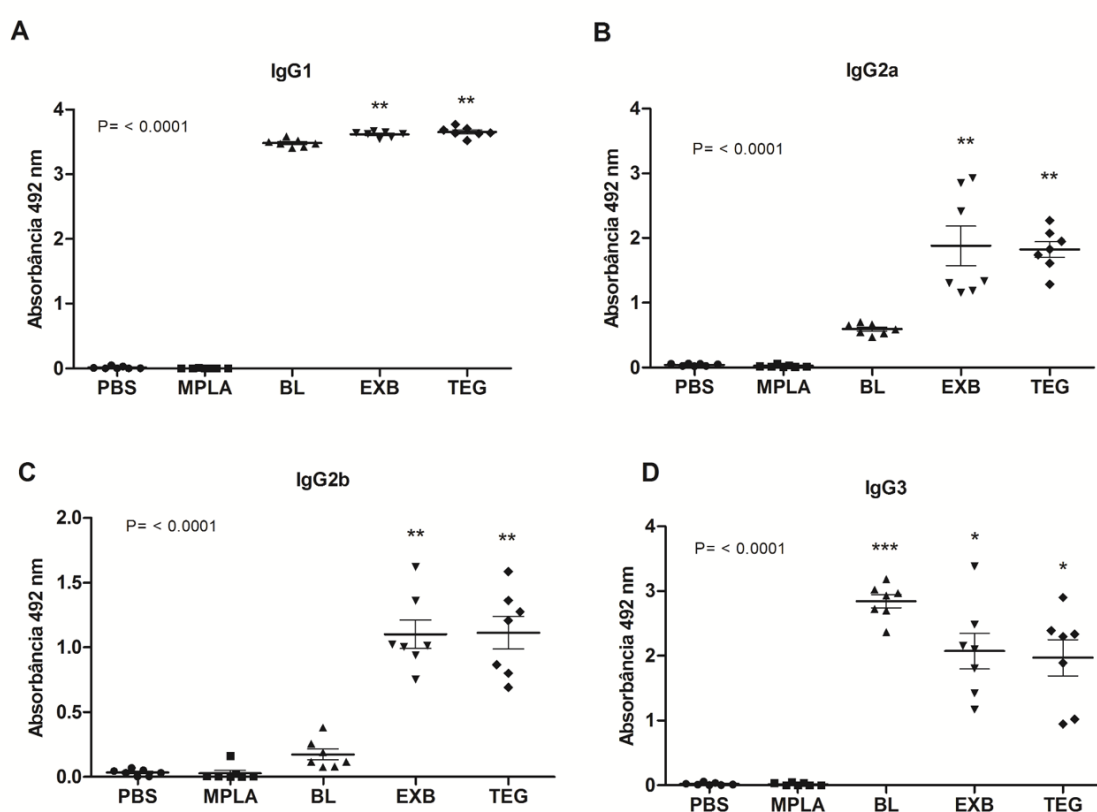
Após observarmos o aumento significativo de IgG antígeno-específico nos grupos imunizados com os antígenos e a proteção caracterizada pela redução em aproximadamente 65% da carga parasitária nos animais após a transferência passiva de anticorpos IgG anti – antígeno de *A. suum*, nosso próximo objetivo foi investigar a participação das subclasses de IgGs presentes nos soros dos animais dos diferentes grupos e suas relações com a proteção encontrada. Primeiro passo foi feito Elisa das frações com o soro dos animais após as três imunizações (**Fig. 12**) para avaliarmos o perfil de imunoglobulinas fracionadas produzidas após a imunização com os antígenos. Com base nos dados recuperados, observamos elevados níveis das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 presentes no soro dos animais imunizados. Entre todas as frações analisadas, IgG1 (**Fig. 12A**) e IgG3 (**Fig. 12D**) apresentaram-se com aumento significativo em todos os grupos imunizados com os antígenos BL, EXB e TEG, quando comparado ao grupo controle PBS e ao grupo somente imunizado com o adjuvante *BpMPLA*, sendo um valor de  $p < 0,0001$  em concordância para todas as análises. As subclasses IgG2a e 2b também se apresentaram em elevados níveis no soro dos animais imunizados, entretanto sua presença se destaca principalmente nos grupos imunizados com extrato bruto de verme adulto e de tegumento de *A. suum*, e baixos níveis encontrados no soro dos animais imunizados com antígeno bruto de larva (**Fig. 12B; 12C**).



**Figura 12: Determinação de subclasses de IgGs em camundongos BALB/c após imunizações com antígenos de *A. suum*.** Determinação da presença de subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 no soro de animais após a terceira imunização (Tempo 3) com os antígenos de *A. suum*. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Em paralelo, juntamente com a investigação da presença das subclasses de IgGs no soro dos animais após as três imunizações, foi feita também uma análise para a determinação das subclasses de IgGs no soro dos animais após as imunizações juntamente com o desafio com *A. suum* (**Fig. 13**), para observarmos se há alguma alteração de resposta principalmente na produção de anticorpos após a infecção nos animais previamente imunizados. Os níveis séricos das subclasses de IgGs apresentaram um aumento significativo nos grupos imunizados com antígeno BL, EXB e TEG, quando comparado ao grupo controle PBS e o apenas imunizado com o adjuvante MPLA. Em concordância com os dados vistos na presença das subclasses após as três imunizações, neste caso após a infecção também foi observado o destaque para a imunoglobulina IgG1, que se apresentou com aumento significativo e gradual após as

imunizações e após a infecção em todos os grupos imunizados e destaque também para a IgG3 que apresentou-se com níveis significativos porém mais baixos em todos os grupos imunizados quando comparada ao seu nível somente após as imunizações. As subunidades de IgG2a e 2b, assim como o perfil apresentado após as três imunizações, observamos o mesmo perfil após a infecção. Por fim, avaliando os níveis séricos de todas as imunoglobulinas fracionadas após as três imunizações e comparando com a produção após a infecção foi possível observar um aumento significativo dessa produção de anticorpos após a infecção com o parasito.



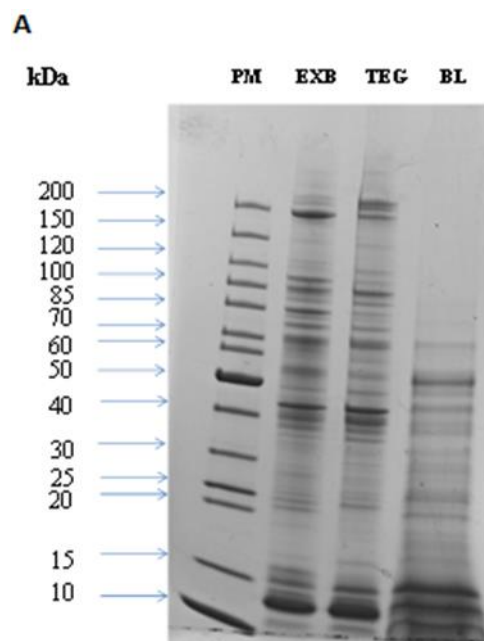
**Figura 13: Determinação de subclasses de IgGs em camundongos BALB/c após imunização com antígenos de *A. suum* e desafio com o parasito.** Determinação da presença de subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 no soro de animais após as três imunizações mais o desafio com a infecção por *A. suum* (Tempo 4). As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle PBS e MPLA no qual \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### ***5.9 – Determinação da antigenicidade dos antígenos bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e extrato de tegumento de A. suum***

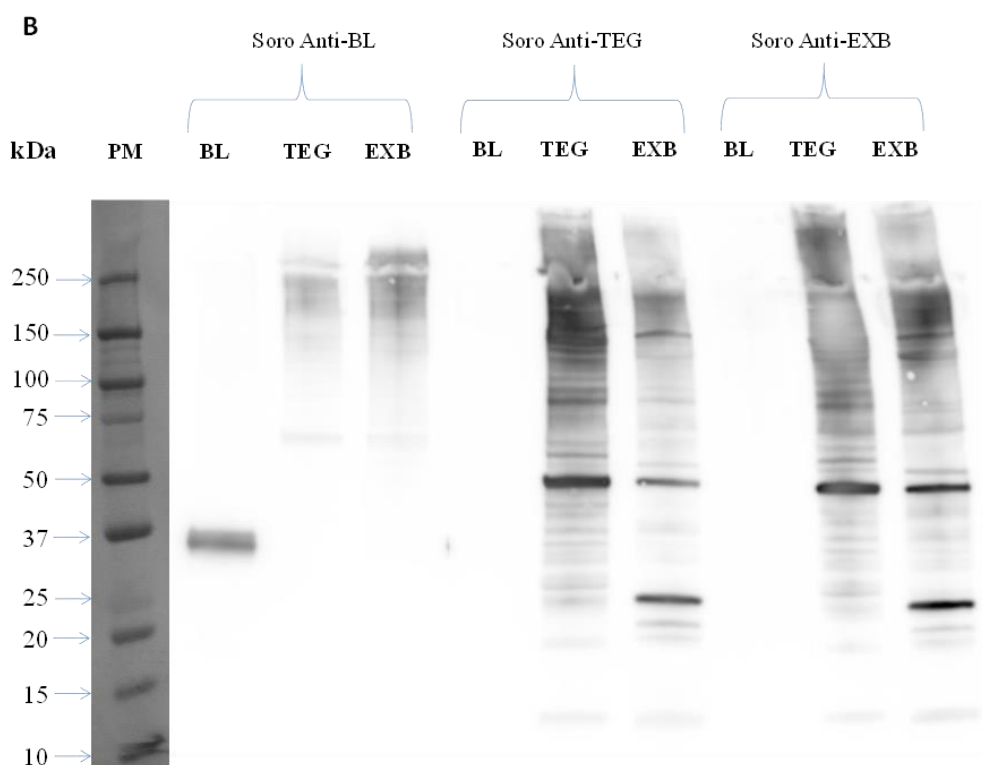
Para a identificação das proteínas antigênicas presente em cada extrato antigênico testado, inicialmente avaliamos o perfil de bandas de cada antígeno através de eletroforese em gel de poliacrilamida para futuro entendimento e investigação através de predição em relação a tamanho, localização e perfil de proteínas presentes em cada antígeno. Com base no resultado encontrado, tanto o antígeno de extrato bruto de verme adulto quanto de extrato de tegumento de *A. suum* apresentaram perfis bem semelhantes quanto ao perfil de proteínas expressas durante a eletroforese, incluindo uma distribuição homogênea tanto de proteínas de alto quanto de baixo peso molecular, sendo mais abundantes em certos padrões de tamanho. Quanto ao antígeno bruto de larva, foi observado um perfil diferente do encontrado para os outros antígenos sendo caracterizado abundantemente por um perfil de proteínas de baixo peso molecular chegando na sua maior concentração proteínas entre 10 e 15 kDa.

Em paralelo, realizamos a avaliação quanto ao reconhecimento soro-antígeno específico e cruzado utilizando soro de animais em seus respectivos grupos coletados após as imunizações. A avaliação foi feita com os três antígenos. Como resultado, quando utilizamos soro anti-TEG e anti-EXB, avaliando o reconhecimento soro-antígeno específico, o reconhecimento se apresentou de forma excelente quanto ao perfil de proteínas expressas e sua distribuição em relação ao tamanho e peso molecular em ambas as análises dos dois antígenos. Em contra partida, ambos os soros não reconheceram nenhum perfil de proteínas expressas pelo antígeno bruto de larva, não apresentando portanto um bom reconhecimento cruzado.

Em relação ao soro-anti BL quanto ao reconhecimento soro-antígeno específico ao antígeno bruto de larva, houve a expressão de uma banda única de proteínas com peso molecular aproximado de 37kDa e em relação ao reconhecimento soro-antígeno cruzado com os outros dois antígenos, não houve um bom reconhecimento quanto ao perfil de proteínas expressas pelos antígenos de extrato bruto de verme adulto e de tegumento de *A. suum* pelo soro-anti BL.



**Figura 14: Perfil eletroforético dos antígenos de *A. suum*.** (A) Perfil de bandas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) dos antígenos bruto de larva (BL), extrato bruto de verme adulto (EXB) e extrato de tegumento de *A. suum* (TEG).



**Figura 15: Avaliação da antigenicidade dos antígenos de *A. suum*.** (B) Reconhecimento soro-antígeno específico e cruzado entre os antígenos bruto de larva, extrato bruto de verme adulto e extrato de tegumento de *A. suum* através de Western Blott.

## **6. DISCUSSÃO**



Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente um quinto da população mundial está infectada por *Ascaris* spp. e mais da metade está sob risco de infecção (WHO, 2012). Considerada como a doença tropical negligenciada mais prevalente no mundo, a ascaridíase humana acomete principalmente comunidades carentes e crianças em idade escolar. Estratégias para intervenções profiláticas contra a ascaridíase humana são limitadas, uma vez que o sistema de educação em saúde e saneamento básico nas regiões endêmicas para a doença são extremamente precários, o que resulta em elevadas taxas de reinfecção mesmo após tratamento específico (Jia et al., 2012). Somado a esse fator, o diagnóstico padrão para a ascaridíase é limitante: até hoje continua baseado na detecção de ovos do parasito por meio de técnicas de concentração dos exames parasitológicos de fezes (Lutz, 1919; Hoffman et al., 1934; Ritchie, 1948). A partir disso, com o intuito de estimular o desenvolvimento de novas estratégias imunoprofiláticas frente a ascaridíase, o presente trabalho teve como objetivo primário investigar a eficácia vacinal, imunogenicidade de três antígenos do parasito *Ascaris suum*, agente etiológico da ascaridíase suína, sendo eles: antígeno bruto da larva L3 infectante, antígeno bruto do verme adulto e antígeno bruto do tegumento do verme adulto.

A utilização de camundongos como um modelo experimental para o estudo da fase inicial/aguda da ascaridíase permitiu-se hoje uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro (Enobe et al., 2006; Arizono et al., 2010, Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013), uma vez que os estudos sobre a infecção experimental em humanos são limitados devido a considerações éticas (Dold e Holanda, 2011). A linhagem de camundongos BALB/c foi escolhida para o presente estudo, pois tem sido frequentemente utilizada em estudos biológicos relacionados à infecção por *Ascaris*, especialmente no estudo de alterações imunológicas induzidas por antígenos do parasito (Paterson et al., 2002) e os seus efeitos de proteção após o desafio subsequente com larvas de *A. suum* (Tsuji et al., 2003; Islam et al., 2005).

O presente estudo, portanto, investigou a resposta imunológica celular e humoral de camundongos imunizados pelos antígenos de *A. suum*, através da análise da carga parasitária no pulmão durante a migração das larvas pelo órgão bem como aspectos fisiológicos e imunopatológicos teciduais e sistêmicos após as imunizações seguidas de desafio com o parasito

Como primeiro resultado, foi possível elucidar através da recuperação de larvas no pulmão dos animais uma significativa proteção frente a infecção para todos os grupos imunizados chegando a atingir 60% de redução da carga parasitária principalmente no

grupo imunizado com o antígeno bruto de tegumento de *A. suum*. Este dado corrobora com trabalhos na literatura assim como Tsuji et al., (2001), que utilizou a proteína recombinante As14 acoplada com a toxina B de Cólera como um candidato vacinal, e testou três possíveis vias de administração sendo a primeira a via subcutânea, o qual obteve uma redução de 50% da carga parasitária no pulmão dos camundongos, a via oral de administração no qual obteve 99% de proteção e por fim testaram a via intranasal e que de forma semelhante, também obteve uma redução significativa da carga quando comparado ao grupo não imunizado. Chen et al., (2012), utilizou os candidatos AsCE, um extrato bruto de larva L3 de *A.suum*, e pVAX-Enol, um clone de As-enol-1, que foram administrados via intramuscular seguindo protocolo de três imunizações e obtiveram uma significativa redução da carga parasitária de 61,13% e 88,62% respectivamente. Seguindo a investigação dos aspectos imunológicos, através de uma análise do lavado bronco alveolar dos animais imunizados, foi observado um aumento significativo de leucócitos totais, principalmente envolvendo células da imunidade inata como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, corroborando com dados encontrados em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013; Nogueira et al., 2016), onde discutiu-se o papel dessa resposta celular inata na finalidade de reconhecimento e eliminação do parasito. Devido a presença da migração das larvas pelo pulmão dos animais principalmente ao dano tecidual causado por esse processo, além da própria influência do adjuvante *BpMPLA* que já induz por si só um processo inflamatório no organismo do animal, foi caracterizado um aumento de hemoglobina e de proteínas totais no lavado bronco alveolar de todos os grupos imunizados quando comparado ao grupo controle, sendo o antígeno bruto de tegumento o candidato que levou a uma resposta inflamatória mais branda não causando tanto dano ao tecido.

Avaliando o perfil imunogênico dos antígenos de *A. suum*, foi caracterizado o perfil de citocinas sistêmicas através da quantificação de IL-2, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-10, assim como a quantificação de citocinas teciduais IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Na imunopatologia da infecção por *Ascaris* spp. as citocinas desempenham um importante papel na definição do tipo de resposta imunológica. As respostas do tipo Th1 e Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias e mediam a inflamação pela secreção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17. As células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-5, IL-13 e IL33, e contribuem para a sobrevivência do parasito (Raphael et al., 2014). Como descrito por Cooper et al., 2000; Mahanty et al., 1992; Mahanty et al., 1993; a infecção por *Ascaris* e helmintos de um modo geral induzem uma polarização da produção mista de

citocinas Th1/Th2 em infecções helmínticas principalmente de IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Os helmintos podem promover um fenótipo de regulação das resposta imunológicas pela secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-10 é uma citocina produzida por inúmeras populações celulares, principalmente pelas células T reguladoras que suprimem a produção das citocinas inflamatórias pelas células Th1 e Th17. O papel das células Treg em doenças helmínticas pode determinar se a doença está na fase aguda ou crônica da infecção (Spencer et al., 2009). Alcântara-Neves et al., (2014) investigaram como as coinfeções por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Toxocara* spp. afetam os marcadores da resposta alérgica e da asma em crianças. Eles observaram uma associação entre as coinfeções por helmintos e uma alta produção de IL-10 proporcional a carga parasitária das infecções, assim como uma elevada resposta de citocinas Th2, principalmente de IL-5. Nosso estudo corrobora com esses dados, onde também demonstramos um aumento significativo dessas citocinas plasmáticas em particular ao grupo imunizado pelo antígeno bruto de tegumento de *A. suum*, o que possivelmente pode ser explicado pela modulação da resposta imune observada principalmente nos parâmetros de lesão tecidual e recrutamento de células inflamatórias após a infecção. Na fase inicial da infecção por helmintos, as citocinas IL-5, IL-13 e IL-33 podem desempenhar um papel protetor para a saúde no hospedeiro acidental (Finlay et al., 2014). Porém, no nosso estudo, os níveis de IL-13 e IL-33 não foram expressivos na resposta imune contra o *A. suum*.

Com o objetivo de caracterizar a fisiologia do pulmão desses animais após a imunização, foram avaliados parâmetros como resistência, complacência dinâmica, capacidade total do pulmão e sua capacidade residual funcional. Nogueira et al., (2016) demonstrou em seu estudo um aumento da resistência pulmonar dos camundongos, caracterizada pela capacidade de resistência do pulmão ao fluxo de ar, após múltiplas reinfecções quando comparados ao grupo controle. Além disso, apresentou uma redução da complacência dinâmica, caracterizada pela capacidade do pulmão de se expandir. Essa redução, portanto, pode ser explicada principalmente pela alteração histopatológica do órgão no decorrer da infecção. Tais achados são naturais em infecções helmínticas com fase de migração pulmonar. No nosso estudo, também foi observado esses aspectos, entretanto, o grupo imunizado pelo antígeno bruto de tegumento e bruto de larva apresentaram melhores funções pulmonares quando analisado todos os parâmetros. No caso, uma possível explicação para a melhora do funcionamento pulmonar apresentado pelo grupo de animais imunizados com antígeno bruto de tegumento seria devido a uma menor resposta inflamatória desencadeada por esses animais após a imunização, e

consequentemente a um menor dano tecidual e alteração histopatológica do órgão que fosse capaz de levar a uma mudança do quadro pulmonar dos animais.

Na análise histopatológica, foi possível elucidar através da morfometria do pulmão um aumento significativo do infiltrado inflamatório, caracterizado pelo aumento do espessamento dos septos interalveolares e consequente diminuição dos espaços alveolares livres, e pela presença de fibrose encontrada no pulmão desses animais após imunização com os antígenos. Esses achados, corroboram com trabalhos presentes na literatura como o estudo feito por Resende et al., (2015) com *Toxocara canis* que demonstra um o aumento do quadro inflamatório e de uma resposta imune local intensa após a infecção com o parasito devido a presença da migração da larva pelo órgão. Quando se analisa a deposição de colágeno, somente o grupo imunizado pelo antígeno bruto de tegumento apresentou uma redução significativa quanto ao quadro de fibrose pulmonar, apresentando uma melhora do aspecto patológico do pulmão quando comparado aos outros grupos imunizados, que apresentaram um perfil bastante semelhante ao dano pulmonar apresentado pelo grupo controle infectado. Essa redução da fibrose causada pelo antígeno de tegumento é semelhante ao observado por Prata et al., (2016), que descreveu a associação de um exercício aeróbico juntamente a ação de uma enzima chamada ACE2, com a finalidade de reduzir os danos no tecido pulmonar induzidos por Bleomicina, diminuindo, portanto, o quadro de fibrose pulmonar.

Por fim, como foi visto que não houve diferença quanto a produção de citocinas tanto sistêmicas quanto teciduais após a imunização com os antígenos, e consequentemente nos sugerindo uma possível resposta protetora alternativa, desencadeada pelo animais imunizados, o presente estudo resolveu investigar a participação da resposta humoral frente à proteção observada. Para isso, primeiramente foi feita a quantificação de IgG antígeno-específico no soro dos animais após a imunização com os antígenos de *A. suum* e além disso, os níveis de IgG após a infecção. Assim como observado por Islam et al., (2005), que utilizou a proteína As24 como um possível candidato vacinal para a ascaridíase e demonstrou um aumento gradual e significativo dos níveis de IgG a medida que a imunização era feita, o resultado encontrado no nosso estudo também nos mostrou que a medida que foram administrados os antígenos nos camundongos, o nível de IgG específico aumentava gradativamente conforme as imunizações atingindo um platô final entre a terceira imunização e aos níveis de anticorpos produzidos após infecção, garantindo o sucesso da imunização dos animais frente aos antígenos.

Com intuito de analisar a participação dos anticorpos na eficácia vacinal, caracterizada pela redução da carga parasitária após as imunizações com os antígenos de *A. suum*, realizamos o protocolo de transferência passiva de IgG específico de camundongos pré-imunizados com os antígenos. Transferimos através do soro destes animais, anticorpos IgG anti-antígeno purificados para camundongos BALB/c selvagens e avaliamos a carga parasitária no oitavo dia pós infecção. De forma interessante, após a recuperação de larvas no pulmão, foi possível observar uma significativa redução da carga parasitária em todos os grupos imunizados, nos sugerindo um papel crucial e essencial da resposta humoral e a participação de anticorpos frente a infecção, corroborando com os dados encontrados na quantificação de citocinas sistêmicas e teciduais na qual implica que o sucesso da eficácia vacinal possivelmente não é mediada por uma resposta celular. Esses dados corroboram com trabalhos como de Nour et al., (2012), que utiliza a transferência passiva de IgM específico de *Strongyloides ratti*, com o objetivo de proteção frente a infecção, e obteve uma significativa redução da presença de *S. ratti* adultos assim como a redução da migração das larvas. Mangold e Dean, (1986), utilizaram anticorpos IgG do soro de camundongos imunizados com cercarias irradiadas para a transferência passiva a fim de adquirir resistência à infecção por *Schistosoma mansoni*, no qual obteve uma redução da carga parasitária de 20-50% quando comparados ao grupo controle.

Após o sucesso da transferência passiva, próximo passo foi investigar as subclasses de IgGs presentes no soro dos animais após as três imunizações (tempo 3) e após as imunizações juntamente com o desafio (tempo 4). Tsuji et al., (2001) e Islam (2005), realizaram o protocolo de imunização ativa com possíveis candidatos vacinais para *Ascaris* spp., e observaram principalmente altos níveis de IgG1 e IgG3, corroborando assim com os dados encontrados no nosso estudo. Tais achados nos levam a identificar uma polarização mista, tanto de uma resposta do tipo 1 pelos altos níveis de IgG3 presentes, como também e mais prevalente, uma resposta do tipo 2 caracterizada pelos altos níveis de IgG1 e IgG2A.

Em síntese, caracterizando este trabalho como uma prova de conceito de que vacina para *Ascaris* é possível de ser desenvolvida e viável quanto a melhoria da qualidade de vida de indivíduos de áreas endêmicas, estudamos três possíveis candidatos vacinais frente a infecção, sendo eles o antígeno bruto de larva, antígeno bruto de verme adulto e antígeno bruto de tegumento de *A. suum*. Todos os três candidatos apresentaram resultados promissores quanto a redução significativa da carga parasitária no pulmão dos animais infectados, atingindo 60% de proteção. Entretanto, entre todos os antígenos

estudados, o antígeno de tegumento apresentou-se como o mais efetivo, uma vez que além da proteção observada, desencadeou uma menor resposta inflamatória para o hospedeiro, causando um menor infiltrado inflamatório interalveolar, melhor função pulmonar devido a uma melhor preservação do órgão, menor dano tecidual e conseqüentemente menor fibrose pulmonar. Todos esses fatores nos levam a identificar o antígeno de tegumento como o candidato mais promissor e relevante na imunização dos animais, preservando a qualidade funcional pulmonar e menor morbidade frente a infecção por *Ascaris* spp.

A partir de todos esses dados, demonstramos através deste trabalho uma significativa resposta protetora utilizando três diferentes antígenos de *Ascaris*. Evidenciamos a importância da proteção via anticorpo através principalmente das subclasses IgG1 e IgG3, e que isso pode ser altamente empregado em futuros estudos de imunoprevenções para helmintos, mostrando quais são os principais mecanismos protetores envolvidos. A partir da proteção, próximo passo será identificar as principais moléculas associadas a essa imunogenicidade que induzem essa resposta protetora. Sabemos que a utilização de antígenos brutos do parasito são limitantes, principalmente pela dificuldade de produção, a necessidade de obtenção dos vermes adultos e a variação de lote para lote de antígenos produzidos. Sendo assim, a perspectiva deste trabalho será buscarmos a identificação e caracterização de biomoléculas a partir destes antígenos de *Ascaris*, como proteínas recombinantes ou a utilização de ensaios com peptídeos sintéticos, associados à proteção observada neste presente estudo.

## **7. CONCLUSÃO**

No presente estudo, caracterizado como uma prova de conceito de que o desenvolvimento de uma vacina pra *Ascaris* é viável, foi possível elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta dos animais imunizados com diferentes antígenos de *A. suum* e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito. Pôde-se concluir portanto, que os candidatos apresentaram-se promissores quanto a significativa redução da carga parasitária no pulmão dos animais imunizados, entretanto, analisando todos os parâmetros de melhora de funcionamento pulmonar e inflamação tecidual podemos concluir que o antígeno bruto de tegumento de *A. suum* se apresentou entre todos os estudados, como o melhor candidato por ter induzido uma relevante redução da carga parasitaria, associada a uma menor inflamação tecidual, e conseqüentemente uma melhora dos parâmetros funcionais pulmonares dos animais infectados.

Além disso, foi possível elucidar a participação crucial da resposta humoral frente a redução e controle da carga parasitária nos pulmões dos animais infectados pelo parasito e imunizados com os antígenos de *A. suum*, sendo caracterizado principalmente por altos níveis séricos de IgG antígeno-específico e suas subunidades envolvidas tanto na resposta Th1 quanto na resposta Th2.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ahmad MM, et al. 2015. Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. *J Health Res Rev.* 2: 37-38.

Anderson, T.J. (1995). *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology* 110 (Pt. 2), 215–219.

Arizono, N., Yoshimura, Y., Tohzaka, N., Yamada, M., Tegoshi, T., Onishi, K., Uchikawa, R. (2010). Ascariasis in Japan: is pig-derived *Ascaris* infecting humans? *Jpn. J. Infect. Dis.* 63, 447–448

Asif M, et al. 2014. Biliary ascariasis - Atypical infestation of *Ascaris lumbricoides*. *Int J Surg Pakistan.* 19 (3): 123-124.

Azhar M, et al. 2015. Case report: Hepatobiliary ascariasis complicated by pancreatitis. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 27(2): 479-481.

Beaver PC. (1975). Biology of soil-transmitted helminths: the massive infection. *Health Lab Sci* 12: 116-125

B L Mangold and D A Dean, 1986. Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J Immunol.* 136 (7) 2644-2648.

Brent Schneider et al. (2011). A history of hookworm vaccine development. *Human Vaccines* 7:11, 1234-1244.

Cavalcanti, C. Influência do óxido nítrico na infecção experimental por *A. suum* durante a fase inicial da ascariíase. (2013). Dissertação de mestrado defendida no Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on.(1997). *Parasitol Today.* Nov;13(11):438-43.

Chauhan V, et al. 2015. Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. *Indian J Med Microbiol.* 33:427-429.

Chitkara RK, Krishna G. (2006). Parasitic pulmonary eosinophilia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006 Apr;27(2):171-84. Review

- Crompton DW. *Ascaris* and ascariasis.(2001). *Adv Parasitol*.48:285-375.
- de Silva NR, et al. 1997a. Morbidity and mortality due to ascariasis: re-estimation and sensitivity analysis of global numbers at risk. *Trop Med InternHealth*. 2(6): 519-528.
- de Silva NR, et al. 1997b. Morbidity and mortality due to *Ascaris*-induced intestinal obstruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 91: 31-36.
- Dey RK, et al. 2012. Right-sided scrotal ascariasis. *Trop Parasitol*. 2(1):80-81.
- Dold, C., Holland, C.V. (2011). Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. *Microbes Infect*. 13, 624–631.
- Dold C, Holland CV. (2011).*Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect* 13: 632-637
- Enobe CS, et al. 2006. Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. *Parasite Immunol*. 28: 453-461.
- Evengård B. Schistosomiasis. Immunological, serological and clinical aspects. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1989;63:1-72.
- Fagerholm HP, Nansen P, Roepstorff A, Frandsen F, Eriksen L. (1988). Growth and structural features of the adult stage of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) from experimentally infected domestic pigs. *J Parasitol*. Apr;84(2):269-77.
- Fujiwara RT, Loukas A, Mendez S, Williamson AL, Bueno LL, et al. (2006) Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine* 24: 501-509.
- Galvin, T.J., (1968). Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. *J. Parasitol*. 54, 1085–1091.
- Galzerano A, et al. 2010. *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. *Eastern Mediterranean Health J*. 16(3): 350-351.
- Gazzinelli-Guimaraes, PH., et al. Cell apoptosis induced by hookworm antigens: a strategy of immunomodulation. *Frontiers in Bioscience, Elite* 5E, 2013.

Gazzinelli-Guimaraes, PH. Novas abordagens sobre a imunobiologia da ascaridíase larval. (2014). Tese de doutorado defendida no Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Gazzinelli-Guimaraes PH, Gazzinelli-Guimaraes AC, Silva FN, Mati VL, Dhom-Lemos Lde C, et al. (2013) Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int J Parasitol* 43: 697-706.

Green NM 1957. Protease Inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. *Biochemical J.* 16: 416-419.

Herrera IA and Meneses LT 2005. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. *Cuadernos del Hospital de Clinicas.* 50(2): 69-73.

Hirakawa E, Suetsugu T, Tanoue A, Takagi K, Shinmura M, Machida K, Fukuoka T, Niina K (2009). Pulmonary eosinophilia caused by visceral larva due to *Ascaris suum*. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* Jan 10;98(1):144-6

Hoeningl M, Valentin T, Zollner-Schwetz I, Salzer HJ, Raggam RB, Strenger V, Flick H, Wurm R, Krause R. (2010) Pulmonary ascariasis: two cases in Austria and review of the literature. *Wien KlinWochenschr.* Oct;122Suppl 3:94-6

Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. (1934). Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J PublHlth;* 9:283-98.

Holland, C.V. (2009). Predisposition to ascariasis: patterns, mechanisms and implications. *Parasitology* 136, 1537–1547.

Hotez PJ. (2008). Holidays in the sun and the Caribbean's forgotten burden of neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e239.

Hotez PJ. (2009). The neglected tropical diseases and their devastating health and economic impact on the member nations of the Organisation of the Islamic Conference. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e539.

Hotez PJ, Kamath A. (2009). Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e412.

Hotez PJ, Gurwith M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis.* 2011 Sep;15(9):e611-9. doi: 10.1016/j.ijid.2011.05.006. Epub 2011 Jul 16.

Hotez PJ AM, Basanez MG, Bolliger I, Bourne R et al. (2014). The Global Burden of Disease Study 2010: implications for the neglected tropical diseases. *PLOS Negl Trop Dis* in press.

Jackson JA, Turner JD, Rentoul L, Faulkner H, Behnke JM, et al. (2004). T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. *J Infect Dis* 190: 1804-1811.

Jia TW, Melville S, Utzinger J, King CH, Zhou XN. (2012). Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(5):e1621.

KHURROO M.S., ZARGAR S.A., MAHAJAN R. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis in India. *Lancet* 335: 1503–06, 1990.

Khuroo MS. (1996). Ascariasis. *Gastro enterol Clin North Am.* Sep;25(3):553-77.

Khuroo MS, et al. 2015. Biliary ascariasis in the etiology of recurrent pyogenic cholangitis in an endemic area. *Int J Hepatobiliary Pancreat Dis.* 5: 22-29.

Louw JH 1966. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. *Brit J Surg.* 53(6): 510-522.

Lukes S. (1992). *Ascaris suum* vaccination of mice with liposome encapsulated antigen. *Veterinary Parasitology.* 43:105-113.

Lutz AO. (1919). *Schistosomum mansoni* e a Schistomatose, segundo observações feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz;*11:121-55.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):733-44.

Maizels RM, Balic A. (2004). Resistance to helminth infection: the case for interleukin-5-dependent mechanisms. *J Infect Dis* 190: 427-429

M. Khyrul Islam, et al, 2005. Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of

protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology* 35 (2005) 1023–1030.

Morano JACOD and Morano JFBLT 1988. *Ascaridiose vesicular*. RECCS. 12-13.

Murrell KD, Eriksen L, Nansen P, Slotved HC, Rasmussen T. (1997). *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. *J Parasitol* 83: 255-260.

Mwenda AS and Ilkul JH 2013. Obstructive ileal ascariasis. *New Engl J Med*. 368(10): 943.

Nadia Ben Nour, et al, 2012. Passive immunization with a monoclonal IgM antibody specific for *Strongyloides ratti* HSP60 protects mice against challenge infection. *Vaccine*. 30(33): 4971–4976.

NAOTOSHI TSUJI, et al, 2001. Intranasal Immunization with Recombinant *Ascaris suum* 14-Kilodalton Antigen Coupled with Cholera Toxin B Subunit Induces Protective Immunity to *A. suum* Infection in Mice. *INFECTION AND IMMUNITY* 12 (69): 7285–7292

Naotoshi Tsuji, et al, 2003. Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from Roundworm *Ascaris* Parasites Are Protected against Larval Migration of *Ascaris suum*. *INFECTION AND IMMUNITY* 9 (71): 5314–5323.

Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Skov Sorensen UB. (2005). Ascariasis is a zoonosis in denmark. *J ClinMicrobiol*. Mar;43(3):1142-8.

Nejsum P, Betson M, Bendall RP, Thamsborg SM, Stothard JR. (2012). Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *J Helminthol*. Jun;86(2):148-55.

Ning Chena,b,c,1, Zi-Guo Yuana,b,\*,1, Min-JunXua, Dong-HuiZhoua, Xiu-XiangZhangc, Yan-Zhong Zhang d, Xiao-Wei Wang b, ChaoYane, Rui-QingLinc, Xing-QuanZhua,f,g,\* (2012) *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis *Vaccine* 30 3478–3482

Nogueira D, (2013). Aspectos imunológicos e parasitológicos da fase inicial da reinfecção experimental por *Ascaris suum*. Dissertação de mestrado. Programa de PósGraduação em Parasitologia, ICB, UFMG.

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

Palmer DR, Hall A, Haque R, Anwar KS. (1995). Antibody isotype responses to antigens of *Ascaris lumbricoides* in a case-control study of persistently heavily infected Bangladeshi children. *Parasitology* 111 ( Pt 3): 385-393.

Pawlowski ZS. (1982). Ascariasis: host-pathogen biology. *Rev Infect Dis*. JulAug;4(4):806-14.

Philip J. Cooper, et al, 2000. Human Infection with *Ascaris lumbricoides* Is Associated with a Polarized Cytokine Response. *J Infect Dis*. 182(4):1207-13

Pires RR, et al. 2001. Production and characterization of a monoclonal antibody against an *Ascaris suum* allergenic component. *Braz J Med Biol Res*. 34: 1033-1036.

Prata LO, et al, 2016. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 242(1):8-21.

Resende NM, et al, 2015. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit Vectors*. 8:354.

Rim HJ s.d. Distribution of the larvae of *Toxocara canis* and *Ascaris lumbricoides* in the tissues of mice. *Korean J Parasit*. 1(1): 37-45.

Ritchie LS. (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept*; 8:326.

Roepstorff A, Nilsson O, Oksanen A, Gjerde B, Richter SH, Ortenberg E, Christensson D, Martinsson KB, Bartlett PC, Nansen P, Eriksen L, Helle O, Nikander S, Larsen K. (1998). Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. *Vet Parasitol*. Apr 30;76(4):305-19.

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

Sanjeev SM, Lum LC. 2012. Biliary ascariasis from a rural setting: A case study. *Med & Health*. 7(2): 102-106.

S Mahanty, et al, 1992. Parallel regulation of IL-4 and IL-5 in human helminth infections. *J Immunol*. 148 (11):3567-3571.

S Mahanty, et al, 1993. IL-4- and IL-5-secreting lymphocyte populations are preferentially stimulated by parasite-derived antigens in human tissue invasive nematode infections. *J Immunol*. 151 (7):3704-3711.

Serrano FJ, et al, 2001. Resistance against migrating ascaris suum larvae in pigs immunized with infective eggs or adult worm antigens. *Parasitology*. (Pt 6):699-707.

Spillmann RK. (1975). Pulmonary ascariasis in tropical communities. *Am J Trop Med Hyg* 24: 791-800.

Sprent JF. (1952). Anatomical distinction between human and pig strains of *Ascaris*. *Nature*. Oct 11;170 (4328):627-8.

Stewart TB, Hale OM. (1988). Losses to internal parasites in swine production. *J Anim Sci*. Jun;66 (6):1548-54

Takata, I. (1951). Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig.

Tsuji N, et al. 2001. Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with Cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun*. 69(12): 7285-7292.

Umetsu S, et al. 2014. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. *World J Gastroenterol*. 20(38): 14058-14062.

Wang J, et al. 2013. Biliary ascariasis in a bile duct stones-removed female patient. *World J Gastroenterol*. 19(36): 6122-6124.

Zhan B, et al. 2014. Advancing a multivalent 'Pan-anthelmintic' vaccine against soil-transmitted nematode infections. *Expert Reviews Vaccines*. 13(3), 321–331.



## **9. ANEXO**

## 9.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG



**UFMG**

### **CERTIFICADO**

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

### **CERTIFICATE**

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

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

Belo Horizonte, 16/12/2014.

Atenciosamente.

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

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