

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FÁRMACOS
IMUNOMODULADORES NA INFECÇÃO
DE HAMSTERS, *Mesocricetus auratus*, POR
Ancylostoma ceylanicum (Loss, 1911)**

Belo Horizonte

2011

Sílvia Regina Costa Dias

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FÁRMACOS
IMUNOMODULADORES NA INFECÇÃO
DE HAMSTERS, *Mesocricetus auratus*, POR
Ancylostoma ceylanicum (Loss, 1911)**

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

Orientadora: Prof. Dra. Élide Mara Leite Rabelo
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa do Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira, pela oportunidade; à CAPES, pela bolsa de estudos; ao CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Agradeço a minha querida orientadora, Élida, que me apoiou em todos os momentos desta caminhada; que estava presente mesmo do outro lado do mundo... Agradeço a você não só pela orientação, mas também pela amizade, oportunidade, disponibilidade, paciência, incentivo e confiança. Agradeço a você pelo sorriso (!!!!), pelo carinho, pela convivência e brincadeiras, pelos momentos de descontração.... Aprendi muito nestes cinco anos de caminhada e só estamos começando...

Ao Ricardo Fujiwara, por ter escancarado as portas do seu laboratório para mim. Obrigada pela oportunidade, orientação, confiança, compreensão, apoio, amizade e paciência. Aprendi muito com você! E espero continuar aprendendo...

À Cláudia, Kátia e Carol, da UFOP, tão simpáticas e prestativas, pela orientação e os ensinamentos de patologia. Ao Rodolfo e Bruno, pelos exames hematológicos.

Ao Prof. Alan, pela ajuda com minhas dúvidas quanto à biologia de ancilostomídeos. E por todos os ensinamentos em Parasitologia durante todos estes anos.

Ao Ricardo Araújo, pela relatoria do projeto, pelos conselhos e sugestões do projeto e do dia-a-dia.

Às Profs. Déborah e Ana Caetano (Depto. Bioquímica e Imunologia), pelas importantes considerações ao meu trabalho na minha qualificação.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia, especialmente ao Carlos, do biotério, sempre tão prestativo e competente; Seu Nery, pela conversa amiga e pelo café

que me manteve alerta durante o dia de trabalho; e, à querida Sumara, por toda sua competência e apoio na pós-graduação. A todos os professores do Departamento, pela convivência e pelas portas sempre abertas... A cada dia que passa vejo que a pesquisa não precisa de laboratórios fechados... e sim de portas e mentes abertas!

Em todos estes anos de Departamento vi muitas pessoas entrarem, muitas saírem... Mas muitas ficaram, não só fisicamente, mas de coração. E, de certa forma, todas participaram da minha vida e de mais esta conquista. Por isso, agradeço à Marcelle e a Jú, pelos encontros esporádicos, mas sempre muito afetuosos. À Lú, André, Ana Maggi e Janine, pelo apoio e carinho incondicionais. Às minhas amigas de longa data, Kelly, Carol e Vânia que desde a graduação estão juntas comigo nesta caminhada e neste departamento...

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, em especial ao Pedro, pelo aprendizado, pelas conversas, ajuda, atenção e disponibilidade. Com certeza, um futuro brilhante o aguarda!

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular (e anexos) de ontem, de hoje e, certamente, do futuro: Érlisson, Ariadna, Denílson, Hélen, Luciana, Carina, Karininha, Camila, Júlia, Diana, Lorrana, Mayra, Rodrigo e Gabriela. Cada um teve uma participação especial nesta caminhada. Mas todos me ensinaram muitas coisas... Agradeço aqui, especialmente, à Ana Flávia, pela amizade e por toda a paciência do mundo em me ensinar biologia molecular... MUITÍSSIMO obrigada!!

Alguns amigos são muito especiais... E a nossa amizade vai além dos laboratórios, dos corredores, do café e da UFMG...

À Ceres, pelo carinho e amizade de longa data... Obrigada pelos ensinamentos, discussões, lasanhas, risadas e também pela conversa jogada fora!

À Renata, agora comadre... Obrigada por tudo nestes anos todos! Obrigada pelo apoio, incentivo e carinho... Pelos lanches de fim de tarde, pelos happy hour, pelos finais de semana... Você é muito especial pra mim... e agora pra Clarinha também....

Ao Sydney, Sr. Picareta... Não tenho como agradecer toda a sua ajuda e seu apoio. Acho que um "Valeu!" resume toda a minha gratidão. Obrigada pelas palavras certas nas horas necessárias, pelos quebra-galhos... E obrigada também pela sua verdadeira amizade, além-universidade...

Outras amizades foram tão ou mais importantes do que as que existem aqui dentro... Dentre estes, agradeço à Rizzia e Luciano pelo carinho. À Jozi e ao Thales, pela amizade eterna, pelo carinho e pela preocupação de sempre... À Carol e Mari pelos sorrisos lindos e inspiradores! À Walzi e ao Lê, pela amizade, carinho e atenção!

Além dos amigos, mais importante é a família. E, sem a ajuda da minha mãe, não sei o que teria sido de mim! Abriu mão de coisas e tempo seus para ficar comigo, para me ajudar... E, poucas vezes tive a oportunidade de agradecer... Esta é uma delas... Muito obrigada, mãe!!!! Além dela, agradeço também às minhas irmãs, Gabriela e Luísa.

Obrigada aos meus sogros pela atenção, carinho e prestatividade.

Ao longo do doutorado, fui abençoada com o maior presente de todos: uma filha! Junto com ela, veio a formação de uma família linda! E, com ela, vieram outros problemas e também outras soluções... Parte de tudo o que sou hoje devo a eles:

Ao Luiz, pelo amor, carinho, compreensão, ajuda e companheirismo... Sem ele eu não teria conseguido chegar ao fim desta caminhada. Obrigada por tudo, meu amor! Obrigada pelo tempo, pela casa, pela convivência... e, principalmente, por ela...

...A minha chimbica, Clara, Clarinha... Presente maior da minha vida! Obrigada pela sua presença tão linda e meiga... Pelo seu sorriso doce e pelas brincadeiras que me aliviaram a

tensão. Obrigada pela sua vozinha tão suave que algumas vezes me fizeram chorar e me serviram de inspiração... Obrigada por, sem saber, ter colaborado para eu conseguir chegar até aqui... Por hoje entender que a mamãe precisa trabalhar com o ratinho e fazer a tese... Amo muito você!

E, pensando em todas estas pessoas que foram importantes na minha vida, agradeço a Deus por ter colocado cada um de vocês no meu caminho. Pela dádiva da vida e saúde. A Ele devo tudo o que sou hoje.

*“Muitas vezes as coisas que me pareceram verdadeiras
quando comecei a concebê-las, tornaram-se falsas
quando quis colocá-las no papel.”*

René Descartes

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar, no hamster, os efeitos imuno-parasitológicos da administração de fármacos imunomoduladores na infecção por *Ancylostoma ceylanicum*. Foram avaliadas quatro classes de drogas (imunossuppressores, anticorpos anti-linfocitários, anti-inflamatórios e anti-histamínicos). Entre os imunossuppressores, foram testadas a ciclosporina A (CsA) e a prednisolona. Os resultados mostraram que o tratamento com CsA, não interfere na ancilostomíase experimental. Já o tratamento com prednisolona alterou a regulação do sistema imune, afetando diretamente a integridade intestinal e a postura de ovos de *A. ceylanicum*. O tratamento com anticorpos anti-CD3, não alterou o quadro de infecção por *A. ceylanicum* em hamsters; no entanto, quando associado à prednisolona, observou-se que o anticorpo específico ameniza o quadro de inflamação. Não obtivemos sucesso em mostrar as prostaglandinas como mediadores inflamatórios de importância na ancilostomíase. Não foram observadas diferenças em aspectos parasitológicos e imunológicos entre animais tratados ou não com ácido acetilsalicílico, diclofenaco ou etoricoxibe e infectados com *A. ceylanicum*. Os animais tratados com drogas anti-histamínicas (loratadina e ranitidina) apresentaram sinais clínicos graves e foram sacrificados após 24 dias de infecção. Observamos um aumento na eliminação de ovos e o número de eosinófilos e neutrófilos periféricos nos animais tratados com a combinação de drogas. Mostramos que fármacos imunossuppressores são drogas que, não necessariamente suprimem a resposta efetora do organismo – Th₁ ou Th₂ – mas são responsáveis por favorecer a regulação do processo de resposta imune efetora. Portanto, a imunorregulação exacerbada da resposta do organismo leva a um desequilíbrio na infecção por *A. ceylanicum* no intestino, levando a quadros exacerbados de inflamação intestinal e conseqüente prejuízo ao desenvolvimento dos vermes adultos e à postura de ovos. O aumento da inflamação intestinal, decorrente do excesso de regulação da resposta imune, associado à diminuição do número de células caliciformes é responsável pelo aumento da perda de mucosa intestinal. Neste trabalho, mostramos um comportamento inverso entre o número de células caliciformes e inflamação intestinal: quanto mais células caliciformes, menor inflamação tecidual. Dessa forma, as células caliciformes estariam associadas à proteção da mucosa intestinal na infecção por *A. ceylanicum*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate, the effects of immunomodulatory drugs upon the immune response and parasitological patterns of hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. Four classes of drugs (immunosuppressants, anti-lymphocyte, anti-inflammatory and antihistamines drugs) were used in this study. Among the immunosuppressors cyclosporin A (CsA) and prednisolone were tested. The results showed that CsA treatment does not interfere with the experimental hookworm's infection. On the other hand, the treatment with prednisolone has altered the regulation of the immune system, affecting, directly the intestinal integrity and oviposition of *A. ceylanicum*. Treatment with anti-CD3 had no influence in the *A. ceylanicum* infection in hamsters, however, when associated with prednisolone, it was observed that the specific antibody alleviated the context of inflammation. Prostaglandins did not work as inflammatory mediators of importance in the hookworm's infection, in this study. There were no differences in parasitological and immunological aspects between animals treated or not with aspirin, diclofenac or etoricoxib and infected with *A. ceylanicum*. Animals treated with anti-histamine (loratadine and ranitidine) presented severe clinical signs and were euthanized after 24 days of infection. We observed an increase in the number of eliminated eggs and the number of peripheral eosinophils and neutrophils in animals treated with a combination of both drugs. We show that immunosuppressive drugs do not necessarily suppress the Th1 or Th2 organism's effector response but they are responsible for regulating this process. Therefore, an exacerbated immunoregulated response of the body leads to an imbalance in the infection by *A. ceylanicum* in the intestine, leading to conditions that exacerbate the intestinal inflammation and consequently damaging the development of adult worms and egg's elimination. The increase in intestinal inflammation, due to excessive regulation of immune response associated with a reduction in the number of goblet cells is responsible for the increased loss of intestinal mucosa. We show an inverse behavior between the number of goblet cells and inflammatory bowel disease: as highest were the number of goblet cells, less tissue inflammation was present in the intestine. Thus, goblet cells were associated with protection of the intestinal mucosa in infection by *A. ceylanicum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos. 22
- FIGURA 2 – Distribuição e prevalência da ancilostomíase humana no mundo. 25
- FIGURA 3 – Fotomicrografias de secções de intestino delgado de hamsters não-infectados (A e B) ou infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (C e D) e tratados com ciclosporina (E e F) ou prednisolona (G e H). 57
- FIGURA 4 – Fotomicrografias de secções de baço de hamsters não-infectados (A e B) ou infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (C) e tratados com ciclosporina (D) ou prednisolona (E). 58
- FIGURA 5 – Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters não infectados (A e E), infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e F) e tratados com OKT3 (C e G) ou OKT3 + Pd (D e H). 78
- FIGURA 6 – Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters não infectados (A e F), infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e G) e tratados com ácido acetilsalicílico (C e H) ou diclofenaco (D e I) ou etoricoxibe (E e J). 98
- FIGURA 7 – Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters negativos (A e B), infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e G) e tratados com loratadina (C e H), ranitidina (D e I) ou ambas (Lor + Ran) (E e J). 117
- GRÁFICO 1 – Ensaio de proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados, estimuladas e incubadas com (A) prednisolona e (B) ciclosporina A em diferentes concentrações. 46
- GRÁFICO 2 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com ciclosporina (10 mg/kg, VO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO). 48
- GRÁFICO 3 – (A) Contagem global de hemácias e (B) níveis de hemoglobina por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO). 50

- GRÁFICO 4 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO). 51
- GRÁFICO 5 – Valores absolutos de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO). 52
- GRÁFICO 6 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO). 54
- GRÁFICO 7 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas (INT) ou não (NINT) com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina (10 mg/kg, VO) (ICICLO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO) (IPRED). (A) Processo inflamatório. (B) Células caliciformes – CC. (C) Mucosa. 56
- GRÁFICO 8 – Ensaio de proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados, estimuladas e incubadas com OKT3® em diferentes concentrações. 66
- GRÁFICO 9 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio e infectadas e tratadas com OKT3® (5 mg/kg, IP), OKT3® + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). 68
- GRÁFICO 10 – (A) Contagem global de hemácias por milímetro cúbico de sangue e (B) dosagem de hemoglobina de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3® (5 mg/kg, IP), OKT3® + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). 69
- GRÁFICO 11 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3® (5 mg/kg, IP), OKT3® + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). 71

- GRÁFICO 12 – Contagem diferencial de linfócitos (A), eosinófilos (B) e neutrófilos (C) por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). 72
- GRÁFICO 13 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). 74
- GRÁFICO 14 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP) (IOKT3), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO) (IOKT3+PRED). 76
- GRÁFICO 15 – Recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com ácido acetilsalicílico (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO) e Etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). 88
- GRÁFICO 16 – (A) Contagem global de hemácias e (B) hemoglobina por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). 90
- GRÁFICO 17 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). 91
- GRÁFICO 18 – Contagem diferencial de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). 93
- GRÁFICO 19 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e 94

infectadas e tratadas com ácido acetilsalicílico (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO).

- GRÁFICO 20 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO) (IASP), diclofenaco (2 mg/kg, VO) (IDICLO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO) (IETO). 96
- GRÁFICO 21 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). 107
- GRÁFICO 22 – (A) Contagem global de hemácias e (B) leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). 109
- GRÁFICO 23 – Contagem diferencial de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). 111
- GRÁFICO 24 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). 112
- GRÁFICO 25 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectados e tratados com loratadina (0,2 mg/kg, VO) (LOR), Ranitidina (12 mg/kg, VO) (IRAN) ou Loratadina + Ranitidina (I(LOR + RAN)). 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
APC	Células apresentadoras de antígeno
APR	“Aspartic protease”
ASP	“ <i>Ancylostoma</i> secreted protein”
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool program”
CD3	“Cluster differentiation 3”
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
COX	Ciclooxigenase
CsA	Ciclosporina A
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme linked imunossorbent assay”
ES	Produtos de excreção/secreção
EST	“Expressed sequence tags”
H ₁ R	“Histamine 1 receptor” – Receptor de histamine tipo 1
H ₂ R	“Histamine 2 receptor” – Receptor de histamine tipo 2
H ₃ R	“Histamine 3 receptor” – Receptor de histamine tipo 3
H ₄ R	“Histamine 4 receptor” – Receptor de histamine tipo 4
HE	Hematoxilina-eosina
HHVI	“Human Hookworm Vaccine Initiative”
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G

IgG ₁	Imunoglobulina G isotipo 1
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopyranosideo
L ₁	Larva de primeiro estágio
L ₂	Larva de segundo estágio
L ₃	Larva de terceiro estágio
L ₄	Larva de quarto estágio
MHC	“major histocompatibility complex”
mRNA	RNA mensageiro
MTP	“Astacin-like metalloprotease”
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
OPD [®]	o-phenylenediamine dihydrochloride [®]
OPG	Ovos por grama de fezes
pb	Pares de base
PBS	“Phosphate buffer saline”
PBST	“Phosphate buffer saline” - salina tamponada mais Tween 20
Pd	Fosfato sódico de prednisolona
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
PGD ₂	Prostaglandinas D ₂
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	“Reverse transcriptase” PCR
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
TCR	“T cell receptor” – Receptor de célula T
Th	Linfócitos T helper
TNF- α	“Tumoral necrosis factor – alpha”
T _{reg}	Linfócitos T regulatório
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VO	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	19
I.1. Posição taxonômica e morfologia dos ancilostomídeos	20
I.2. Ciclo biológico dos ancilostomídeos.....	21
I.3. Patogenia e sinais clínicos	22
I.4. Diagnóstico	23
I.5. Epidemiologia	24
I.6. Controle	25
I.7. Resposta imune	27
I.8. Resposta imune em ancilostomídeos X modelo experimental.....	30
II. OBJETIVOS	32
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
III.1. Ensaio de proliferação celular	35
III.2. Infecção de hamsters com <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	35
III.3. Coleta de sangue	37
III.4. Quantificação do número de ovos por grama de fezes (OPG).....	37
III.5. Testes imunológicos	37
III.6. Análise histopatológica.....	39
III.7. Análise estatística	39
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
IV.1. IMUNOSSUPRESSORES.....	41
IV.1.1. Tratamento.....	45
IV.1.2. RESULTADOS	46
IV.1.2.1. Proliferação celular	46
IV.1.2.2. Ganho de peso	47
IV.1.2.3. Eliminação de ovos.....	47
IV.1.2.4. Recuperação de vermes.....	47
IV.1.2.5. Exames hematológicos.....	49
IV.1.2.6. Histopatologia	55
IV.1.3. DISCUSSÃO	59

IV.2.1. Tratamento.....	65
IV.2.2. RESULTADOS	66
IV.2.2.1. Proliferação celular	66
IV.2.2.2. Eliminação de ovos.....	67
IV.2.2.3. Recuperação de vermes.....	67
IV.2.2.4. Exames hematológicos.....	67
IV.2.2.4.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA.....	73
IV.2.2.5. Histopatologia	75
IV.2.3. DISCUSSÃO	78
IV.3.1. Tratamento.....	86
IV.3.2. RESULTADOS	87
IV.3.2.1. Recuperação de vermes.....	88
IV.3.2.2. Exames hematológicos.....	88
IV.3.2.2.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA.....	92
IV.3.2.3. Histopatologia	95
IV.3.3. DISCUSSÃO	98
IV.4.1. Tratamento.....	104
IV.4.2. RESULTADOS	105
IV.4.2.1. Eliminação de ovos.....	105
IV.4.2.2. Recuperação de vermes.....	106
IV.4.2.3. Exames hematológicos.....	108
IV.4.2.3.3. “Enzyme linked immunossorbent assay” - ELISA.....	112
IV.4.2.4. Histopatologia	113
IV.4.3. DISCUSSÃO	117
V. CONCLUSÕES	122
VI. BIBLIOGRAFIA	124
VII. ANEXOS.....	145
ANEXO A – APROVAÇÃO CETEA 066/08.....	146
ANEXO B – APROVAÇÃO CETEA 088/09.....	147

I. INTRODUÇÃO

A ancilostomíase é uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo. Em países em desenvolvimento, leva a quadros de anemia e desnutrição entre a população mais carente. A doença acomete entre 576 e 740 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (De Silva *et al.*, 2003). É considerada como uma das doenças negligenciadas em países tropicais e como a segunda doença parasitária mais importante no homem, superada apenas pela malária. (Hotez *et al.*, 2005; Hotez, 2008).

Entre os ancilostomídeos parasitos do homem destacam-se o *Ancylostoma duodenale* e o *Necator americanus*. Outras espécies, tais como o *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma ceylanicum*, são infectantes para os seres humanos, sendo considerados agentes zoonóticos (parasitos de cães e/ou gatos), mas de pouca importância na saúde pública ou de importância localizada com distribuição geográfica bem delineada (Bungiro *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004; Loukas e Prociv, 2001).

I.1. Posição taxonômica e morfologia dos ancilostomídeos

Segundo Blaxter *et al.* (1998, 2000), o *Ancylostoma* é um parasito que está incluído no reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Strongylidea, família Ancylostomidae. Esta família é caracterizada por nematódeos que apresentam cápsula bucal desenvolvida, armada com dentes ou lâminas quitinosas cortantes em sua margem ventral (Rey, 2001). Parasitos desta família apresentam um nítido dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de uma bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior. A maioria das espécies parasita o intestino delgado, alimentando-se do sangue de vários hospedeiros mamíferos, incluindo o homem.

Dentre as subfamílias pertencentes a esta família, podemos destacar duas de interesse para a parasitologia médica e/ou veterinária: Ancylostominae e Bunostominae. Os indivíduos pertencentes à subfamília Ancylostominae caracterizam-se por apresentarem, na margem da cápsula bucal, um a três pares de dentes quitinosos. Na subfamília Bunostominae, além de outras características diferenciais, os adultos possuem lâminas cortantes em substituição aos dentes. Nesta subfamília, destaca-se o *N. americanus*.

I.2. Ciclo biológico dos ancilostomídeos

O ciclo de vida dos ancilostomídeos está representado na FIG. 1. O ciclo é direto, sem hospedeiros intermediários. Vermes adultos vivem no intestino delgado e se alimentam de mucosa e sangue do hospedeiro. As fêmeas adultas fazem postura de ovos que são eliminados nas fezes do hospedeiro e se embrionam no meio exterior. Do ovo eclodem as larvas de primeiro estágio (L_1), que se alimentam de microorganismos no ambiente e sofrem duas mudas, passando a larvas de segundo (L_2) e terceiro (L_3) estágio. As L_3 , filarióides, não se alimentam, são envolvidas pela bainha das L_2 e apresentam grande capacidade de movimentação, sendo infectantes para o hospedeiro definitivo. As L_3 , livres no ambiente, infectam o hospedeiro pelo contato com a pele e/ou mucosa do mesmo (Soulsby, 1965).

As L_3 infectantes penetram na pele do hospedeiro via folículos pilosos e alcançam os capilares sanguíneos e/ou linfáticos. Durante a penetração, as L_3 perdem a bainha de L_2 , que as envolvia, e voltam a se alimentar de componentes do soro do hospedeiro (Hawdon e Shad, 1990). As larvas são então carregadas até os pulmões, onde sofrem mais uma muda, para larvas de quarto estágio (L_4). As L_4 possuem um primórdio de cápsula bucal e apresentam sistema genital em desenvolvimento. Dos pulmões, as larvas passam à traquéia, são deglutidas, alcançando o intestino delgado.

No intestino, as L_4 se fixam com o primórdio de cápsula bucal nas microvilosidades e iniciam o parasitismo, passando a adultos imaturos. Com o desenvolvimento da maturidade sexual, machos e fêmeas copulam e as fêmeas iniciam a postura de ovos, cerca de 14 dias após a infecção (Loukas e Prociv, 2001).

Apenas *Ancylostoma* é capaz de infectar por via oral e, nestes casos, as larvas não passam pelos pulmões (Haas *et al.*, 2005). As L_3 infectantes passam pelo trato gastro-intestinal, atingem o estômago e perdem a cutícula externa pela ação do suco gástrico. Após, aproximadamente, três dias de infecção, migram para o intestino delgado e penetram nas células de Lieberkühn onde ocorre a muda para a larva L_4 . Posteriormente, estas voltam à luz do intestino, transformam-se em adultos jovens, fixando-se à mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais para realizar hematofagia e cópula.

Pode ocorrer ainda que as L₃ de *Ancylostoma* após a penetração atinjam a circulação sistêmica e se dispersem pelos tecidos (migração somática), ficando instaladas em fibras musculares esqueléticas como larvas L₃ hipobióticas (Cury e Lima, 2002). Estas larvas hipobióticas podem ser reativadas para o desenvolvimento e migração, levando à formação de vermes adultos no intestino, possivelmente quando as condições ambientais são favoráveis, como por exemplo, em períodos de maior umidade e calor (onde as condições são ótimas para a transmissão) e interferem com o metabolismo do hospedeiro. Além disso, em cães, estas larvas podem promover infecções transplacentárias e transmamária as quais são influenciadas por mudanças hormonais durante o periparto, assumindo uma importância epidemiológica muito elevada (Cunha, 2009).

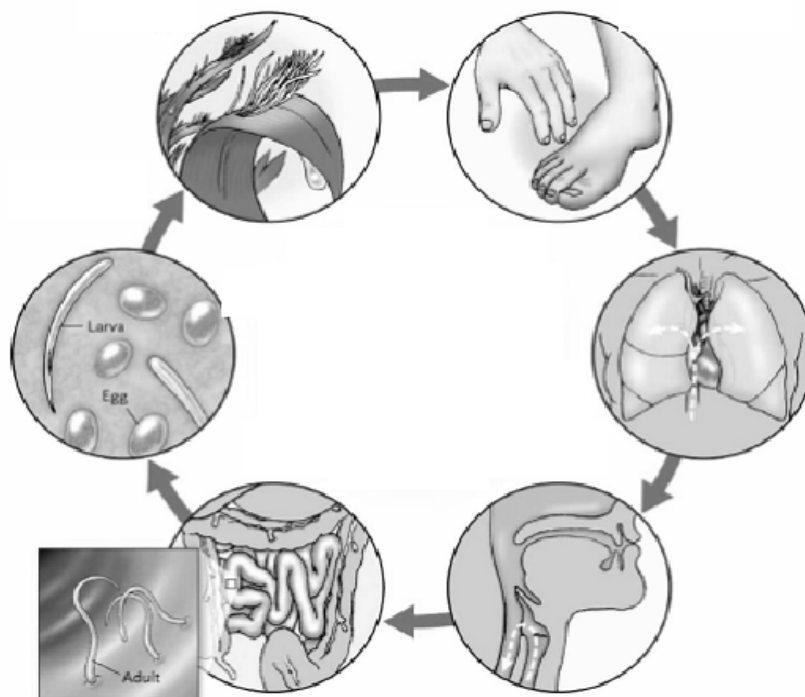


FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos. Adaptado de Hotez *et al.* (2005).

I.3. Patogenia e sinais clínicos

Durante a penetração da L₃, a larva perde a cutícula do estágio anterior (L₂) e secreta enzimas que facilitam a sua migração através dos tecidos. Muitas larvas são mortas pelo sistema imune do hospedeiro ao longo do caminho. Neste momento, muitas reações

inflamatórias são montadas no organismo, podendo variar entre reações assintomáticas até erupções cutâneas (Loukas e Prociv, 2001).

Durante a fase de migração tecidual até os pulmões, as larvas podem induzir lesões hemorrágicas e inflamatórias focais, que podem se manifestar clinicamente como sintomas da síndrome de Löeffler, associada à migração de larvas de helmintos no pulmão. Quadros clínicos respiratórios são raros e podem ser vistos apenas em casos de infecções maciças por ancilostomídeos ou em casos de resposta imunológica direcionada às larvas, com consequente morte destas (Loukas e Prociv, 2001; Prociv e Croese, 1990).

No intestino, os parasitos adultos alimentam-se fixando profundamente a cápsula bucal nas microvilosidades do epitélio. A presença de dentes/lâminas na cápsula bucal ajuda o parasito a se ancorar na mucosa, facilitando a maceração do tecido (Cury e Lima, 2002; Prociv e Croese, 1990).

Glândulas do parasito secretam vários produtos, incluindo proteases e anticoagulantes, que são liberados através da cápsula bucal no local de fixação. Ocorre, assim, uma “pré-digestão” da mucosa intestinal do hospedeiro. Em resposta ao desgaste do tecido e/ou início da resposta inflamatória, os parasitos mudam de posição na mucosa a cada 4-6 horas (h) (Loukas e Prociv, 2001).

A patogenia da doença é consequência direta da perda de sangue que ocorre durante a fixação e alimentação dos parasitos adultos no intestino. Ancilostomídeos são a principal causa de anemia ferropriva, que, em infecções maciças, podem causar, devido à enteropatias por perda de proteínas, retardo físico e mental em crianças, além de óbito (Gasser *et al.*, 2008; Hotez *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2006; Prociv e Croese, 1990).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico parasitológico da infecção por ancilostomídeos é feito baseado no encontro de ovos nas fezes do hospedeiro, utilizando diversas técnicas de exame de fezes. A principal técnica utiliza a câmara de McMaster, que quantifica o número de ovos por grama de fezes (OPG), fornecendo dados que permitem estimar a intensidade de infecção, que, de acordo

com a Organização Mundial de Saúde, é definida como: baixa, aquela com OPG abaixo de 1999; moderada, quando varia entre 2000-3999; e, intensa, acima de 4000 (Gordon e Whitlock, 1939; Hotez *et al.*, 2005; Gasser *et al.*, 2008).

As características morfológicas dos ovos são típicas (~65x40 µm), mas não permitem identificar as espécies. Para superar essa limitação no diagnóstico, o método de coprocultura (Roberts e O'Sullivan, 1950) pode ser usado para desenvolver ovos em L₃, que permitem identificar microscopicamente o gênero do parasito. Entretanto, esta identificação é laboriosa e demorada, já que o desenvolvimento ovo-L₃ leva cerca de uma semana e a identificação, por espécie, não é possível.

I.5. Epidemiologia

Ancilostomídeos ocorrem quase exclusivamente em comunidades rurais pobres de países em desenvolvimento nas regiões tropicais do globo terrestre (FIG. 2). A prevalência regional da ancilostomíase é dependente do clima local e da composição do solo. Isso ocorre devido à dependência do ciclo biológico do parasito, que tem uma fase de desenvolvimento larvário no ambiente/solo, em condições ideais de temperatura e umidade (Hotez, 2008).

Os dois fatores mais importantes na infecção por ancilostomídeos são as condições sócio-econômicas e de desenvolvimento do país/região. Nas regiões tropicais em desenvolvimento, a maioria dos casos de ancilostomíase ocorre em regiões rurais de extrema pobreza, onde a população possui renda menor do que US\$2/dia, confirmando a relação entre a prevalência da infecção e a baixa condição sócio-econômica (Hotez *et al.*, 2005; Hotez, 2008).

A relação entre ancilostomíase e pobreza tem origem multifatorial, incluindo instalações sanitárias inadequadas, ausência de saneamento básico e dificuldade ao acesso a medicamentos essenciais. Além disso, condições de pobreza facilitam a infecção por ancilostomídeos e a infecção por ancilostomídeos promove a pobreza, isto porque leva a efeitos negativos na saúde e educação em crianças e na produtividade dos trabalhadores.

Nas últimas décadas, a redução na pobreza e crescente urbanização dos países em desenvolvimento diminuíram com sucesso a prevalência da ancilostomíase (Hotez, 2008).

Enquanto altas cargas parasitárias continuam ocorrendo entre crianças em diversas áreas tropicais, estudos conduzidos em todo mundo nos últimos anos mostram que a infecção por ancilostomídeos não confere proteção à re-infecções e indicam que o pico de prevalência e intensidade de infecção para ancilostomídeos tem ocorrido com frequência em indivíduos adultos ou mais velhos (Bethony *et al.*, 2002; Gandhi *et al.*, 2001; Hotez *et al.*, 2003).

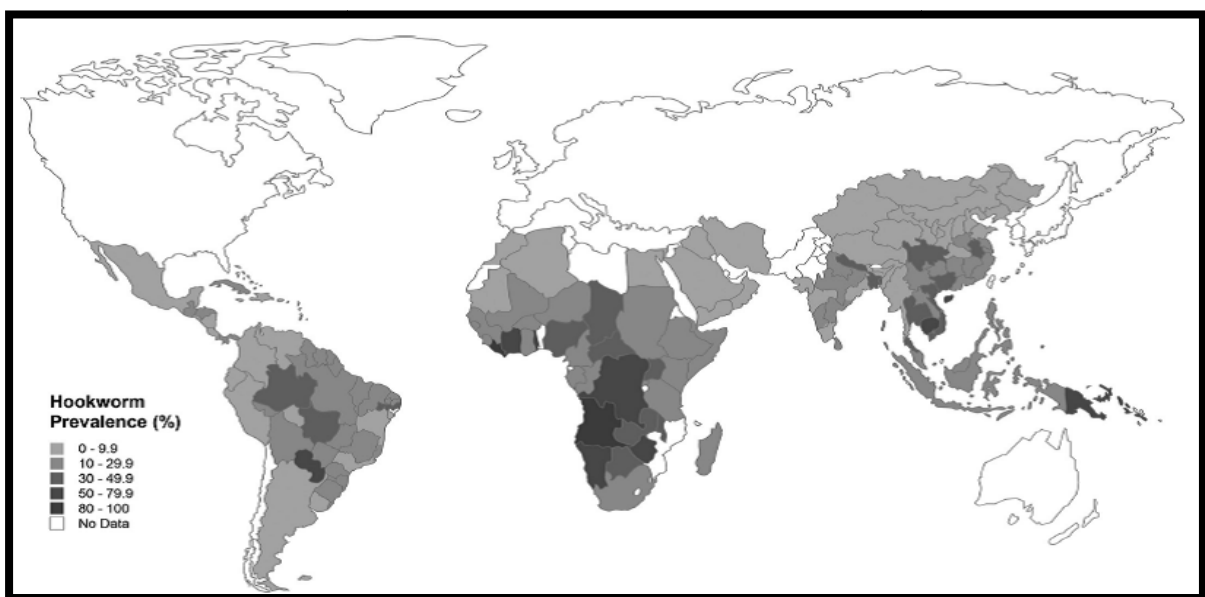


FIGURA 2 – Distribuição e prevalência da ancilostomíase humana no mundo. Ilustração: Margaret Shear, Public Library of Science, adaptado de Silva *et al.*, 2003.

1.6. Controle

Ancilostomídeos adultos podem viver de um a cinco anos no intestino delgado e são causas importantes de morbidade devido à deficiência de ferro no sangue (Quinnell *et al.*, 2004). Portanto, pode-se dizer que a morbidade é maior entre os hospedeiros que albergam maior número de parasitos adultos (Hotez *et al.*, 2005).

Devido ao alto potencial de transmissão, os ancilostomídeos são de difícil erradicação em áreas pobres ou de condições sanitárias precárias. Esforços de controle têm, por esta razão, reduzido a morbidade através de tratamentos em massa de populações afetadas com drogas

anti-helmínticas, principalmente benzimidazóis (Hotez *et al.*, 2005). Estas drogas são seguras e efetivas quanto à redução na prevalência e intensidade das infecções e, em termos, podem fornecer condições do organismo de recuperar os níveis de hemoglobina e crescimento (Bungiro e Cappello, 2005).

Tratamentos anti-helmínticos periódicos e repetidos, complementados com saneamento básico e utilização de água limpa apresentam a melhor relação custo-benefício e são consideradas as melhores formas de controle de morbidade causada pelos ancilostomídeos (Hotez *et al.*, 2005). Embora estes tratamentos antihelmínticos sejam eficazes na eliminação de vermes adultos, reinfecções ocorrem cerca de 120 dias após o tratamento (Albonico *et al.*, 1995, 2003; Quinnell *et al.*, 1993).

Infelizmente, os benefícios de programas de tratamento com anti-helmínticos, a longo prazo, têm sido difíceis de quantificar, visto que o tratamento é voltado, sobretudo a crianças em idade escolar, enquanto as maiores prevalências e intensidade de infecção ocorrem em indivíduos adultos (Bethony *et al.*, 2006). Além disso, apesar de estudos darem suporte ao valor do tratamento quimioterápico em áreas endêmicas, alguns trabalhos sugerem que uso repetido de algumas drogas pode levar à diminuição de sua eficácia, sugerindo a emergência de resistência a drogas (Albonico *et al.*, 2003; Bungiro e Cappello, 2005).

Outro enfoque no controle da ancilostomíase é o desenvolvimento de vacinas contra o parasito. Ensaios de imunizações com antígenos de excreção e secreção (ES) de larva e de adulto isolados produziram bons resultados e, de acordo com Bethony *et al.* (2006) a tendência é criar uma vacina que reúna um antígeno específico de cada fase do helminto (vacina bivalente) ou uma vacina que contenha um produto ES que seja expresso tanto na fase de larva quanto na de adulto (vacina monovalente).

É esperado que o uso de uma vacina em larga escala prolongue o intervalo requerido entre os tratamentos anti-helmínticos periódicos e leve também a um atraso no surgimento de

resistência às drogas hoje disponíveis, além de prevenir o quadro de doença (redução da morbidade) (Bethony *et al.*, 2006).

I.7. Resposta imune

A complexidade do ciclo de vida dos ancilostomídeos oferece numerosas oportunidades para o parasito e o hospedeiro interagirem molecularmente. Assim, o contato do parasito com suas barreiras críticas, como durante a invasão cutânea e passagem através dos tecidos pulmonares, bem como durante a chegada e penetração na mucosa intestinal, expõem o hospedeiro a uma diversidade antigênica muito grande (Loukas e Prociv, 2001). Além disso, cada fase de desenvolvimento do parasito (L₃, L₄ e adulto) expressa um perfil de proteínas antigênicas. Esses dois fatores representam um desafio para o sistema imune do hospedeiro vertebrado.

No entanto, ancilostomídeos geram uma resposta imunológica típica de nematóides gastrointestinais em seus hospedeiros definitivos. Pacientes infectados por ancilostomídeos produzem altos níveis de imunoglobulina (Ig) E, com eosinofilia sistêmica e localizada (pulmões e intestino), se caracterizando como uma resposta do perfil T helper tipo 2 (Th₂) (Loukas *et al.*, 2006).

Uma resposta humoral exacerbada é montada contra adultos e larvas de ancilostomídeos, mas o efeito que esta tem sobre os parasitos ainda não é muito claro. Além disso, é difícil distinguir entre a resposta anti-larva e anti-adulto, dado que ambos produzem muitos antígenos (Loukas e Prociv, 2001).

Ancilostomídeos sobrevivem relativamente bem em um ambiente imunologicamente hostil, onde o ambiente com fenótipo Th₂ (com predomínio das interleucinas (IL)-4 e IL-5) está associado com proteção parcial do hospedeiro. No entanto, esta resposta não protege contra reinfecções. Os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda são desconhecidos (Loukas *et al.*, 2006). O parasito pode promover sua sobrevivência secretando agentes imunossupressores e, acredita-se que estimulando o aparecimento de populações T regulatórias (T_{reg}) (Pritchard *et al.*, 2007)

Estudos mostram que a infecção por ancilostomídeos tem um efeito imunomodulatório que pode afetar a resposta imunológica do hospedeiro (homem) infectado, quando exposto a antígenos exógenos, tais como vacinas. Nesses estudos foram evidenciados diminuição da resposta linfocitária no sangue periférico de pacientes (Kalinkovich *et al.*, 1998; Onyemelukwe *et al.*, 2001) e altos níveis de IL-10 (Geiger *et al.*, 2004). Entretanto, tem sido mostrado que o tratamento com mebendazol pode recuperar a resposta imunológica celular contra os ancilostomídeos (Geiger *et al.*, 2004).

I.7.1. Resposta imune contra larvas infectantes (L₃)

Quando a infecção ocorre pela penetração cutânea, as L₃ perdem a cutícula de L₂ e secretam enzimas que facilitam a migração pelos tecidos. Nesta fase, muitas larvas são mortas pela resposta imune do hospedeiro.

Quando alcançam a circulação, inicia-se a fase de interação com o sistema imune do hospedeiro e o parasito logo alcança os pulmões. A chegada neste órgão é facilitada pela secreção de mais antígenos, que induzem respostas representativas do sistema imune local. Neste “ataque” muitas larvas morrem, mas as que sobrevivem fazem a escalada mucociliar, interagindo com células apresentadoras de antígenos (APC's) localizadas na mucosa. Ainda nos pulmões sofrem mais uma muda, para L₄, liberando mais moléculas antigênicas, com propriedades imunomodulatórias (Loukas e Prociv, 2001).

Camundongos imunocompetentes desafiados com *A. caninum* e *A. duodenale* não se infectam, mas, neles, as L₃ realizam a migração tecidual pelos pulmões, assim como ocorre em hospedeiros definitivos. Neste modelo, foi observado aumento nos níveis de IgM, IgG₁ e IgE, no entanto, a dose-desafio em camundongos é desproporcional (Hotez *et al.*, 1999; Loukas e Prociv, 2001).

No que diz respeito à resposta imune celular, os eosinófilos predominam na resposta inflamatória contra L₃ de ancilostomídeos nos tecidos e, dependendo da dose de larvas infectantes, este quadro se reflete em eosinofilia periférica (Loukas e Prociv, 2001).

Evidências sugerem que estas células são capazes de matar os estágios infectantes, mas não adultos (Meeusen e Balic, 2000).

I.7.2. Resposta imune contra vermes adultos

A invasão de tecidos por ancilostomídeos, e helmintos de forma geral, está associada a elevados níveis de IgE no soro do hospedeiro. A maior parte desta IgE produzida está diretamente ligada ao estímulo provocado pelos antígenos do parasito. Citocinas do tipo Th₂ (IL-4, IL-5 e IL-13, principalmente) predominam na resposta, com IL-4 promovendo a síntese de IgE, enquanto citocinas do tipo Th₁, inibem a sua produção (Loukas e Prociv, 2001).

Ancilostomídeos adultos induzem a produção de IgE, IgG e IgM no soro de pacientes. Os níveis destas imunoglobulinas voltam ao normal após o tratamento anti-helmíntico (Ganguly *et al.*, 1988; Kumar *et al.*, 1980; Loukas e Prociv, 2001). No entanto, Bungiro *et al.* (2008) encontraram altos níveis de IgA específica no intestino delgado e nas fezes de hamsters experimentalmente infectados com *A. ceylanicum*. Apesar de a secreção de IgA específica na luz intestinal não estar relacionada à proteção, ela atua em conjunto com outras respostas de mucosa, criando um ambiente desfavorável ao parasito, tais como: mastocitose, hiperplasia das células de muco, eosinofilia e alterações na arquitetura da mucosa (Bungiro *et al.*, 2008). IgA pode ainda estar associada à neutralização de moléculas excretadas e secretadas pelo parasito (Underdown e Schiff, 1986; Woof e Keer, 2006) e/ou à indução da degranulação de eosinófilos (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1989).

Eosinófilos são as células predominantes na resposta leucocitária causada por ancilostomídeos adultos. O número de eosinófilos circulantes está relacionado à carga parasitária no hospedeiro (Pritchard *et al.*, 1990). Os eosinófilos circulantes estão em trânsito da medula óssea para os sítios de infecção, no caso, intestino. Em infecções humanas, o principal fator é a infiltração deste tipo celular para o local onde está ocorrendo o parasitismo (local onde o parasito está se alimentando), mas isso varia de acordo com o estágio e intensidade da infecção e com o hospedeiro (Loukas e Prociv, 2001). Além disso, a degranulação de mastócitos em resposta à IgE tem papel fundamental na mobilização local e na ativação dos eosinófilos (Else e Finkelman, 1998). Proteases liberadas por mastócitos

degradam o colágeno cuticular de adultos de *N. americanus* (McKean e Pritchard, 1989). Fujiwara *et al.* (2009) observaram que eosinófilos de pacientes infectados por *Necator* apresentam maior grau de ativação celular, se comparados aos controles.

I.8. Resposta imune em ancilostomídeos X modelo experimental

Modelos experimentais para infecções por ancilostomídeos se fazem cada vez mais necessários para o desenvolvimento de novas drogas anti-helmínticas e, especialmente, para o desenvolvimento de vacinas (Fujiwara *et al.*, 2006).

Camundongos já foram desafiados com *Ancylostoma* spp. e *N. americanus*, no entanto, tal modelo se mostrou não permissível ao desenvolvimento de larvas em vermes adultos. Conseqüentemente, não foi possível avaliar a perda de sangue intestinal pela alimentação do adulto ou hemorragia intestinal (Fujiwara *et al.*, 2006; Soh, 1958).

Atualmente, os modelos usados para o estudo da infecção por ancilostomídeos são modelos naturais ou permissíveis, tais como o cão e hamsters, respectivamente. Apesar de estes modelos apresentarem limitações quanto ao desenvolvimento de resistência às infecções, cães podem ser utilizados na infecção por *A. ceylanicum* e *A. caninum*, enquanto hamsters albergam *A. ceylanicum* e *N. americanus* (Fujiwara *et al.*, 2006; Garside *et al.*, 1990; Loukas e Prociv, 2001).

A infecção de hamsters (*Mesocricetus auratus*) por *A. ceylanicum* tem sido usada como modelo da infecção experimental por ancilostomídeos em estudos de patologia, imunologia e vacinação (Alkazmi *et al.*, 2006, 2008; Bungiro *et al.*, 2001; Dondji *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2006; Menon *et al.*, 1985). Ao contrário de camundongos, que não permitem o desenvolvimento de parasitos adultos de *Ancylostoma*, hamsters imunocompetentes são permissíveis ao desenvolvimento de ancilostomídeos parasitos do homem, inclusive *A. ceylanicum*. Assim, larvas infectantes (L₃) administradas por via oral no hamster se desenvolvem no intestino delgado em vermes adultos (Bungiro *et al.*, 2003). O modelo é útil porque reproduz a perda de peso, diminuição no ritmo de crescimento e anemia encontrados em infecções maciças por ancilostomídeos em humanos (Bungiro *et al.*, 2001,

2003; Garside e Behnke, 1989; Ghosh *et al.*, 2006; Menon *et al.*, 1985;). Entretanto, hamsters desenvolvem uma resistência parcial a infecções secundárias por *A. ceylanicum* (Garside *et al.*, 1990).

Estudos realizados sobre a resposta imunológica de hamsters experimentalmente infectados por *A. ceylanicum* mostram que infecção oral com 100 L₃ resulta em uma resposta predominantemente Th₁ com regulação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , que ocorre durante a fase de migração larvária e continua nos 14 dias após a infecção (pré-patência). O desenvolvimento das larvas em adultos sexualmente maduros (patência) coincide com uma alteração no perfil de resposta, mudando para uma resposta predominantemente Th₂, com aumento na produção de IL-4 e IL-10 (Mendez *et al.*, 2005).

Além disso, o perfil de citocinas observados em hamsters infectados por *A. ceylanicum* durante a patência é similar à resposta de citocinas no sangue periférico em infecções humanas crônicas por ancilostomídeos, nas quais IFN- γ e IL-12 são suprimidas, mas há elevação de IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 (Fujiwara *et al.*, 2006).

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de fármacos comerciais amplamente utilizados na medicina humana na infecção por *Ancylostoma ceylanicum*, avaliando a administração destas drogas no papel imunomodulador de vias específicas na resposta à infecção.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos de imunossupressores (prednisolona e ciclosporina) na infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, em relação a aspectos parasitológicos, imunológicos e histopatológicos
- 2) Avaliar os efeitos de anticorpos antilinfocitários anti-CD3 associados ou não a glicocorticóides (prednisolona) na infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, em relação a aspectos parasitológicos, imunológicos e histopatológicos
- 3) Avaliar os efeitos de anti-inflamatórios (ácido acetilsalicílico, diclofenaco e etoricoxibe) na infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, em relação a aspectos parasitológicos, imunológicos e histopatológicos
- 4) Avaliar os efeitos de anti-histamínicos (loratadina e cloridrato de ranitidina) na infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, em relação a aspectos parasitológicos, imunológicos e histopatológicos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão apresentados os materiais e métodos comuns que foram utilizados em todos os capítulos. As particularidades de cada experimento serão descritas no respectivo item (RESULTADOS E DISCUSSÃO).

III.1. Ensaio de proliferação celular

Para os experimentos que envolveram imunossupressão, realizamos a avaliação da proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados e incubadas com o fármaco em estudo através de ensaio de MTT (Sigma, EUA) como previamente descrito por Chow *et al.* (2000).

Resumidamente, alíquotas de 160 µl da suspensão celular (1×10^6 células de linfonodos mesentéricos), em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico (Invitrogen, EUA), 1,6% de L-Glutamina (Synth, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, Brasil) foram cultivadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços, com 20 µl do fármaco em diferentes concentrações (30 a 300000 ng/ml) e 20 µl de 50 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Chemical Co. - St Louis, EUA) por 24 horas. Após a incubação, 20 µl de solução de MTT (5 mg/ml) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada por mais 4 horas em uma atmosfera úmida a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período de reação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e substituído por 100 µl de DMSO 10% (Merk, Alemanha), seguida de agitação intensa com pipeta multicanal.

A densidade óptica foi determinada a 570 nm no leitor de placas de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA), e a proliferação celular foi expressa em relação à porcentagem de absorbância de culturas controles, obtida por células não tratadas (sem droga), após subtração da absorbância dos poços utilizados como branco (sem células).

III.2. Infecção de hamsters com *Ancylostoma ceylanicum*

Todos os procedimentos relativos à manipulação infecção e eutanásia dos hamsters seguiram as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), conforme projeto aprovado sob o número 066/08 (ANEXO A) e 088/09 (ANEXO B).

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular, sem controle de luz/temperatura, no Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em gaiolas plásticas, em grupos de cinco animais, sendo oferecidas água e ração comercial para camundongos *ad libitum*. A limpeza das gaiolas foi feita duas vezes por semana.

Para infecção, 50 L₃ de *A. ceylanicum* previamente recuperadas e preparadas foram inoculadas via oral, com auxílio de gavage, no tubo digestivo superior dos hamsters.

Sete dias após o inóculo, foi iniciada a coleta de fezes dos animais infectados para realização do exame de fezes, que consistiu na realização de OPG, utilizando câmara de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939), e coprocultura (Roberts e O'Sullivan, 1950). Esta foi incubada a 27° C por sete dias, quando foi então feito o exame de Baermann Moraes modificado (Barçante *et al.*, 2003) para recuperação das L₃.

As L₃ recuperadas foram lavadas em solução salina tamponada (PBS –“phosphate buffer saline”, pH 7,4) e centrifugadas (200 g – 5 minutos – 25° C). Este procedimento foi repetido três vezes e as L₃ foram contadas por estimativa em microscópio estereoscópio. As larvas recuperadas foram tratadas com HCl 0,1% por 10 min sob agitação. Ao término, a solução foi novamente lavada em solução salina e as larvas congeladas em freezer -80° C para sua utilização na produção de antígeno.

A fim de evitar a eliminação espontânea dos vermes adultos, trinta dias após a infecção os animais foram sacrificados com sobredose de anestésico (150 mg/kg de Thiopental sódico®).

Após a eutanásia, o animal foi colocado em decúbito dorsal e a cavidade abdominal foi aberta. Observou-se a condição geral dos intestinos, baço, fígado e linfonodos mesentéricos.

Uma amostra de tecido do baço e intestino delgado foi retirada, fixada em solução de formaldeído para posterior análise histopatológica.

O intestino delgado foi aberto em placa de Petri contendo PBS para recuperação dos parasitos. Os parasitos adultos foram recuperados diretamente da mucosa intestinal, contados, sexados e congelados em freezer -80° C para os ensaios imunológicos.

III.3. Coleta de sangue

Cerca de 1 mililitro (ml) de sangue foi obtido diretamente do plexo retro-orbital de todos os animais utilizando pipeta de Pasteur heparinizada. As coletas ocorreram dos animais experimentais ainda negativos (sem tratamento e sem infecção) e no dia da eutanásia dos animais (dia 30). O sangue coletado foi utilizado para realização de hemograma completo (Analisador de Hematologia Veterinária BC2800, Quibasa, Brasil) e para obtenção de plasma para os testes imunológicos.

III.4. Quantificação do número de ovos por grama de fezes (OPG)

Todos os animais foram submetidos à contagem do OPG, utilizando câmara de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939), a cada três dias a partir do sétimo dia de infecção, até o final dos experimentos. As fezes foram coletadas durante a noite (cerca de 12 horas) em gaiolas próprias, por grupo experimental.

III.5. Testes imunológicos

III.5.1. Preparação dos antígenos

III.5.1.1. Larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum*

As larvas recuperadas das coproculturas de hamsters utilizados para manutenção da cepa de *A. ceylanicum* em laboratório foram congeladas em freezer -80° C com coquetel de inibidores de proteases, de acordo com o volume, até o momento de uso.

Para preparação dos antígenos, as larvas foram ressuspensas em 2 ml de PBS, colocadas em tubos cônicos de 15 ml e sonicadas em aparelho de ultra-som (Branson Sonc Power – Sonofer Cell Disruptor 450). Foram realizados 35 ciclos de 30 segundos, com intervalo de um minuto em banho de gelo. O completo rompimento das larvas foi confirmado em microscópio estereoscópico.

As amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 15340 *g*, por 10 min. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer -80° C até o momento do uso.

III.5.1.2. Vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum*

Os adultos (machos e fêmeas) recuperados de necropsias de hamsters utilizados para manutenção da cepa de *A. ceylanicum* em laboratório foram descongelados e ressuspensos em 2 ml de PBS. Imediatamente após, foram macerados manualmente, utilizando um homogeneizador de tecidos.

As amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 15340 *g*, por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer -80° C até o momento do uso.

III.5.2. Dosagem de proteínas

Os antígenos de larva e de vermes adultos foram submetidos à dosagem de proteínas utilizando o kit *BCA*® (Pierce), conforme recomendações do fabricante.

III.5.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA

Todos os animais foram avaliados individualmente quanto à sua resposta por anticorpos IgG total frente a antígenos brutos de L₃ e vermes adultos pela técnica de ELISA.

Para isso, a técnica foi padronizada e as condições ideais definidas para o ensaio foram: a placa (BD Falcon, EUA – 96 poços) foi sensibilizada com 1 µg/ml de antígeno diluído em tampão carbonato (NaHCO₃ 0,05 M, pH9,6), por 18 h, a 4° C. O bloqueio foi feito incubando a placa por 2 h, à temperatura ambiente, em solução contendo 2% de leite em pó desnatado (Molico® – Nestlé) dissolvido em PBS Tween 20 (PBST) 0,05%. Após este tempo, a placa foi

incubada com os soros dos hamsters (individual) na diluição de 1:100, por 18 h, à 4° C. O próximo passo foi incubar a placa com o anticorpo monoclonal IgG, conjugado com biotina (BD Biosciences), na diluição de 1:5000 em PBST 0,05%, por 2 h, à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada a estreptavidina (ReD Systems – EUA) diluída 1:200 em PBST 0,05%, conforme recomendações do fabricante. A incubação ocorreu por 20 minutos. A revelação foi feita utilizando reagente o-phenylenediamine dihydrochloride - OPD® (Sigma Aldrich), incubado por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando 50 µl de H₂SO₄ 2 N a cada poço da placa. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro a 492nm.

Cabe ressaltar que após cada etapa de incubação (exceto após incubação com OPD®), a placa foi lavada cinco vezes com PBST 0,05%.

III.6. Análise histopatológica

Para análise histopatológica, realizada no Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), em parceria com a Dra. Cláudia Martins Carneiro, parte do baço e duodeno recuperados após o eutanásia dos animais foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado com tampão fosfato. O intestino foi fixado aberto com auxílio de alfinetes em papelão duro. Em seguida as amostras foram desidratadas com banhos de álcool de 10 minutos cada, em concentrações crescentes entre 70% a 100%. Após este passo as amostras foram diafanizadas com três banhos de cinco minutos de xilol e, em seguida, incluídas em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e avaliados individualmente.

III.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Grubb, para detecção de “outliers”. Os métodos estatísticos foram escolhidos de acordo com a natureza dos dados: os paramétricos foram avaliados por análise de variância ou pelo teste T não-pareado; os não-paramétricos foram submetidos aos testes de Mann e Whitney ou Kruskal-Wallis. Foram usados os pacotes Instat e Graph Pad Prism 5.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1.IMUNOSSUPRESSORES¹

¹ Parte dos dados apresentados neste capítulo foi submetida como artigo científico intitulado “**Prednisolone and cyclosporine A: effects on an experimental model of ancylostomiasis**” para a revista *International Journal for Parasitology* (APÊNDICE A).

Infecções helmínticas em indivíduos imunossuprimidos são prejudiciais e levam a um aumento na suscetibilidade a infecções como tuberculose (Brooker *et al.*, 2004). Isso ocorre devido ao aumento no nível de citocinas do tipo Th₂ e supressão da resposta imune do tipo Th₁ (Brooker *et al.*, 2004). Borkow e Bentwich (2004) sugerem que a ativação crônica da resposta imune por helmintos produzem grandes volumes de material antigênico tornando os indivíduos mais propensos a se infectarem pelo vírus HIV, e, uma vez infectados, a terem maiores cargas virais e rápida evolução da doença. O aumento da resposta imune do tipo Th₂ pode levar a hiporesponsividade e anergia, afetando a resposta do hospedeiro à imunização (Lewthwaite *et al.*, 2005).

Ainda segundo Lewthwaite *et al.* (2005), infecções helmínticas induzem uma resposta por citocinas do tipo Th₂ e diminuição não-específica da resposta Th₁, ao passo que, doenças inflamatórias do intestino, tais como a doença de Crohn e colite ulcerativa, parecem ser consequência de uma falha do organismo em diminuir a resposta inflamatória do tipo Th₁. O desenvolvimento desta resposta pode explicar a relação simbiótica que humanos têm com parasitos intestinais e a relativa baixa incidência de doenças inflamatórias do intestino em países em desenvolvimento, comparado com a alta incidência destas doenças em países desenvolvidos, onde a exposição a parasitos intestinais é menor (Lewthwaite *et al.*, 2005).

Os corticosteróides são usados para suprimir efeitos indesejados das respostas imunes de origem auto-imune ou alérgica, bem como aquelas induzidas pela rejeição de transplantes. Os corticosteróides são derivados farmacológicos dos membros da família de glicocorticóides dos hormônios esteróides. A prednisolona, um dos glicocorticóides mais amplamente usados, atua por meio de receptores intracelulares expressos em quase todas as células do corpo. O complexo formado pela associação do corticosteróide com seu receptor intracelular interfere em uma região regulatória específica do DNA, interferindo com a síntese ou ligação de fatores de transcrição na região promotora dos genes específicos, regulando a transcrição destes (Paliogianni *et al.*, 1993; Scheinman *et al.*, 1995).

Levando em consideração que um grande número de genes é regulado pelos corticosteróides e que diferentes genes são regulados em diferentes tecidos, os efeitos da

terapia com esteróides são bem estabelecidos e muito complexos apesar de seus mecanismos de ação serem indefinidos ou pouco claros. Dentre os efeitos benéficos, temos: i) a sua atividade anti-inflamatória, com efeitos sobre a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico; ii) ao inibir a expressão de moléculas de adesão, os corticosteróides inibem a migração de células inflamatórias aos locais de inflamação; e, iii) promoção da apoptose dos leucócitos e linfócitos (Janeway *et al.*, 2007).

Na forma oral, prednisona ou prednisolona é rapidamente absorvida. A via de metabolização é hepática, sendo a prednisona convertida a prednisolona. Em condições fisiológicas, o corticosteróide participa na maturação intra-tímica dos linfócitos T e na expressão do complexo de histocompatibilidade (“major histocompatibility complex” – MHC), mas, em condições suprafisiológicas, inibe a proliferação celular de linfócitos T, a imunidade dependente de célula T e a transcrição gênica de citocinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α (Scheinman *et al.*, 1995; Wilckens e de Rijk, 1997).

A ciclosporina é um decapeptídeo cíclico, neutro e lipofílico, cujas propriedades imunossupressoras tem sido bem caracterizadas. A ciclosporina não é uma droga citotóxica. É considerada uma droga seletiva, visto que exerce seu efeito em uma população restrita de células linfóides, e poupando outras células de linhagem mielóide (Pestana, 2001). É um importante imunossupressor clínico com papel fundamental na manutenção de órgãos transplantados e no tratamento de doenças auto-imunes (Pestana, 2001).

O efeito farmacológico da ciclosporina depende da sua ligação ao seu receptor citoplasmático, denominado ciclofilina, membro de uma família de proteínas intracelulares conhecidas como imunofilinas. Assim, a ação imunossupressora depende da formação deste complexo, interferindo com as rotas de sinalização para a expansão clonal de linfócitos (Janeway *et al.*, 2007; Pestana, 2001).

A ciclofilina, quando ligada a ciclosporina, inibe a expressão de genes codificadores de proteínas nucleares envolvidas na proliferação de células T. Além disso, a ciclosporina inibe a

expressão de vários genes de citocinas que são normalmente induzidas na ativação de células T, principalmente IL-2, cujo bloqueio é considerado o principal efeito da droga (Fruman *et al.*, 1992; Janeway *et al.*, 2007; Kahan, 1989).

Embora o principal efeito imunossupressor da ciclosporina seja o resultado da inibição da proliferação das células T, ela tem uma grande variedade de outros efeitos imunológicos, alguns dos quais podem ser importantes farmacologicamente. Entre eles temos: i) inibição da apoptose de linfócitos T por antígenos; ii) inibição da proliferação de linfócitos T após a ligação de imunoglobulinas de superfície; iii) indução de apoptose de linfócitos T após ativação de células B; e iv) nos granulócitos, reduz a exocitose dependente de cálcio das serinas esterases associadas aos grânulos (Janeway *et al.*, 2007).

Em infecções parasitárias, a ciclosporina atua como imunossupressor, causando aumento da infecção ou atraso na eliminação dos parasitos. No entanto, Chappell e Wastling (1992)² *apud* Bell *et al.* (1996), revisaram a literatura sobre a atividade anti-parasitária da ciclosporina e mostraram que, *in vivo*, a ciclosporina A pode agravar algumas infecções mas, em outras, pode aliviar o quadro. Em alguns casos, ambos efeitos são observados. Não é possível prever quando a administração da ciclosporina em animais de laboratório infectados vai resultar em ação anti-parasitária ou imunomodulatória porque o efeito do tratamento parece ser independente do grupo taxonômico e da localização dos parasitos no corpo do hospedeiro.

Schad (1986) mostrou que uma única injeção de ciclosporina (30 mg/kg), via subcutânea, dada ao mesmo tempo da infecção de camundongos com L₃ de *Strongyloides ratti* diminuiu em 99,3% o estabelecimento de adultos. Este dado mostra que, neste caso, a ciclosporina tem efeito protetor sobre a fase tecidual do parasito.

² CHAPPEL, L.H.; WASTLING, J.M. Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitology*. n.105, suppl, p. 25-40, 1992.

IV.1.1. Tratamento

Para avaliar o efeito da imunossupressão em hamsters infectados por *A. ceylanicum*, os animais foram tratados com fármacos imunossupressores utilizadas em pacientes humanos transplantados.

Foram utilizados dois fármacos comerciais: i) Fosfato sódico de prednisolona[®] (Medicamento genérico, 3 mg, Prati Donaduzzi); ii) Ciclosporina - CsA (Sandimun Neoral[®], 100 mg, Novartis). Além destes, foram mantidos 14 animais controle, não tratados e infectados.

Os animais foram tratados durante três dias consecutivos antes da infecção e, a partir daí, o tratamento ocorreu em dias alternados. A dose de tratamento foi definida como a dose máxima recomendada em casos de transplantes e/ou doenças auto-imunes. Considerou-se o hamster com peso médio de setenta gramas. A administração da droga ocorreu sempre no final da tarde.

IV.1.1.1. Fosfato sódico de prednisolona

Este medicamento foi utilizado na forma de solução oral (3 mg/ml). O grupo tratado foi composto por 14 hamsters e cada um deles recebeu a dose de 10 mg/kg (0,6 mg/hamster), via oral, com auxílio de pipeta.

IV.1.1.2. Ciclosporina A (CsA)

O medicamento de escolha para este tratamento encontra-se sob a forma de cápsula de gelatina mole, cada uma contendo 1 ml de ciclosporina. Este volume foi retirado da cápsula em condições estéreis, com auxílio de seringa e agulha, aliquotado em tubos de microcentrífuga com 300 µl cada. Os tubos foram mantidos à 4° C por, no máximo, sete dias. O grupo tratado foi composto por 14 hamsters, que receberam a dose de 10 mg/kg (0,6 mg/hamster), via oral, com auxílio de pipeta.

IV.1.2. RESULTADOS

IV.1.2.1. Proliferação celular

A dose administrada para prednisolona e ciclosporina A, foi de 0,6 mg/hamster (6×10^5 ng/hamster). Neste ensaio, foram utilizadas doses maiores do que estas, com a maior delas equivalendo à metade da dose administrada (3×10^5 ng/hamster). Os resultados mostram que células de linfonodo mesentérico de hamsters estimuladas com PHA não apresentam grande variação na proliferação quando incubadas com prednisolona ($p > 0,05$) e a proliferação celular para todas as doses testadas foram menores do que as culturas de células incubadas sem a droga ($p < 0,05$) (GRAF. 1 A). Neste ensaio, comparada ao grupo estimulado com PHA, sem droga, metade da dose de prednisolona administrada foi suficiente para inibir mais de 70% da proliferação ($p < 0,001$).

Para CsA (GRAF. 1 B), comparado às células estimuladas, mas sem droga, apenas altas doses ($\geq 30 \mu\text{g/ml}$) foram capazes de inibir mais de 75% da proliferação das células de hamsters ($p < 0,001$).

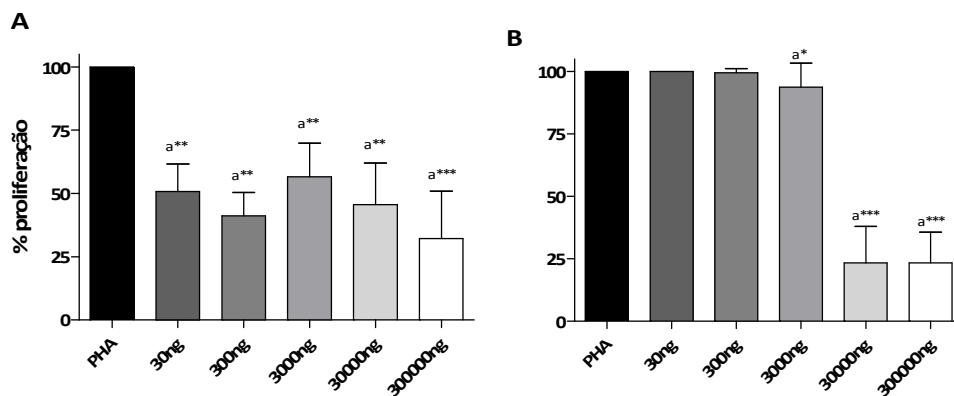


GRÁFICO 1 – Ensaio de proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados, estimuladas e incubadas com (A) prednisolona e (B) ciclosporina A em diferentes concentrações. Dados mostrados como média + SD. a = diferença estatística em relação à cultura estimulada com PHA. ** = $p < 0,01$
*** = $p < 0,001$

IV.1.2.2. Ganho de peso

Os animais foram pesados no dia da infecção (dia 0) e no dia da eutanásia (30 DAI). Os animais dos grupos tratados ganharam, em média, vinte gramas, contra cerca de oito, nos animais controle. Não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos.

IV.1.2.3. Eliminação de ovos

A cinética de eliminação de ovos dos animais tratados e controle está apresentada no GRAF. 2 A. O período pré-patente foi de 21 dias para todos os grupos experimentais. No entanto, a maior eliminação de ovos para os grupos tratados com ciclosporina ocorreu 24 dias após a infecção (DAI) (OPG = 2400) e, para o grupo controle, aos 29 DAI (OPG = 3040). O grupo tratado com prednisolona apresentou baixa eliminação de ovos durante todo o período observado, com maior OPG aos 24 e 29 DAI (OPG = 429 e 400, respectivamente).

IV.1.2.4. Recuperação de vermes

O número de vermes adultos recuperados está representado no GRAF. 2 B. Do grupo controle foram recuperados, em média, 16 vermes por hamster, enquanto dos animais tratados com ciclosporina, foram recuperados 21 e, quando tratados com prednisolona recuperou-se menor quantidade de vermes (em média, 12 por hamster). Não houve diferença estatística na recuperação total de vermes adultos ou entre a recuperação de machos e fêmeas (dados não mostrados) entre os grupos.

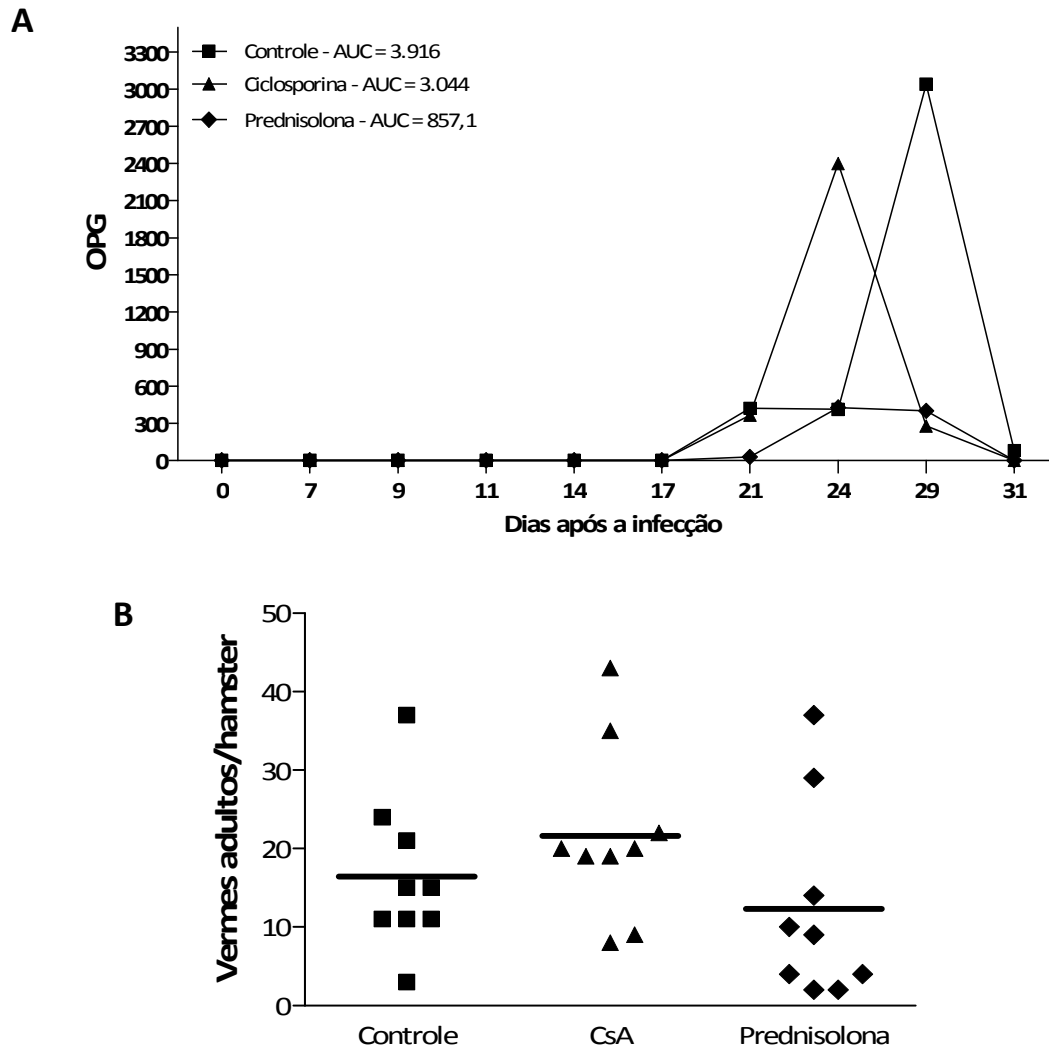


GRÁFICO 2 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* recuperados do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) e prednisolona (10 mg/kg, VO). n=14 hamsters/grupo. AUC = “area under curve” (área sob a curva). VO = via oral.

IV.1.2.5. Exames hematológicos

Os valores de referência mencionados (destacados nos gráficos com linha pontilhada) referem-se aos valores normais para hamsters, *Mesocricetus auratus*, fêmeas, obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981)³ *apud* Gad (2007). Os valores apresentados como negativos foram obtidos de parte dos animais antes do tratamento e/ou infecção.

IV.1.2.5.1. Hemácias e hemoglobina

Os níveis de hemácias circulantes dos animais tratados e infectados se mantiveram em níveis fisiológicos normais durante todo o experimento (GRAF. 3 A). Observamos diferença estatística entre todos os animais infectados e os animais negativos ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Com relação aos níveis de hemoglobina, houve diferença estatística entre todos os animais infectados e os animais negativos (GRAF. 3 B).

IV.1.2.5.2. Leucócitos

IV.1.2.5.2.1. Total

O GRAF. 4 mostra as variações no número de leucócitos totais entre os animais negativos e infectados. Observamos diminuições nas contagens para os grupos controle e tratado com prednisolona, aos 30 DAI, sendo que, para o primeiro, a contagem média ficou abaixo dos valores fisiológicos considerados normais. Não houve diferença estatística entre os grupos.

³ Mitruka, B. M.; Rawnsley, H. M. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and humans*. 2. ed. New York: Masson. 1981.

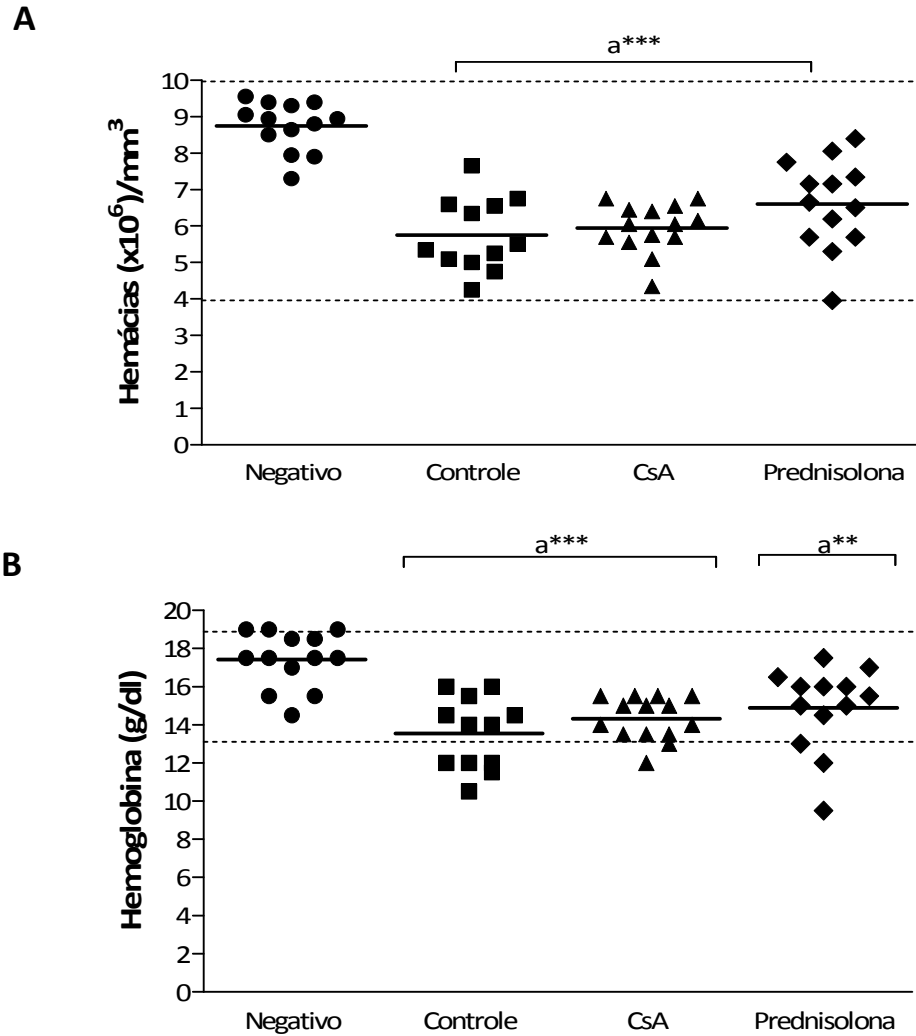


GRÁFICO 3 – (A) Contagem global de hemácias e (B) níveis de hemoglobina por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) e prednisolona (10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). n=14 hamsters/grupo. a = diferença estaística para o grupo negativo. ** = p < 0,01. *** = p < 0,001. VO = via oral.

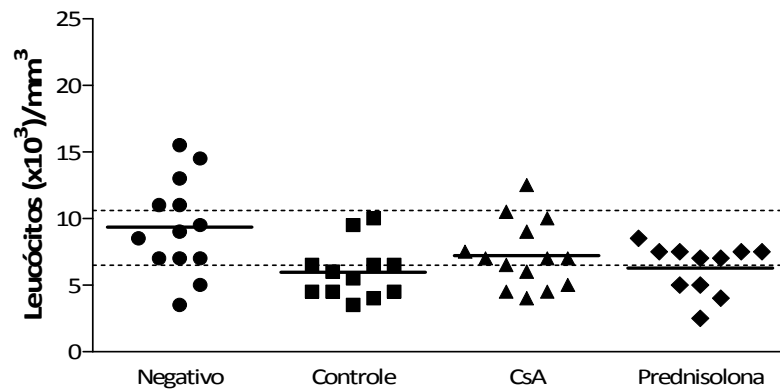


GRÁFICO 4 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) e prednisolona (10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). n=14 hamsters/grupo. VO = via oral.

IV.1.2.5.2.2. Linfócitos

Para todos os animais, houve ligeira diminuição na contagem de linfócitos em relação aos animais negativos. Os números se mantiveram abaixo dos limites fisiológicos normais nos animais controle e tratados com prednisolona (GRAF. 5 A). Não houve diferença estatística entre os grupos.

IV.1.2.5.2.3. Eosinófilos

O GRAF. 5 B mostra a contagem de eosinófilos/mm³ de sangue. A média dos valores encontrados nos animais nos animais negativos e infectados e tratados com prednisolona (30 DAI) superaram os limites fisiológicos normais. No entanto, os animais controle e tratados com ciclosporina apresentaram diminuição na contagem de eosinófilos periféricos. Não houve diferença estatística entre os grupos.

IV.1.2.5.2.4. Neutrófilos totais

Com relação à contagem de neutrófilos totais (GRAF. 5 C), observou-se neutrofilia nos animais negativos. No entanto, trinta dias após a infecção, os animais controle apresentaram marcada diminuição na contagem deste tipo celular ($p < 0,05$), assim como os animais infectados ($p < 0,05$) e tratados com ciclosporina e prednisolona.

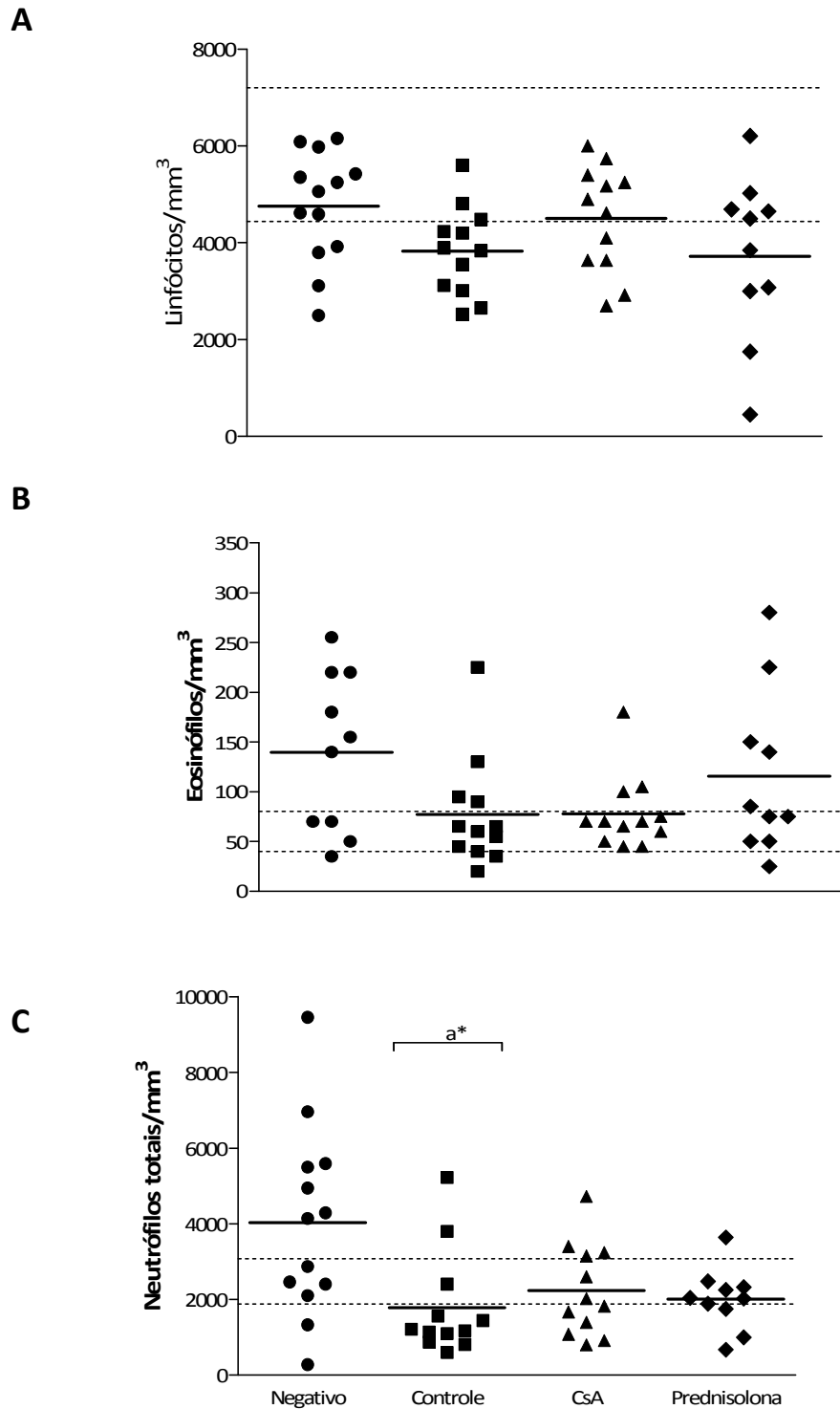


GRÁFICO 5 – Valores absolutos de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) e prednisolona (10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). n=14 hamsters/grupo. a = diferença estaística para o grupo negativo. * = $p < 0,05$. VO = via oral.

IV.1.2.5.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA

Foi realizado o exame de ELISA individual dos soros coletados dos animais no dia 0 e 30 após a infecção. Os resultados dos exames frente a antígeno bruto de larva e verme adulto estão apresentados nos GRAF. 6 A e B, respectivamente.

É possível observar a pouca ou nenhuma resposta por IgG frente a antígeno bruto de larva. Não foi observada diferença estatística na média de absorbância entre os grupos experimentais.

Já a resposta frente a antígenos de verme adulto (GRAF. 6 B), mostrou resultado expressivo. Não foi observada resposta nos animais negativos. Aos 30 DAI, foi observado aumento nos níveis de anticorpos IgG no grupo controle ($p < 0,001$), e, se comparados aos grupos tratados, observou-se diferença para os tratamentos com ciclosporina e prednisolona ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

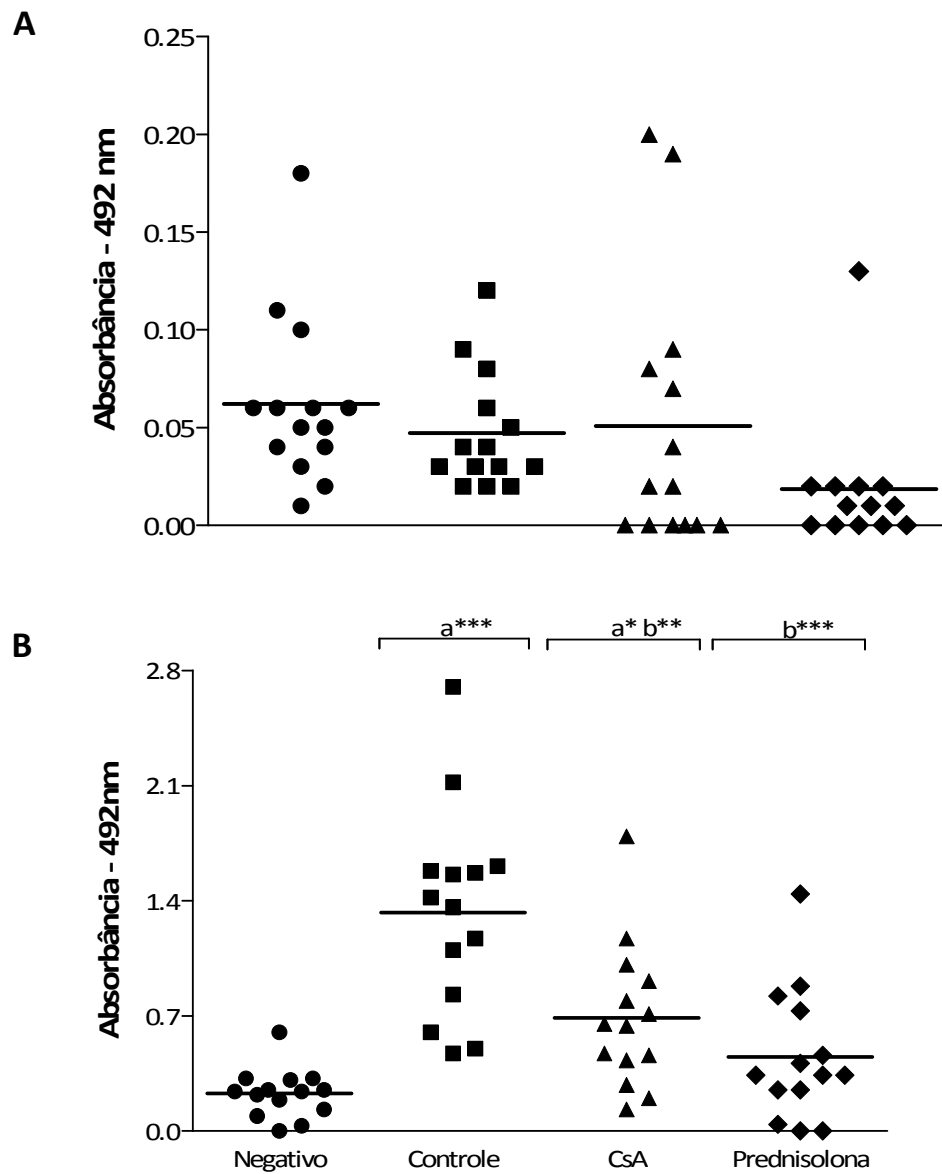


GRÁFICO 6 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina - CsA (10 mg/kg, VO) e prednisolona (10 mg/kg, VO). n=14hamsters/grupo. a = diferença estatística para o grupo negativo. b = diferença estatística para o grupo controle. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$. DAI = dias após a infecção. VO = via oral.

IV.1.2.6. Histopatologia

Hamsters negativos apresentam aspecto histológico normal do intestino delgado com vilosidades da mucosa íntegras, altas, células caliciformes e de Paneth em reduzido número no interior das criptas de Lieberkuhn.

O GRAF. 8 mostra a quantificação relativa de alterações encontradas com relação ao processo inflamatório (GRAF. 7 A), ao número de células caliciformes (GRAF. 7 B) e à mucosa (GRAF. 7 C) do intestino delgado dos hamsters infectados ou infectados e tratados.

Não foi observada inflamação na camada muscular do intestino delgado de nenhum dos grupos infectados. Nestes, foi observado um padrão linfoplasmohistiocitário com poucos eosinófilos no infiltrado inflamatório da mucosa, o que é sugestivo de uma inflamação em fase crônica. (FIG. 3). Este infiltrado inflamatório mostrou-se moderado, nos animais tratados com ciclosporina; e, intenso, com alteração na arquitetura e congestão, nos animais tratados com prednisolona. No grupo controle, cerca de 40% dos animais mostraram perda de epitélio intestinal, com manutenção da vilosidade. Observou-se um aumento de células caliciformes no intestino delgado decorrente da infecção por *A. ceylanicum* (FIG. 3 B, D, F, H), exceto nos animais tratados com prednisolona (FIG. 3 J). Ainda com relação a este último tratamento, os animais apresentaram perda de mucosa intestinal, representando o grupo mais alterado deste experimento (FIG. 3 I, J). Nos outros grupos, foi observada apenas uma diminuição no tamanho da vilosidade (FIG. 3 C, E).

Com relação aos achados no baço, diferentemente dos animais negativos, que apresentaram leve predomínio da polpa vermelha sobre a polpa branca (FIG. 4 A, B), todos os animais infectados apresentaram hiperplasia de polpa branca, com predominância desta (FIG. 4 C, D, F, G). Nos animais tratados com prednisolona, houve perda da arquitetura do tecido (FIG. 4 G).

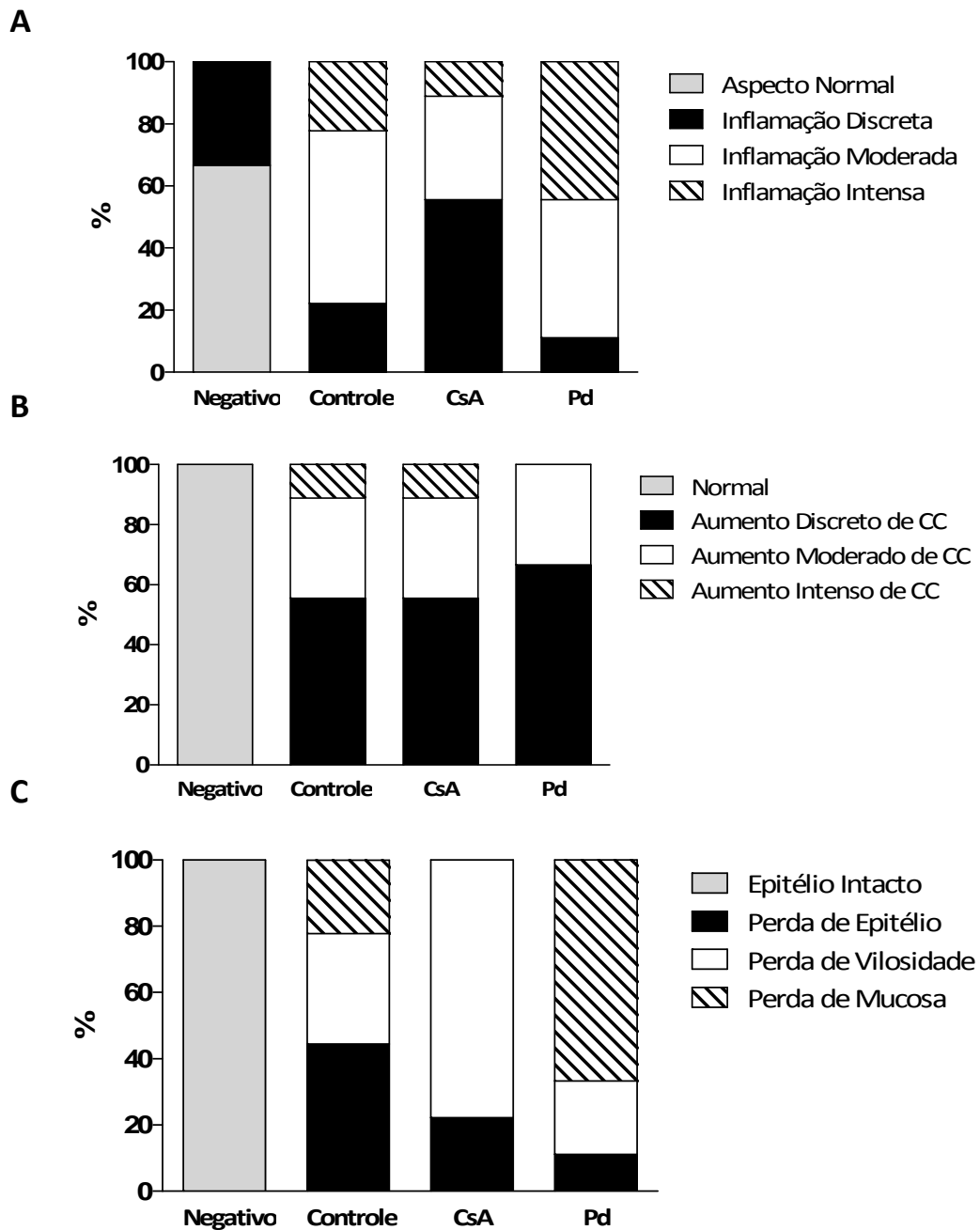


GRÁFICO 7 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas (INT) ou não (NINT) com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ciclosporina (10 mg/kg, VO) (ICICLO) ou prednisolona (10 mg/kg, VO) (IPRED). (A) Processo inflamatório. (B) Células caliciformes – CC. (C) Mucosa.

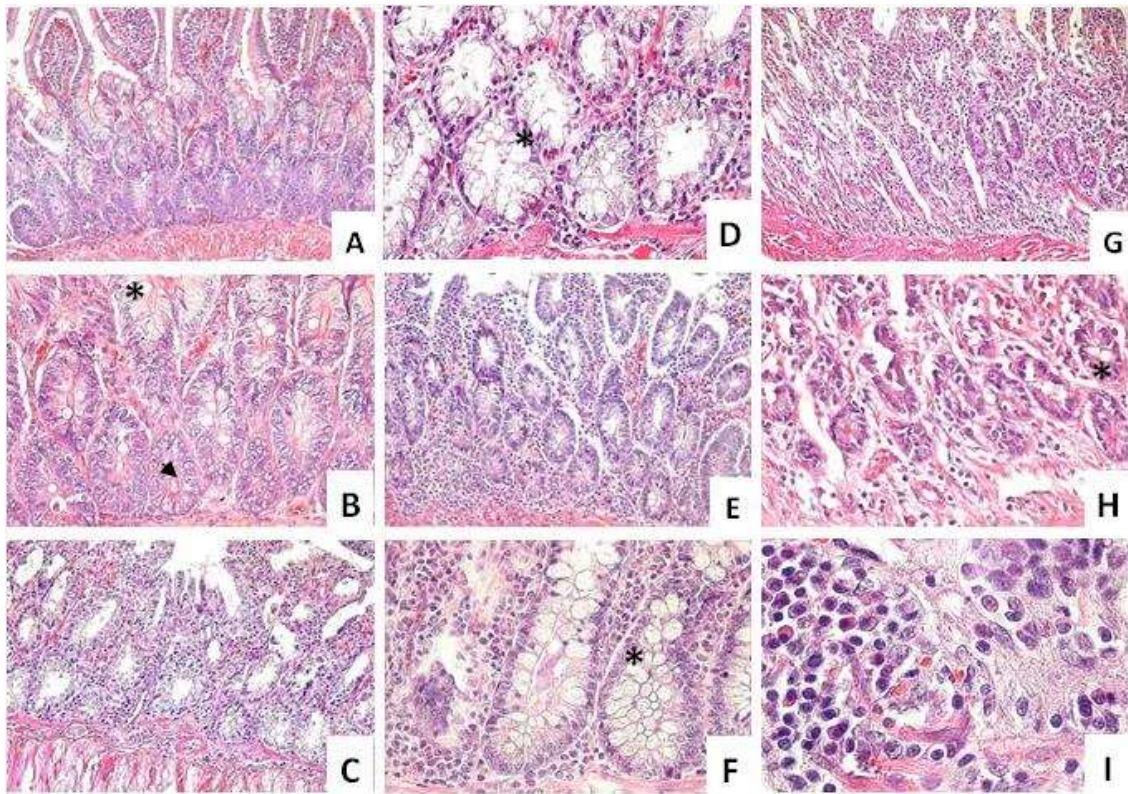


FIGURA 3 - Fotomicrografias de secções de intestino delgado de hamsters não-infectados (A e B) ou infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (C e D) e tratados com ciclosporina (E e F) ou prednisolona (G e H). (A) aspecto histológico normal com vilosidades da mucosa íntegras, (B) células caliciformes (asterisco) e de Paneth (setas) no interior das criptas de Lieberkuhn; (C) inflamação discreta, diminuição na altura das vilosidades e (D) aumento acentuado de células caliciformes; (E) inflamação moderada, diminuição na altura das vilosidades e (F) aumento acentuado de células caliciformes; (G) alteração da arquitetura mostrando inflamação intensa, perda de mucosa e (H) discreto aumento de células caliciformes e de Paneth; (I) Infiltrado inflamatório linfoplasmohistiocitário característico em todos os grupos infectados com *Ancylostoma* com predomínio de plasmócitos. Hematoxilina Eosina, aumento de 20 x, em A, C, E e G; aumento de 40x em B, D, F e H; e aumento de 100x em I.

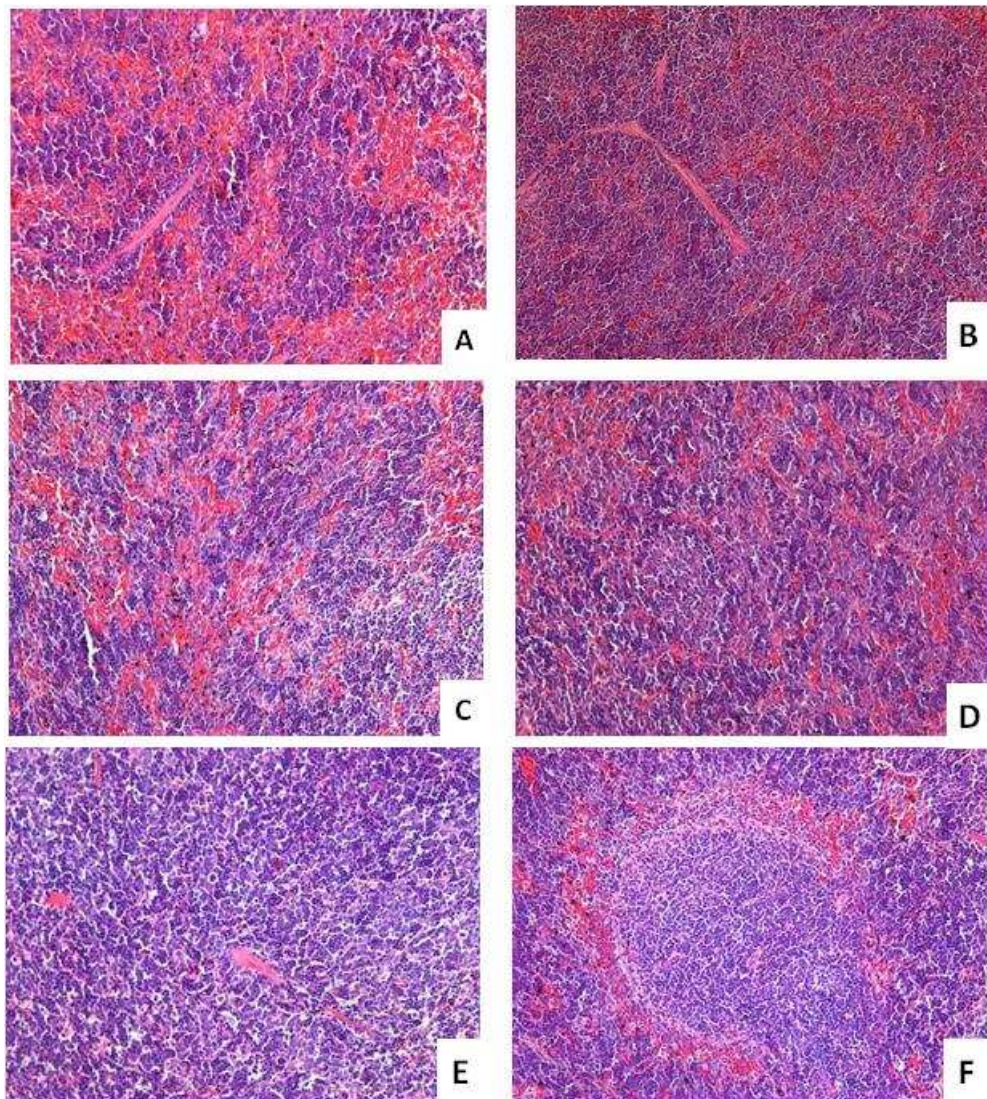


FIGURA 4 - Fotomicrografias de secções de baço de hamsters não-infectados (A e B) ou infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (C) e tratados com ciclosporina (D) ou prednisolona (E). (A) Leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca e, (B) presença de trabécula. (C) Baço de hamsters infectados com *Ancylostoma* mostrando discreta hiperplasia da polpa branca. (D) Baço com leve predomínio de polpa branca. (E) Baço com perda da arquitetura e intensa hiperplasia da polpa branca. (F) Folículo linfóide ativado em animais infectados com *Ancylostoma*. Hematoxilina Eosina, aumento de 20 x.

IV.1.3. DISCUSSÃO

Diversos autores têm mostrado que a ciclosporina A, além da atividade imunossupressora, tem ação antiparasitária em modelos experimentais de parasitos e hospedeiros. No entanto, apesar de não se conhecer completamente o mecanismo pelo qual a ciclosporina exerce sua função antiparasitária, acredita-se que a ligação desta ao receptor ciclofilina do parasito seja responsável por uma inibição das funções normais deste (Armson *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1996; Colebrook *et al.*, 2002; El-Ganayni and Handousa, 1992; Gargione *et al.*, 1998; Hurd *et al.*, 1993; Matsuzawa *et al.*, 1998; McLauchlan *et al.*, 2000; Palau and Pankey, 1997; Ryffel, 1993; Yoshimura *et al.* 1993). Pouca informação está disponível sobre o papel das ciclofilinas de parasitos ou de seu envolvimento na sensibilidade dos mesmos à CsA. Colebrook *et al.* (2002) sugere que a CsA interfira no processo de enovelamento das proteínas e que isso possa interferir com a atividade das mesmas, interferindo, conseqüentemente, com o desenvolvimento do parasito. Além disso, estudos mostram um aparente efeito residual antiparasitário da ciclosporina contra *Schistosoma mansoni* em camundongos (Bell *et al.*, 1996; Bout *et al.*, 1986; Chappell *et al.*, 1987). Já os glicocorticóides são os agentes imunossupressores mais usados em esquemas terapêuticos. Em concentrações fisiológicas influenciam na distribuição de água e eletrólitos, metabolismo de glicose, na força muscular e outros parâmetros. Em concentrações farmacológicas, eles exercem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Interferem direta ou indiretamente na cinética de leucócitos, na defesa exercida por fagocitose, na imunidade celular e na produção de mediadores inflamatórios (Cohn, 1997). Para ancilostomídeos, não há descrito na literatura nenhum trabalho mostrando o efeito de drogas, exceto anti-helmínticos, na infecção de humanos ou de modelos experimentais.

A eliminação de CsA e seus metabólitos do sangue/plasma inicia após 14-17 horas após o tratamento (Bell *et al.* 1996), no entanto, estudos mostram detecção da droga em tecidos de camundongos por mais de duas semanas após o término do tratamento (Kahan, 1985). Corticosteróides são disponíveis em diversas formulações. Os ésteres, incluindo o acetato de prednisolona, liberam o princípio ativo aos poucos, ao longo de dias ou semanas (Cohn, 1997). Aqui, optamos pelo tratamento em dias alternados com a intenção de minimizar os

efeitos tóxicos, tais como, para CsA, disfunção renal e hipertensão decorrentes do tratamento prolongado (Bell *et al.*, 1996) e, para prednisolona, efeitos que variam desde o aumento na diurese à instalação de infecções oportunistas, que podem comprometer o estado geral do indivíduo (Cohn, 1997).

A avaliação *in vitro* da resposta proliferativa de linfócitos induzidos por mitógeno (como o ensaio de MTT) determina a capacidade funcional, a reatividade imunológica e a sensibilidade à terapia imunossupressora de células (Magee *et al.*, 2001). No entanto, a extrapolação para o *ex vivo* é complicada pelo fato de a resposta medida refletir o número de linfócitos T presentes na amostra assim como a capacidade de responder ao desafio imunológico, ambos afetados pela terapia imunossupressora (Meno-Tetang *et al.*, 1999). Neste trabalho, os animais foram tratados com 10mg/kg de acetato de prednisolona e CsA. Para ambas as drogas, com a metade desta dose, observamos, *in vitro*, a redução de cerca de 70% na proliferação de células de linfonodos mesentéricos estimuladas com PHA após 48h de cultura. Olivos-Garcia *et al.* (2007) encontraram valores semelhantes de inibição da proliferação celular em hamsters tratados diariamente, por 7 dias, com a mesma dose de CsA. Para roedores, Adamcak e Otten (2000) recomendaram 0,5-2,2 mg/kg de prednisolona como dose imunossupressora.

Nos animais tratados e infectados, apesar de o PPP ter sido igual para os outros grupos, foi observado um adiantamento na eliminação de ovos dos animais tratados com ciclosporina. Os animais tratados com prednisolona eliminaram poucos ovos, apesar de não haver diferença entre o número de vermes adultos, especialmente fêmeas, recuperados. Neste caso, acreditamos que a droga interfira indiretamente sobre este aspecto do parasito, visto que a imunidade do hospedeiro pode influenciar na postura e desenvolvimento de ovos de nematóides (Jorgensen *et al.*, 1998; Strain *et al.*, 2002).

Greer *et al.* (2005) avaliando a resposta de ovelhas infectadas com *Trichostrongylus columbriformes* e tratadas com prednisolona mostraram que a resposta por anticorpos à infecção é menor do que a de animais infectados e não tratados. Nossos resultados mostraram o mesmo em relação aos dois tratamentos imunossupressores, principalmente

com prednisolona, onde foi observada diferença estatística em relação ao grupo controle, que, assim como descrito na literatura, apresentaram, aos 31 DAI, altos níveis de IgG circulantes (Bungiro *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2005).

De acordo com nossos dados, a infecção por *A. ceylanicum* leva a um quadro de imunossupressão celular periférica, caracterizada pela diminuição no número de leucócitos totais, linfopenia e neutropenia, semelhante ao dos animais tratados com CsA e/ou prednisolona, não havendo diferença entre os grupos. Apesar de existirem poucas informações conclusivas a respeito da resposta imunológica na ancilostomíase experimental, este achado concorda com outros autores, que mostram que a infecção de modelos experimentais ou humanos por ancilostomídeos e outros helmintos está associada com o comprometimento da proliferação de linfócitos, da apresentação e processamento de antígenos e com o aumento da secreção de óxido nítrico (Dondji *et al.*, 2008; Jenson *et al.*, 2002). Além disso, roedores são sabidamente conhecidos como espécies sensíveis a glicocorticóides e, por isso, apresentam, no sangue periférico, componentes clássicos de um “stress leukogram”, que é caracterizado por neutrofilia madura (que não foi observada), linfopenia por lise de linfócitos e eosinopenia (Cohn, 1997). No entanto, a infecção por *A. ceylanicum* parece ter mascarado quaisquer efeitos adversos decorrentes do tratamento, visto que não foram observadas diferenças nos exames hematológicos de animais tratados ou não tratados.

Neste trabalho, avaliamos a histologia do baço de animais infectados e também a influência dos tratamentos sobre o órgão. Conforme descrito na literatura, encontramos, nos animais infectados, um quadro de estimulação imunológica, caracterizada por hiperplasia de polpa branca. Trabalhos mostram que, o baço de animais com 30 dias de infecção, é cerca de três vezes maior do que o de animais não infectados (Dondji *et al.*, 2008; Garside *et al.*, 1989). No entanto, os trabalhos mostram que as células do baço e linfonodo mesentéricos de animais infectados apresentam mínima resposta proliferativa frente a um mitógeno (Dondji *et al.*, 2008; Garside *et al.*, 1989). Dondji *et al.* (2008) mostraram a produção de óxido nítrico, relacionada com a suscetibilidade à infecção, e que células apresentadoras de antígeno de animais não infectados recuperam a capacidade proliferativa dos linfócitos T.

Nos animais tratados com prednisolona, observamos mesmo perfil de hiperplasia de polpa branca, o que contradiz a literatura que mostra que hormônios glicocorticóides induzem a morte dos linfócitos da polpa branca esplênica (Luzikova and Efimova, 2009).

O perfil linfoplasmohistiocitário da mucosa intestinal encontrado em todos os animais infectados confirma os dados da literatura que mostram altos níveis de IgA secretada sendo excretada na fezes de hamsters infectados, uma vez que esta é a imunoglobulina mais abundante na secreção da mucosa intestinal, além de IgG (Bienenstock, 1970; Bungiro *et al.*, 2008; Haakenstad e Coe, 1971). IgA estaria relacionada com a neutralização de moléculas secretadas-excretadas pelo parasito (Kilian *et al.*, 1988; Underdown *et al.*, 1986; Wuff and Kerr, 2006;) e/ou mesmo estimulando a degranulação de eosinófilos (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1989). Alkazmi *et al.* (2006) mostraram que hamsters infectados com *A. ceylanicum* apresentam alterações ao nível de proliferação celular e marcada alteração na arquitetura da mucosa do intestino delgado dos animais. Os autores ressaltam ainda que estas alterações são dependentes da presença/ausência de vermes e da densidade destes no local (intensidade da infecção), além da duração da infecção (Alkazmi *et al.*, 2006). Diversos estudos vêm mostrando que os ancilostomídeos têm a capacidade de criar um sítio de “privilégio imunológico” em torno de si na mucosa intestinal. Esta estratégia rapidamente induziria a formação de um infiltrado de leucócitos ativados no sítio de colonização do parasito, levando à apoptose da célula, o que reduziria a inflamação e levaria a um quadro de infecção assintomática (Chow *et al.*, 2000; Croese *et al.*, 2006; Loukas e Prociv, 2001). Os cortes de intestino dos animais tratados com prednisolona se destacam pela alteração na arquitetura do órgão, com inflamação e congestão intensas, ao contrário dos outros dois grupos que apresentaram quadros moderados de inflamação. Croese e Speare (2006) realizaram um estudo em voluntários e mostraram por endoscopia e histologia que a mucosa intestinal que circunda os vermes imaturos de *N. americanus* apresenta-se muito mais inflamada do que a que circunda vermes maduros. Além disso, os mesmos autores mostram que a intensidade da resposta eosinofílica no intestino estaria relacionada com a expulsão dos vermes adultos (Croese e Speare, 2006). À necropsia, encontramos machos e fêmeas acasalados. No entanto, não realizamos a avaliação da maturidade sexual (principalmente em fêmeas). Assim, os nossos achados no tratamento dos animais com

prednisolona, concordam com os dados apresentados na literatura, mostrando que a degradação da mucosa intestinal cria um ambiente completamente desfavorável, obrigando os vermes adultos a mudarem de lugar com frequência, o que, além de criar um balanço nutricional negativo, com a diminuição do tamanho dos vermes, dificultaria o encontro dos casais e a cópula e, conseqüentemente, diminuiria a postura de ovos (Alkazmi *et al.*, 2006; Bungiro *et al.*, 2008; Croese *et al.*, 2003).

IV.2.ANTICORPOS ANTILINFOCITÁRIOS

Ainda no campo da imunossupressão relacionada à rejeição de transplantes, a introdução de anticorpos monoclonais possibilitou melhora considerável nestas terapias e, a maior vantagem é a especificidade de suas propriedades terapêuticas (Sgro, 1995).

Muromonab (“Murine monoclonal antibody”) CD3[®] é o primeiro anticorpo monoclonal a ser disponibilizado para terapia em humanos. Ele reconhece as populações de linfócitos T maduros que expressam CD3. É eficaz em episódios de rejeição a transplantes renais, de fígado, cardíaco e pâncreas (Sgro, 1995).

Estes anticorpos modulam o complexo receptor de célula T (TCR) – CD3 resultando em células que não reconhecem o antígeno (modulação antigênica). Além disso, o anticorpo induz anergia ou apoptose de células T ativadas através de alterações na transdução de sinais mediada por TCR (Chatenoud e Bluestone, 2007).

A ligação do TCR com o anticorpo (anti-CD3) induz o bloqueio da produção de IL-2 e subsequente inativação de células Th₁. Essa cascata de eventos bioquímicos é resultado da formação de uma sinapse imunológica incompleta durante a fase inicial da ativação de células T (Chatenoud e Bluestone, 2007).

Em contraste, células T regulatórias são mais resistentes à morte celular induzida pelos anticorpos monoclonais anti-CD3, se comparadas com células T naïve ou recentemente ativadas. Este efeito parece ser dose-dependente, em que baixas doses de anticorpos antilinfocitários depletam seletivamente células T efectoras, enquanto altas doses, depletam células T_{reg}, dando suporte ao uso de baixas doses da droga imunomodulatória para usos terapêuticos (Chatenoud e Bluestone, 2007).

IV.2.1. Tratamento

Os animais foram tratados durante três dias consecutivos antes da infecção e, a partir daí, o tratamento ocorreu em dias alternados. A dose de tratamento foi definida como a dose máxima recomendada em casos de transplantes. Para este experimento houve a necessidade de ajuste de valores (dose/peso) para o animal e, para isso, considerou-se um

indivíduo adulto com peso médio de sessenta quilos e o hamster com peso médio de cem gramas.

Cada hamster (12 animais/grupo) recebeu 8 µg/dia (dose = 5 mg/kg/dia) da droga, via intraperitoneal, com agulha de insulina. A utilização do OKT3[®] (ANEXO E) pode, na clínica médica, ser combinada ao uso de prednisolona e, para este caso, os animais receberam a dose de OKT3[®] (via intraperitoneal) combinada com Fosfato sódico de prednisolona[®] (ANEXO C) (3 mg/ml), administrado por via oral, com auxílio de pipeta, na dose de 10 mg/kg (0,6 mg/hamster) (Grupo OKT3[®] + Pd).

IV.2.2. RESULTADOS

IV.2.2.1. Proliferação celular

Independente da dose utilizada (30 a 300000 ng/ml), não foi observada inibição da proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados com *A. ceylanicum* (GRAF. 8).

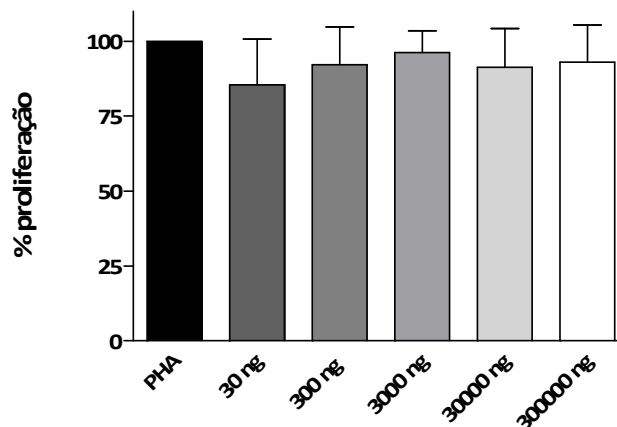


GRÁFICO 8 – Ensaio de proliferação celular de células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados, estimuladas e incubadas com OKT3[®] em diferentes concentrações. Dados mostrados como média + SD.

IV.2.2.2. Eliminação de ovos

A eliminação de ovos dos animais está representada no GRAF. 9 A. No período avaliado, foi observado pico de eliminação para o grupo controle aos 25 DAI, enquanto os grupos tratados ao fim dos experimentos ainda apresentavam curva ascendente de eliminação de ovos. De acordo com o cálculo da área sob a curva, os animais tratados com OKT3[®] + Pd apresentaram menor eliminação de ovos.

IV.2.2.3. Recuperação de vermes

Com relação à quantificação dos adultos, foram recuperados mais vermes dos animais tratados com OKT3[®] (cerca de 60%), se comparados aos grupos controle e OKT3[®] + Prednisolona (38 e 42%, respectivamente) ($p > 0,05$) (GRAF. 9 B).

IV.2.2.4. Exames hematológicos

Os valores de referência mencionados (destacados nos gráficos com linha pontilhada) referem-se aos valores normais de hamsters, *Mesocricetus auratus*, fêmeas, obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981)⁴ *apud* Gad (2007). Os valores apresentados como negativos foram obtidos de parte dos animais antes do tratamento e/ou infecção.

IV.2.2.4.1. Hemácias e hemoglobina

Apesar de todos os animais infectados terem apresentado diminuição nas contagens de hemácias em relação aos negativos ($p < 0,001$), os valores encontrados se mantiveram dentro dos valores fisiológicos normais e não houve diferença entre os tratamentos (GRAF. 10 A).

Ao contrário, os valores encontrados para hemoglobina aos 30 DAI, encontravam-se abaixo dos valores fisiológicos normais, com diferenças estatísticas se comparados aos animais negativos ($p < 0,001$) e não houve diferença entre os tratamentos (GRAF. 10 B).

⁴ Mitruka, B. M.; Rawnsley, H. M. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and humans*. 2. ed. New York: Masson. 1981.

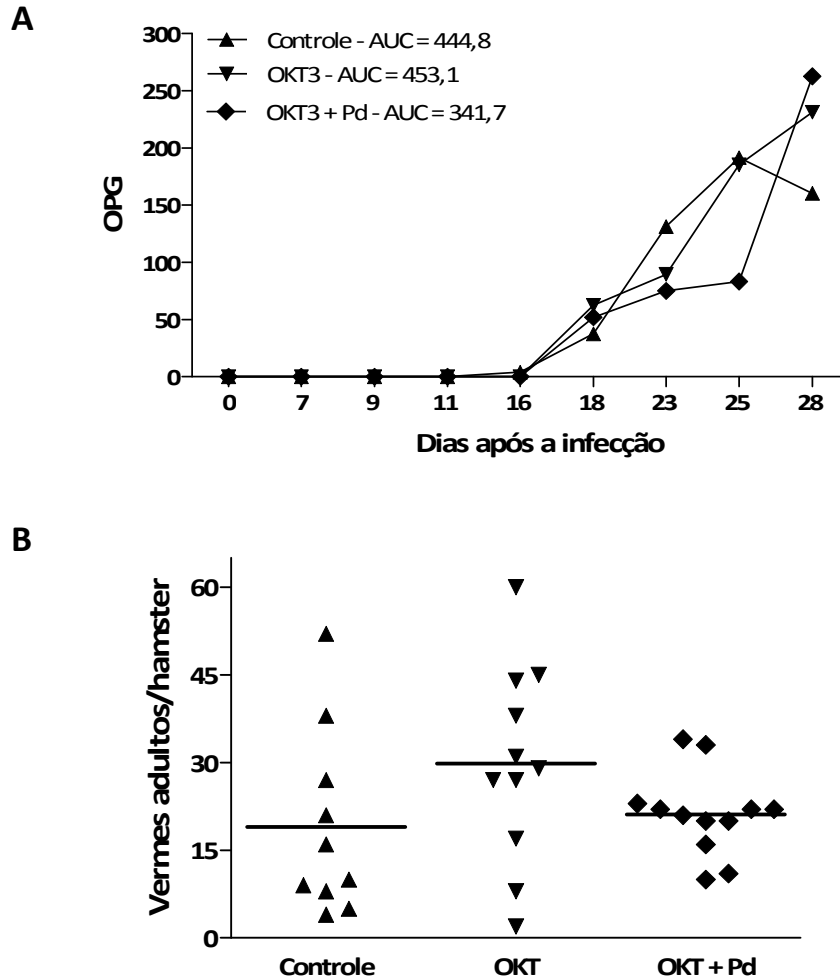


GRÁFICO 9 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* recuperados do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio e infectadas e tratadas com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). AUC = “area under curve” (área sob a curva). OPG = ovos por grama de fezes. n=12hamsters/grupo. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

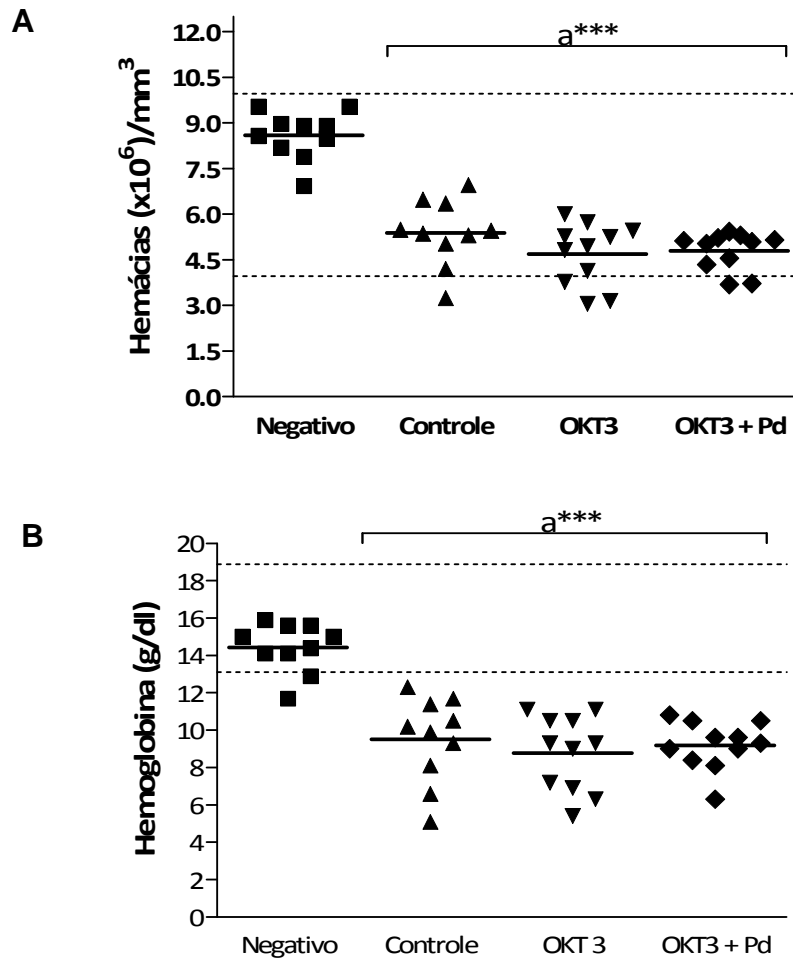


GRÁFICO 10 – (A) Contagem global de hemácias por milímetro cúbico de sangue e (B) dosagem de hemoglobina de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. *** = $p < 0,001$. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

IV.2.2.4.2. Leucócitos

IV.2.2.4.2.1. Totais

O GRAF. 11 mostra a contagem global de leucócitos totais antes e após a infecção para os grupos controle e tratados. Para todos os grupos, foi observado um aumento acima dos limites fisiológicos no número de leucócitos aos 30 DAI, principalmente para o grupo tratado com OKT3[®] + Pd ($p < 0,05$, em relação aos animais negativos).

IV.2.2.4.2.2. Linfócitos

Foi observado aumento na contagem de linfócitos para todos os grupos infectados, superando os limites fisiológicos, sendo que os grupos que receberam OKT3[®] apresentaram $p < 0,001$ em relação aos valores negativos (GRAF. 12 A).

IV.2.2.4.2.3. Eosinófilos

O GRAF. 12 B mostra que a contagem inicial de eosinófilos foi superior ao limite fisiológico. Aos 30 DAI foi observada diminuição na contagem de eosinófilos para o grupo controle, ao contrário dos grupos tratados, onde, aos 30 DAI, este tipo celular apresentou altos níveis de contagem, quase semelhantes aos valores negativos ($p > 0,05$).

IV.2.2.4.2.4. Neutrófilos totais

O GRAF. 12 C mostra os valores encontrados nas contagens de neutrófilos totais para os animais negativos, controle e tratados. Os valores negativos obtidos mostraram contagens acima dos valores fisiológicos normais. No entanto, após a infecção, foi observada uma diminuição na contagem de neutrófilos periféricos no grupo controle ($p > 0,05$), ao contrário dos outros dois grupos, a infecção/tratamento não alterou as contagens deste tipo celular.

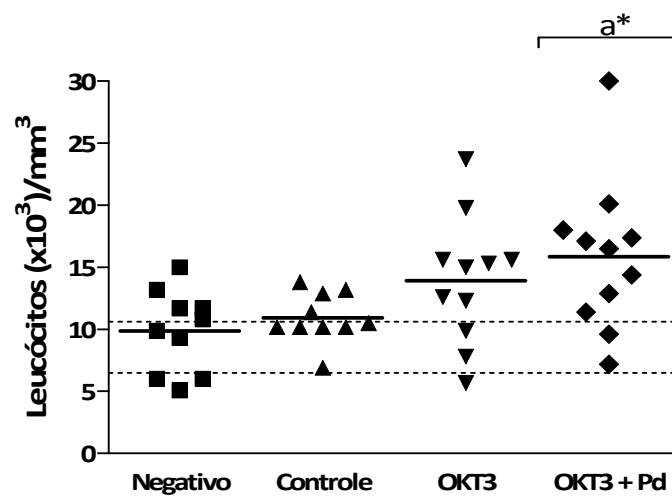


GRÁFICO 11 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. * = $p < 0,05$. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

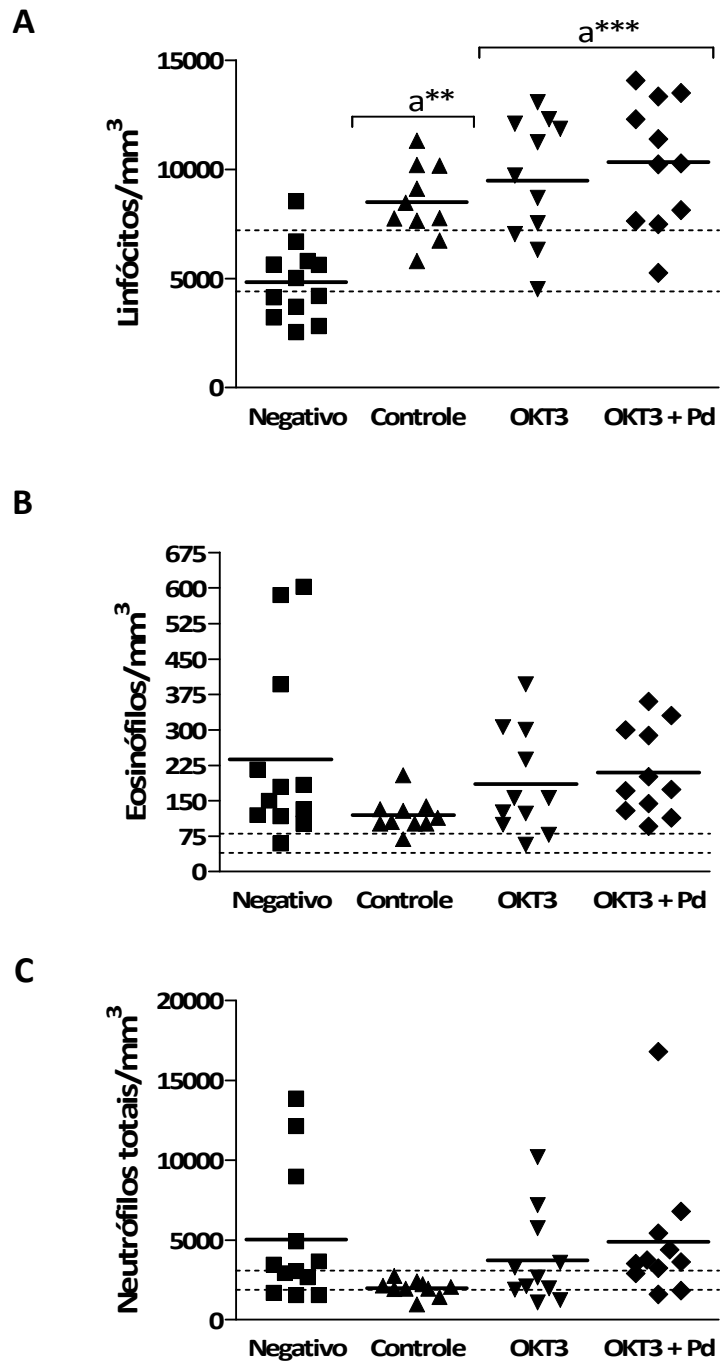


GRÁFICO 12 – Contagem diferencial de linfócitos (A), eosinófilos (B) e neutrófilos (C) por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitraka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

IV.2.2.4.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA

Foi realizado o teste de ELISA frente a antígenos brutos de verme adulto e L₃ de *A. ceylanicum* avaliando a resposta individual de cada animal.

Para o antígeno de larva foi observada uma baixa resposta por anticorpos IgG, sendo maior resposta encontrada nos animais controle (não tratados) aos 30 DAI ($p > 0,05$) (GRAF. 13 A). Foi observada diferença significativa entre os animais tratados com OKT3[®] + Pd e os animais controle (infectados e não tratados) aos 30 DAI ($p < 0,01$).

No que diz respeito à resposta frente a antígeno bruto de vermes adultos (GRAF. 13 B), pode-se observar um aumento, aos 30 DAI, no reconhecimento de anticorpos IgG para todos os grupos, principalmente nos animais controle, onde dois animais se destacaram na resposta, mas não foram considerados “outliers” pelo teste escolhido ($p < 0,05$). Os animais infectados e tratados com OKT3[®] + Pd também apresentaram diferença significativa para os negativos ($p < 0,05$).

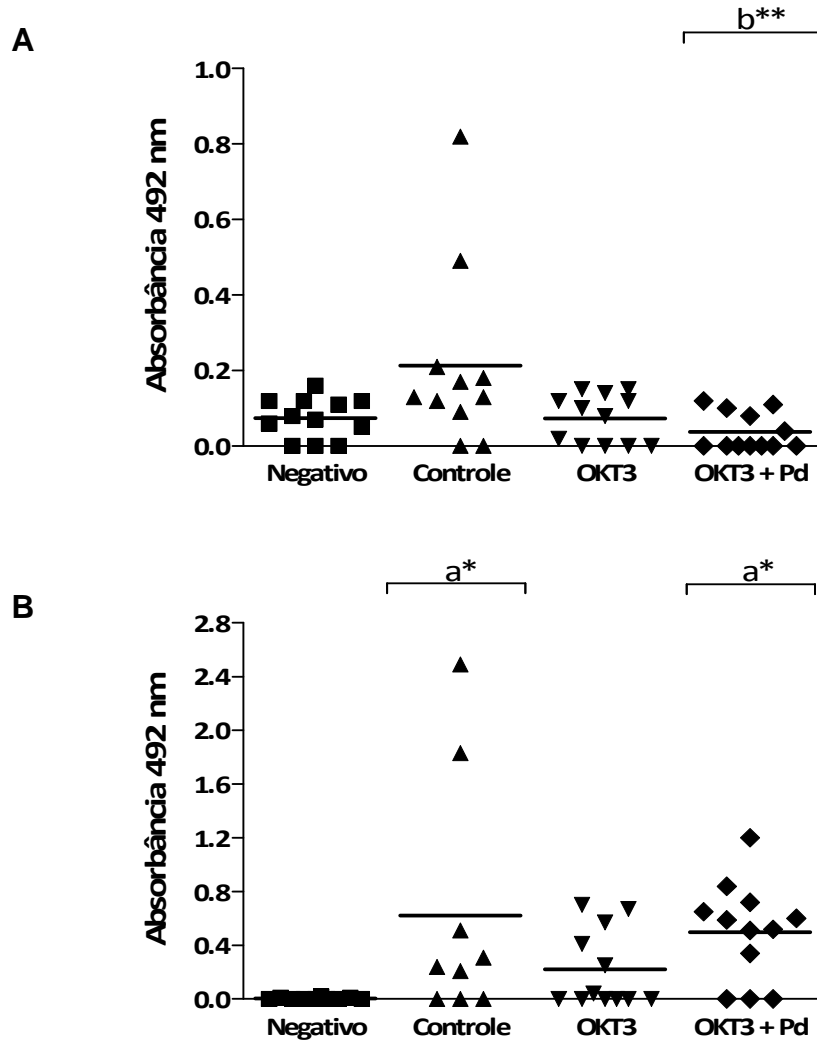


GRÁFICO 13 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO). a = diferença estatística para o grupo negativo. b = diferença estatística para o grupo controle. * = p < 0,05. ** = p < 0,01. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

IV.2.2.5. Histopatologia

Hamsters negativos apresentam aspecto histológico normal do intestino delgado com vilosidades da mucosa íntegras, altas, células caliciformes e de Paneth em reduzido número no interior das criptas de Lieberkuhn.

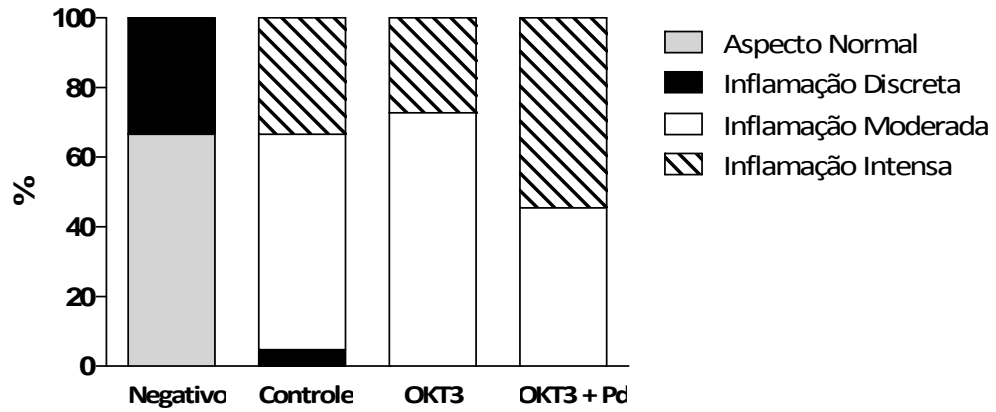
Em todos os grupos infectados, no intestino delgado, o padrão do infiltrado inflamatório da mucosa foi linfoplasmohistiocitário, do tipo mononuclear, o que sugere inflamação crônica. Não foi verificado processo inflamatório na camada muscular.

O GRAF. 14 mostra a quantificação relativa de alterações encontradas com relação ao processo inflamatório (GRAF. 14 A), ao número de células caliciformes (GRAF. 14 B) e à mucosa (GRAF. 14 C) do intestino delgado dos hamsters infectados ou infectados e tratados.

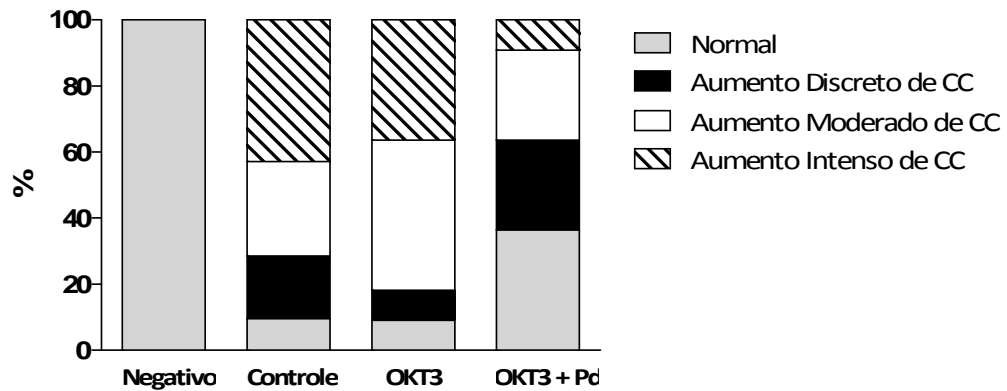
O intestino delgado dos animais infectados (FIG. 5 F) com *A. ceylanicum* apresentou inflamação moderada, com perda de epitélio e manutenção do arcabouço intestinal. Houve aumento moderado a intenso de células caliciformes. Já os animais tratados com OKT3® apresentaram perda de mucosa intestinal e aumento moderado de células caliciformes (FIG. 5 G). Os animais que receberam o tratamento combinado de OKT3® + Pd apresentaram maior alteração tecidual, que pode ser observada na FIG. 5 H. Nestes animais foram encontrados quadros de inflamação moderada a intensa, com perda de mucosa e aumento discreto a moderado de células caliciformes.

No baço de animais não infectados (negativos), foi observado leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca. Os animais infectados do grupo controle e tratados com OKT3® apresentaram moderada hiperplasia de polpa branca, cápsula com aspecto normal e trabécula inflamada (FIG. 5 B e C). Já os animais tratados com a combinação de OKT3® + Pd apresentaram intensa hiperplasia de polpa branca e inflamação de trabécula (FIG. 5 D).

A



B



C

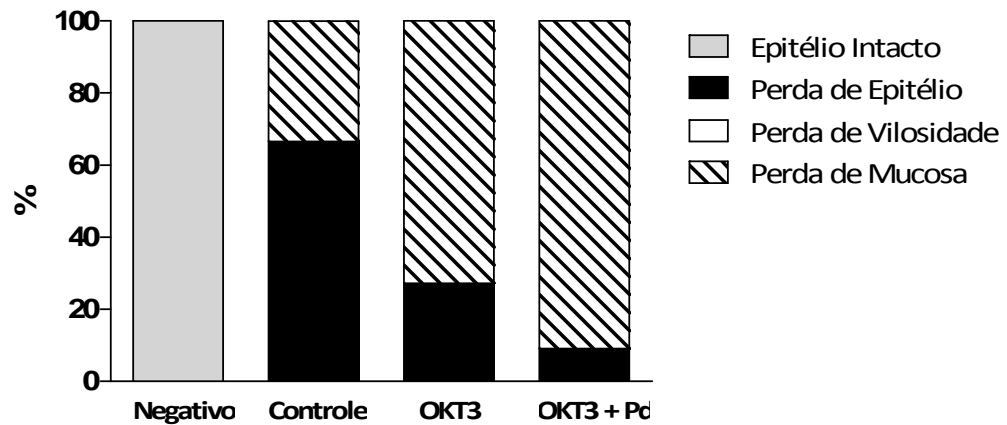


GRÁFICO 14 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectados e tratados com OKT3[®] (5 mg/kg, IP) (IOKT3), OKT3[®] + Prednisolona (Pd) (5 mg/kg, IP + 10 mg/kg, VO) (IOKT3+PRED). (A) Processo inflamatório. (B) Células caliciformes – CC. (C) Mucosa.

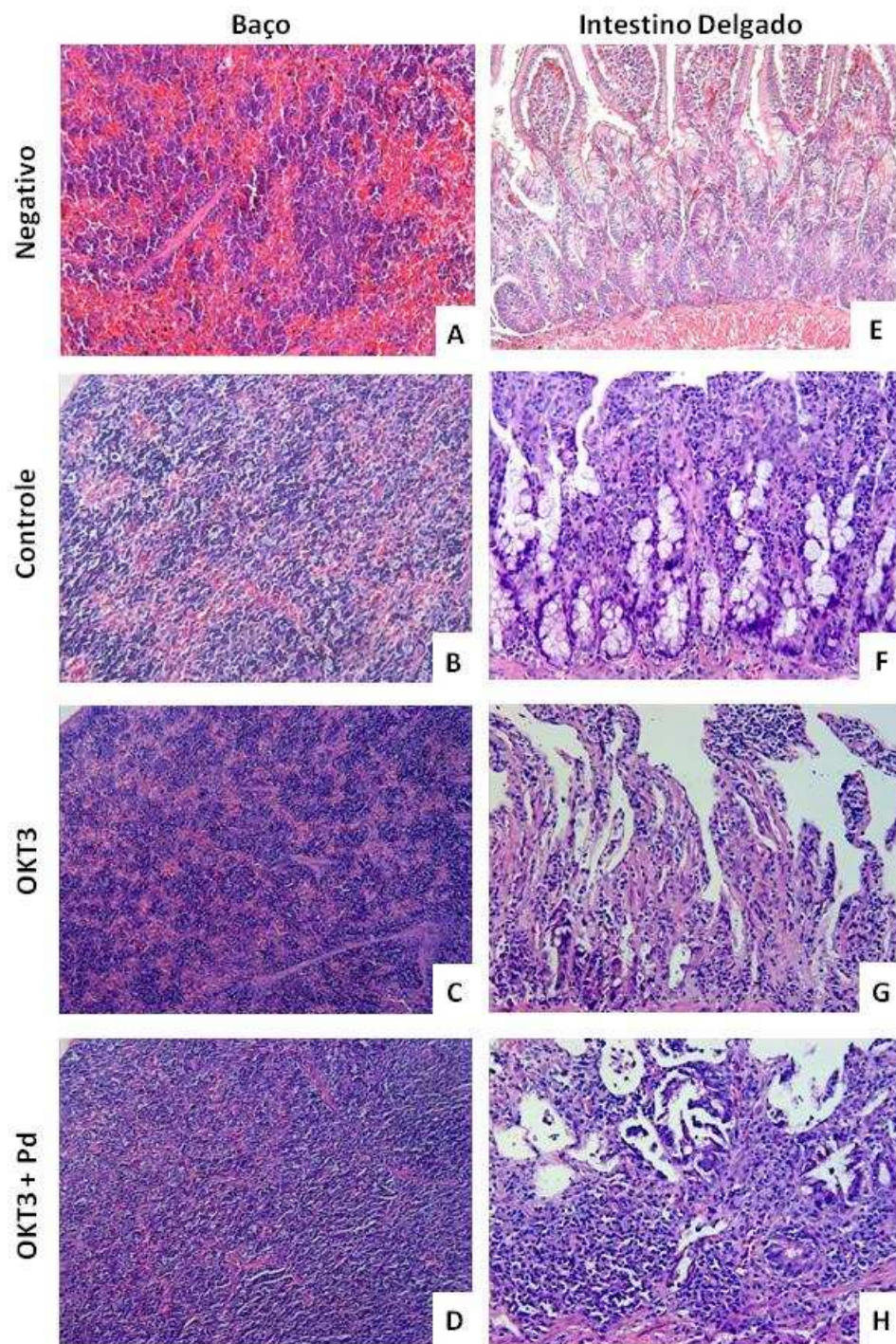


FIGURA 5 - Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters não infectados (A e E), infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e F) e tratados com OKT3 (C e G) ou OKT3 + Pd (D e H). (A) Leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca. (B) Hiperplasia moderada a intensa da polpa branca. (C) Hiperplasia moderada da polpa branca. (D) Intensa hiperplasia da polpa branca. (E) Aspecto histológico normal com vilosidades da mucosa íntegras. (F) Inflamação moderada e perda de epitélio com manutenção da arquitetura. (G) Inflamação moderada e perda de mucosa. (H) Processo inflamatório intenso com alteração da arquitetura e perda de mucosa. Hematoxilina-Eosina, aumento de 10x em A, B, C e D; aumento de 20x em E, F, G e H.

IV.2.3. DISCUSSÃO

O Orthoclone OKT3[®] foi o primeiro anticorpo monoclonal produzido em camundongos específico para anticorpos CD3 humanos. Estes anticorpos modulam o complexo TCR/CD3, resultando em modulação antigênica. Além disso, ele induz anergia ou apoptose de células T ativadas e inibe a produção de IL-2 e conseqüente ativação de células Th₁ (Chatenoud e Bluestone, 2007). Os efeitos do tratamento com OKT3[®], de acordo com Chatenoud e Bluestone (2007), parecem ser dose-dependentes: baixas doses depletam células T efectoras, enquanto altas doses de anticorpo depletam células T_{reg}.

O estudo do papel de células T CD3⁺ na infecção por ancilostomídeos ainda não foi esclarecido, mas a infecção por ancilostomídeos modula a resposta imune celular do hospedeiro através de vários mecanismos, inclusive a proliferação de linfócitos, o comprometimento com a apresentação e processamento do antígeno e redução de células T CD4⁺ no baço e linfonodo mesentérico (Dondji et al, 2008; Geiger *et al.*, 2007; Onyemelukwe e Musa, 2001). Estudo realizado por Dondji *et al.* (2010), usando anticorpos monoclonais anti-CD4 de camundongos, mostraram o papel efector de células T CD4⁺ na resposta imune de mucosa e sistêmica na infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, com diminuição no número de vermes e eliminação de ovos, por exemplo.

A terapêutica imunossupressora convencional em alguns casos clínicos de transplantes é baseada no tratamento dos pacientes com a associação de prednisolona, azatioprina ou ciclosporina. A introdução do OKT3[®] (que nunca é administrado sozinho em humanos) no esquema terapêutico faz necessária a redução das doses anteriormente administradas ao paciente de outros imunossupressores (Sgro, 1995). Estudos randômicos realizados em pacientes transplantados, comparando a administração de diferentes doses e em diferentes esquemas terapêuticos mostraram que a administração de 2,5 mg de OKT3[®]/dia (metade da dose recomendada) é eficaz na prevenção de rejeição de transplantes (Midtvedt *et al.*, 1996). No entanto, a administração de 5 mg de OKT3[®] em dias alternados não o é (Lye *et al.*, 1998). Ainda sim, em camundongos, Schneider *et al.* (1997) observaram que o número de linfócitos circulantes ocorre três dias após a injeção.

A via de administração recomendada para o OKT3[®] é endovenosa e neste trabalho, ela foi feita por via intraperitoneal, o que pode ter comprometido a eficácia do tratamento. Ochi *et al.* (2006) mostraram, em modelo de encefalomielite induzida (uma doença autoimune), que a via de administração do anticorpo monoclonal anti-CD3 está diretamente relacionada com o efeito do fármaco, uma vez que, ao contrário da administração venosa do anticorpo específico, nem mesmo a administração de altas doses (500 µg) por via oral modula o complexo TCR-CD3 das células T, assim como não depleta ou induz a mitose deste tipo celular (Ochi *et al.*, 2006). Além disso, os autores descreveram o encontro do anticorpo específico na vilosidade intestinal (30 min – 3 h após a administração) quando o anticorpo foi administrado via oral, enquanto, por via endovenosa, ele foi encontrado apenas na serosa do intestino. Segundo o trabalho, a administração oral do anticorpo pode desencadear um sinal efetor pouco eficiente às células, o que favoreceria o aparecimento de uma função reguladora das células (Ochi *et al.*, 2006).

No ensaio de proliferação celular realizado, independente da dose utilizada, não observamos nenhuma inibição em células de linfonodo mesentérico de hamsters não infectados estimuladas com mitógeno. Este efeito poderia ser esperado, visto que um dos efeitos farmacológicos do OKT3[®] é que a própria droga seja um mitógeno de células T em ensaios *in vitro*, onde se observam a liberação de IL-2, TNF e IFN- γ (Abramovicz *et al.*, 1989). Por isso, como dito anteriormente, o OKT3[®] nunca é utilizado sozinho, e sempre é associado a outro fármaco imunossupressor (Sgro, 1995).

Muitos trabalhos têm mostrado que o efeito considerado imunossupressor do OKT3[®] é proveniente da sua capacidade de estimular a produção de células inibitórias (CD8⁺), regulando o microambiente (Ablamunits e Herold, 2008; Lau e Goldstein, 1981). O anticorpo monoclonal anti-CD3 gera a produção de citocinas relacionadas à estimulação de células B, tais como IL-2 e IL-4 (Schneider *et al.*, 1997). No entanto, o principal mecanismo de ação do OKT3[®] é a modulação antigênica, através da modulação dos complexos TCR/CD3, induzindo anergia e apoptose de células T (Chatenoud e Bluestone, 2007). Assim, ocorre inibição da

proliferação das células T efectoras (T helper) e conseqüente diminuição do estímulo às células B e produção de anticorpos (Sgro, 1995).

De acordo com Aune e Pogue (1989), o OKT3[®] em culturas de células polimorfonucleares sanguíneas (PBMC) humanas estimuladas com PHA resulta na diminuição de células T CD4⁺ e no crescimento de linhagens quase puras de células T CD8⁺, com atividade supressora. Além disso, estudo publicado por Ishikawa *et al.* (2007), utilizando camundongos como modelo experimental de diabetes, mostraram que a administração oral de anticorpos anti-CD3 suprime IL-2 e IFN- γ e aumenta a secreção de TGF- β , uma citocina imunoregulatória. Dessa forma, outra hipótese possível, seria a de que a ativação das células do linfonodo de hamsters pelo OKT3[®] resultaria na inibição da proliferação de células T CD4⁺ e no aumento da proliferação de células reguladoras T CD8⁺, criando um ambiente imunologicamente regulado (Ablamunits e Herold, 2008; Lau e Goldstein, 1981), tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Neste estudo, a cinética de eliminação de ovos, apesar de baixa, mostrou-se semelhante e ascendente em todos os grupos experimentais. A queda observada no último OPG dos animais controle não indica necessariamente diminuição na eliminação de ovos a partir daquele momento, visto que nossas observações mostram que, em hamsters, ocorre uma eliminação de ovos de *A. ceylanicum* com muitas oscilações entre dias alternados.

Os animais dos grupos tratados receberam a(s) droga(s) por três dias consecutivos antes da infecção (-3 DAI), de forma que no momento da infecção, as larvas já “encontrassem” um organismo imunossuprimido, permitindo avaliar o efeito da imunossupressão na taxa de infecção através da recuperação final de vermes adultos. E, neste quesito, apesar de não ter sido observada diferença estatística, o grupo tratado com OKT3[®] apresentou maior percentual de recuperação de vermes. No entanto, essa maior recuperação de adultos não correspondeu a uma diminuição significativa do número de hemácias e níveis de hemoglobina, se comparados aos animais controle.

De acordo com Schneider *et al.* (1997), o tratamento de camundongos com uma dose única de anticorpo anti-CD3 (10 μ g/animal) resulta em modificações hematopoiéticas rápidas e

pronunciadas no sangue periférico, enquanto a medula óssea permanece inalterada. Os autores mostraram que houve diminuição drástica nos níveis de linfócitos 24 h após a injeção do anticorpo, o que poderia ser explicado pelo seqüestro ou destruição dos TCR. A recuperação do número de linfócitos/mm³ de sangue ocorre três dias após a injeção, alcançando valores normais (Schneider *et al.*, 1997).

Neste trabalho, os animais foram tratados com 8 µg de OKT3[®] por animal (dose recomendada em casos de prevenção a rejeição a transplantes em humanos) em dias alternados. E, aqui, foi observado que no dia 0 (equivale a três dias consecutivos de tratamento), apesar de não ter diferença estatística, houve diminuição nas contagens de leucócitos totais, mas não linfócitos, nos animais tratados com OKT3[®] (dados não mostrados). No entanto, aos 30 DAI, foi observado marcado aumento na contagem de leucócitos totais e linfócitos em todos os animais infectados (independente do tratamento), indicando que a infecção por *A. ceylanicum* pode ter sido responsável pelo aumento nos níveis destes tipos celulares circulantes.

Nos animais tratados com OKT3[®] e OKT3[®] + Pd foi observada menor diminuição no número de eosinófilos aos 30 DAI, o que não ocorreu nos animais controle, onde foi observada queda entre o dia 0 e 30 após a infecção. Schneider *et al.* (1997) também descreveram aumento no número de eosinófilos em camundongos tratados com anticorpo anti-CD3, o que não foi observado nos animais controle.

De acordo com Schneider *et al.* (1997), a injeção de anticorpos anti-CD3 leva, no dia seguinte à aplicação, a um aumento no número de neutrófilos circulantes no sangue periférico. Estes dados corroboram com os encontrados neste trabalho, onde, ao contrário dos animais controle, foi observado aumento no número de neutrófilos circulantes aos 30DAI, nos animais que receberam tratamento com OKT3[®].

Observamos diminuição significativa na resposta por anticorpos IgG contra antígenos de larva nos animais tratados com OKT3[®] + Pd, se comparados aos animais controle aos 30 DAI. A mesma diminuição foi encontrada frente a antígenos de adultos, principalmente nos

animais tratados apenas com OKT3[®], onde não observamos diferença estatística para os animais negativos. A diminuição nos níveis de células T efectoras decorrentes do tratamento diminui consequentemente a estimulação de células B e a produção de anticorpos (Sgro, 1995). No entanto, os animais que receberam a combinação com prednisolona apresentaram níveis mais altos de anticorpos.

Com relação à histologia do baço, a hiperplasia de polpa branca observada é característica do órgão estimulado antígenicamente, o que ocorre naturalmente nos animais infectados. Nos animais tratados, isto poderia ser explicado pelo fato de que a administração de OKT3[®] promove uma grande ativação de linfócitos T, mas não uma depleção significativa desta célula no órgão (Ellenhorn *et al.*, 1988; Ellenhorn *et al.*, 1990).

Nos animais infectados, o perfil linfoplasmohistiocitário da mucosa intestinal confirma os dados da literatura que mostram altos níveis de IgA e IgG secretadas sendo excretada na fezes de hamsters infectados e alterações ao nível de proliferação celular e na arquitetura da mucosa do intestino delgado dos animais (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1989; Alkazmi *et al.*, 2006; Bienenstock, 1970; Bungiro *et al.*, 2008; Chow *et al.*, 2000; Croese *et al.*, 2006; Haakenstad e Coe, 1971; Kilian *et al.*, 1988; Loukas e Prociv, 2001; Underdown *et al.*, 1986; Wuff e Kerr, 2006). Nos animais que receberam o tratamento com OKT3[®], o quadro de inflamação mais acentuado pode estar relacionado ao maior número de parasitos adultos presentes na mucosa intestinal. E, quando associado à prednisolona, o quadro inflamatório se torna mais intenso. O quadro descrito no capítulo anterior para o tratamento com prednisolona se mostrou bem mais agudo, assim, é possível perceber que a associação com OKT3[®] levou a uma amenização do quadro inflamatório encontrado quando a prednisolona é administrada sozinha. De acordo com a literatura, acreditamos que esta diferença entre os tratamentos em relação à inflamação da mucosa intestinal possa ter sido a responsável pela diminuição da recuperação de vermes neste grupo (30 vermes em média, no grupo tratado com OKT3[®], contra 20, no grupo com OKT3[®] + Pd) (Alkazmi *et al.*, 2006; Bungiro *et al.*, 2008; Croese *et al.*, 2006).

IV.3.ANTI-INFLAMATÓRIOS

Quando ocorre um dano à membrana celular, que é basicamente composta de fosfolípidos, a enzima fosfolipase A2, presente em leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1. Esta enzima leva à degradação dos fosfolípidos, produzindo ácido aracdônico. Este, quando metabolizado, dá origem aos leucotrienos, através da ação da lipoxigenase, e prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanas, através da ação da enzima ciclooxigenase (Hilário *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação das drogas anti-inflamatórias consiste na supressão de ciclooxigenases (COX), resultando na redução da produção de prostaglandinas, controlando, assim, a inflamação, dor e febre.

Existem alguns anti-inflamatórios que, seletivamente ou especificamente, inibem COX-1 ou COX-2. Apenas COX-1 inibe a formação de tromboxana (agente agregador de plaquetas). A inibição de COX-1 é associada com o aumento no risco de danos e sangramento intestinais. Inibidores seletivos e específicos de COX-2 foram desenvolvidos para reduzir a incidência de efeitos adversos da inibição da COX-1 (Brune e Hinz, 2004). Estes inibidores incluem diclofenaco e nimesulida, exemplo de drogas de primeira geração (inibidores não seletivos de COX-); e etoricoxib e celecoxib, exemplo de drogas de segunda geração (inibidores seletivos de COX-) (Van Hecken *et al.*, 2000).

Ciclooxigenases (COX's) são as primeiras enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico (Brune e Hinz, 2004; Cronstein, 2002; Fitzgerald e Patrono, 2001). Um importante avanço na terapia anti-inflamatória foi a descoberta de duas isoformas da COX: COX-1 e COX-2. Apesar de as duas serem muito semelhantes na forma protéica, estas enzimas são codificadas por diferentes genes. Geneticamente, COX-1 e COX-2 são 60% homólogas e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente (Cronstein, 2002).

COX-1 e COX-2 apresentam diferenças mínimas, que conferem funções distintas a elas. COX-1 está presente na maioria dos tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestinos, rins) e, por esta razão, é definida como enzima constitutiva. É associada com a produção de

prostaglandinas e resulta em uma variedade de efeitos fisiológicos, tais como agregação plaquetária, proteção gástrica e manutenção da circulação sanguínea renal (Hilário *et al.*, 2006).

Já COX-2 está presente no sítio de inflamação e, por esta causa, é denominada como enzima induzida. É primeiramente expressa pelas células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos. Também pode ser encontrada em outros tecidos e órgãos, tais como rins, cérebro, cartilagens, endotélio, entre outros. COX-2 é induzida por citocinas (IL-1, IL-2 e TNF- α) e outros mediadores (como fatores de crescimento e endotoxinas) no sítio inflamatório (Harris, 2002). É expressa no sistema nervoso central e exerce papel na mediação de dor e febre. A expressão de COX-2 pode ser suprimida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-14 (Hilário *et al.*, 2006).

As prostaglandinas estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação/vasoconstrição, contração/relaxamento de musculatura uterina e brônquica, aumento na circulação sanguínea renal, supressão da secreção de suco gástrico, resposta imune, hiperalgesia, regulação da atividade celular quimiotática, angiogênese, entre outras (Hilário *et al.*, 2006).

No trato gastrointestinal, as prostaglandinas são moléculas citoprotetoras da mucosa gástrica, já que suprimem a secreção de suco gástrico, aumentam a circulação sanguínea local, provocam a secreção de muco e aumentam a síntese de glutathione (um anti-oxidante relacionado ao metabolismo de radicais livres). Além disso, elas provocam o relaxamento de músculo liso (Hilário *et al.*, 2006).

Quando a produção de prostaglandinas é aumentada, há aumento da sensibilidade à dor e febre e aumento da resposta inflamatória. Entretanto, as prostaglandinas também são capazes de apresentar ação anti-inflamatória devido a supressão de IL-1 e da síntese de TNF- α (Hilário *et al.*, 2006).

Prostaglandinas E2 (PGE2) são potentes imunomoduladores com efeitos estimulatórios e inibitórios (Celentano *et al.*, 1995). PGE2 inibe a síntese de IL-2 e seus receptores (Walker *et al.*, 1983), a síntese de IFN- γ e, conseqüentemente, a expressão de MHC de classe II. Por outro lado, prostaglandinas atuam na diferenciação de clones Th₀ para sintetizarem citocinas do tipo Th₂ (Freire de Lima *et al.*, 2000), assim como induzem o “switch” nas classes de imunoglobulinas, preferencialmente para os isotipos IgE e IgG₁ (Phipps *et al.*, 1991; Roper *et al.*, 1990; Roper e Phipps, 1994).

O ácido acetilsalicílico é um inibidor não seletivo de COX. Ele acetila irreversivelmente essa enzima. A inibição destas enzimas pelo ácido acetilsalicílico constitui o mecanismo principal dos seus efeitos. A inibição da COX-1 é a responsável por muitos efeitos indesejados. Os efeitos anti-inflamatórios também são largamente dependentes da inibição da produção de mediadores importantes em todos os fenômenos associados à inflamação, como vasodilatação, dor e atração de leucócitos ao local. Além disso, os salicilatos são eficazes em neutralizar os radicais livres, moléculas produzidas na inflamação e altamente nocivas para os tecidos (ex. superóxido, peróxido de hidrogênio).

É um composto não-esteróide com propriedades anti-reumática, anti-inflamatória, analgésica e antipirética. O mecanismo de ação do diclofenaco, um inibidor não seletivo de COX, é a inibição da síntese das prostaglandinas, fatores principais na causa da inflamação, dor e febre.

O etoricoxib é um anti-inflamatório não-hormonal, bem absorvido por via oral e com alta seletividade pela COX-2. A inibição da COX-2 por esta medicação leva a efeitos analgésicos e anti-inflamatórios potentes com riscos mínimos para o trato gastro-intestinal, visto que não interfere com a COX-1. O etoricoxib não inibe a síntese gástrica de prostaglandinas e não tem efeitos sobre a função plaquetária.

IV.3.1. Tratamento

Para avaliar o efeito de anti-inflamatórios em hamsters infectados com *A. ceylanicum*, os animais foram tratados com fármacos utilizadas em humanos.

Os animais foram tratados a partir do dia de infecção (dia 0) e, a partir daí, o tratamento ocorreu diariamente. As doses foram determinadas de acordo com a maior dose administrada em pacientes humanos. Quando houve a necessidade de ajuste de valores (dose/peso) para o animal, considerou-se um indivíduo com peso médio de cinquenta quilos e o hamster com peso médio de cem gramas. A administração ocorreu sempre no final da tarde.

Foram utilizadas três drogas comerciais: i) Diclofenaco resinato (Biofenac[®], 45 mg, Aché); ii) Etoricoxibe (Arcoxia[®], 90 mg, Merck Sharp e Dohme); iii) Ácido acetilsalicílico (Aspirina[®], 100 mg, Bayer).

IV.3.1.1. Diclofenaco resinato

Foi utilizado o medicamento na forma de suspensão oral (15 mg/ml). Quatorze animais foram tratados com a dose de 2 mg/kg (0,2 mg/hamster), via oral, com auxílio de pipeta.

IV.3.1.2. Etoricoxibe

O medicamento utilizado apresenta-se na forma de comprimidos revestidos, com 90 mg do princípio ativo. Cada comprimido foi macerado em grau e pistilo. O pó resultante foi diluído em 5 ml de água destilada. Foram utilizados 14 animais e cada um recebeu 1,8 mg/kg (0,18 mg/hamster), via oral, com auxílio de pipeta.

IV.3.1.3. Ácido acetilsalicílico (AAS)

Cada comprimido com 100 mg de ácido acetilsalicílico foi macerado em grau e pistilo. O pó foi diluído em 5 ml de água destilada e cada hamster (14 animais) recebeu 2 mg/kg (0,2 mg/hamster), via oral, com auxílio de pipeta.

IV.3.2. RESULTADOS

IV.3.2.1. Recuperação de vermes

Com relação à recuperação de vermes adultos, não foi observada diferença entre os grupos tratados e controle ($p > 0,05$) (GRAF. 15). No entanto, foram recuperados menos vermes no grupo tratado com diclofenaco, se comparados aos demais.

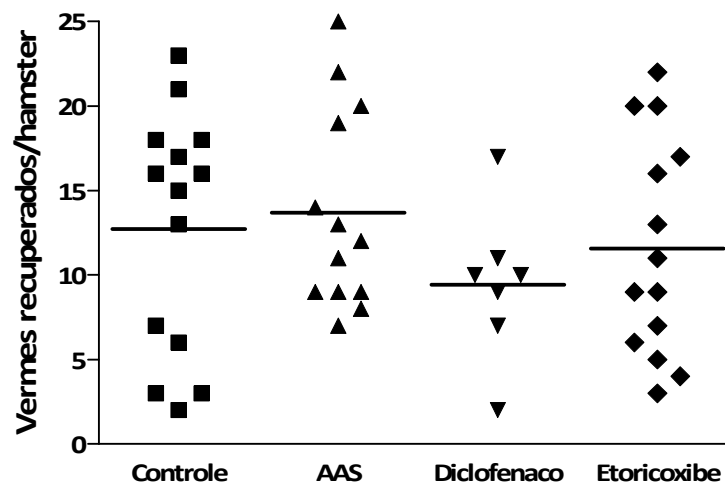


GRÁFICO 15 – Recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO) e Etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). $p > 0,05$. VO = via oral.

IV.3.2.2. Exames hematológicos

Os valores de referência mencionados (destacados nos gráficos com linha tracejada) referem-se aos valores normais de hamsters, *Mesocricetus auratus*, fêmeas, obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981)⁵ *apud* Gad (2007). O tratamento dos animais teve início no mesmo dia da infecção (dia 0). Portanto, os valores negativos apresentados se referem à parte dos animais no dia 0 (sem infecção e sem tratamento).

⁵ Mitruka, B. M.; Rawnsley, H. M. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and humans*. 2. ed. New York: Masson. 1981.

IV.3.2.2.1. Hemácias e hemoglobina

O GRAF. 16 A mostra que não foram observadas diferenças nas contagens de hemácias entre os grupos infectados aos 30 DAI ($p > 0,05$). No entanto, é possível observar uma queda nas contagens de hemácias, se comparados aos valores encontrados no dia 0 para todos os grupos ($p < 0,001$), mas ainda se mantendo dentro dos parâmetros fisiológicos normais.

Ao contrário, o GRAF. 16 B mostra os níveis de hemoglobina encontrados e, apesar de não haver diferenças entre os grupos tratados e controle aos 30 DAI ($p > 0,05$), todos os grupos infectados se mantiveram a dosagem abaixo dos limites fisiológicos. Houve diferença estatística entre todos os grupos infectados e o dia 0 ($p < 0,001$).

IV.3.2.2.2. Leucócitos

IV.3.2.2.2.1. Totais

Com relação à contagem global de leucócitos, todos os grupos apresentaram uma diminuição aos 30 DAI ($p < 0,01$), se comparadas ao dia 0, alcançando valores fisiológicos normais (GRAF. 17). Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados ou não aos 30DAI. É possível perceber que no tratamento com etoricoxibe, ao contrário dos animais negativos e controle, os animais apresentaram uma contagem de leucócitos mais homogênea, com pouca variação em torno da média.

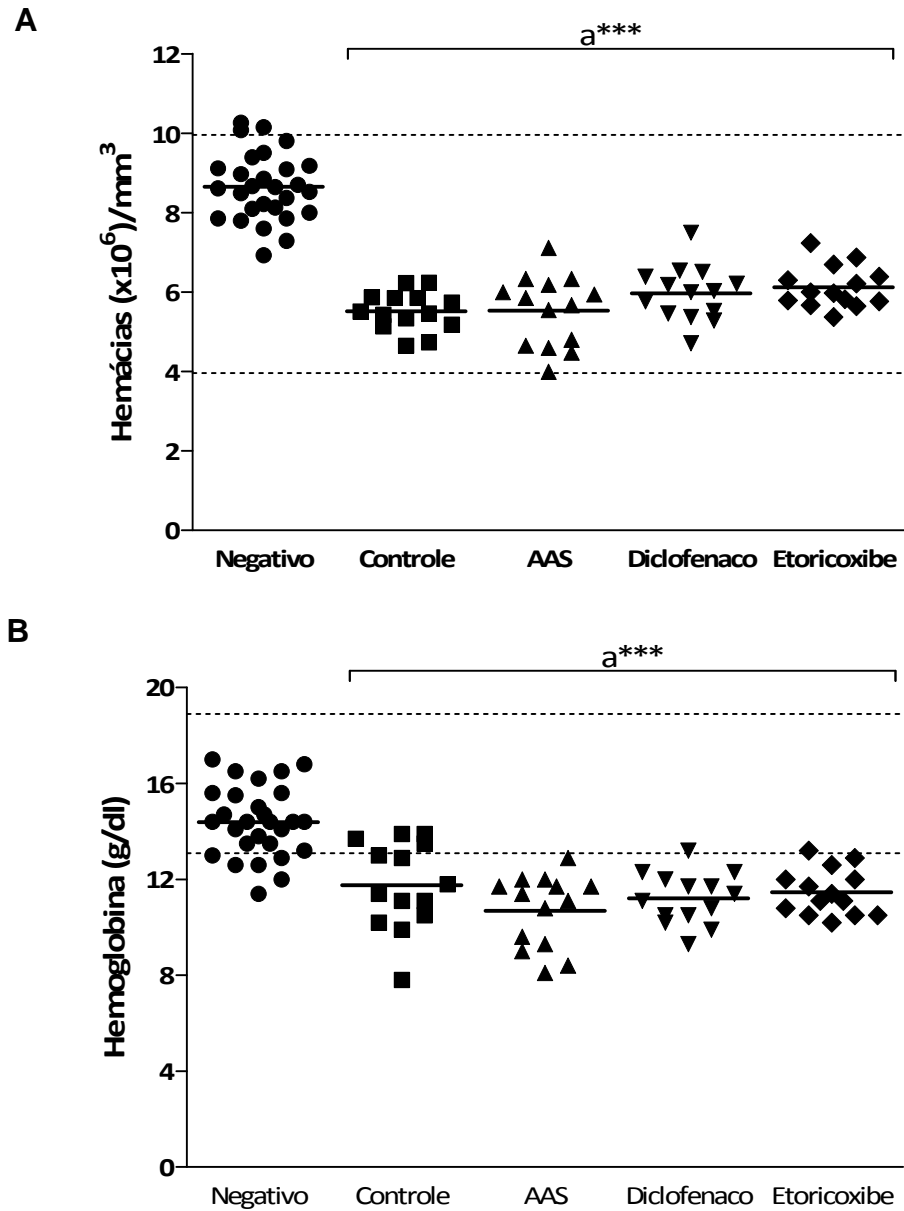


GRÁFICO 16 – (A) Contagem global de hemácias e (B) hemoglobina por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

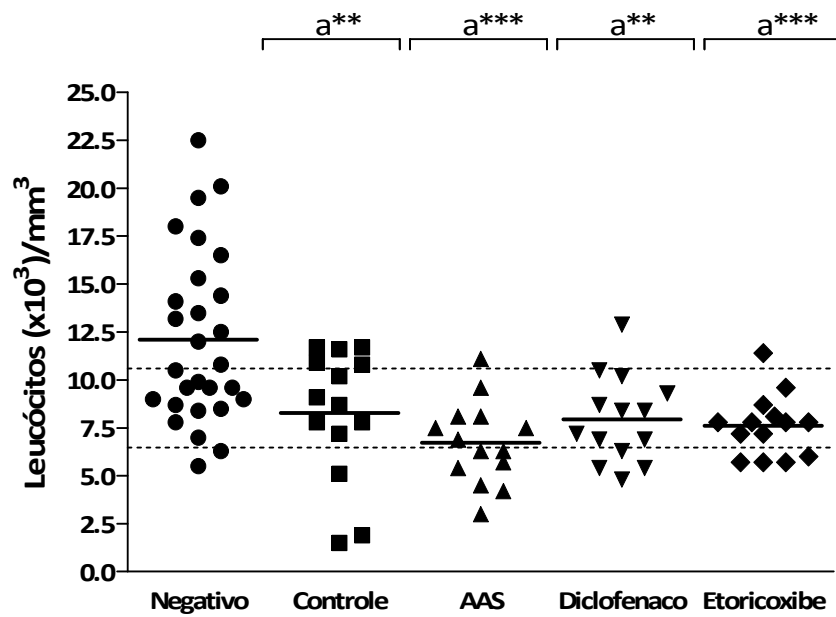


GRÁFICO 17 – Contagem global de leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

IV.3.2.2.2.2. Linfócitos

O GRAF. 18 A mostra queda na contagem de linfócitos dos animais infectados aos 30 DAI, se comparados ao dia 0 ($p < 0,01$), alcançando valores próximos aos limites fisiológicos mínimos.

IV.3.2.2.2.3. Eosinófilos

A contagem de eosinófilos no dia 0 foi bem superior aos valores fisiológicos normais (GRAF. 18 B). Aos 30 DAI, apesar de os valores se manterem acima dos valores fisiológicos normais, foi observada uma diminuição, sem diferença estatística, na contagem ($p > 0,05$).

IV.3.2.2.2.4. Neutrófilos totais

Os valores encontrados nas contagens de neutrófilos totais no dia 0 foram superiores aos valores fisiológicos normais, mas, o GRAF. 18 C mostra queda nas contagens aos 30 DAI para todos os grupos experimentais (infectados), principalmente nos grupos que receberam tratamento com AAS e etoricoxibe, cujas contagens variaram bem próximas à média do grupo ($p < 0,05$).

IV.3.2.2.3. “Enzyme lynked immunosorbent assay” – ELISA

O GRAF. 19 A mostra que não houve reconhecimento significativo de anticorpos IgG frente a antígeno de larva para nenhum dos grupos experimentais ($p > 0,05$), principalmente para os animais controle, cujo reconhecimento foi menor ainda.

Para antígeno bruto de verme adulto, foi encontrada resposta significativa para todos os grupos infectados ($p < 0,001$) (GRAF. 19 B). Houve pouca variação na resposta entre os grupos infectados, no entanto os animais tratados com etoricoxibe apresentaram menor reconhecimento por anticorpos aos antígenos de adulto de *A. ceylanicum*.

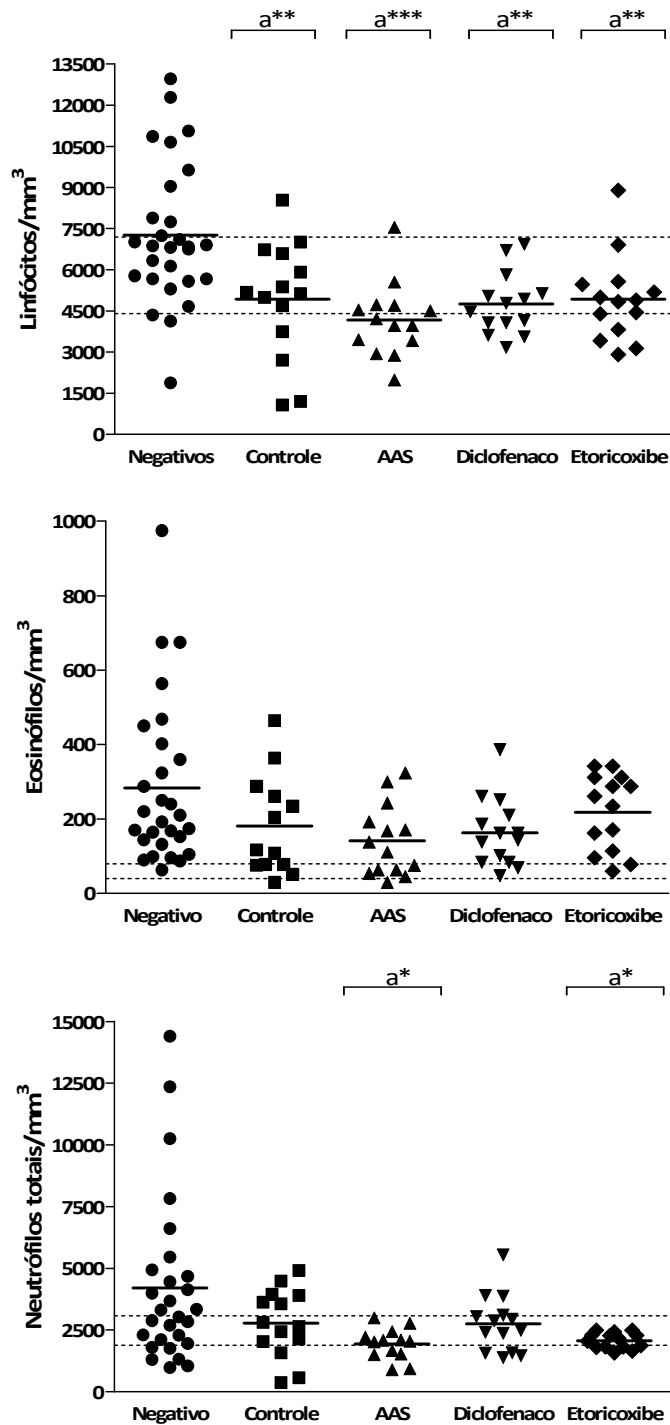


GRÁFICO 18 – Contagem diferencial de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

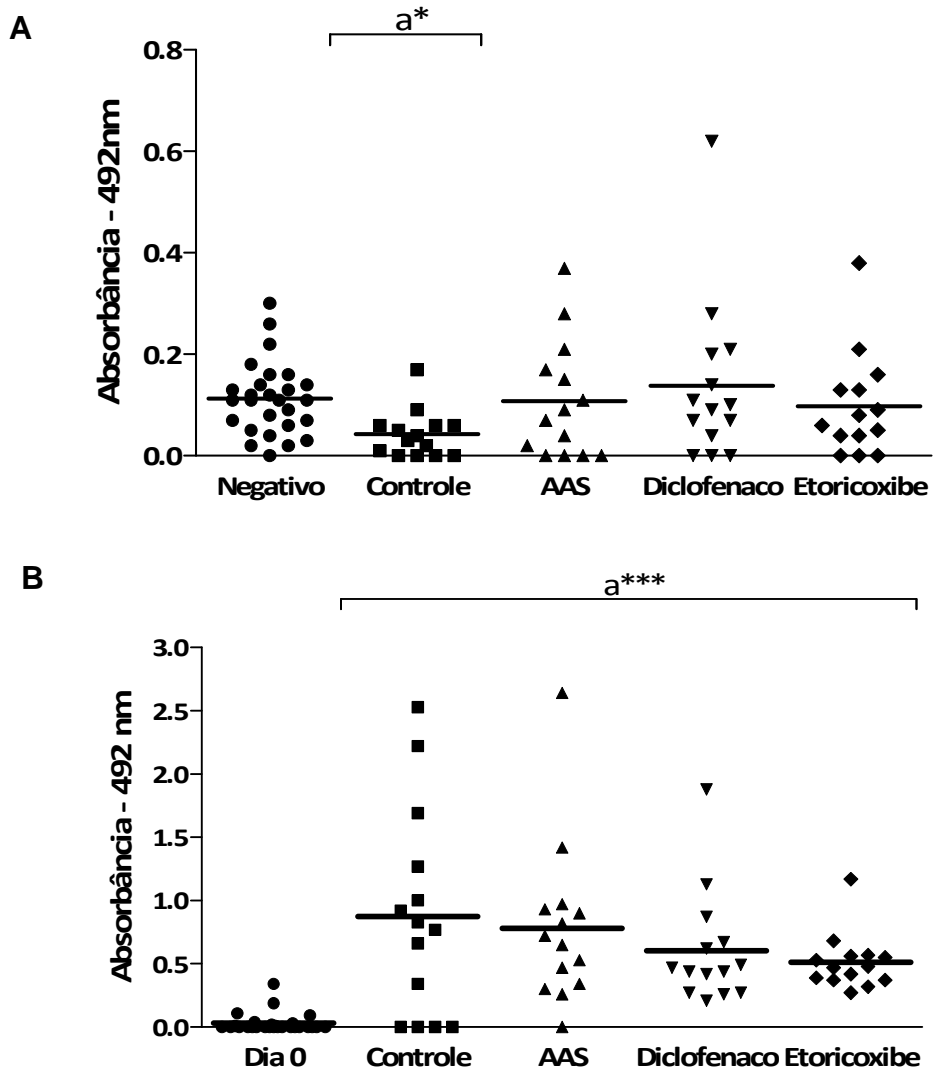


GRÁFICO 19 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO), diclofenaco (2 mg/kg, VO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO). a = diferença estatística para o grupo negativo. * = $p < 0,05$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

IV.3.2.3. Histopatologia

Hamsters negativos apresentam aspecto histológico normal do intestino delgado com vilosidades da mucosa íntegras, altas, células caliciformes e de Paneth em reduzido número no interior das criptas de Lieberkuhn.

Em todos os grupos infectados o padrão do infiltrado inflamatório da mucosa intestinal foi linfoplasmohistiocitário, do tipo mononuclear, o que sugere inflamação crônica. Não foi verificado processo inflamatório na camada muscular.

O GRAF. 20 mostra a quantificação relativa de alterações encontradas com relação ao processo inflamatório (GRAF. 20 A), ao número de células caliciformes (GRAF. 20 B) e à mucosa (GRAF. 20 C) do intestino delgado dos hamsters infectados ou infectados e tratados.

Nos animais do grupo controle foi encontrado quadro de inflamação moderada, com perda de epitélio e manutenção do arcabouço. Foi observado aumento moderado a intenso de células caliciformes (FIG. 6 G). Nos animais tratados com AAS, houve inflamação moderada com perda de mucosa intestinal e aumento moderado de células caliciformes (FIG. 6 H). A FIG. 6 I mostra que animais infectados e tratados com diclofenaco apresentaram quadro de inflamação moderada, com perda de epitélio e áreas de ulceração transmural. Nestes animais houve aumento moderado a intenso de células caliciformes. Os animais infectados que receberam tratamento com etoricoxibe foram os que apresentaram maior alteração no intestino, com alteração da arquitetura tecidual. Nestes, foram encontrados quadros de inflamação intensa, perda de mucosa e aumento moderado de células caliciformes (FIG. 6 J).

Com relação à histologia do baço, ao contrário dos animais negativos, que apresentaram leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca, todos os animais infectados apresentaram hiperplasia de polpa branca (variando de discreta a moderada) e inflamação da trabécula (FIG. 6 A-E).

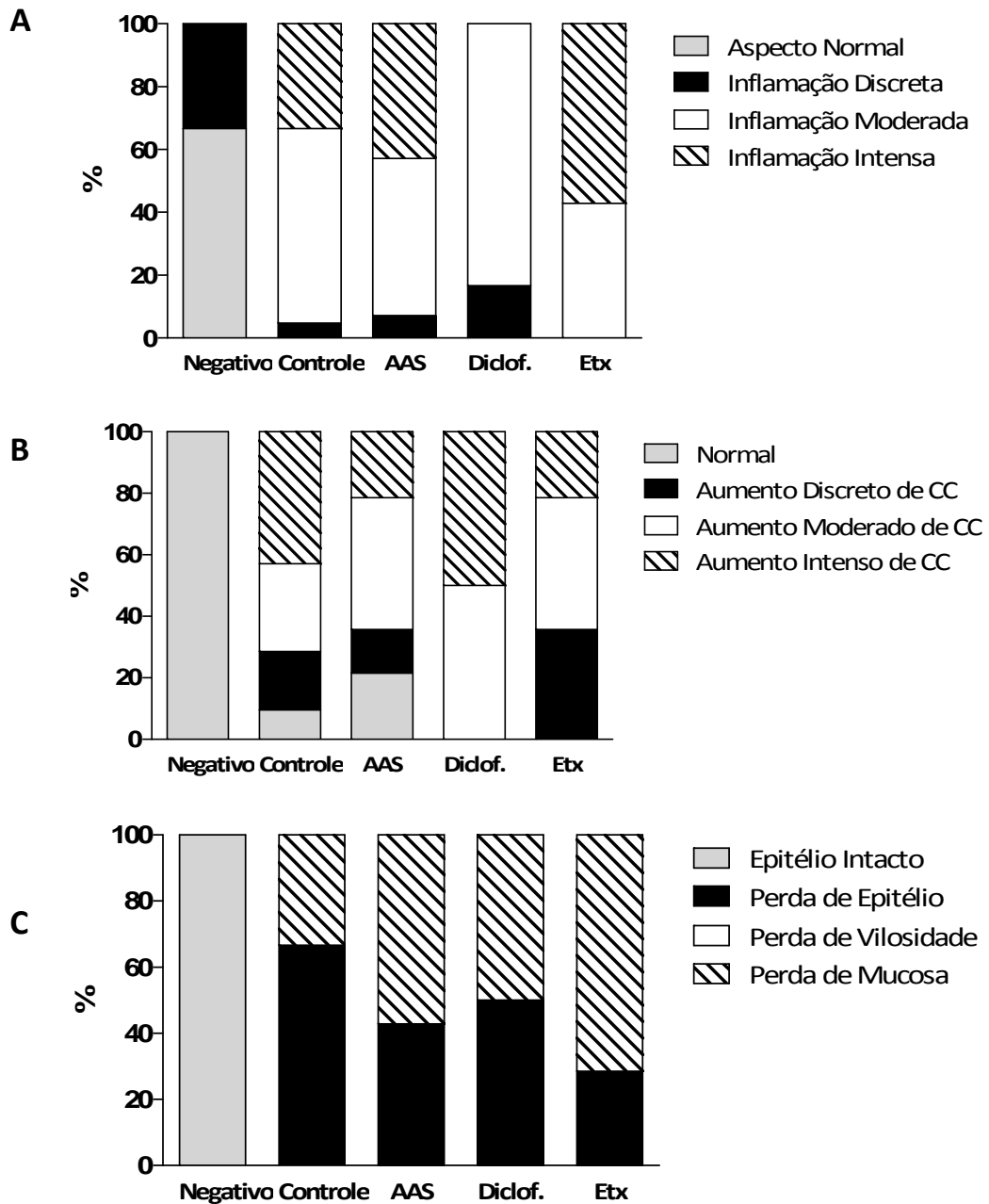


GRÁFICO 20 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectadas e tratadas com ácido acetilsalicílico - AAS (2 mg/kg, VO) (IASP), diclofenaco (2 mg/kg, VO) (IDICLO), etoricoxibe (1,8 mg/kg, VO) (IETO). (A) Processo inflamatório. (B) Células caliciformes – CC. (C) Mucosa.

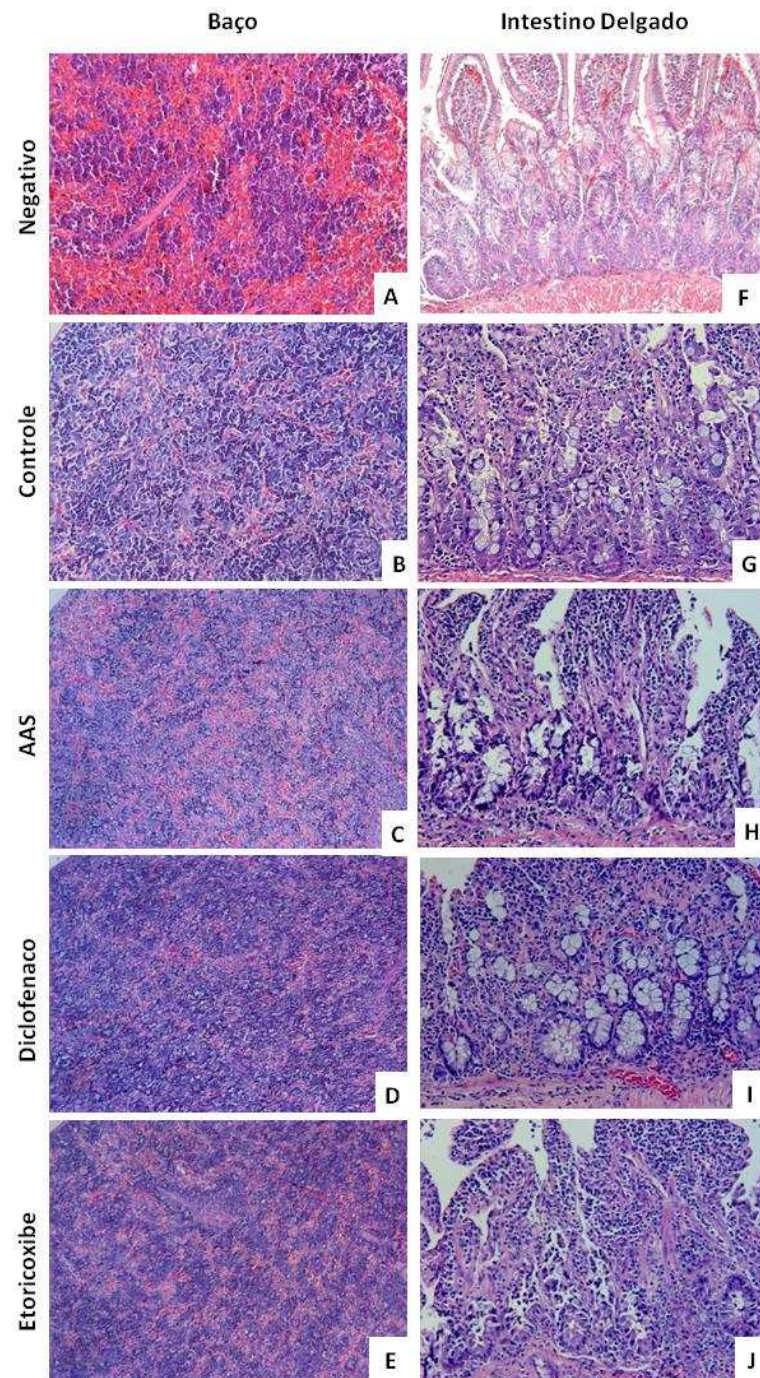


FIGURA 6 - Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters não infectados (A e F), infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e G) e tratados com ácido acetilsalicílico - AAS (C e H) ou diclofenaco (D e I) ou etoricoxibe (E e J). (A) Leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca. (B) Hiperplasia moderada a intensa da polpa branca. (C) Leve hiperplasia da polpa branca. (D-E) Moderada hiperplasia da polpa branca. (F) Aspecto histológico normal com vilosidades da mucosa íntegras. (G) Inflamação moderada e perda de epitélio com manutenção da arquitetura. (H) Inflamação moderada e perda de mucosa. (I) Manutenção da arquitetura e processo inflamatório moderado. (J) Inflamação intensa com alteração da arquitetura e perda de mucosa. Hematoxilina-Eosina, aumento de 10x em A,B, C, D e E; aumento de 20x em E, F, G, H e J.

IV.3.3. DISCUSSÃO

Prostaglandinas são moduladores de importantes processos fisiológicos e suas funções têm sido extensivamente estudadas. Elas são inibidas por glicocorticóides e anti-inflamatórios não-esteroidais, tais como indometacina, aspirina, diclofenaco, ibuprofeno e celecoxibe (López-Armada *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2000; Süleyman *et al.*, 2004). Indometacina (inibidor não seletivo de COX) é a droga mais utilizada em estudos sobre o envolvimento de prostaglandinas na inflamação induzida por parasitos (Dauguschies, 1995; Dauguschies e Ruttkowski, 1998; Machado *et al.*, 2010; Nishina e Suzuki, 2002; Rahka *et al.*, 1996; Terrazas *et al.*, 1999;). Ibuprofeno é uma potente droga anti-inflamatória não seletiva que inibe a diferenciação e a proliferação de células inflamatórias, além de reduzir a fertilidade de helmintos (Farag *et al.*, 1995). Novas moléculas com atividade anti-inflamatória, tais como os inibidores seletivos de COX-2, celecoxibe e etoricoxibe, são utilizados no tratamento de artrite reumatóide e osteoartrite, suprimindo também o desenvolvimento de cânceres de cólon, pulmões e outros (Everts *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2002).

Infecções helmínticas estão sempre associadas com elevada produção de prostaglandinas, que estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro, levando a sintomas da infecção (Noverr *et al.*, 2003). A descoberta de que estes parasitos também produzem prostaglandinas, assim como seus hospedeiros, e que possuem uma maquinaria para biosíntese de tais moléculas têm aumentado ainda mais o interesse no estudo do papel das prostaglandinas nas infecções, uma vez que podem representar uma das formas pelas quais o parasito modula o sistema imune do hospedeiro e estabelece a infecção (Dauguschies e Joachim, 2000; Kubata *et al.* 2000, 2002, 2007; Sanchez-Ramirez *et al.*, 2004). A síntese de prostaglandinas já foi descrita em *S. mansoni*, *Ascaris* spp. e *Onchocerca volvulus* (Kubata *et al.*, 2007), e, além destas, outras enzimas envolvidas na cascata do ácido aracdônico e da produção de prostaglandinas (como fosfolipases, prostaglandinas-sintases e enzimas ciclooxigenases-“like”) também já foram descritas em parasitos, tais como *S. mansoni*, *Ascaridia galli*, *O. volvulus*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Entamoeba* (Kubata *et al.*, 2007).

Além disso, estudos mostram que a produção de prostaglandinas está associada aos processos de muda e crescimento de parasitos, como em *Oesophagostomum dentatum* (Dauguschies 1995, 1996; Dauguschies and Ruttkowski 1998). Joachim *et al.* (2005) mostraram que a incubação de larvas de *O. dentatum* com ácido acetilsalicílico leva a diminuição no processo de muda das mesmas e que, a adição de prostaglandinas ao meio não é capaz de reverter este quadro.

Ao contrário de outros estudos, no modelo experimental de ancilostomíase utilizado, não obtivemos sucesso em mostrar as prostaglandinas como mediadores inflamatórios de importância na infecção. Não foram observadas diferenças em aspectos parasitológicos e imunológicos entre animais tratados e não tratados infectados com *A. ceylanicum*. Estudos realizados com *Nippostrongylus brasiliensis* também não mostraram alterações no parasito *in vitro* e na infecção *in vivo* de ratos, descartando o envolvimento direto de PGE₁ e PGE₂ na modulação da resposta imune contra o parasito (Conder *et al.*, 1987; Kassai *et al.*, 1980; Kassai e Redl, 1982). O mesmo foi observado no estudo da infecção de cobaias com *Trichostrongylus columbriformes* (Rothwell *et al.*, 1977).

No entanto, Nessim e Mahmoud (2007) mostraram o efeito profilático com diminuição da carga parasitária em camundongos infectados com *S.mansoni* e tratados com diclofenaco (0,5 e 1,0 mg/animal em dose única). Abdalla *et al.* (2008), trabalhando com *Trypanosoma cruzi*, também observaram diminuição da parasitemia no sangue de camundongos infectados e tratados com meloxicam (0,5 mg/kg) e etoricoxibe (0,6 mg/kg).

Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de quantificar as prostaglandinas no sangue ou tecido dos animais. No entanto, Machado *et al.* (2010) mostraram em modelo de strongilíase (*Strongyloides venezuelensis*) que a administração de drogas anti-inflamatórias seletivas ou não de COX, em doses próximas às utilizadas no nosso estudo e administradas diariamente, foram capazes de diminuir, no intestino delgado, a síntese de PGE₂ em 17% em relação aos animais não tratados. Os autores mostraram que os animais tratados apresentaram maior retenção de adultos no intestino, maior eliminação de ovos e menor reação inflamatória nos pulmões e intestino delgado, se comparados aos não tratados.

As principais diferenças encontradas entre infecção e tratamentos foram com relação à histopatologia do intestino, onde encontramos quadros de ulceração intestinal nos animais tratados com diclofenaco e, nos animais tratados com etoricoxibe, a inflamação intestinal foi intensa, com alteração da arquitetura tecidual. Essa grande alteração no intestino de animais tratados com etoricoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, pode ser explicado pela baixa ou nenhuma produção de prostaglandinas, especialmente PGE₂. No intestino, PGE₂ diminui a apoptose e aumenta a proliferação de células epiteliais, tendo grande importância na regulação e resposta a injúrias teciduais (Stenson, 2007). Machado *et al.* (2010) observaram nos animais infectados com *S. venezuelensis* e tratados com anti-inflamatórios (seletivos ou não) que, apesar de estes animais apresentarem mais vermes no intestino delgado, o infiltrado inflamatório no local era menor e com menor quantidade de eosinófilos do que os animais infectados e não tratados.

Ainda assim, não descartamos a hipótese de que as prostaglandinas tenham um papel relevante na imunomodulação da infecção por *Ancylostoma* em hamsters. Dineen e Kelly (1976) sugeriram que, para *N. brasiliensis* PGE poderia afetar diretamente no metabolismo e migração do parasito ao longo do intestino, alterando também o microambiente intestinal. Além disso, existem outras moléculas derivadas de ciclooxigenases (PGI₂, PGF₂ e PGD₂, por exemplo) que podem ter papel fundamental na ancilostomíase. PGD₂, produzida por mastócitos, por exemplo, está envolvida no tráfego de células Th₂, eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares a sítios inflamatórios em alergias e doenças parasitárias (Chevalier *et al.* 2005; Satoh *et al.*, 2006; Schratl *et al.*, 2007).

Levando todo o exposto em consideração, duas hipóteses são possíveis: i) a falta de regulação na resposta imune local, associada à falta de resposta do tipo Th₂ exarcebaria os efeitos da resposta Th₁ e dos produtos excretado-secretados (ES) (ex. proteases e anticoagulantes) do parasito na mucosa intestinal, o que aumentaria ainda mais a destruição do tecido; e, ii) considerando que a inflamação intestinal decorrente da doença de Crohn leva a um aumento de COX-2 (Cox *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2006; Masferrer *et al.*, 1996;) e que, nestes casos, a infecção por ancilostomídeos leva a melhora do quadro inflamatório

(Croese *et al.*, 2006; Reddy e Fried, 2009), acreditamos que um dos mecanismos de regulação do processo inflamatório seja a secreção de produtos imunomoduladores pelo parasito, que atuem como anti-inflamatórios locais. Assim, novos experimentos devem ser desenvolvidos para definir o papel imunomodulador das ciclooxigenases e prostaglandinas na ancilostomíase.

IV.4.ANTI-HISTAMÍNICOS

A histamina é considerada um mediador da hipersensibilidade imediata e tem papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos. Os efeitos da histamina são mediados pelos seus receptores (HR) (H₁R, H₂R, H₃R e H₄R) expressos em diversos tipos celulares, incluindo células nervosas, endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e células B e T (Leurs *et al.*, 1995). Estes são considerados importantes alvos de estudo visto que, quando ligados à histamina, estão envolvidos em processos de proliferação e diferenciação celular, hematopoiese, regeneração, neurotransmissão, reações inflamatórias, modulação da resposta imune (inclusive a produção de anticorpos) e regulação de sistemas vitais, entre eles, o gastrointestinal (Jutel *et al.*, 2001; Tripathi *et al.*, 2010a, 2010b).

Os efeitos histaminérgicos da ativação do H₁R são decorrentes da mobilização de cálcio intracelular e liberação de óxido nítrico, o que leva aos quadros de vasodilatação, eritema, aumento da permeabilidade vascular e edema (Li *et al.*, 2003). A ativação do H₂R está relacionada à regulação da proliferação celular e, no trato gastrointestinal, à secreção ácida da mucosa gástrica e de bicarbonato no intestino (decorrente da inibição da PGE₂) e da regulação da motilidade intestinal (Jones e Kearns, 2011). Além disso, H₂R apresenta importante função imunoregulatória, visto que inibe a quimiotaxia de neutrófilos, basófilos e eosinófilos (Jones e Kearns, 2011).

H₃R e H₄R correspondem a cerca de 3% de todos os receptores de histamina e são receptores, cujas funções ainda estão sendo estudadas (Jutel *et al.*, 2002). No entanto, sabe-se que o H₃R localiza-se principalmente em células do sistema nervoso central e que, o H₄R está presente em células hematopoiéticas, intestino delgado e outros órgãos, estando relacionados, respectivamente, com funções de neurotransmissão e imunomodulação (Jones e Kearns, 2011; Tiligada *et al.*, 2009). Estudos clínicos sobre o H₃R foram descritos em casos de distúrbios sono, obesidade e cognição, enquanto o H₄R parece ter potencial terapêutico em casos de alergia, inflamação e distúrbios autoimunes (Jones e Kearns, 2011; Kiss e Keseru, 2009; Tiligada *et al.*, 2009).

O melhor tratamento clínico para doenças/síndromes de origem alérgica é a supressão da inflamação no tecido. Estas reações envolvem a liberação de mediadores químicos ou citocinas pelos mastócitos e consequente inflamação e infiltração celular, principalmente de eosinófilos (Watanabe *et al.*, 2004). Anti-histamínicos são fármacos desenvolvidos para serem utilizados no alívio de sintomas alérgicos, desencadeados pela liberação da histamina. Não inibem a produção de histamina. Atuam bloqueando, por competição, os receptores de histamina na sua forma inativa, alterando a expressão/função destes em células importantes do sistema imune (Jones e Kearns, 2011)

A loratadina é um anti-histamínico tricíclico, de ação prolongada, com atividade antagonista seletiva sobre receptores histaminérgicos H₁ periféricos (H₁R). É rapidamente absorvida do trato gastrointestinal após administração oral, atingindo picos de concentrações plasmáticas em cerca de uma hora. A loratadina e seus metabólitos não atravessam a barreira hematoencefálica.

A ranitidina é um dos antagonistas dos receptores H₂ periféricos (H₂R) mais estudados nos efeitos da histamina na imunomodulação. Sua absorção após a administração oral é rápida, sendo as concentrações plasmáticas máximas atingidas dentro de duas após a administração. Ranitidina tem efeito inibitório na regeneração do fígado (Tripathi *et al.*, 2010a).

IV.4.1. Tratamento

Para avaliar o efeito de anti-histamínicos em hamsters infectados com *A. ceylanicum*, os animais foram tratados com fármacos utilizados no controle de reações alérgicas pela medicina.

Os animais deste grupo foram tratados a partir do dia da infecção (dia 0) e, a partir daí, o tratamento ocorreu diariamente. As doses foram determinadas de acordo com a maior dose administrada em pacientes humanos. Quando houve a necessidade de ajuste de valores (dose/peso) para o animal, considerou-se um indivíduo com peso médio de cinquenta quilos

e o hamster com peso médio de oitenta gramas. A administração ocorreu sempre no final da tarde.

Foram utilizadas duas drogas comerciais, isoladas ou em combinação (como descrito abaixo): i) Loratadina (Loratamed[®], 1 mg/ml, CIMED); ii) Cloridrato de ranitidina (Medicamento genérico, 150 mg, Medley).

IV.4.1.1. Loratadina

Foi utilizada a droga na forma xarope (1 mg/ml). Cada hamster (14 animais) recebeu a dose de 0,2 mg/kg, via oral, com auxílio de pipeta.

IV.4.1.2. Ranitidina

Foi utilizada a droga na forma de comprimidos, com 150 mg do princípio ativo. Cada comprimido foi macerado em grau e pistilo. O pó resultante foi diluído em 5 ml de água destilada. Cada hamster (14 animais) recebeu 12 mg/kg, via oral, com auxílio de pipeta.

IV.4.1.3. Loratadina e ranitidina (Lor + Ran)

Para avaliar o efeito do bloqueio concomitante dos receptores H₁ e H₂, foi feita uma associação dos dois medicamentos. Ambos foram administrados conforme descrito acima (item II.1.1. e II.1.2.). O grupo continha 14 animais.

IV.4.2. RESULTADOS

Os animais tratados com drogas anti-histamínicas apresentaram sinais clínicos marcantes tais como caquexia, pelagem ruim, hipotermia e prostração. Aos 23 dias de infecção, tinham sido verificadas quatro mortes por grupo de tratamento. Por esta razão, os animais foram sacrificados aos 24 DAI.

IV.4.2.1. Eliminação de ovos

O período pré patente dos animais infectados e não tratados foi aos 16 dias, enquanto o dos animais que receberam tratamento foi de 11, 13 e 16 dias para ranitidina, loratadina e Lor + Ran, respectivamente.

O GRAF. 21 A mostra a curva de eliminação de ovos dos animais infectados e infectados e tratados. O grupo que recebeu combinação de drogas apresentou elevada eliminação de ovos aos 16 DAI. O grupo controle apresentou, no período observado, maior eliminação aos 16 DAI. Comparativamente, de acordo com os valores obtidos no cálculo da área da curva, o grupo que recebeu a combinação de drogas eliminou, em 23 dias de infecção, cerca de três vezes mais ovos do que os animais controle.

IV.4.2.2. Recuperação de vermes

O GRAF. 21 B mostra que o número de vermes recuperados apresentou grande variação (1 – 100%) entre os animais em todos os grupos experimentais. No entanto, a média de vermes recuperados nos animais tratados com ranitidina foi menor do que nos outros animais (17%) ($p > 0,05$).

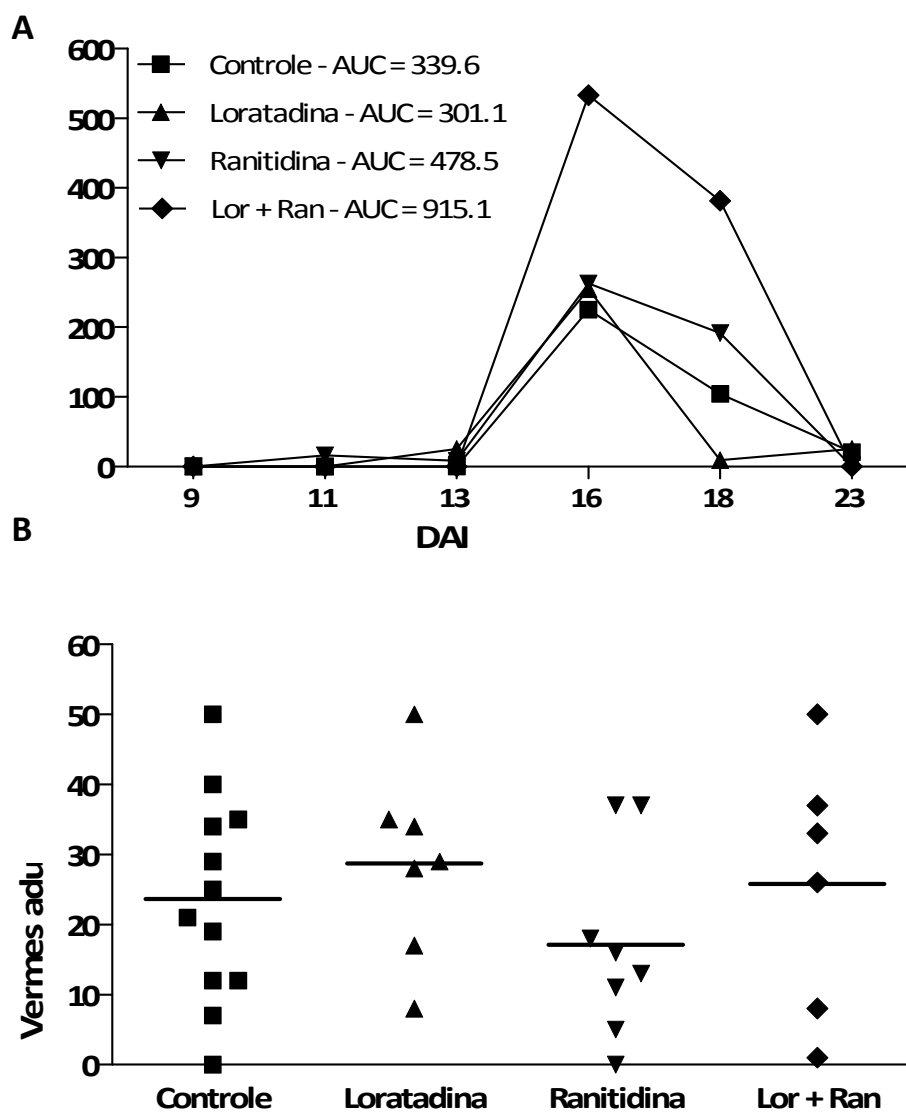


GRÁFICO 21 – (A) Eliminação de ovos por grama de fezes e (B) recuperação de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum* do intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). AUC = “area under curve” (área sob a curva). DAI = dias após a infecção. OPG = ovos por grama de fezes. n=12hamsters/grupo. VO = via oral. IP = via intraperitoneal.

IV.4.2.3. Exames hematológicos

Os valores de referência mencionados (destacados nos gráficos com linha pontilhada) referem-se aos valores normais de hamsters, *Mesocricetus auratus*, fêmeas, obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981)⁶ *apud* Gad (2007). O tratamento dos animais teve início no mesmo dia da infecção (dia 0). Portanto, os valores negativos apresentados se referem ao dia 0 (sem infecção e sem tratamento).

O sangue coletado dos animais tratados, aos 24 DAI, apresentou-se espessado e, o plasma, com aspecto opaco, compatível com quadro de lipemia, que se confirmou após resfriamento do plasma, onde observou-se a formação de placas, semelhantes à de gordura.

IV.4.2.3.1. Hemácias

Os valores obtidos para contagem de hemácias estão representados no GRAF. 22 A. Apesar da queda no número médio de hemácias circulantes em relação ao dia 0, os valores encontrados ainda permaneceram dentro dos parâmetros fisiológicos normais ($p > 0,05$), exceto nos animais que receberam combinação de drogas. Nestes, aos 24 DAI, foi observada diferença estatística em relação aos animais controle ($P < 0,05$) e ao dia 0 ($p < 0,001$).

IV.4.2.3.2. Leucócitos

IV.4.2.3.2.1. Totais

Todos os valores encontrados para contagem global de leucócitos apresentaram-se dentro dos limites fisiológicos (GRAF. 22 B). Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), os animais tratados com a combinação de drogas foram os que apresentaram maior variação nas contagens, o que resultou em um aumento na média do grupo, superando, inclusive, os animais do grupo controle.

⁶ Mitruka, B. M.; Rawnsley, H. M. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and humans*. 2. ed. New York: Masson. 1981.

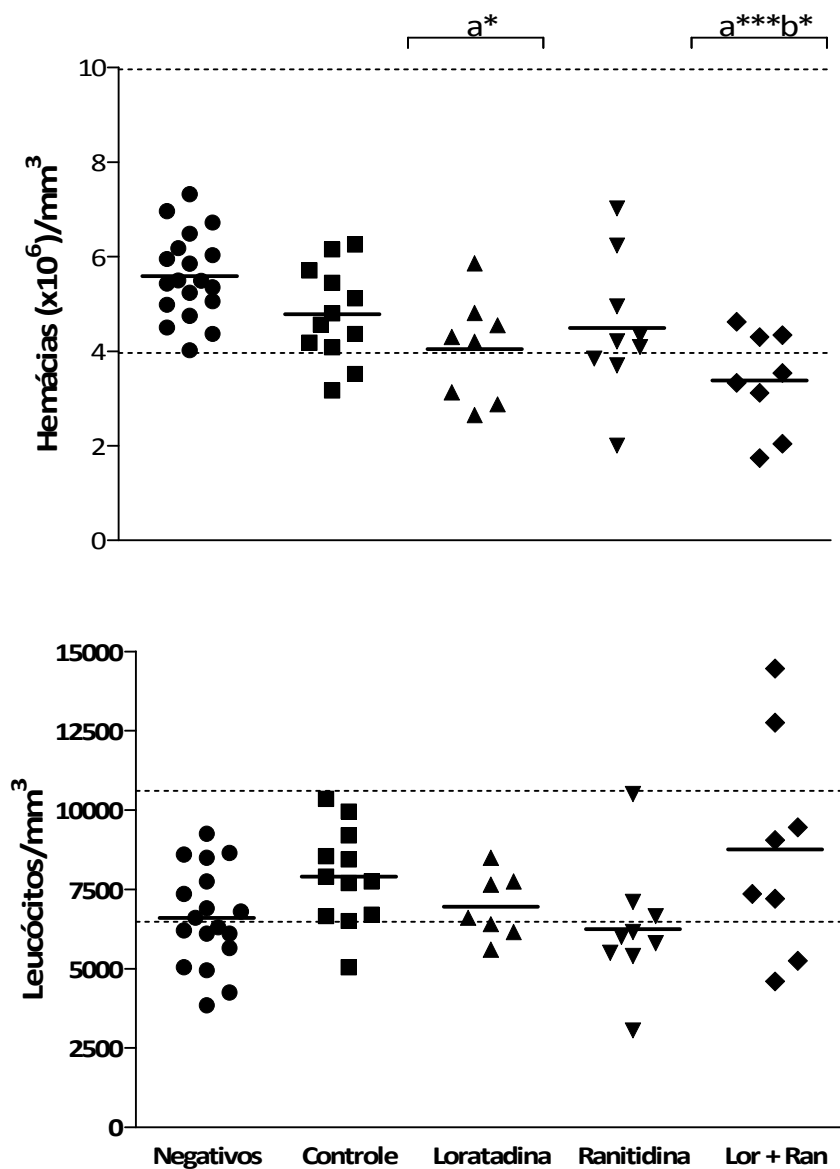


GRÁFICO 22 – (A) Contagem global de hemácias e (B) leucócitos por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. b = diferença estatística para o grupo controle. * = $p < 0,05$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

IV.4.2.3.2.2. Linfócitos

Com relação à contagem de linfócitos, apesar de os valores encontrados estarem abaixo do fisiológico normal desde o dia da infecção (negativos), foi observada uma manutenção no número deste tipo celular nos animais ao longo da infecção (GRAF. 23 A). Mais uma vez, os animais tratados com a combinação da droga (Lor + Ran) apresentaram maior variação no número deste tipo celular. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

IV.4.2.3.2.3. Eosinófilos

O número de eosinófilos encontrados nos animais no dia 0 foi superior ao fisiológico normal, o que caracteriza um quadro de eosinofilia periférica (GRAF. 23 B). No decorrer da infecção não foi observado aumento no número deste tipo celular, exceto nos animais tratados com Lor + Ran, que, devido à contagem de dois animais, apresentou elevação na média do grupo, mas sem diferença estatística para os demais grupos ($p > 0,05$).

IV.4.2.3.2.4. Neutrófilos totais

Observou-se, nos animais controle ($p > 0,05$) e tratados com a combinação de drogas ($p < 0,01$), moderada elevação na contagem de neutrófilos totais circulantes em relação ao dia 0 (GRAF. 23 C). Foi observada diferença estatística nas contagens dos grupos tratados com ranitidina e combinação Lor + Ran ($p < 0,05$).

Os animais que foram tratados com droga única (loratadina ou ranitidina) apresentaram contagem de neutrófilos totais menores do que a dos animais controle, que não receberam tratamento. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

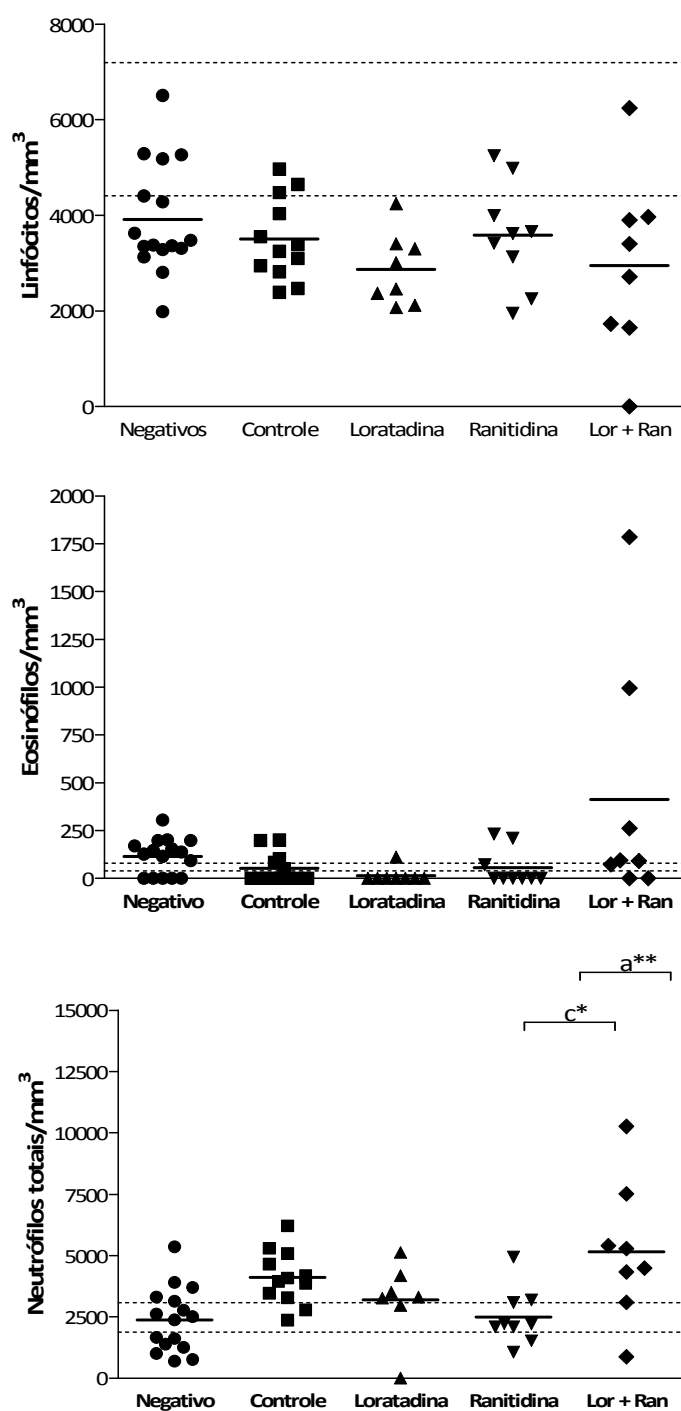


GRÁFICO 23 – Contagem diferencial de (A) linfócitos, (B) eosinófilos e (C) neutrófilos totais por milímetro cúbico de sangue de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* e infectados e tratados com loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). As linhas pontilhadas indicam os valores de referência normais obtidos de Mitruka e Rawnsley *apud* Gad (2007). a = diferença estatística para o grupo negativo. c = diferença estatística entre tratamentos. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. VO = via oral.

IV.4.2.3.3. “Enzyme linked immunossorbent assay” - ELISA

O GRAF. 24 A mostra baixos níveis de anticorpos IgG reconhecendo o antígeno de L₃ de *A. ceylanicum*, sem diferença entre os animais negativos e infectados ($p > 0,05$). Com relação ao antígeno de verme adulto (GRAF. 24 B), apesar de terem sido detectados baixos níveis de anticorpos, houve diferença entre os animais controle e tratados com loratadina e ranitidina em relação aos valores negativos ($p < 0,01$). Os animais infectados e tratados com a combinação de drogas apresentaram menores níveis de anticorpos em relação aos demais animais infectados, não apresentando diferença estatística para os valores negativos ($p > 0,05$).

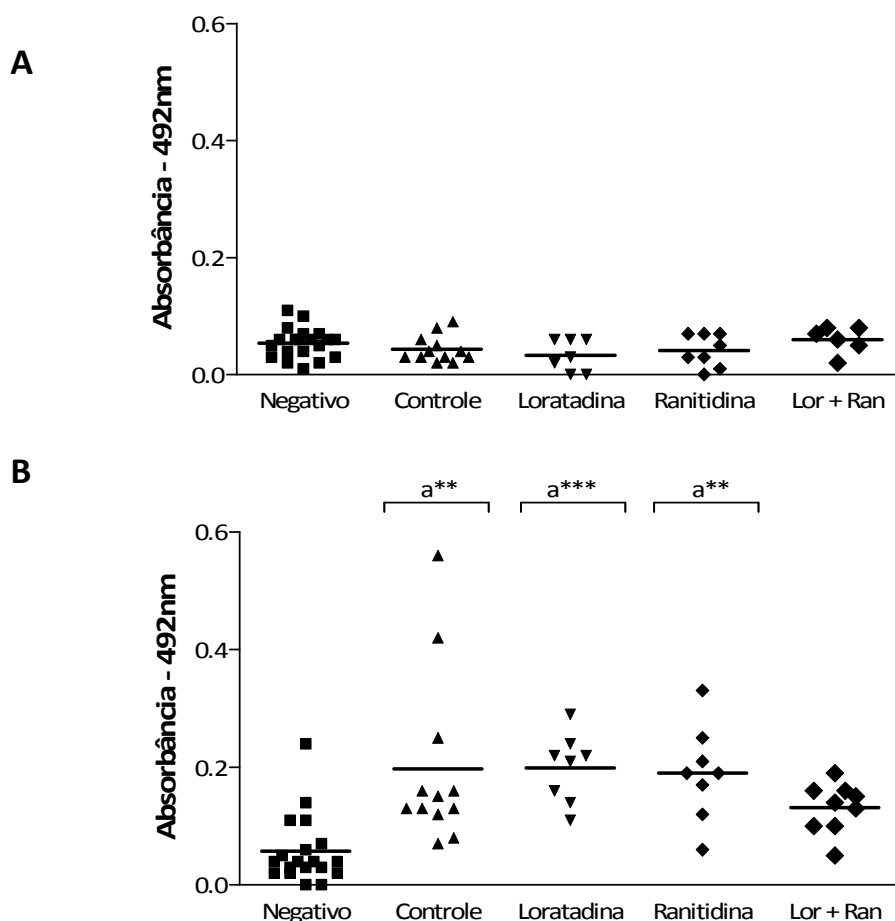


GRAFICO 24 – Níveis de anticorpos IgG frente a antígenos brutos de (A) larva e (B) verme adulto de *Ancylostoma ceylanicum* de hamsters fêmeas infectados com 50 larvas de terceiro estágio de *A. ceylanicum* e infectadas e tratadas com Loratadina (0,2 mg/kg, VO), Ranitidina (12 mg/kg, VO) ou Loratadina + Ranitidina (Lor+Ran). a = diferença estatística para o grupo negativo. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$. VO = via oral.

IV.4.2.4. Histopatologia

É importante ressaltar que, diferentemente dos demais experimentos, aqui, os animais foram sacrificados aos 24 DAI.

Hamsters negativos apresentam aspecto histológico normal do intestino delgado com vilosidades da mucosa íntegras, altas, células caliciformes e de Paneth em reduzido número no interior das criptas de Lieberkühn. Nos grupos infectados, o padrão do infiltrado inflamatório da mucosa intestinal foi linfoplasmohistiocitário, do tipo mononuclear. Não foi verificado processo inflamatório na camada muscular, nem diferenças em relação aos mastócitos.

Os GRAF. 25 mostram a quantificação relativa de alterações encontradas com relação ao processo inflamatório (GRAF. 25 A), ao número de células caliciformes (GRAF. 25 B) e à mucosa (GRAF. 25 C) do intestino delgado dos hamsters infectados ou infectados e tratados.

O intestino delgado dos animais do grupo controle e tratados com loratadina, representados na FIG. 7 G e H, respectivamente, mostraram-se com inflamação moderada, perda de epitélio e áreas de ulceração transmural. Nestes, houve aumento intenso de células caliciformes em ambos os grupos. Os animais tratados com ranitidina apresentaram maiores alteração no intestino delgado (FIG. 7 I), com quadros de inflamação variando de moderada a intensa, alteração da arquitetura, mostrando perda acentuada de mucosa e aumento discreto a intenso de células caliciformes. A combinação das duas drogas associada à infecção por *A. ceylanicum* levou a inflamação moderada do intestino, com perda de epitélio ou mucosa e moderado aumento de células caliciformes (FIG. 7 J). Em relação aos mastócitos, não foram observadas diferenças entre os grupos controle e tratados.

Animais normais, não infectados, apresentam leve predomínio de polpa vermelha sobre a polpa branca no baço. No entanto, aos 24 DAI, animais infectados apresentaram hiperplasia moderada a intensa da polpa branca e trabécula não inflamada (FIG. 7 B). Os animais tratados com loratadina apresentaram intensa hiperplasia de polpa branca e trabécula com

infiltrado inflamatório (FIG. 7 C). Já os animais tratados com ranitidina, apresentaram maiores alterações esplênicas, com inflamação e espessamento da cápsula, trabécula inflamada e intensa hiperplasia da polpa branca (FIG. 7 D). A combinação dos dois tratamentos e da infecção levou à inflamação da trabécula, espessamento da cápsula e intensa hiperplasia da polpa branca (FIG. 7 E).

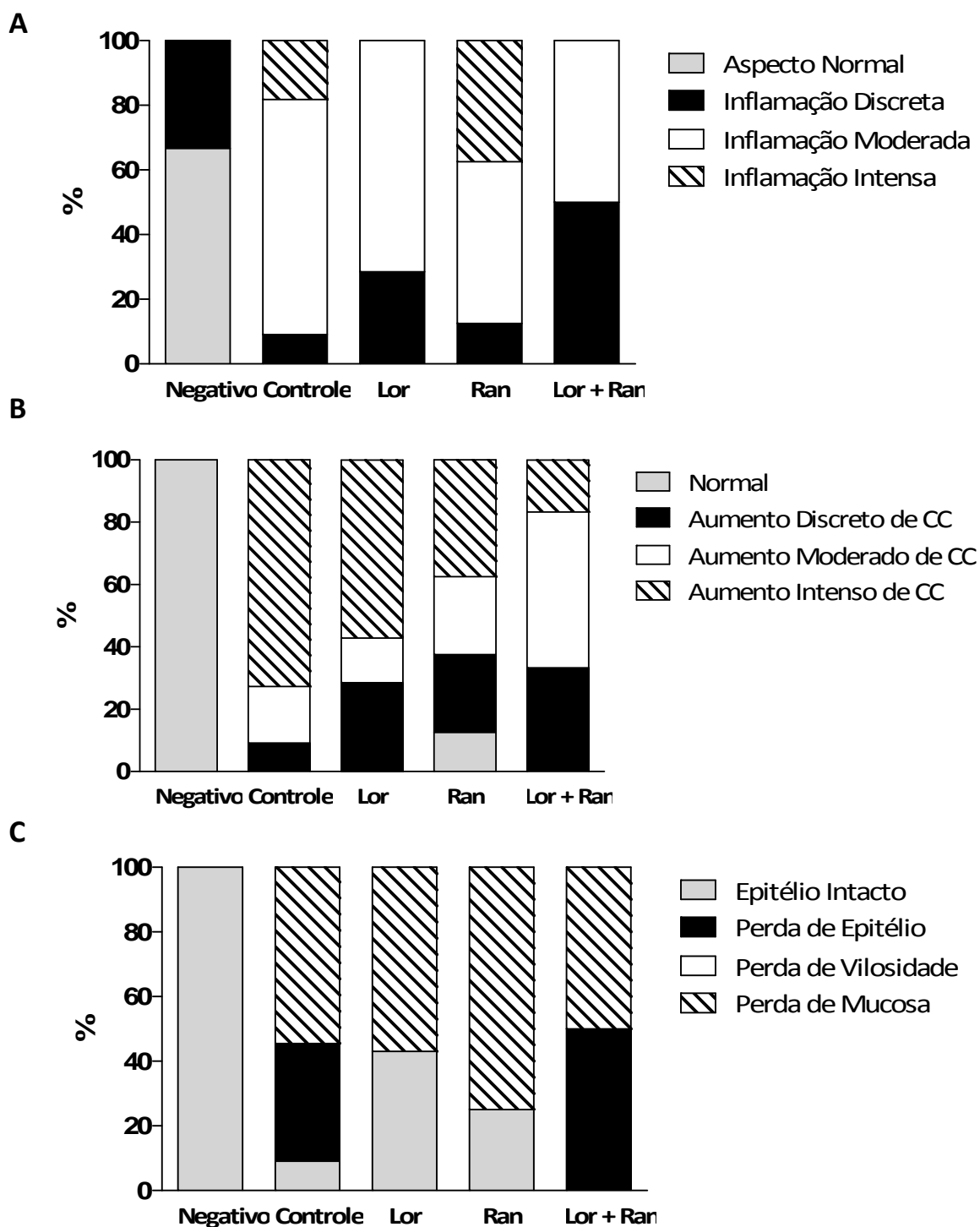


GRÁFICO 25 – Quantificação relativa dos parâmetros avaliados no intestino delgado de hamsters fêmeas infectadas com 50 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma ceylanicum* (INT) e infectados e tratados com loratadina (0,2 mg/kg, VO) (LOR), Ranitidina (12 mg/kg, VO) (RAN) ou Loratadina + Ranitidina (LOR + RAN). (A) Processo inflamatório. (B) Células caliciformes – CC. (C) Mucosa.

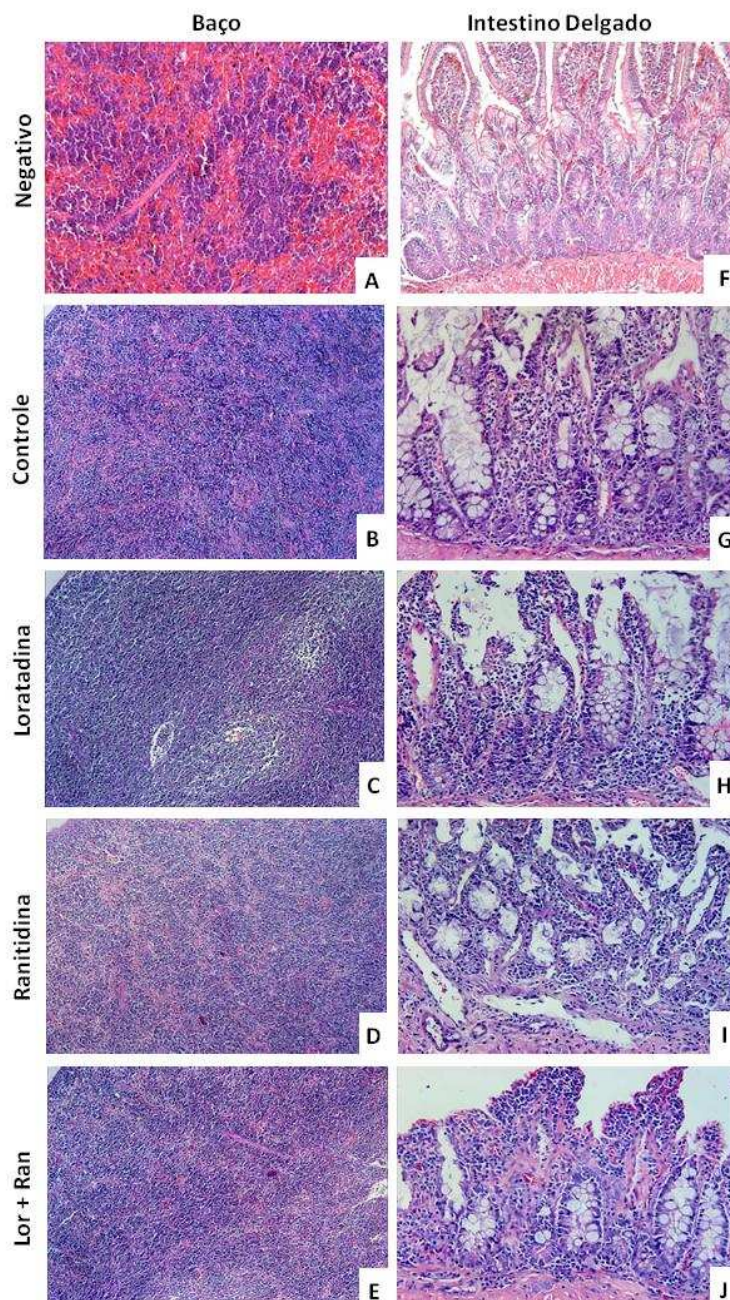


FIGURA 7 – Fotomicrografias de secções de baço e intestino delgado de hamsters negativos (A e F), experimentalmente infectados com *Ancylostoma ceylanicum* (B e G) e tratados com loratadina (C e H) ou ranitidina (D e I) ou ambas (Lor + Ran) (E e J). (A) Leve predomínio de polpa vermelha sobre polpa branca. (B) Moderada hiperplasia moderada a intensa da polpa branca. (C e E) Intensa hiperplasia da polpa branca. (D) Intensa hiperplasia da polpa branca e cápsula espessa e inflamada. (F) Aspecto histológico normal com vilosidades da mucosa íntegras. (G) Inflamação moderada e perda de epitélio. (H) Inflamação moderada e perda de mucosa. (I) Alteração da arquitetura e processo inflamatório moderado. (J) Inflamação discreta com manutenção da arquitetura e perda de epitélio. Hematoxilina-Eosina, aumento de 10x em A,B, C, D e I; aumento de 20x em E, F, G, H, J.

IV.4.3. DISCUSSÃO

Todas as células críticas à resposta imune possuem receptores de histamina e são capazes de produzir e secretar histamina (Jutel *et al.*, 2002; Tiligada *et al.*, 2009). Diversos estudos experimentais indicam que efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios dependem da predominância de um receptor específico para histamina. Células Th₁ apresentam predominante, mas não exclusivamente, expressão de H₁R, enquanto células Th₂ apresentam regulação elevada de H₂R (Jones e Kearns, 2011; Jutel *et al.*, 2001). Histamina aumenta a resposta Th₁ pela ligação à H₁R, enquanto respostas Th₁ e Th₂ são negativamente reguladas pelo H₂R (Jutel *et al.*, 2001). A estimulação do H₂R pode ter efeitos imunossupressores no controle da inflamação, uma vez que induz a secreção de IL-10 (Jones e Kearns, 2011; Osna *et al.*, 2001).

No trato gastrointestinal humano, estudo de Sander *et al.* (2005) mostrou a expressão dos receptores H₁R, H₂R e H₄R, mas não H₃R. Os autores mostraram ainda não haver diferenças no padrão de expressão dos receptores em diferentes porções do intestino. Os enterócitos e leucócitos presentes dentro dos vasos sanguíneos apresentam receptores H₄R. O estudo mostrou ainda que pacientes com alergia alimentar ou síndrome do intestino irritável apresentaram elevada expressão de H₁R e H₂R no intestino, enquanto a expressão de H₄R se manteve inalterada em relação a tecidos de pacientes saudáveis e não foi verificada a presença de H₃R (Sander *et al.*, 2005).

Fatores produzidos por células presentes no intestino, tais como a histamina e serotonina, assim como proteases e peroxidases, são mediadores bioquímicos envolvidos na expulsão de nematódeos intestinais (Shin *et al.*, 2003; Woodbury *et al.*, 1984). A histamina, quando ligada aos seus receptores, é conhecida por aumentar a contratilidade intestinal, facilitando a expulsão de vermes (Serna *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2003). No entanto, muitas vezes essa hipótese se mostra contraditória. Um exemplo é a infecção de ratos por *Nippostrongylus brasiliensis*. Estudos mostraram a relação entre a infecção e a diminuição da concentração de histamina no intestino, assim com o número de mastócitos (Keller, 1971; Roth e Levy, 1980). Outros trabalhos mostraram hiperplasia de mastócitos e aumento nos níveis de

histamina no intestino (Befus *et al.*, 1979). Murray *et al.* (1971) mostraram que o tratamento diário com serotonina e prometazina (antagonista do H₁R) de ratos infectados com *N. brasiliensis* adia a expulsão dos vermes. Na infecção por *Trichinella spiralis* o tratamento com ketotifen (antagonista H₁R) levou a um aumento na carga, no tamanho dos vermes e, em relação ao intestino, observa-se menor atividade de mastócitos, alterações motoras e, assim como neste trabalho, houve proteção da camada epitelial do intestino (Doligalska, 2000; Serna *et al.*, 2006).

Estudo feito por Gupta *et al.* (1990) mostrou que hamsters imunizados e tratados com histamina exógena (20 mg/hamster) tiveram sua suscetibilidade à infecção por *A. ceylanicum* aumentada devido à imunossupressão causada pelo tratamento (Gupta *et al.*, 1990). Neste estudo, os autores mostraram que a histamina não interfere com a função de macrófagos, podendo atuar ao nível dos linfócitos (Gupta *et al.*, 1990; Rocklin, 1976; Rocklin *et al.*, 1978).

Além destes estudos, trabalhos têm mostrado que parasitos são capazes de produzir endogenamente aminas bioativas, principalmente serotonina, que estão relacionadas com a neurotransmissão de sinais pelo corpo do parasito, proporcionando movimento a eles (Boyle *et al.*, 2000; Boyle e Yoshino, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005). Pouco ainda é conhecido sobre a histamina, mas estudos mostram que ela está presente nas estruturas neuronais de parasitos e que seja sintetizada endogenamente ou absorvida pelo tegumento (em maior ou menor quantidade) (Eriksson *et al.*, 1996; Mettrick e Telford, 1963; Wickgren *et al.*, 1990). A função da histamina endógena em parasitos é pouco clara, mas acredita-se que ela seja um importante modulador da função neuromuscular e que, a histamina exógena module a frequência da movimentação corporal, influenciando a atividade motora em cestodas e trematodas (Ercoli *et al.*, 1985; Sukhdeo *et al.*, 1984). Cercárias de *S.mansoni* tratadas com um antagonista de H₁R (prometazina) ficam paralisadas e perdem a infectividade e este quadro pode ser revertido quando é adicionada histamina ao meio (Ercoli *et al.*, 1985). No entanto, o tratamento com antagonistas de H₂R (cimetidina ou metiamida) não provocam quaisquer alterações no parasito (Ercoli *et al.*, 1985).

O propósito deste trabalho foi avaliar, pela primeira vez em relação à infecção por *Ancylostoma*, o efeito da utilização de dois fármacos antagonistas de receptores de histamina: a loratadina, antagonista do H₁R, e a ranitidina, antagonista do H₂R. A grande mortalidade observada nos animais que receberam o tratamento foi inesperada e nenhuma literatura consultada menciona este fato. De acordo com a literatura, a dosagem administrada nos animais foi igual (H₂R) ou inferior (H₁R) à descrita na literatura, em outros modelos experimentais. Além disso, o sangue coletado apresentou, apesar de não ter sido dosado, altos níveis de lipídeos no sangue/plasma. Com relação aos mastócitos, principais células envolvidas na liberação de histamina, apesar da coloração por HE não ser a ideal, não foram observadas diferenças entre os grupos.

No tratamento com antagonistas de H₁R observamos um comportamento da infecção semelhante ao do grupo controle, não tratados: vermes adultos presentes em um ambiente imunologicamente hostil, com predominância de uma resposta Th₂ (Pritchard *et al.*, 2007). No entanto, assim como descrito na literatura, observamos um quadro de inflamação intestinal melhorado em relação aos controles, onde cerca de 40% dos animais mantiveram o epitélio intestinal intacto (Doligalska, 2000; Serna *et al.*, 2006). Isto pode ser explicado pelo fato de que a inibição do H₁R pelo antagonista, inibe a proliferação de células Th₁ e suas respostas (Bachert, 2002; Jutel *et al.*, 2001), favorecendo a ligação da histamina aos outros receptores, principalmente H₂R. Além de o próprio parasito excretar/secretar moléculas que promovam certa imunossupressão local (Croese e Speare, 2006; Pritchard *et al.*, 2007), a ligação da histamina ao H₂R provoca uma inibição das respostas Th₁ e Th₂, criando um ambiente regulado (Jones e Kearns, 2011; Osna *et al.*, 2001). Neste caso, no foco inflamatório são observados aumento de IL-10, e diminuição de neutrófilos, eosinófilos e basófilos locais (Jones e Kearns, 2011).

A utilização de antagonista de H₂R, na dose administrada, não aumenta a suscetibilidade de hamsters à infecção por *A. ceylanicum*. No entanto, a diminuição de células calciformes no intestino, associado à perda de mucosa e ao aumento da inflamação intestinal (chegando a alterar a arquitetura do órgão) refletem a diminuição da resposta Th₂ e aumento da resposta Th₁. E, aqui, mais uma vez observamos que a diminuição do número de vermes no intestino

delgado está associada a um quadro de inflamação intestinal intensa. De acordo com outros autores, durante quadros de inflamação intestinal, ocorre um aumento da sensibilidade dos reflexos gastrointestinais (Gay *et al.*, 2000; Stead, 1992; Torrents *et al.*, 2002) e uma modificação na sensibilidade dos músculos lisos do intestino (Tanovic *et al.*, 2002). Este aumento na movimentação intestinal (peristaltismo) associado à dificuldade dos parasitos adultos se fixarem na mucosa inflamada favoreceria a expulsão precoce dos vermes.

Quando combinados, os antagonistas de H₁R e H₂R induziram um aumento na suscetibilidade da infecção, onde a eliminação de ovos foi mais de três vezes maior do que os outros grupos. Com o bloqueio de ambos receptores (H₁R e H₂R), as respostas Th₁ e Th₂ são inibidas e a histamina se liga aos outros receptores livres (H₃R e H₄R). Os H₄R estão presentes nos enterócitos e leucócitos nos vasos sanguíneos do intestino e a ligação da histamina a este receptor leva à imunomodulação do ambiente intestinal (Sander *et al.*, 2006), favorecendo a manutenção dos parasitos adultos e, conseqüentemente, a postura de ovos.

Com relação à resposta humoral, é sabido que a histamina atua como uma molécula co-estimulatória em células B, afetando diretamente a produção de anticorpos, característica da resposta de perfil Th₂ (Akdis e Blaser, 2003; Akdis e Simons, 2006; Jutel *et al.*, 2005; Rocklin e Beer, 1983). Entre os dois receptores mais comuns no organismo, H₁R e H₂R, o primeiro modula a geração de imunoglobulinas totais e, especialmente, IgG; e, o segundo, tem grande importância na geração de IgM e está envolvido na imunossupressão e imunorregulação (diferenciação e proliferação) da resposta humoral (Tripathi *et al.*, 2010a).

Neste trabalho devemos levar em consideração que os animais foram sacrificados 24 dias após a infecção e, neste momento, observamos baixos níveis de anticorpos contra L₃ e vermes adultos. Uma possibilidade seria devido ao curto tempo de exposição aos antígenos do verme adulto, o que justificaria os baixos níveis de IgG. Entretanto, foi observada pouca elevação ou diferença entre os tratamentos nos anticorpos entre animais negativos e infectados, principalmente nos que receberam combinação de drogas. Trabalhos mostram

que os antagonistas de H₁R e H₂R e H₄R exercem importante papel modulador na produção de anticorpos (Tripathi *et al.* 2010b).

Este trabalho abre portas para novas investigações sobre o papel dos mastócitos e outras células relacionadas à liberação de histamina na infecção por *Ancylostoma*. Acreditamos que novos trabalhos devam ser realizados *in vitro* e *in vivo*, avaliando qual é o efeito da histamina sobre o parasito e sobre a imunomodulação da infecção.

V. CONCLUSÕES

Ciclosporina A, OKT3[®] e anti-inflamatórios não interferem no curso da infecção de *A. ceylanicum* em hamsters.

Prednisolona e antagonistas de H₂R, afetam negativamente a integridade intestinal e a postura de ovos de *A. ceylanicum*, enquanto a combinação de antagonistas H₁R e H₂R leva a considerável aumento na postura.

Fármacos imunossupressores são responsáveis por favorecer a regulação da resposta imune efetora, e não suprimi-la. Esta imunorregulação exacerbada leva a um desequilíbrio na infecção por *A. ceylanicum* no intestino, levando a quadros de intensa inflamação intestinal, associada à diminuição de células caliciformes e perda de mucosa. Este quadro prejudica o desenvolvimento dos vermes adultos e a postura de ovos.

VI. BIBLIOGRAFIA

ABDALLA, G.K. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: The role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* n. 118, p. 514-521, 2008.

ABLAMUNITS, V.; HERALD, K.C. Generation and function of human regulatory CD8+ T cells induced by a humanized OKT3 monoclonal antibody hOKT3 γ 1 (Ala-Ala). *Human Immunol.* n. 69, p. 732-736, 2008.

ABRAMOWICZ, D. *et al.* Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* n. 47, p. 606-8, 1989.

ABU-GHAZALEH, R.I. *et al.* IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* n.142, v.7, p. 2393-2400, 1989.

ADAMCAK, A.; OTTEN, B. Rodent therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* n.3, p. 221-237, 2000.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* n. 112, v. 1, p. 15-22, 2003.

AKDIS, C.A.; SIMONS, F.E. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* n. 533, v. 1-3, p. 69-76, 2006.

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

ALBONICO, M. *et al.* Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull. World Health Organ.* n.81, v.5, p. 343-352, 2003.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M. The effect of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* on the mucosal architecture of the small intestine in hamsters. *J. Helminthol.* n.80, v.4, p. 397-407, 2006.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M. The mucosal cellular response to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. *J. Helminthol.* n.82, v.1, p. 33-44, 2008.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* n.215, p. 403-10, 1990.

ARMSON, A. *et al.* Murine strongyloidiasis: the effects of cyclosporin A and thiabendazole administered singly and in combination. *Int. J. Parasitol.* n.25, p. 533-535, 1995.

AUNE, T.M.; POGUE, S.L. Generation and characterization of continuous lines of CD8+ suppressor T lymphocytes. *J Immunol.* n.142, p. 3731-9, 1989.

BACHERT, C. The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy.* n. 57, v. 4, p. 287-96, 2002.

BARÇANTE, J.M. *et al.* A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.* n.89, v.2, p. 89-93, 2003.

BEFUS, A.D.; JOHNSTON, N.; BIENNSTOCK, J. *Nippostrongylus brasiliensis*: mast cells and histamine levels in tissues of infected and normal rats. *Exp. Parasitol.* n. 48, v. 1, p. 1-8, 1979.

BELL, A.; ROBERTS, H.C.; CHAPPELL, L.H. The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology.* n.27, p. 963-971, 1996.

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

BETHONY, J. *et al.* Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis and hookworm. *Lancet.* n.367, p. 1521-1532, 2006.

BIENENSTOCK, J. The significance of secretory immunoglobulins. *Can. Med. Assoc. J.* n.103, p. 39-43, 1970.

BLAXTER, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol.* n.30, p. 347-355, 2000.

BLAXTER, M. L. *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* v.392, n.6671, p. 71-75, 1998.

BORKOW, G.; BENTWICH, Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. *Clin. Microbiol. Rev.* n.17, v.4, p. 1012-30, 2004.

BOUT, D.; DESLÈE, D.; CAPRON, A. Antischistosomal effect of cyclosporine A: cure and prevention of mouse and rat schistosomiasis *mansoni*. *Infect. Immun.* n. 52, p. 823-827, 1986.

BOYLE, J.P.; YOSHINO, T.P. Serotonin-induced muscular activity in *Schistosoma mansoni* larval stages: importance of 5-HT transport and role in daughter sporocyst production. *J Parasitol.* n. 91, v. 3, p. 542-50, 2005

BOYLE, J.P.; ZALDE, J.V.; YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: effects of serotonin and serotonin receptor antagonists on motility and length of primary sporocysts in vitro. *Exp. Parasitol.* n. 94, v. 4; p. 217-26, 2000.

BROOKER, S.; BETHONY, J.; HOTEZ, P.J. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv. Parasitol.* n.58, p. 197-288, 2004.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* n.50, v.8, p. 2391-9, 2004.

BUNGIRO, R.D.; CAPPELLO, M. Detection of excretory/secretory coproantigens in experimental hookworm infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* n.73, p. 915-920, 2005.

BUNGIRO, R.D.Jr. *et al.* Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. *J. Infect. Dis.* n.183, v.9, p. 1380-1387, 2001.

BUNGIRO, R.D.Jr.; ANDERSON, B.R.; CAPELLO, M. Oral transfer of adult *Ancylostoma ceylanicum* hookworms into permissive and nonpermissive host species. *Infect. Immun.* n.71, v.4, p. 1880-1886, 2003.

BUNGIRO, R.D. *et al.* Purification and molecular cloning of and immunizations with *Ancylostoma ceylanicum* excretory-secretory protein 2, an immunoreactive protein produced by adult hookworms. *Infec. Immun.* n.72, p. 2203-2213, 2004.

BUNGIRO, R.D.Jr. *et al.* Mucosal antibody response in experimental hookworm infection. *Parasite Immunol.* n.30, p. 293-303, 2008.

CARVALHO, W.F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia. Coopmed (Ed.), Belo Horizonte, 281pp., 2008.

CELENTANO, A.M. *et al.* PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins.* n. 49, v. 3, p. 141-153, 1995.

CHAPPELL, L.H. *et al.* Dosage, timing, and route of administration of cyclosporin A and nonimmunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporin A and cyclosporin C against *Schistosoma mansoni* in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* n. 31, p. 1567-1571, 1987.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J.A. CD-3 specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nature.* v.7, p. 622-632, 2007.

CHEVALIER, E., *et al.* Cutting edge: chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells plays a restricting role on IL-5 production and eosinophil recruitment. *J. Immunol.* n. 175, v. 4, p. 2056-60, 2005.

CHOW, S.C.; BROWN, A.; PRITCHARD, D.I. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol.* n. 22, p. 21-29, 2000.

COHN, L.A. Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Animal).* v.12, n.3, p. 150-156, 1997.

COLEBROOK, A.L.; JENKINS, D.D.; LIGHTOWLERS, M.W. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein. *Parasitology.* n. 125, p. 485-493, 2002.

CONDER, G.A. *et al.* Effects of PGE1 or PGE2 and/or acetazolamide on expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats. *Prostaglandins*. n. 34, v. 6, p. 817-27. 1987

COX, D.G. *et al.* Haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.* n. 11, v. 38, p. 6003-8. 2005

CROESE, J.; SPEARE, R. Intestinal allergy expels hookworms: seeing is believing. *Trends Parasitol.* n. 22, p. 547-550, 2006.

CROESE, J. *et al.* Clinical and endoscopic features of eosinophilic esophagitis in adults. *Gastrointest. Endosc.* n. 58, v. 4, p. 516-22, 2003.

CROESE, J. *et al.* Allergy controls the population density of *Necator americanus* in the small intestine. *Gastroenterology*. n. 131, p. 402-409, 2006.

CRONSTEIN, B.N. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: translating pharmacology into clinical utility. *Cleve Clin. J. Med.* n.69, suppl 1, p. 13-19, 2002.

CUNHA, Denílson Eduardo Silva. *Comparação da infecção canina por diferentes espécies de ancilostomídeos: aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares*. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CURY, M. C.; LIMA, W. S. Helminths of dogs and cats. *Cad. Téc. Vet. Zootec.* n.39, p. 12-35, 2002.

DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A. Eicosanoids in parasites and parasitic infections. *Adv Parasitol.* n. 46, p. 181-240, 2000.

DAUGSCHIES, A.; RUTTKOWSKI, B. Modulation of migration of *Oesophagostomum dentatum* larvae by inhibitors and products of eicosanoid metabolism. *Int J Parasitol.* v. 28, n. 2, p. 355-62, 1998.

DAUGSCHIES, A. *Oesophagostomum dentatum*: population dynamics and synthesis of prostanoids by histotrophic stages cultured in vitro. *Exp Parasitol.* v.81, n. 4, p. 574-83, 1995.

DAUGSCHIES, A. Investigations into the production and function of leukotrienes during histotropic development of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitol Res.* v. 82, n. 5, p. 416-22, 1996.

DE SILVA, N.R. *et al.* Soil transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* v.19, p. 547-551, 2003.

DINEEN, J.K.; KELLY, J.D. Levels of prostaglandins in the small intestine of rats during primary and secondary infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* n. 51, v. 4, p. 429-40, 1976.

DOLIGALSKA, M. Effect of ketotifen on the immune response in BALB/c mice infected with *Trichinella spiralis*. *Wiad Parazytol.* n. 46, v. 2, p. 217-24, 2000.

DONDJI, B. *et al.* Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. *Infect. Immun.* n. 76, v. 6, p. 2560-2567, 2008.

DONDJI, B. *et al.* CD4 T cells mediate mucosal and systemic immune responses to experimental hookworm infection. *Parasite Immunol.* n. 32, p. 406-413, 2010.

ELLENHORN, J.D. *et al.* In vivo administration of anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth. *Science.* n. 242, v. 4878, p. 569-71, 1988.

ELLENHORN, J.D. *et al.* T lymphocyte activation following OKT3 treatment. *Curr Surg.* n. 47, v. 6, p. 458-9, 1990.

EL-GANAYNI, G.A.; HANDOUSA, A.E. The effect of cyclosporin A (CSA) on murine visceral toxocariasis *canis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* n. 22, p. 487-494, 1992.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitol.* n.28, v.8, p. 1145-1158, 1998.

ERCOLI, N.; PAYARES, G.; NUÑEZ, D. *Schistosoma mansoni*: neurotransmitters and the mobility of cercariae and schistosomules. *Exp. Parasitol.* n. 59, v. 2, p. 204-16, 1985.

ERIKSSON, K.S. *et al.* Widespread distribution of histamine in the nervous system of a trematode flatworm. *J. Comp. Neurol.* n. 373, v. 2, p. 220-7, 1996.

EVERTS, B.; WÄHRBORG, P.; HEDNER, T. COX-2-Specific inhibitors--the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin. Rheumatol.* n. 19, v. 5, p. 331-43, 2000.

FARAG, M.M.; SALAMA, M.A.; ABOU-BASHA, L. Experimental murine schistosomiasis: reduced hepatic morbidity after pre- and/or post-infection treatment with ibuprofen or diclofenac sodium. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* n. 89, v. 5, p. 497-504, 1995.

FITZGERALS, G.A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* n.345, v.6, p. 433-442, 2001.

FREIRE-DE-LIMA, C.G. *et al.* Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* n. 403, v. 6766, p. 199-203, 2000.

FRUMAN, D.A. *et al.* Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* n. 89, v. 9, p. 3686-90, 1992.

FUJIWARA, R. T. *et al.* Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine.* v. 26, p. 501-509, 2006.

FUJIWARA, R.T. *et al.* Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol.* v. 28, n. 7, p. 285-93, 2006.

FUJIWARA, R.T. *et al.* *Necator americanus* infection: A possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 3, n. 3, e399, 2009 doi:10.1371/journal.pntd.0000399.

GAD, S.C.; HESS, F.G. The hamster. In: GAD, S.C. *Animal models in toxicology.* 2^a ed. EUA: CRC Press, 2007. cap. 4, p. 297.

GANDHI, N.S. *et al.* Epidemiology of *Necator americanus* hookworm infections in Xiulongkan Village, Hainan Province, China: high prevalence and intensity among middle-aged and elderly residents. *J. Parasitol.* n. 87, v. 4, p. 739-743, 2001.

GANGULY, N.K. *et al.* Role of specific immunoglobulin E to excretory-secretory antigen in diagnosis and prognosis of hookworm infection. *J. Clin. Microbiol.* n. 26, v. 4, p. 739-42, 1988.

GARGIONE, C. *et al.* Immunosuppression and parasitic diseases: experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo.* n. 53, p. 122-128, 1998.

GARSIDE, P.; BEHNKE, J.M. *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. *Parasitology.* n.98, v.2, p. 283-289, 1989.

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

GARSIDE, P.; BEHNKE, J.M.; ROSE, R.A. Acquired immunity to *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters. *Parasite Immunol.* n.12, v.3, p. 247-258, 1990.

GASSER, R.B.; CANTACESSI, C.; LOUKAS, A. DNA technological progress toward advanced diagnostic tools to support human hookworm control. *Biotechnol. Adv.* v.26, p. 35-45, 2008.

GAY, J. *et al.* Development and sequels of intestinal inflammation in nematode-infected rats: role of mast cells and capsaicin-sensitive afferents. *Neuroimmunomodulation.* n. 8, v. 4, p. 171-8, 2000.

GEIGER, S.M. *et al.* Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin.Exp.Immunol.* v. 136, p. 334-340, 2004.

GEIGER, S.M. *et al.* Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunol.* n. 29, p. 347-358, 2007

GHOSH, K. *et al.* The impact of concurrent and treated *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections on the immunogenicity of a recombinant hookworm vaccine in hamsters. *J.Infec.Dis.* v. 193, p. 155-162, 2006.

GIULIETTI, A. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. v. 25, p. 386-401, 2001.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* v.12, p. 50-52, 1939.

GREER, A. W. *et al.* The effect of concurrent corticosteroid induced immunosuppression and infection with the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on food intake and utilization in both immunologically naïve and competent sheep. *Animal Science*. n. 80, p. 89-99, 2005.

GUPTA S. *et al.* The effect of histamine on the immune response of hamsters to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. *Ann Trop Med Parasitol*. n. 84, v. 4, p. 393-9, 1990

HAAS, W. *et al.* Behavioural strategies used by the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* to find, recognize and invade the human host. *Parasitol Res.* n. 95, v. 1, p. 30-9, 2005.

HAAKENSTAD, A.O.; COE, J.E. The immune response in the hamster. IV. Studies on IgA. *J. Immunol.* n. 106, p. 1026-1034, 1971.

HARRIS, R.C. Cyclooxygenase-2 and the kidney: functional and pathophysiological implications. *J. Hypertens. Suppl.* n.20, v.6, p. S3-9, 2002.

HAWDON, J.M.; SCHAD, G.A. Serum-stimulated feeding in vitro by by third-stage infective larvae of the canine hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.* v.76, p. 394-398, 1990.

HILÁRIO, M.O.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *J. Pediatr.* n.82, v.5 (suppl), p. 206-212, 2006.

HOTEZ, P.J. *et al.* Experimental approaches to the development of a recombinant hookworm vaccine. *Immunol. Rev.* n. 171, p. 163-171, 1999.

HOTEZ, P.J. *et al.* Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: The Human Hookworm Vaccine Initiative. *Int. J. Paras.* n. 33, p. 1245-1258, 2003.

HOTEZ, P.J. *et al.* Hookworm infection. *N. Engl. J. Med.* n. 351, p. 799-807, 2004.

HOTEZ, P.J. *et al.* Hookworm: "the great infection of mankind". *PLoS Med.* n. 2, p. 177-181, 2005.

HOTEZ, P.J. *et al.* New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol.* n. 22, p. 327-331, 2006.

HOTEZ, P.J. Hookworm and poverty. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* n.1136, p. 38-44, 2008.

HURD, H.; MACKENZIE, K.S.; CHAPPELL, L.H. Anthelmintic effects of cyclosporin A on protoscolecemes and secondary hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* in the mouse. *Int. J. Parasitol.* n. 23, p. 315-320, 1993.

ISHIKAWA, H. *et al.* Inhibition of autoimmune diabetes by oral administration of anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes.* n. 56, v. 8, p. 2103-9, 2007.

JANEWAY, C.A. *et al.* *Imunobiologia - O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença.* Artmed (Ed.), São Paulo, 908 pp., 2007.

JENSON, J.S. *et al.* Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur. J. Immunol.* n. 32, p. 858-867, 2002.

JONES, B.L.; KEARNS, G.L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther.* n. 89, v. 2, p. 189-97, 2011.

JORGENSEN, L.T. *et al.* Variation between hosts in the developmental success of the free-living stages of trichostrongyle infections of sheep. *Int. J. Parasitol.* n. 28, p. 1347-1352, 1998.

JOACHIM, A.; RUTKOWSKI, B.; DAUGSCHIES, A. Ecdysis of *Oesophagostomum*: possible involvement of eicosanoids and development of a bioassay. *Parasitol Res. N.* 95, v. 6, p. 391-7, 2005.

JUTEL, M. *et al.* Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature.* n. 413, v. 6854, p. 420-425, 2001.

JUTEL, M. *et al.* Immune regulation by histamine. *Opinion. Cur. Op. Immunol.* v. 14, p. 735-740, 2002

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* n. 137, v. 1, p. 82-92, 2005.

KAHAN, B.D. Cyclosporine: the agent and its actions. *Transplant. Proc.* n. 17, p. 5-18, 1985

KAHAN, B.D. Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* n. 321, v. 25, p. 1725-1738, 1989.

KASSAI, T. *et al.* Studies on the involvement of prostaglandins and their precursors in the rejection of *Nippostrongylus brasiliensis* from the rat. *Int J Parasitol.* n. 10, v. 2, p. 115-20, 1980.

KASSAI, T.; REDL, P. PGE1 without effect on *Nippostrongylus brasiliensis*. *Int J Parasitol.* n. 12, v. 4, p. 243, 1982.

KALINKOVICH, A. *et al.* Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin. Exp. Immunol.* n. 114, v. 3, p. 414-421, 1998.

KELLER, R. *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat: failure to relate intestinal histamine and mast cell levels with worm expulsion. *Parasitology.* n. 63, v. 3, p. 473-81, 1971

KILLIAN, M.; MESTECKY, J.; RUSSEL, M.W. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.* n. 52, p. 296-303, 1988.

KISS, R.; KESERU, G.M. Histamine H4 receptor ligands and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat.* n. 19, v. 2, p. 119-35, 2009.

KUBATA, B.K. *et al.* Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med.* n. 192, v. 9, p. 1327-38, 2000.

KUBATA, B.K. *et al.* A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* n. 196, v. 9, p. 1241-51, 2002.

KUBATA, B.K. *et al.* Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol.* n. 23, v. 7, p. 325-31, 2007.

KUMAR, N. *et al.* Serum and intestinal immunoglobulins in patients of ancylostomiasis. *Indian J. Med. Res.* n. 71, p. 531-537, 1980.

LAU, C.; GOLDSTEIN, G. OKT3 induces suppressor cells for mixed lymphocyte and PHA mitogenic responses in human peripheral lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* n.3, v.3, p. 187-192, 1981.

LEURS, R.; SMIT, M.J.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* n. 66, v.3, p. 413-463, 1995.

LEWTHWAITE, P. *et al.* Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. *Curr. Opin. Infect. Dis.* n. 18, v. 5, p. 427-435, 2005.

LI, H. *et al.* Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation.* n. 107, v. 18, p. 2348-54, 2003.

LÓPEZ-ARMADA, M.J. *et al.* Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* n. 61, v. 11, p. 1027-30, 2002.

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

LOUKAS, A. *et al.* Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* n. 6, v. 11, p. 733-741, 2006.

LUZICOVA, E.M.; EFIMOVA, O.A. Reaction of Bcl-2-positive splenic cells to glucocorticoids. *Bull. Exp. Biol. Med.* n. 147, p. 257-261, 2009.

LYE, W.C. *et al.* Low-dose OKT3 is not effective in the treatment of steroid-resistant acute renal allograft rejections. *Transplant Proc.* n. 30, v. 7, p. 3106-7, 1998.

MACHADO, E.R. Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* n. 59, v. 1, p. 18-32, 2010.

MAGEE, M.H. *et al.* Prednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to sex and race. *J. Clin. Pharmacol.* n. 41, p. 1180-1194, 2001.

MAO, Y.; REN, J.; LI, J. Regulated spatial distribution of cyclooxygenases and lipooxygenases in Crohn's ulcer. *Mediators Inflamm.* n. 2006, v.3, p. 89581, 2006.

MASFERRER, J.L.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterol. Clin. North Am.* n. 25, v. 2, p. 363-72, 1996.

MATSUZAWA, K. *et al.* Immunosuppressive and antiparasitic effects of cyclosporin A on *Hymenolepis nana* infection in mice. *Int. J. Parasitol.* n. 28, p. 579-588, 1998.

MCLAUHLAN, P.E.; ROBERTS, H.C.; CHAPPELL, L.H. Mode of action of cyclosporin A against *Hymenolepis microstoma* (Cestoda): relationship between cyclophilin binding and drug-induced damage. *Parasitology.* n.121, p. 661-670, 2000.

MCKEAN, P.G.; PRITCHARD, D.I. The action of a mast cell protease on the cuticular collagens of *Necator americanus*. *Parasite Immunol.* n.11, v.3, p. 293-297, 1989.

MEEUSEN, E. N.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today.* n.16, p. 95-101, 2000.

MENDEZ, S. *et al.* Host cytokine production, lymphoproliferation and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Inf. Immun.* n. 73, v. 6, p. 3402-3407, 2005.

MENON, S.; BOPHALE, M.K. *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): pathogenicity and humoral immune response to a primary infection. *J. Helminthol.* n.59, v.2, p. 143-146, 1985.

MENO-TETANG, G.M.; GOBBURU, J.V.; JUSKO, W.J. Influence of gender on prednisolone effects on whole blood T-cell deactivation and trafficking in rats. *J. Pharm. Sci.* n. 88, p. 46-51, 1999.

METTRICK, D.F.; TELFORD, J.M. Histamine in the phylum Platyhelminthes. *J. Parasitol.* n. 49, p. 653-6, 1963.

MIDTVEDT, K. *et al.* Half dose of OKT3 is efficient in treatment of steroid-resistant renal allograft rejection. *Transplantation.* n. 62, v. 1, p. 38-42, 1996.

MURRAY, M. *et al.* *Nippostrongylus brasiliensis*: histamine and 5-hydroxytryptamine inhibition and worm expulsion. *Exp. Parasitol.* n. 30, v. 1, p. 58-63, 1971.

NESSIM, N.G.; MAHMOUD, S. Prophylactic effect of the anti-inflammatory drug diclofenac in experimental schistosomiasis *mansoni*. *Int. J. Infec. Dis.* v. 11, p. 161-165, 2007.

NISHINA, M.; SUZUKI, M. Biphasic hypothermia in mice infected with a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *Exp Anim.* n. 51, v. 2, p. 207-11, 2002.

NOVERR, M.C.; ERB-DOWNWARD, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev.* n. 16, v. 3, p. 517-33, 2003.

OCHI, H. *et al.* Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. *Nat Med.* n. 12, v. 6, p. 627-35, 2006.

OLIVOS-GARCIA, A. *et al.* Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. *Exp. Mol. Pathol.* n. 82, p. 310-315, 2007.

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

OSNA, N.; ELLIOT, K.; KHAN, M.M. Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in TH2 cells and splenocytes. *Int Immunopharmacol.* v.1, p. 85-96, 2001.

PALAU, L.A.; PANKEY, G.A. *Strongyloides* hyperinfection in a renal transplant recipient receiving cyclosporine: possible *Strongyloides stercoralis* transmission by kidney transplant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* n.57, p. 413-415, 1997.

PALIOGIANNI, F. *et al.* Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J. Clin. Invest.* n. 91, v. 4, p. 1481-1489, 1993.

PHIPPS, R.P.; STEIN, R.H.; ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today.* n.12, v.10, p. 349-352, 1991.

PESTANA, José Osmar Medina. *Análise de ensaios terapêuticos que convergem para a individualização da imunossupressão no transplante renal.* 2001. 195 f. Tese (Livredocência) – Escola Paulista de Medicina, USP, 2001.

PRITCHARD, D.I. *et al.* Epidemiology and immunology of *Necator americanus* infection in a community in Papua New Guinea: humoral responses to excretory-secretory and cuticular collagen antigens. *Parasitology.* n. 100, p. 317-326, 1990.

PRITCHARD, D.I. *et al.* Basophil competence during hookworm (*Necator americanus*) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* n. 77, v. 5, p. 860-865, 2007.

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

QUINNELL, R.J. *et al.* Reinfection with hookworm after chemotherapy in Papua New Guinea. *Parasitology.* v. 106, p. 379-385, 1993.

QUINNELL, R.J.; PRITCHARD, D.I. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *J. Infect. Dis.* v.190, p. 430-438, 2004.

RAKHA, N.K.; DIXON, J.B.; CARTER, S.D. *Taenia multiceps* (Cestoda): Ia antigen expression and prostaglandin secretion by parasite-modified, murine peritoneal macrophages. *Parasite*. n. 3, v. 2, p. 135-41, 1996.

RAMASWAMY, K.; KUMAR, P.; HE, Y.X. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*. n. 165, v. 8, p. 4567-74, 2000.

RAO, C.V. *et al.* Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*. n. 62, v. 1, p. 165-70, 2002.

REDDY, A.; FRIED, B. An update on the use of helminths to treat Crohn's and other autoimmune diseases. *Parasitol Res*. n. 104, v. 2, p. 217-21, 2009.

REY, L. Ancilostomídeos e ancilostomíase: I – Os parasitos. In: REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 46, p. 591-599.

RIBEIRO, P.; EL-SHEHABI, F.; PATOCKA, N. Classical transmitters and their receptors in flatworms. *Parasitology*. n. 131, suppl, p. S19-40, 2005.

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

ROCKLIN, R.E.; BEER, D.J. Histamine and immune modulation. *Adv. Intern. Med*. n. 28, p. 225-51, 1983.

ROCKLIN, R.E. Mediators of cellular immunity, their nature and assay. *J. Invest. Dermatol*. n. 67, v. 3, p. 372-80, 1976.

ROCKLIN, R.E. *et al.* Modulation of cellular immune function in vitro by histamine receptor-bearing lymphocytes: mechanism of action. *Cell. Immunol*. n. 37, v. 1, p. 162-73, 1978.

ROPER, R.L. *et al.* Prostaglandin E2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *J. Immunol.* n. 145, v. 8, p. 2644-2651, 1990.

ROPER, R.L.; PHIPPS, R.P. Prostaglandin E2 regulation of the immune response. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* n.22, p. 101-111, 1994.

ROTH, R.L.; LEVY, D.A. *Nippostrongylus brasiliensis*: peripheral leukocyte responses and correlation of basophils with blood histamine concentration during infection in rats. *Exp Parasitol.* n. 50, v. 3, p. 331-41, 1980.

ROTHWELL, T.L.; LOVE, R.J.; GOODRICH, B.S. Failure to demonstrate involvement of prostaglandins in the immune expulsion of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* n. 53, v. 1, p. 93-5, 1977.

RYFFEL, B. Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* n. 46, p. 1-12, 1993.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B. *et al.* *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol.* n. 106, v. 3-4, p. 119-25, 2004.

SANDER, L.E. *et al.* Selective expression of histamine receptors H₁R, H₂R, and H₄R, but not H₃R, in the human intestinal tract. *Gut.* n. 55, v. 4, p. 498-504, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SATOH, T. *et al.* Prostaglandin D₂ plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J Immunol.* n. 177, v. 4, p. 2621-9, 2006.

SCHAD, G.A. Cyclosporine may eliminate the threat of overwhelming strongyloidiasis in immunosuppressed patients. *J. Infect. Dis.* v. 153, n. 1, p. 178, 1986.

SCHNEIDER, E. *et al.* Hematopoietic changes induced by a single injection of anti-CD3 monoclonal antibody into normal mice. *Stem Cells.* n. 15, v.2, p.154-160, 1997.

SCHEINMAN, R.I. *et al.* Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. n. 270, v. 5234, p. 283-286, 1995.

SCHRATL, P. *et al.* The role of the prostaglandin D2 receptor, DP, in eosinophil trafficking. *J Immunol*. n. 179, v. 7, p. 4792-9, 2007.

SERNA, H.; PORRAS, M.; VERGARA, P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* n. 319; v. 3, p. 1104-11, 2006.

SGRO, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology*. n.105, p. 23-29, 1995.

SHIN, H.D. *et al.* Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE. *Hum. Mol. Genet.* n. 12, v. 11, p. 1279-85, 2003.

SOH, C.T. The distribution and persistence of hookworm larvae in the tissues of mice in relation to species and to routes of inoculation. *J. Parasitol.* n.44, v.5, p. 515-519, 1958.

SOULSBY, E.J.L. Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. v. 1, Philadelphia: F. A. Davis Company, p. 95-98, 1965.

STEAD, R.H. Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Reg. Immunol.* n. 4, v. 2, p. 91-9, 1992.

STENSON, W.F. Prostaglandins and epithelial response to injury. *Curr Opin Gastroenterol.* n. 23, v. 2, p. 107-10, 2007.

STRAIN, S.A. *et al.* The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology*. n. 124, p. 545-552, 2002.

SUKHDEO, M.V. *et al.* *Hymenolepis diminuta*: behavioral effects of 5-hydroxytryptamine, acetylcholine, histamine and somatostatin. *J. Parasitol.* n. 70, v. 5, p. 682-8, 1984.

SÜLEYMAN, H. *et al.* Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol J Pharmacol.* n. 56, v. 6, p. 775-80, 2004.

TERRAZAS, L.I. *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitol Res.* n. 85, v. 12, p. 1025-31, 1999.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* v.24, p. 1596-1599, 2007.

TANOVIC, A.; JIMÉNEZ, M.; FERNÁNDEZ, E. Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from *Trichinella spiralis* infected rats. *Life Sci.* n. 71, v. 26, p. 3121-36, 2002.

TILIGADA, E. *et al.* Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs.* n. 18, v. 10, p. 1519-31, 2009.

TORRENTS, D. *et al.* Antinerve growth factor treatment prevents intestinal dysmotility in *Trichinella spiralis*-infected rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* n. 302, v. 2, p. 659-65, 2002

TRIPATHI, T. *et al.* Immunological, biochemical and histopathological evaluation of histamine receptors (H1R, H2R, H3R and H4R)-antagonist in rabbit experimental model: A short term study. *Exp Toxicol Pathol.* 2010a. doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

TRIPATHI, T. *et al.* Modulation of in vivo immunoglobulin production by endogenous histamine and H1R and H2R agonists and antagonists. *Pharmacol Rep.* n. 62, v. 5, p. 917-25, 2010b.

UNDERDOWN, B.J.; SCHIFF, J.M. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* n.4, p. 389-417, 1986.

YOSHIMURA, K. *et al.* The effect of cyclosporin A on *Angiostrongylus cantonensis* infection and eosinophilia in mice. *Int. J. Parasitol.* n. 23, p. 997-1003, 1993.

VAN HECKEN, A. *et al.* Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* n. 40, v. 10, p. 1109-1120, 2000.

WALKER, C. *et al.* Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.* n. 130, v. 4, p. 1770-1773, 1983.

WATANABE, H. *et al.* Reduction of allergic airway eosinophilia by dietary raffinose in Brown Norway rats. *Br J Nutr.* n. 92, v. 2, p.247-55, 2004.

WICKGREN, M. *et al.* Immunocytochemical localization of histamine in flatworms. *Cell Tissue Res.* n. 260, v. 3, p. 479-84, 1990

WILCKENS, T.; DE RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* n.18, v.9, p. 418-424, 1997.

WOODBURY, R.G. *et al.* Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature.* n. 312, v. 5993, p. 450-2, 1984.

WOOF, J.M.; KERR, M.A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* n.208, v.2, p. 270-82, 2006.

VII. ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO CETEA 066/08



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 66/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Manutenção das cepas de *ancylostoma ceylanicum* e *necator americanus* em laboratório**", que tem como responsável(is) **Elida Mara Leite Rabelo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 66/2008**, related to the project entitled "**Maintenance of *ancylostoma ceylanicum* and *necator americanus* strains in laboratory**", under the supervisors of **Elida Mara Leite Rabelo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

ANEXO B – APROVAÇÃO CETEA 088/09



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 88/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Mecanismos imunológicos relacionados à infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em modelo experimental*", que tem como responsável(is) **Elida Mara Leite Rabelo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 08/2009**.

Este certificado expira-se em **26/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 88/2009**, related to the project entitled "*Studies of the immune regulatory mechanisms related to *Ancylostoma ceylanicum* infection in experimental models*", under the supervisors of **Elida Mara Leite Rabelo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 26, 2009**.

This certificate expires in **August 26, 2014**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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