

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

**NOVAS ABORDAGENS SOBRE A IMUNOBIOLOGIA DA
ASCARIDÍASE LARVAL**

PEDRO HENRIQUE GAZZINELLI GUIMARÃES

BELO HORIZONTE – MG

NOVEMBRO

2014

Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

NOVAS ABORDAGENS SOBRE A IMUNOBIOLOGIA DA ASCARIDÍASE LARVAL

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientadora: Dr^a. Lilian Lacerda Bueno

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2014

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais

-Departamento de Parasitologia-

Prof^a. Dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu

Prof^a. Dr^a. Deborah Negrão Corrêa

Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo

-Departamento de Microbiologia-

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

-Departamento de Bioquímica e Imunologia-

Prof. Dr. Helton Santiago

Universidade Federal de Ouro Preto

-Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas-

Prof^a. Dr^a. Cláudia Carneiro Martins

Prof^a. Dr^a. Paula Vieira

Baylor College of Medicine e Sabin Vaccine Institute – Houston, Texas, EUA

Dr. Peter Hotez

Dr^a. Maria Elena Botazzi

Universidade Federal de Uberlândia

-Departamento de Morfologia-

Prof. Dr. Alexandre Barcelos da Silveira

Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas René Rachou

Dr^a. Soraya Gaze

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar sempre meu caminho e meus atos.

Aos meus pais pelo imenso amor, confiança, por sempre acreditarem no meu futuro, por investirem sem receio algum na minha carreira profissional e por terem tornado esse sonho, real.

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

Aos meus padrinhos Béia e Don, por serem mentores da minha vida pessoal e profissional. Obrigado por sempre incentivarem, vibrarem e acompanharem de perto a minha carreira, mesmo que isso os coloque em lugares como Colômbia, Moçambique e (Qual será a próxima aventura?)

Aos meus irmãos, que sempre se fizeram presente em minha vida e compartilharam dos momentos de vitória e angústia. Agradeço pela torcida e principalmente por tornar nossa família tão unida e amada.

A toda minha família: tios/tias, em especial á tia Rosina e tio Eduardo, primos/primas por ser a melhor família do mundo.

Aos meus amigos de infância e amigos da faculdade, por fazerem tanta questão da minha companhia e da minha amizade, mesmo eu sendo muito enrolado; e por poder contar com vocês todos os dias da minha vida.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara. Obrigado por ter me recebido há seis anos como seu aluno de mestrado e principalmente como seu amigo. Foi um prazer imensurável trabalhar neste projeto novamente ao teu lado. Obrigado pelos ensinamentos, pela confiança, e por acreditar no meu potencial. Espero que a nossa parceria dure muito tempo. É um privilégio tê-lo como mentor e agora como colega.

A minha co-orientadora Lilian Lacerda Bueno, por sempre acreditar no meu potencial e por ter insistido inúmeras vezes para eu começar a trabalhar com *Ascaris*, tema não só desta tese, mas como de minha principal linha de pesquisa atual.

Ao Dr. Helton Santiago e Dr. Thomas B. Nutman por me receberem no National Institute of Health, EUA, para a realização do meu doutorado sanduíche.

Ao Dr. Alan Fenwick, pelo convite e oportunidade de gerenciar o programa de controle da esquistossomose em Moçambique durante o doutoramento.

A todos os colaboradores deste projeto, em especial aos Professores Dr^a Deborah Negrão-Corrêa UFMG, MG; Dr. Flávio Guimarães da Fonseca UFMG, MG, Dr^a Cláudia Carneiro Martins UFOP, MG; Dr^a Paula Vieira UFOP, MG, Dr^a Soraya Gaze FIOCRUZ, MG, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelas sugestões que certamente contribuíram muito para o sucesso deste trabalho.

A banca examinadora da minha defesa de Tese de Doutorado, Dr. Stefan Michael Geiger UFMF, MG; Dr^a Josiane Barçante UFLA, MG; Dr^a Cristina Fonseca FIOCRUZ, MG, Dr. Cristiano Massara FIOCRUZ, MG, pela imensa contribuição para o melhoramento da minha tese, pelo elevado nível de discussão e pelo resultado final.

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

Aos colegas e amigos do Departamento de Parasitologia, por terem me recebido de forma tão carinhosa e amistosa na UFMG.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial à Coordenação, à querida Sumara e querida Sibebe, pela oportunidade, pelo apoio e pelo imenso carinho.

Aos Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, Prof. Giovanni Gazzinelli, Dr^a Andréa Teixeira e Dr^a Denise Lemos pela amizade e pelos excelentes ensinamentos durante a iniciação científica no Centro de Pesquisas René Rachou. Vocês foram fundamentais para a minha formação. Obrigado!

A Clari pela imensa disponibilidade, ajuda e pelo carinho especial.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do CPqRR, pelo agradável convívio durante a iniciação científica.

Às agências financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG por tornarem este projeto viável.

Aos pacientes e animais estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

Aos meus pais, irmãos e padrinhos

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2. OBJETIVO GERAL.....	12
CAPÍTULO 1: Aspectos parasitológicos e imunológicos da ascaridíase larval.....	13
1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1. Comitê de Ética.....	16
2.2. Parasitos.....	16
2.3. Embrionamento dos ovos <i>in vitro</i>	17
2.4. Teste de infectividade dos ovos.....	17
2.5. Infecção experimental.....	18
2.6. Histologia do pulmão de camundongos infectados por <i>A. suum</i> durante a migração das larvas pelo órgão.....	20
2.7. Perfil de citocinas no pulmão de camundongos infectados por <i>A. suum</i> durante a migração das larvas pelo órgão.....	20
2.8. Perfil de citocinas sistêmicas de camundongos infectados por <i>A. suum</i> durante a migração larval.....	21
2.9. Análise estatística dos dados.....	22
3. RESULTADOS.....	24

3.1.	Embrionamento in vitro de ovos de <i>A. suum</i>	24
3.2.	Infectividade dos ovos de <i>A. suum</i> em função do tempo de embrionamento <i>in vitro</i>	25
3.3.	Influência da idade do hospedeiro na carga parasitária.....	27
3.4.	O perfil de migração das larvas de <i>A. suum</i>	28
3.5.	Comparação entre a infecção experimental por <i>A. suum</i> e <i>A. lumbricoides</i>	29
3.6.	Alterações histológicas do pulmão de camundongos BALB/c durante a migração das larvas de <i>A. suum</i> pelo órgão.....	30
3.7.	Caracterização da resposta imunológica da ascaridíase larval experimental: perfil de citocinas teciduais e sistêmicas.....	33
4.	DISCUSSÃO.....	38

CAPÍTULO 2: Avaliação da resposta imune celular, com ênfase no papel dos eosinófilos, na ascaridíase larval.....	46
--	----

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	47
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
2.1. Comitê de ética.....	50
2.2. Parasitos.....	50
2.3. Camundongos.....	50
2.4. Análise parasitológica.....	51
2.5. Análise hematológica.....	51
2.6. Análise imunopatológica do pulmão de camundongos BALB/c WT e GATA infectados, durante a migração das larvas pelo órgão.....	52
2.7. Análise estatística.....	56
3. RESULTADOS.....	57

3.1.	A ascaridíase larval é marcada por uma eosinofilia periférica e tecidual.....	57
3.2.	A ausência de eosinófilos está associada com o aumento da carga parasitária na ascaridíase larval.....	58
3.3.	Camundongos deficientes em eosinófilos apresentam uma importante redução na resposta inflamatória pulmonar durante a migração das larvas de <i>A. suum</i>	61
3.4.	A ausência de eosinófilos regula negativamente a ativação da resposta imune celular inata na inflamação pulmonar causada pela migração das larvas de <i>A. suum</i>	63
3.5.	As produções de TNF e peroxidase eosinofílica dependentes de eosinófilos estão elevadas durante a ascaridíase pulmonar e estão associadas com o remodelamento tecidual do pulmão após a migração das larvas.....	65
4.	DISCUSSÃO.....	71

CAPÍTULO 3:	Influência da ascaridíase larval na resposta imunológica de camundongos concomitantemente infectados por <i>Vaccinia virus</i>	80
-------------	--	----

1.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	81
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
2.1.	Comitê de Ética.....	83
2.2.	Parasitas.....	83
2.3.	Vírus.....	83
2.4.	Camundongos e infecção experimental.....	84
2.5.	Análise estatística dos dados.....	89
3.	RESULTADOS.....	91
3.1.	A migração das larvas de <i>A. suum</i> induz uma grave morbidade/mortalidade em animais concomitantemente infectados por <i>Vaccinia virus</i>	91

3.2. A migração das larvas de <i>A. suum</i> aumenta significativamente a carga viral de VACV nos pulmões de animais coinfectados.....	93
3.3. A ascaridíase larval modula negativamente a resposta imune específica ao VACV.....	94
3.4. As células inflamatórias e o perfil de citocinas no tecido pulmonar estão alterados durante a coinfeção por <i>A. suum</i> e VACV.....	97
3.5. A infecção concomitante por VACV está associada a um aumento na resistência da infecção por <i>A. suum</i>	100
4. DISCUSSÃO.....	102
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
4. PERSPECTIVAS.....	109
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
6. ANEXOS.....	133
6.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	
6.2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	
6.3. DEPÓSITO DE PATENTE	

LISTA DE ABREVIATURAS

BALF – lavado broncoalveolar	HIV – Vírus da Imunodeficiência humana
BSA – Albumina bovina sérica	IL – Interleucina
CD4 – Marcador de superfície celular de linfócitos T	ILC – <i>innate lymphoid cells</i> “células linfóides inatas”
CD8 – Marcador de superfície celular de linfócitos T	IFN- γ – Interferon gama
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação animal	PE - Ficoeritrina
DALYs - <i>disability-adjusted life years</i>	PerCP –Proteína Clorofila Piridina
DP – Desvio Padrão	RPMI 1640 – Meio de cultivo celular
DTN – Doenças tropicais negligenciadas	PBS – Tampão Fosfato Salínico
EDTA - Etilenodiaminotetracético	PBS W – Tampão Fosfato Salínico de lavagem
ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay	PBS P – Tampão Fosfato Salínico Permeabilizante
EM – Erro da média	p.f.u – <i>plates forming units</i> “unidades formadoras de placas”
EPO – peroxidase eosinofílica	TNF- α – Fator de necrose tumoral do tipo α
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade	TGF- β – Fator de crescimento tumoral do tipo β
MPO - mieloperoxidase	WHO – Organização Mundial de Saúde
FITC – Isotiocianato de fluorescência	VACV – <i>Vaccinia virus</i>

TH1 – Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

TH2 – Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

WT – *wild type* “selvagem”

Δ dblGATA – camundongos deficientes em eosinófilos

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Aspectos parasitológicos e imunológicos da ascaridíase larval

- Figura 1:** Embrionamento dos ovos de *A. suum* em função do tempo em cultura com solução de ácido sulfúrico a 0,2M.....25
- Figura 2:** Infectividade dos ovos de *A. suum* em função do tempo de embrionamento.26
- Figura 3:** Influência da idade do hospedeiro na carga parasitária de *Ascaris suum*.....27
- Figura 4:** Caracterização completa da migração das larvas de *A. suum* em camundongos BALB/c.....29
- Figura 5:** Comparação entre infecção experimental por *A. suum* e *A. lumbricoides*.....30
- Figura 6:** Análise histológica dos pulmões de camundongos BALB/c não infectados e com diferentes tempos de infecção por *A. suum*.....32
- Figura 7:** Perfil de citocinas nos pulmões de camundongos BALB/c durante a migração das larvas de *Ascaris suum* pelo órgão.....35
- Figura 8:** Perfil de citocinas sistêmicas em camundongos BALB/c com ascaridíase larval.....37

Capítulo 2: Avaliação da resposta imune celular, com ênfase no papel dos eosinófilos, na fase inicial da infecção por Ascaris sp.

- Figura 1:** Quantificação de eosinófilos na circulação periférica e no tecido pulmonar durante a ascaridíase larval.....58
- Figura 2:** Análise parasitológica de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a ascaridíase larval.....60
- Figura 3:** Avaliação histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão.....62

Figura 4: Produção de IL-6 e MPO nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de <i>A. suum</i> pelo órgão.....	64
Figure 5: Produção de TNF nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de <i>A. suum</i> pelo órgão.....	66
Figure 6: Produção de EPO nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de <i>A. suum</i> pelo órgão.....	67
Figura 7: Fotografia representativa da análise da inflamação e fibrose pulmonar durante a ascaridíase larval.....	69
Figura 8: Hipótese sobre o papel dos eosinófilos durante a ascaridíase larval.....	73

Capítulo 3: *Influência da ascaridíase larval na resposta imunológica de camundongos concomitantemente infectados por Vaccinia virus*

Figura 1. Avaliação da morbidade e mortalidade de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por <i>A. suum</i> e coinfectados por VACV e <i>A. suum</i>	92
Figura 2: Carga viral dos pulmões de camundongos monoinfectados por VACV e coinfectados por VACV e <i>A. suum</i>	93
Figure 3: Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ em camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por <i>A. suum</i> e coinfectados por VACV e <i>A. suum</i>	94
Figura 4: Frequência de citocinas T _H 1, T _H 2 e regulatórias em linfócitos T CD4 ⁺ de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por <i>A. suum</i> e coinfectados por VACV e <i>A. suum</i>	96

Figura 5: Análise morfométrica dos pulmões de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*.....98

Figura 6: Produção de IL-6 e IFN- γ nos pulmões de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*.....99

Figura 7: Quantificação do número total de larvas de *A. suum*, no fígado, pulmões e intestino delgado, durante a coinfeção por VACV.....101

RESUMO

Estudos relacionados aos aspectos imunobiológicos da infecção por *Ascaris* sp. continuam escassos, principalmente aqueles que objetivam elucidar os eventos imunológicos da fase inicial da infecção, denominada ascaridíase larval. Neste trabalho, foi demonstrada uma nova padronização para a infecção experimental e os principais aspectos sobre a imunopatologia pulmonar causada pela migração das larvas de *Ascaris* sp. Além disso, a resposta imune celular, com ênfase no papel dos eosinófilos no controle da carga parasitária e patogênese da inflamação pulmonar foi avaliada, utilizando camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA) como estratégia experimental. Por fim, a coinfeção com o *Vaccinia virus* (VACV) respiratório foi realizada como um modelo de inflamação pulmonar que objetivou a avaliação da influência da migração das larvas de *Ascaris* spp. em um microambiente inflamatório já estabelecido nos pulmões dos animais e a capacidade da ascaridíase larval em alterar o percurso de infecções virais respiratórias. Os principais resultados deste trabalho sugerem que o modelo de proteção na ascaridíase larval seja mediado por uma intensa resposta inflamatória inata, caracterizada inicialmente pela ativação de eosinófilos por meio da produção de IL-5 por células pulmonares residentes. Estes eosinófilos, por sua vez, são responsáveis em ativar e potencializar a resposta imune celular inata, principalmente neutrófilos, que são responsáveis em produzir IL-6 e MPO, aumentando a inflamação pulmonar. A intensa inflamação tecidual reduz o número de larvas de *Ascaris* spp. no pulmão, mas por outro lado, provoca lesão e perda de função no tecido pulmonar. Por essa razão, após a migração das larvas pelos pulmões, os eosinófilos produzem TNF e EPO que irão participar ativamente no processo de cicatrização e remodelamento do tecido pulmonar lesado. Esta hipótese de proteção para a ascaridíase larval foi comprovada por meio da utilização de um modelo de inflamação pulmonar

induzido pelo VACV respiratório e subsequente associação à infecção concomitante por *A. suum*. Em conclusão, os novos aspectos apresentados sobre a ascaridíase larval possibilitaram um melhor entendimento sobre os eventos imunopatológicos associados à proteção na ascaridíase larval, os quais contribuirão para futuros estudos direcionados a ensaios de imunoprofilaxia e imunização.

ABSTRACT

Studies related to the immunobiological aspects of an *Ascaris* spp. infection are still scarce, especially those that aim to elucidate the early events of the immune response. In this study, we demonstrated a novel standardized method for early experimental *Ascaris* infection, using a murine model, and we evaluated the main aspects about the lung immunopathology induced by the *Ascaris* larvae migration. Besides that, the innate immune response, highlighting the role of eosinophils in the control of parasitic burden and into the pathogenesis of lung inflammation was evaluated, using an eosinophil-deficient mice model (Δ dblGATA mice). Finally, a coinfection model by respiratory *Vaccinia virus* (VACV) and pulmonary ascariasis was performed in order to evaluate the impact of *Ascaris* larvae migration through an inflammatory microenvironment, and to evaluate the capacity of larval ascariasis on alter the course of viral infection. The main findings of this study suggest that the protective immunity against larval ascariasis is mediated by an intense innate inflammatory response, characterized by the activation of eosinophils by IL-5 producing innate lymphoid cells. These eosinophils are responsible to potentiate the innate immunity, activating neutrophils, which produce IL-6 and MPO, increasing the lung inflammation. This lung inflammation decreases the number of migrating larvae, however causes tissue damage and fibrosis. To restore lung homeostasis, eosinophils start to produce TNF and EPO, which are involved in the lung remodeling and repairing after larvae migration. This hypothesis on the mechanisms of protection against larval ascariasis was supported by the experiments of coinfection with VACV and *A. suum*. The results revealed that the increase of lung inflammation induced by the airway concomitant infection was responsible to reduce consistently the number of migrating larvae through the lungs of coinfecting mice. Taken together, the novel aspects of

Ascaris infection presented here enabled a better understanding of the immunopathological events during larval migration, providing insight for further studies focused on immunization and immunoprophylactic assays.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) formam um grupo de doenças crônicas causadas por diversos agentes infecciosos (parasitos, bactérias, fungos e vírus), que acometem principalmente pessoas de baixo nível socioeconômico residentes em países em desenvolvimento (Hotez, 2008). Estas doenças persistem endemicamente ao longo das últimas décadas, inicialmente devido a um descaso político geral em relação ao mundo subdesenvolvido e, atualmente, devido à centralização de investimentos globais para o controle da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), tuberculose e malária (Feasey et al., 2010).

Dentre as principais DTN destacam-se as doenças parasitárias cuja distribuição é cosmopolita e, atualmente, estima-se que mais de um quinto da população mundial, cerca de 1,5 bilhão de pessoas, esteja infectada por parasitos. Os principais países afetados são aqueles em desenvolvimento localizados na Ásia, América Latina, Caribe e África subsaariana (Hotez e Kamath, 2009). Nestas regiões destaca-se como mais prevalente parasito o geohelminto nematódeo *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus 1758), pertencente a ordem Ascaridida, família Ascaridae, causador da ascaridíase humana.

Recentes estimativas do “Global Burden of Disease Study 2010” (GBD 2010) indicam que aproximadamente 800 milhões de pessoas estejam com ascaridíase em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento da África subsaariana, América Latina, China e leste asiático (Hotez et al., 2014). Este parasito é considerado o principal causador de doenças em áreas de pobreza no mundo (Hotez et al., 2014). De acordo com Hotez et al., (2008), aproximadamente 84 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 500 milhões vivem em áreas de risco em 27 países da América Latina. Na África subsaariana, aproximadamente 25% da população (173 milhões de

peessoas) está infectada (Hotez, 2009) e, no sudeste asiático, a prevalência é superior a 60%. Nos Estados Unidos, quatro milhões de casos já foram registrados, sendo concentrados nos imigrantes de regiões tropicais e subtropicais do globo (Murrell et al., 1997). Na Europa, estudos realizados em adultos e crianças demonstraram que existam áreas cuja prevalência pode variar de 1 a 69%, como a Albânia e a Turquia, respectivamente (Hotez et al., 2011).

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

A fase inicial larval da ascaridíase inicia-se poucas horas após a infecção por via oral pelo *A. lumbricoides*, por meio da ingestão de ovos completamente embrionados, que apresentam a larva infectante (L3) no seu interior. A eclosão das larvas e, conseqüentemente a liberação das larvas infectantes no lúmen intestinal do hospedeiro marcam o início da fase aguda da doença. Uma vez livres no intestino delgado, as larvas infectantes migram e penetram ativamente na mucosa intestinal na altura do cólon proximal ou do ceco (Murrell et al., 1997). Em seguida, são carreadas até o fígado pela circulação portal e subseqüentemente aos pulmões, onde saem da circulação e migram para o parênquima adjacente e atingem os espaços alveolares (Dold e Holland, 2011).

Essa migração das larvas pelas vias aéreas do hospedeiro, também conhecida como Ciclo de Loss, é uma fase crucial para o ciclo de vida do parasito, mas ainda pouco estudada. A falta de um diagnóstico específico para a ascaridíase larval, a limitação ética em estudos envolvendo experimentação humana e a falta de um modelo

experimental padronizado torna essa doença uma grande incógnita para a parasitologia atual.

Como ocorre na maioria das infecções helmínticas, a migração pulmonar das larvas de *Ascaris* spp., induz uma intensa resposta inflamatória eosinofílica no local da migração, produzindo uma gama de manifestações clínicas, como asma, dispneia, broncoespasmos, tosse, febre e dor substernal, conhecida como síndrome de Loeffler (Chitkara; Krishna, 2006, Hirakawa et al., 2009; Hoenigl et al., 2011). Essa resposta pode levar a graves distúrbios respiratórios nos indivíduos infectados. (Beaver, 1975; Spillmann, 1975; Pawlowski et al., 1982). É importante ressaltar que a caracterização da resposta inflamatória e o papel dos eosinófilos na ascaridíase pulmonar são temas desta tese e serão extensivamente abordados ao longo do trabalho, que se inicia com a padronização de um modelo experimental para possibilitar essa avaliação.

Ao término da migração hepato-traqueal, as larvas sobreviventes às inúmeras barreiras imunológicas - dentre elas: mucosa intestinal, resposta celular e humoral periférica e inflamação hepática/pulmonar - ascendem a árvore brônquica, passam pela traqueia e movem-se para a faringe. Neste local, induzem um reflexo de tosse no hospedeiro e são deglutidas novamente para o sistema digestório onde se desenvolvem para larva de quarto estágio L4. Em seguida, estas atingem o estágio de adultos e, no intestino delgado, maturam-se sexualmente em machos e fêmeas, iniciando a fase intestinal da infecção que pode perdurar por vários anos (Dold; Holland, 2011, Crompton, 2001).

Embora crônica, e na maioria dos casos não letal e assintomática para o hospedeiro, a fase intestinal da ascaridíase apresenta uma considerável importância na saúde pública. A forma grave da infecção, que afeta anualmente cerca de 8 - 15% dos infectados, é restrita aos indivíduos com elevada carga parasitária. Esta forma da doença

está associada a um quadro de distensão abdominal, de náuseas, de diarreias e pode ser fatal devido a um quadro de obstrução intestinal pelos vermes adultos (Chan, 1997). Todos os anos, este fenômeno é responsável por aproximadamente 20.000 mortes no mundo (Khuroo et al. 1996).

Por outro lado, a infecção leve-moderada recorrente pelo *A. lumbricoides* é mais frequente e está associada a um retardo no crescimento linear assim como na função cognitiva (Dickson et al., 2000; O'Larcain e Holland, 2000). Além disso, pode contribuir consideravelmente para a má-nutrição de crianças residentes em regiões endêmicas (Crompton, 2001).

A morbidade da ascaridíase é estimada em 10.5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade, superando todas as outras geohelmintoses e a esquistossomose (Chan, 1997 – indicativo do índice DALYs “disability-adjusted life years”).

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

Para muitos pesquisadores, *Ascaris lumbricoides* e *A. suum* são considerados macroscopicamente, morfologicamente, e “biologicamente” indistinguíveis. Contudo,

ao longo da história, esses nematódeos foram considerados espécies distintas, com base em observações epidemiológicas, diferenças em infecções experimentais e principalmente em distinções anatômicas dos dentículos das cápsulas bucais (Sprent, 1952). Entretanto, a discussão que considera essas espécies sinônimas se fortaleceu a partir de inúmeras evidências do caráter antropozoonótico de *A. suum* (Takata, 1951; Anderson, 1995; Nejsun et al., 2005; Arizono et al., 2010; Nejsun et al., 2012), e do potencial zooantroponótico confirmado de *A. lumbricoides* (Galvin, 1968). Com isso essa proposta ganhou muita credibilidade quando Liu et al., em 2012, forneceram evidências genéticas, a partir da análise de DNA mitocondrial, que *A. lumbricoides* e *A. suum* possivelmente são a mesma espécie.

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

Estratégias para intervenções profiláticas contra a ascaridíase humana são limitadas, uma vez que o sistema de educação em saúde e saneamento básico nas regiões endêmicas para a doença são extremamente precários, o que resulta em elevadas taxas de reinfecção após tratamento específico (Jia et al., 2012). Somado a esse fator, o diagnóstico padrão para a ascaridíase é limitante: até hoje continua baseado na detecção

de ovos do parasito por meio de técnicas de concentração dos exames parasitológicos de fezes (Lutz, 1919; Hoffman et al., 1934; Ritchie, 1948). Tais métodos não diagnosticam a fase larval da infecção e o indivíduo permanece infectado por aproximadamente 60 dias, período pré-patente da ascaridíase, até começar a eliminar ovos nas fezes e ser passível de diagnóstico. O diagnóstico precoce durante esse prolongado período pré-patente poderia prevenir que crianças infectadas desenvolvessem morbidades relacionadas a infecção larval. Além disso, a ascaridíase larval induz sintomas inespecíficos, o que pode ser confundido com as manifestações clínicas de inúmeras outras infecções agudas. Por essa razão, estudos sorológicos e moleculares são necessários com o objetivo de desenvolver uma alternativa de diagnóstico mais sensível, específico, barato, eficaz para detectar a fase inicial da infecção, menos laborioso e ser realizado em larga escala no campo. No entanto, ainda existe uma grande negligência e lacuna no conhecimento sobre o proteoma e transcriptoma dos diferentes estágios evolutivos do *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*, o que atrasa consideravelmente o desenvolvimento de novas técnicas profiláticas, como vacinas, e o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico.

Com relação à resposta imunológica contra o *A. lumbricoides* em humanos, o que se sabe é oriundo de estudos referentes à fase crônica da infecção. A ascaridíase humana crônica é caracterizada por uma significativa eosinofilia periférica e tecidual, baixa proliferação linfocítica e significativa modulação da resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) (Jackson et al., 2004). Além disso, diversos estudos ressaltam o importante papel da imunidade celular e humoral na resposta anti-helmíntica desenvolvida pelo hospedeiro, caracterizada principalmente pela participação de citocinas Th2 (IL-5, IL-4 e IL-13) e regulatórias (IL-10 e TGF- β), além de elevados níveis de IgE total e específica (Palmer et al., 1995). Foi demonstrado que a citocina IL-5 humana (importante mediador na

resposta induzida por eosinófilos) apresenta uma forte correlação negativa com a reinfecção à nematódeos gastrointestinais (Jackson et al., 2004), o que sugere que a citocina IL-5 seja importante na fase inicial da infecção para a eliminação dos estágios larvais do parasito e não quando ocorre o estabelecimento dos vermes adultos no intestino do hospedeiro (Maizels e Balic, 2004).

Atualmente, sabe-se que o desenvolvimento das respostas Th2 e regulatória (Treg) nas infecções helmínticas é concomitante com a modulação da resposta Th1 (Mendez et al., 2005; Fujiwara et al., 2006; Geiger et al., 2007), considerada crucial para o controle imunológico de inúmeras infecções virais, bacterianas ou por protozoários. Além disso, essas respostas podem induzir uma hiporresponsividade inespecífica no hospedeiro capaz de reduzir a eficácia vacinal a patógenos intra ou extracelulares (Elias et al., 2001). Estudos imunoepidemiológicos sugerem que a coinfeção por helmintos tem um grande potencial em influenciar o percurso de infecções virais, ou por protozoários, principalmente àqueles cujo prognóstico promissor depende de um balanço da resposta imune Th1/Th2 (Borkow & Bentnich, 2002). Usando esses trabalhos como justificativa, e na tentativa de elucidar os mecanismos imunopatológicos de como os helmintos alteram o percurso de infecções virais, a presente tese também discutirá a influência da infecção por *A. suum* na modulação da resposta imune da infecção causada pelo vírus *Vaccinia*.

Não obstante, diversos trabalhos apontam a importante influência das infecções helmínticas, principalmente a ascaridíase devido a sua predominante prevalência mundial, na progressão das manifestações alérgicas. As alergias são desordens inflamatórias cujo desenvolvimento se deve a fatores ambientais, nutricionais e genéticos (Santiago et al., 2011; Warner, 2007). A incidência das alergias nos centros urbanos está cada vez maior (o que também é observado para o uso indiscriminado de

antibióticos e anti-helmínticos) e uma possível explicação para tal fenômeno é a hipótese da higiene. Esta hipótese sugere que a exposição das crianças a agentes microbianos, dentre eles: os helmintos, durante a infância, é fundamental para a proteção contra o desenvolvimento das doenças alérgicas (Liu & Leung, 2006). Entretanto, o papel das infecções helmínticas na hipótese da higiene é intrigante e merece ser elucidado. Atualmente, mais de três bilhões de pessoas em todo mundo, estão infectadas por helmintos ou sofrem de doenças alérgicas, tais como asma brônquica, rinite alérgica, alergia associada à alimentação ou eczema (Pawankar et al., 2012; Hotez et al., 2007). Uma característica comum a estas duas condições patológicas é o desenvolvimento da resposta imunológica do tipo 2 (Paul & Zu, 2010). Esta resposta Th2 que confere proteção nas infecções helmínticas também exerce um importante papel na fisiopatogênese das doenças alérgicas (Pulendran e Artis, 2012).

Cooper e colaboradores (2003) demonstraram que crianças residentes em regiões endêmicas infectadas por helmintos apresentam menores riscos de manifestarem alergias quando comparadas com crianças não parasitadas da mesma região. Estudos imunoepidemiológicos sugerem que as infecções helmínticas modulam a resposta de doenças alérgicas por meio da produção de IL-10 parasito-específica e pelo aumento na frequência de células T regulatórias (Metenou et al., 2010; Mitre et al., 2008; Yazdanbakhsh et al., 2005). Por outro lado, outros estudos mostraram que a infecção por helmintos gastrointestinais está associada com o aumento da incidência de manifestações alérgicas (Dold et al., 1998; Hunninghake et al., 2007; Palmer et al., 2002). Além disso, Leonardi-Bee e colaboradores (2006) sugeriram em uma meta-análise com 30 casos clínicos que a infecção pelo *A. lumbricoides* agrava os sintomas clínicos de pacientes asmáticos. Uma relevante explicação para o aumento da incidência das atopias devido às infecções helmínticas é a reatividade cruzada já comprovada entre

proteínas de helmintos e proteínas de alérgenos (ácaros e baratas) (Caraballo e Acevedo, 2011; Santos et al., 2008). Acevedo e colaboradores (2009) demonstraram a reatividade cruzada da Imunoglobulina E de pacientes asmáticos com a tropomiosina de *Ascaris* sp. Embora a reatividade cruzada entre tropomiosinas tenha sido o principal alvo de estudo na hipótese da higiene nos últimos anos, diversas outras proteínas alergênicas têm elevado grau de identidade com proteínas de *Ascaris* sp., as quais também podem ter importante papel na sensibilização cruzada (Santiago et al., 2012).

Diante o exposto, é notável que trabalhar com ascaridíase nos dias atuais é algo expressivamente necessário pelos diversos caminhos obscuros sobre a doença que ainda não foram elucidados. Sendo assim, essa tese de doutorado direcionada à ascaridíase e aos agentes *A. lumbricoides* e *A. suum*, justifica-se pela relevância epidemiológica em questão e conseqüentemente pelos inúmeros impactos negativos na saúde pública de áreas endêmicas; pela falta de estudos relacionados aos eventos imunopatológicos da fase larval da infecção devido à ausência de um modelo experimental padronizado; e pela necessidade de se compreender e elucidar a influência da infecção por *Ascaris* em prováveis coinfeções.

Esses temas serão abordados nesta tese em forma de três capítulos descritos a seguir.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os eventos imunopatológicos da fase inicial da infecção por *Ascaris* spp. com a finalidade de caracterizar a resposta imunológica protetora da infecção e identificar as populações celulares e mediadores inflamatórios envolvidos no controle e patogênese da ascaridíase larval.

CAPÍTULO 1

Aspectos parasitológicos e imunológicos da ascaridíase larval

Publicado:

Gazzineli-Guimarães et al. Parasitological and immunological aspects of early Ascaris spp. infection in mice. International Journal for Parasitology 43 (2013) 697–706

(Anexo 1)

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Novos estudos relacionados aos aspectos biológicos da infecção por *Ascaris* spp. certamente contribuiriam para o desenvolvimento de estratégias de profilaxia e descobertas de novos alvos terapêuticos, que bloqueiem ou interrompam o estabelecimento da infecção crônica. Entretanto, as limitações das técnicas atuais de diagnóstico, restritas a fase intestinal da doença; somada a dificuldade de se avaliar *in situ* a ascaridíase larval humana por questões éticas e óbvias; e principalmente a falta de modelos experimentais padronizados, tornam a ascaridíase larval desconhecida e negligenciada.

Embora *Ascaris sp.* tem sido usado ao longo dos anos em modelos de roedores (Massara et al, 1990; Slotved et al, 1998; Enobe et al, 2006; Lewis et al, 2006), os aspectos imunopatológicos da infecção experimental com este parasito ainda são pouco conhecidos. A utilização de um modelo experimental murino para a infecção por *Ascaris* spp., por exemplo, poderia ajudar no entendimento da infecção, uma vez que este modelo murino pode fornecer informações detalhadas sobre a biologia da infecção pelas larvas de *Ascaris* spp. Além disso, este modelo mimetiza os eventos biológicos que ocorrem na fase inicial da infecção nos hospedeiros naturais (Murrell et al, 1997; Slotved et al, 1998).

Nesse contexto, o objetivo do primeiro capítulo desta tese foi aperfeiçoar a padronização do modelo experimental murino e caracterizar os aspectos parasitológicos e imunológicos da fase inicial da infecção por *Ascaris* spp.. Objetivamos estudar a infectividade de ovos embrionados em condições de cultura *in vitro*, bem como a influência da idade do hospedeiro no desenvolvimento da infecção. Além disso,

caracterizamos aspectos da imunopatologia da ascaridíase larval, com foco na resposta imune celular e na histopatologia durante a fase pulmonar da infecção pelo parasito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Comitê de Ética

A manutenção e o uso de animais foram realizados em suma concordância com as recomendações do COBEA. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Protocolo # 45/2012) (Anexo 2).

2.2. Parasitos

Vermes adultos de *Ascaris suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte (Latitude: 19°51'57.09"S e Longitude 43°55'51.13"O), Minas Gerais, Brasil. Os vermes adultos de *Ascaris lumbricoides* foram coletados em fezes de indivíduos infectados residentes em Belo Horizonte e Januária, cidades do estado de Minas Gerais, que expeliram os espécimes naturalmente e doaram os mesmos para o estudo. Os vermes adultos fêmeas foram mantidos em PBS e levados para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais para serem processados.

A identificação e comprovação da espécie em questão foram confirmadas pelo uso de um conjunto de primers espécie-específico desenvolvido pelo nosso grupo no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos e patenteados pela Universidade Federal de Minas Gerais (Composição, Processo, Uso e Kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris* – Anexo 3).

2.3. Embrionamento dos ovos *in vitro*

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

2.4. Teste de infectividade dos ovos

A infectividade dos ovos de *A. suum* foi avaliada em função do tempo de embrionamento, pela infecção experimental em camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) (Boes et al., 1998). A infectividade dos ovos foi avaliada a cada cinco dias de cultura a partir do 20º dia até o 50º dia de embrionamento. Considerando estes tempos, a infectividade dos ovos foi testada nas culturas de ovos com 100, 200, 300 e 400 dias de embrionamento. Para cada tempo de embrionamento, seis camundongos foram infectados por via intra-gástrica, com 0,2 mL de suspensão de ovos, contendo 2500 ovos embrionados, seguidos por 0,1 mL de água para lavar os ovos remanescentes na agulha de gavagem. Antes da inoculação, foi realizado um protocolo para o

enriquecimento dos ovos totalmente embrionados com finalidade de garantir a eficácia máxima da infecção experimental. Os ovos de *Ascaris* spp. oriundos da cultura *in vitro*, foram incubados com 5% de hipoclorito de sódio por 2 horas em estufas a 37° C, 5% de CO₂ e posteriormente centrifugados a 400 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, os ovos não embrionados formaram um pellet e os ovos totalmente larvados ficaram no sobrenadante. O sobrenadante foi coletado e os ovos lavados cinco vezes com PBS. O hipoclorito de sódio dissolve a camada externa dos ovos, facilitando a eclosão das larvas.

Oito dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados com dose letal de anestésico (Cetamina 120mg/Kg e Xilazina 45mg/Kg). Os pulmões dos animais foram coletados, picotados com tesoura cirúrgica e colocados em um aparato de Baermann modificado por Morais (1948), por 4 horas em PBS a 37°C. As larvas foram recuperadas no pellet do aparato, fixadas em formalina 10% e quantificadas por microscopia óptica.

2.5.1. Infecção experimental

2.5.1. Influência da idade do hospedeiro na infecção inicial por *A. suum*

Para avaliar a influência da idade do hospedeiro na infecção larval por *Ascaris suum*, foram utilizados 12 camundongos BALB/c (machos), sendo seis com oito semanas de vida e os outros seis com 16 semanas de vida. Todos os animais foram infectados por via intra-gástrica, por gavagem, com 2500 ovos embrionados em 150 dias em cultura com H₂SO₄. A carga parasitária (medida usada para avaliar a influência da idade do hospedeiro na infecção) foi avaliada baseada no número total de larvas

recuperadas nos pulmões dos animais após oito dias de infecção, como descrito no item 2.3 deste capítulo.

2.5.2. Caracterização da migração das larvas de *A. suum* em camundongos BALB/c

Oitenta e quatro camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) foram infectados exatamente conforme descrito no item 2.4.1. Seis camundongos foram eutanasiados por dia, a partir do primeiro dia até o décimo quarto dia de infecção. O número de larvas no intestino grosso, fígado, pulmão e intestino delgado foram quantificados para cada tempo de infecção, usando o aparato de Baermann modificado (Morais, 1948) para recuperação das larvas, conforme já descrito no item 2.3.

2.5.3. Comparação da infecção experimental por *A. suum* e *A. lumbricoides*

Foram infectados seis camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) por *A. suum* e seis camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) por *A. lumbricoides*, com a finalidade de avaliar se a padronização da infecção experimental por *A. suum* também é válida para a espécie *A. lumbricoides*. Dessa forma, a infecção para ambas as espécies foi realizada usando a metodologia padronizada anteriormente para *A. suum*. Entretanto, devido à dificuldade de se obter vermes adultos e conseqüentemente a menor disponibilidade de produzir ovos embrionados de *A. lumbricoides*, a infecção por ambas as espécies foi realizada com 1000 ovos embrionados ao invés de 2500 ovos embrionados como mencionado anteriormente. Em seguida, foi comparada a carga parasitária nos pulmões dos animais após oito dias de infecção.

2.6. Histologia do pulmão de camundongos infectados por *A. suum* durante a migração das larvas pelo órgão

Dezoito camundongos foram infectados por *A. suum* conforme descrito no item 2.3. Destes, seis foram eutanasiados aos oito, seis aos dez e seis aos doze dias de infecção. Para cada tempo avaliado, os pulmões dos animais foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada 10%. Em seguida, os tecidos foram gradualmente desidratados em etanol (70%, 90%, 100%), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados a 4-5 μM de espessura e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina para avaliação das alterações histológicas provocadas pela migração das larvas. A coloração por Tricromo de Masson também foi realizada para a avaliação da deposição de fibras de colágeno. Todas as imagens dos cortes histológicos foram coletadas por um microscópio ótico para a avaliação das alterações histológicas induzidas pela migração das larvas de *A. suum* (Leica DM5000). Seis camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) não infectados, foram usados como grupo controle.

2.7. Perfil de citocinas no pulmão de camundongos infectados por *A. suum* durante a migração das larvas pelo órgão

O perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 foi avaliado nos pulmões de camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos), durante o processo de migração das larvas de *A. suum* pelo órgão. Vinte e quatro camundongos foram infectados conforme descrito no item 2.3 e seis foram subsequentemente eutanasiados após quatro, oito, dez e doze

dias de infecção. Seis camundongos não infectados (tempo zero) foram usados como grupo controle. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-17A foram quantificadas por citometria de fluxo usando o kit CBA *Cytometric Bead Array* (CBA – BD Biosciences, EUA), e a citocina IL-5 foi quantificada pela técnica de ELISA (R&D Systems, EUA). Basicamente, os pulmões dos animais foram removidos nos diferentes tempos e condições de infecção, macerados por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) em 1 mL de PBS suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. Em seguida o homogenato de pulmão foi centrifugado a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração das citocinas.

2.8. Perfil de citocinas sistêmicas de camundongos infectados por *A. suum* durante a migração larval

Para a avaliação do perfil de citocinas sistêmicas na infecção larval por *A. suum*, as citocinas intracitoplasmáticas IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β produzidas por linfócitos T CD4⁺ oriundos do baço dos animais, foram avaliadas por citometria de fluxo.

Dez camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) infectados por *A. suum* conforme descrito no item 2.3 foram eutanasiados após oito dias de infecção e dez camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) não infectados, foram usados como grupo controle. Os baços foram removidos dos animais em capela de fluxo laminar e transferidos imediatamente para meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10%, L-glutamina 1,6% e antibiótico

penicilina/estreptomicina 3% (Invitrogen, EUA). Para purificar os esplenócitos, os órgãos foram mecanicamente macerados e o produto da maceração foi filtrado a 70 μ M (BD Falcon, EUA). Em seguida, os esplenócitos purificados foram incubados com Brefeldina A (Sigma, EUA) por quatro horas e posteriormente os eritrócitos foram lisados por solução de cloreto de amônio 0,15 M por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a lise, os esplenócitos (1×10^7) foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo monoclonal de superfície CD4, conjugado com FITC (BD Biosciences, EUA) por 30 minutos, ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS-W (albumina sérica bovina – BSA 0.5% e azida sódica 0,1%) por 10 minutos a 400 x g. Em seguida foram permeabilizadas com PBS-P (albumina sérica bovina – BSA 0,5%, azida sódica 0,1% e saponina 0,5%) por dez minutos. Após a permeabilização, 1×10^6 esplenócitos purificados, marcados com anticorpo de superfície anti-CD4 e permeabilizados, foram transferidos para tubos de poliestirenos (BD, Biosciences, EUA), contendo anticorpos anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-TGF- β conjugados com PE (ficoeritrina) (BD, Biosciences, EUA) um anticorpo por tubo. As células foram incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente, as células marcadas foram lavadas com PBS-W e fixadas com solução fixadora (paraformaldeído 10g/L, cacodilato de sódio 10,2 g/L, e cloreto de sódio 6.65 g/L) por 15 minutos a 4°C.

Em seguida, as células marcadas foram levadas ao citômetro de fluxo *FACScan* (BD Biosciences, USA) para a análise funcional da população de linfócitos T CD4⁺ dos animais infectados e não infectados por *A. suum*. A análise dos dados foi realizada pelo programa *Cell Quest Pro*TM (BD Biosciences, EUA).

2.9. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para avaliar as diferenças estatísticas do experimento de infectividade dos ovos de *A. suum* em função do tempo de embrionamento, foi realizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni. Para a avaliação das citocinas teciduais e sistêmicas entre os grupos, foi utilizado o teste Kruskal–Wallis seguido do teste de comparação múltipla Dunn. Teste T não pareado foi usado para determinar as diferenças entre a influência da idade do hospedeiro para a infecção experimental de *A. suum* e *A. lumbricoides*. A análise de correlação entre a produção de citocina no pulmão com a migração das larvas pelo órgão foi realizada pelo teste de Spearman. As diferenças estatísticas foram consideradas existentes nesse estudo quando o valor de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Embrionamento *in vitro* de ovos de *A. suum*

O tempo de embrionamento dos ovos de *A. suum* foi avaliado *in vitro*, após a incubação com solução de H₂SO₄ 0,2M por até 400 dias a 26° C (Fig. 1A). Como mostrado na Fig. 1B, os ovos recém-recuperados a partir do útero de fêmeas adultas, denominados de ovos decorticados devido à ausência da membrana externa mamilonada, formada por mucopolissacarídeos, apresentavam no interior, uma massa sólida de células germinativas protegidas por duas camadas, a mais exterior formada principalmente por quitina e a uma interior, impermeável à água, por 25% de proteínas e 75% de lipídeos.

No décimo dia de cultura, o índice de embrionamento dos ovos foi determinado e não foram observados ovos completamente embrionados, embora tenham sido observados os primeiros sinais de embrionamento, caracterizado por uma organização celular. Após quatorze dias de cultura, já foram observadas algumas larvas totalmente formadas dentro dos ovos. No vigésimo dia, os resultados revelaram que 55,3% dos ovos em cultura já estavam totalmente embrionados. Curiosamente, o percentual de ovos embrionados permaneceu próximo aos 50%, com pequena redução no índice de embrionamento ao longo dos 400 dias de cultura (53,66% no 50° dia; 51,86% no 100° dia, 45,82% no 200° dia, 42,33% no 300° dia e 40,26% no 400° dia de embrionamento).

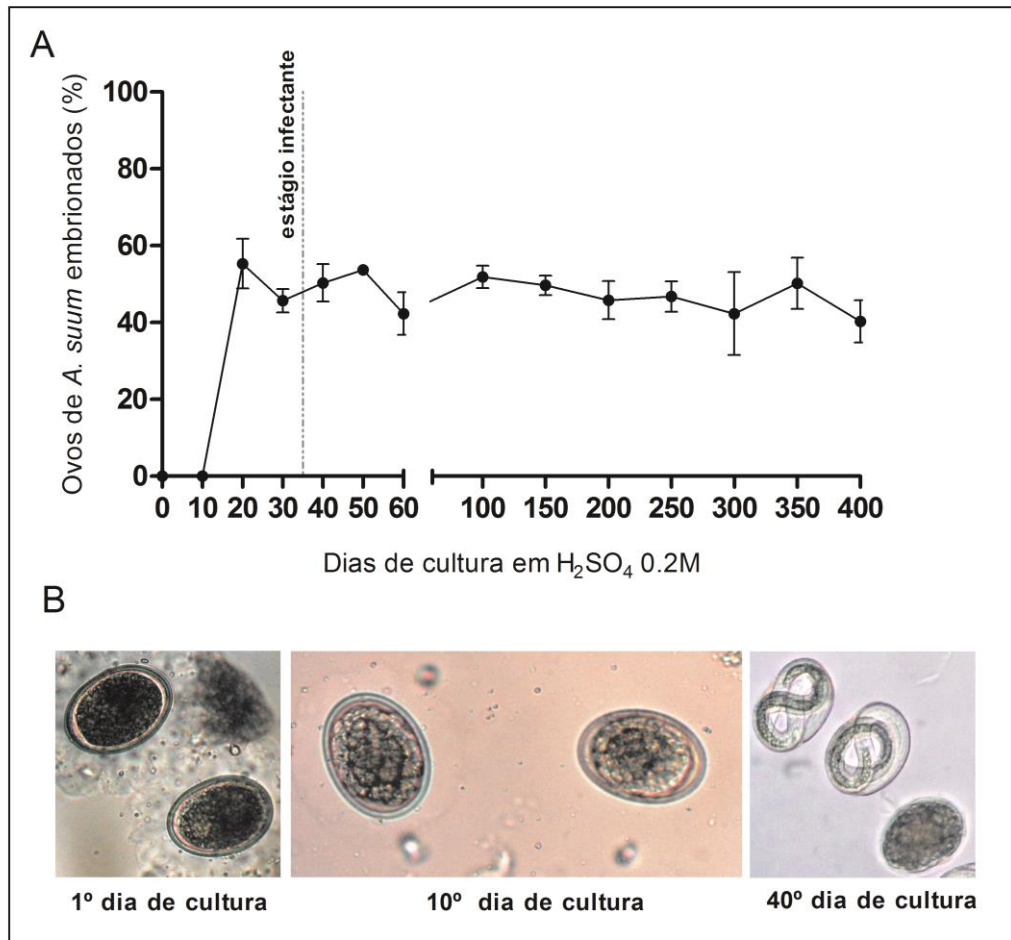


Figura 1: Embrionamento dos ovos de *Ascaris suum* em função do tempo em cultura com solução de ácido sulfúrico a 0,2M. (A) Percentual de ovos embrionados *in vitro* após 400 dias de cultura. (B) Embrionamento dos ovos de *A. suum* em diferentes tempos de cultura.

3.2. Infectividade dos ovos de *A. suum* em função do tempo de embrionamento *in vitro*.

A infectividade dos ovos de *A. suum* foi avaliada por meio da taxa de recuperação de larvas nos pulmões de camundongos BALB/c (8 semanas de idade, machos) infectados com ovos embrionados em diferentes tempos.

Conforme demonstrado na Fig. 2, os ovos de *A. suum* tornaram-se infectantes a partir do 35º dia cultura. Em seguida, a infectividade apresentou um aumento significativo no 50º dia de incubação, e atingiu o pico da infecção entre o 100º e 200º dias. De forma interessante, a infectividade dos ovos reduziu significativamente após 200 dias de cultura e retornou a praticamente zero com 400 dias de cultura.

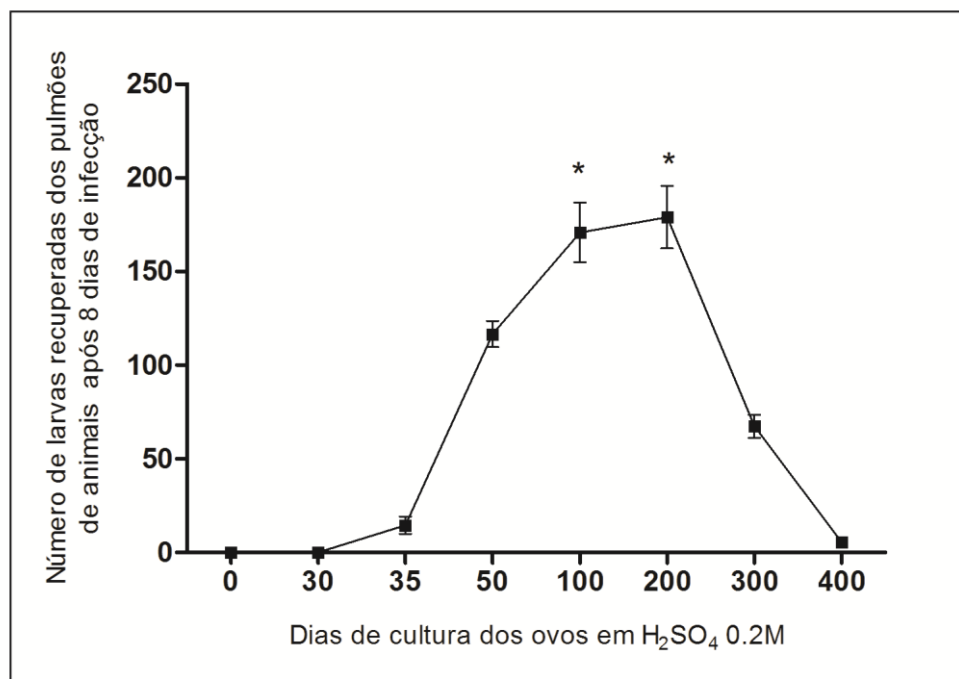


Figura 2: Infectividade dos ovos de *Ascaris suum* em função do tempo de embrionamento. A infectividade dos ovos de *A. suum* em função do tempo de embrionamento em cultura foi avaliada por meio da recuperação das larvas do parasito nos pulmões dos animais com oito dias de infecção. Camundongos BALB/c (8 semanas de idade, machos) foram infectados com 2500 ovos embrionados com diferentes tempos de embrionamento *in vitro*. Os dados representam a média \pm EM de larvas recuperadas nos pulmões de seis camundongos para cada tempo de embrionamento avaliado. As diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) referentes aos diferentes tempos de embrionamento estão representadas por * no gráfico.

3.3. Influência da idade do hospedeiro na carga parasitária

Após padronizar o melhor tempo de embrionamento para a máxima infectividade dos ovos de *A. suum*, a influência da idade do hospedeiro foi avaliada em camundongos BALB/c após oito dias de infecção. Os resultados revelaram que camundongos com oito semanas de idade apresentaram um aumento significativo ($P < 0.0001$) no número de larvas recuperadas nos pulmões quando comparado com camundongos com dezesseis semanas de idade (180.6 larvas x 51.5 larvas, respectivamente) (Fig. 3).

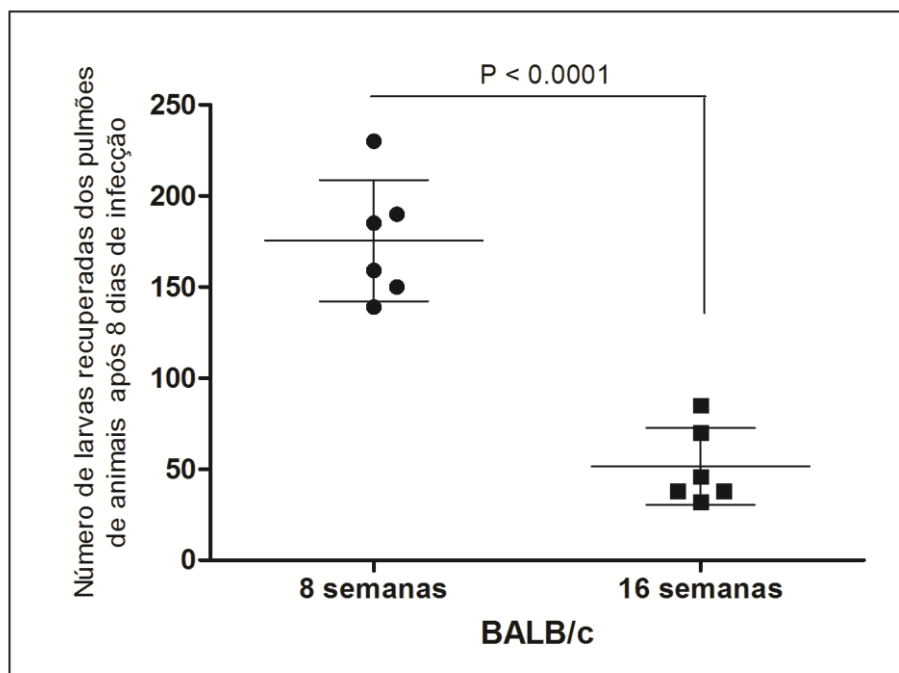


Figura 3: Influência da idade do hospedeiro na carga parasitária de *Ascaris suum*.

Seis camundongos BALB/c (machos) com oito semanas de idade, e seis camundongos BALB/c (machos) com dezesseis semanas de idade foram infectados com 2500 ovos embrionados e a carga parasitária foi avaliada pelo número de larvas recuperadas dos pulmões dos animais após oito dias de infecção. Os dados estão apresentados pela

média \pm EM e as diferenças significativas entre as idades ($P \leq 0,05$) estão representados pelo valor de P no gráfico.

3.4. O perfil de migração das larvas de *A. suum*

A migração completa das larvas de *A. suum* em camundongos BALB/c foi avaliada por quatorze dias. Esse período inclui desde eclosão das larvas no intestino, migração hepato-traqueal, até o retorno das mesmas para intestino delgado. Nesta última etapa de migração, as larvas são eliminadas, uma vez que o camundongo é um hospedeiro não permissivo para a fase intestinal crônica da infecção. Consequentemente, vermes adultos de *Ascaris* sp. não desenvolvem e não maturam-se neste modelo, como observado em humanos e suínos. Após esta análise foi possível compreender a biologia e cronologia da infecção larval (Fig. 4): Nas primeiras 24 horas após a infecção, as larvas eclodidas foram encontradas no intestino grosso e algumas já foram encontradas no fígado dos animais. Em seguida, a migração hepática aumenta gradualmente e atinge o pico até o quinto dia de infecção. Após esse período, a carga parasitária no fígado diminui gradualmente até zero, no décimo dia da infecção (Fig 4A e 4B).

A migração pulmonar em camundongos BALB/c iniciou-se a partir do terceiro dia de infecção e atingiu o pico de migração no órgão no sétimo e oitavo dias (Fig 4C). Em seguida, a carga parasitária nos pulmões dos animais diminuiu gradativamente chegando à zero no décimo quarto dia de infecção. Finalmente, larvas L4 foram observadas no lúmen do intestino delgado dos animais após nove dias de infecção, e a eliminação completa do parasito ocorreu no décimo quarto dia após a infecção (Fig 4D).

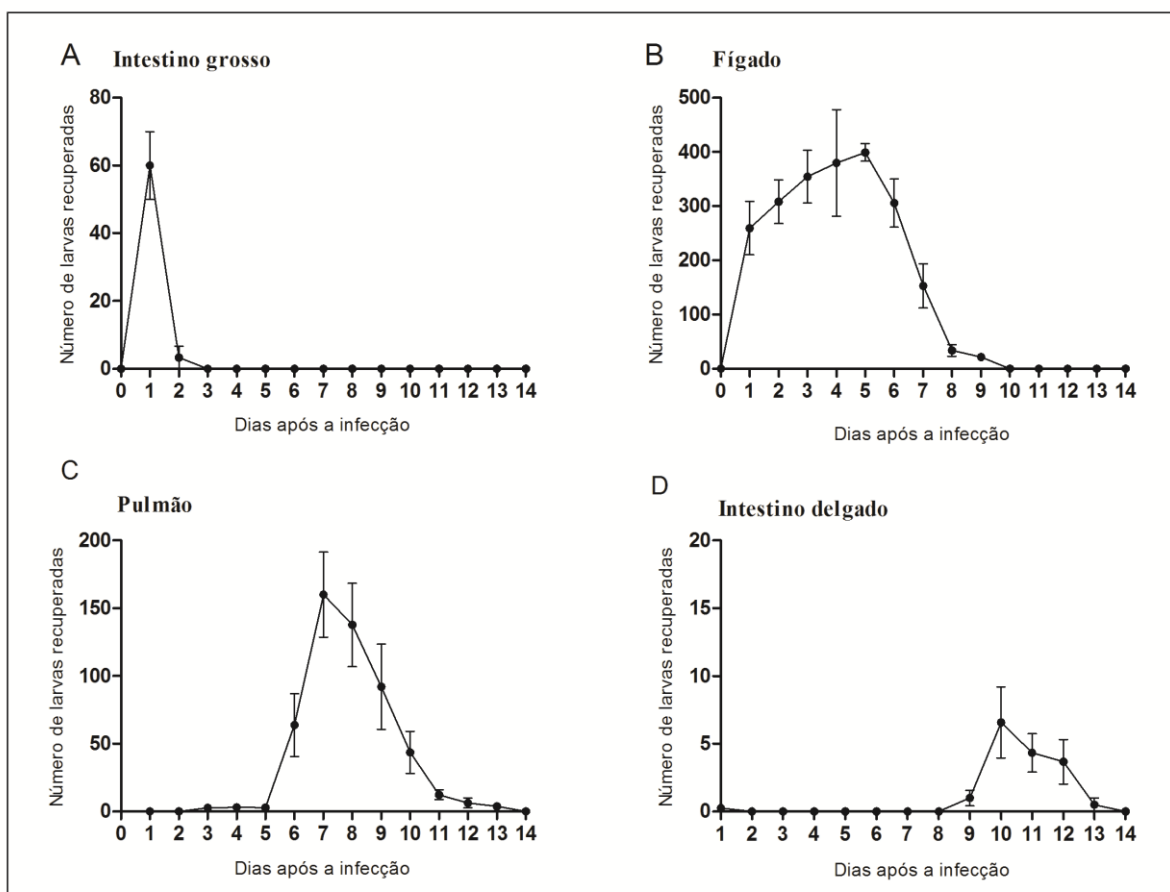


Figura 4: Caracterização completa da migração das larvas de *Ascaris suum* em camundongos BALB/c. Oitenta e quatro camundongos foram infectados com 2500 ovos embrionados de *A. suum* e seis animais foram eutanasiados diariamente entre o primeiro e o décimo quarto dia após a infecção. O número total de larvas foi avaliado no intestino grosso (A), fígado (B), pulmões (C) e no intestino delgado (D).

3.5. Comparação entre a infecção experimental por *A. suum* e *A. lumbricoides*

A padronização da infecção experimental por *A. suum* em camundongos BALB/c foi testada para espécie *A. lumbricoides*, para avaliar a aplicação deste modelo experimental para ambas as espécies. Não foram observadas diferenças no padrão de migração e recuperação das larvas de *A. suum* e *A. lumbricoides* nos pulmões de

camundongos com oito dias de infecção (16,2 larvas e 12,0 larvas, respectivamente ($P = 1,000$)) (Fig. 5).

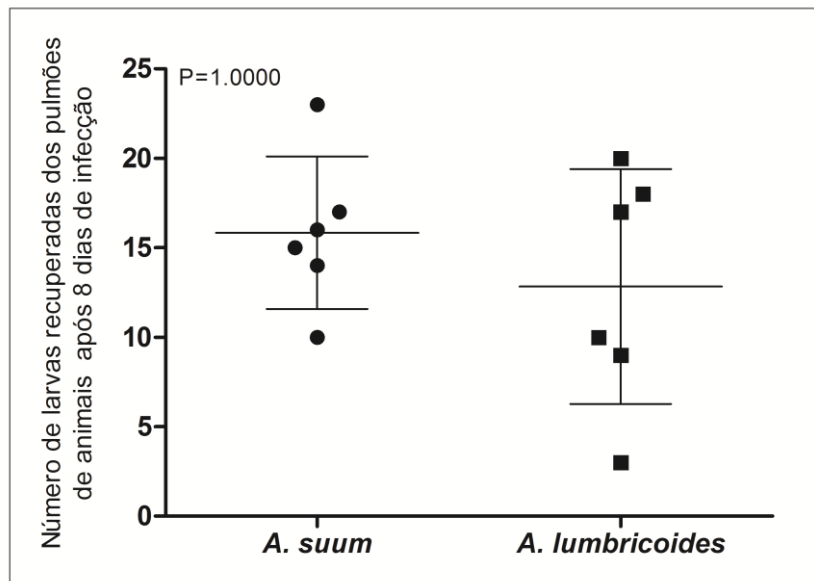


Figura 5: Comparação entre infecção experimental por *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides*. A carga parasitária pulmonar de seis camundongos BALB/c (8 semanas de idade, machos) infectados por 1000 ovos embrionados de *A. suum* foi comparada com a carga parasitária pulmonar pela infecção de *A. lumbricoides* nas mesmas condições. Os dados representam a média \pm EM e o valor P referente a análise entre os dois grupos está apresentado no gráfico.

3.6. Alterações histológicas do pulmão de camundongos BALB/c durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão

A Figura 6 representa os resultados da análise histológica dos pulmões de camundongos BALB/c não infectados (Fig. 6A e B) e em diferentes tempos de infecção por *A. suum* (Fig. 6C-M).

Os animais infectados por *A. suum* apresentaram um relevante aumento no infiltrado inflamatório no tecido pulmonar a partir do oitavo (Fig. 6C e D) até o décimo

segundo dia de infecção (Fig. 6J–L), quando comparado com os animais controles. Neutrófilos foram inicialmente e predominantemente observados no oitavo dia de infecção e foram gradualmente substituídos por células mononucleares. Eosinófilos foram observados a partir do décimo dia de infecção (Fig. 6G). No décimo segundo dia de infecção, o infiltrado inflamatório foi mais evidente e formado principalmente por células mononucleares (Fig. 6J), sendo a maioria macrófagos (Fig. 6L), e também por eosinófilos (Fig. 6K). De forma interessante, larvas de *A. suum* foram observadas nos espaços alveolares e dentro dos bronquíolos até o décimo dia de infecção (Fig. 6H). Além disso, também foi observado um aumento gradual expressivo na deposição de matrix extracelular (fibras colágenas) no tecido, a partir do oitavo de até o décimo segundo dia infecção (Fig. 6E, I, M), em comparação com animais controles.

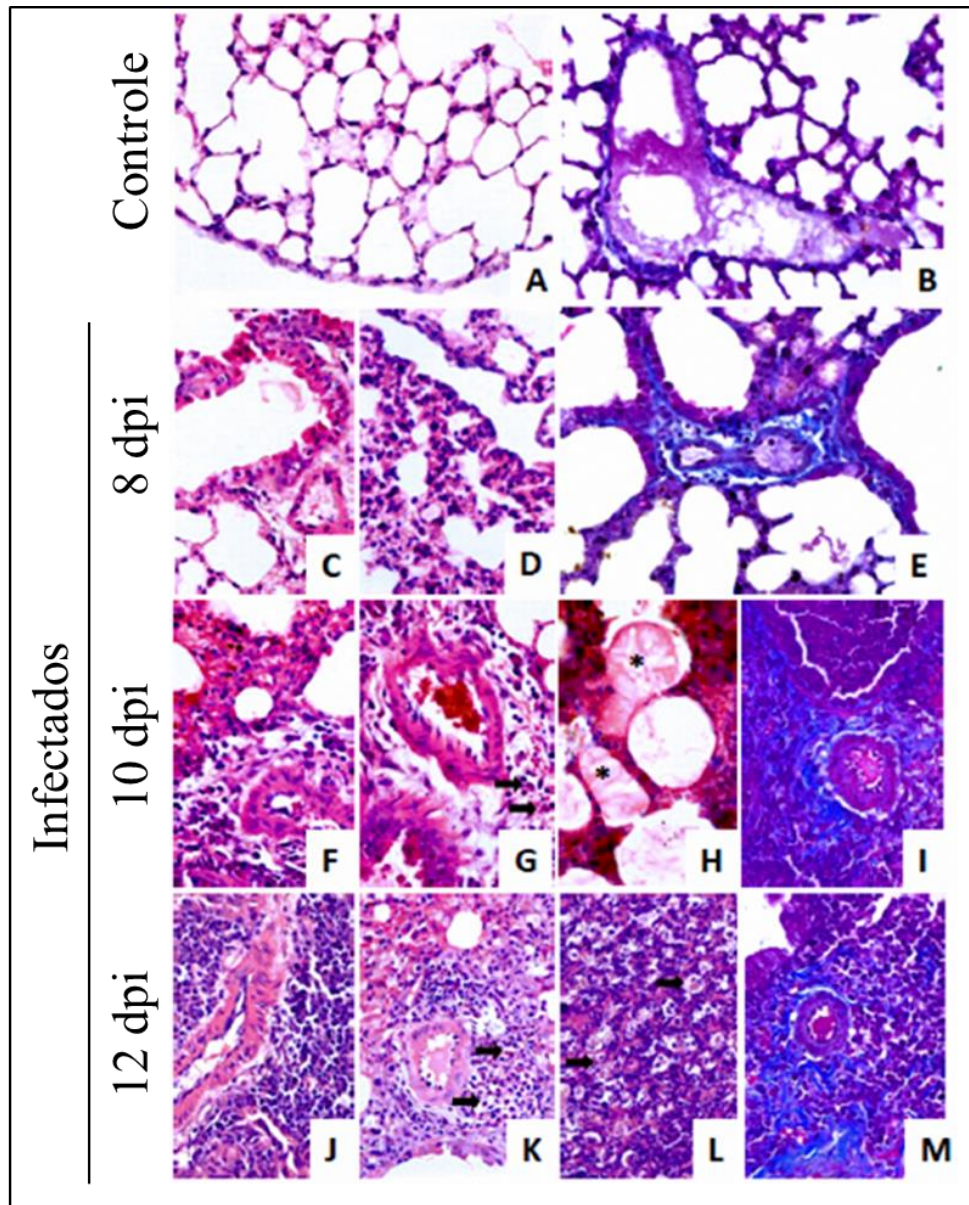


Figura 6: Análise histológica dos pulmões de camundongos BALB/c não infectados (Fig. 6A e B) e com diferentes tempos de infecção por *A. suum* (Fig. 6C-M). Os cortes histológicos foram corados por HE e Tricomo de Masson para a avaliação da inflamação pulmonar e remodelamento/cicatrização tecidual respectivamente. * destacam as larvas nos espaços alveolares e bronquíolos e as setas indicam a infiltração de eosinófilos em grande número na inflamação.

3.7. Caracterização da resposta imunológica da ascaridíase larval experimental: perfil de citocinas teciduais e sistêmicas

O perfil de citocinas teciduais foi avaliado no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c, em diferentes tempos durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão (4, 8, 10 e 12 dias após a infecção) e de camundongos não infectados (Fig. 7). De um modo geral, os principais resultados demonstraram uma polarização na produção de citocinas inflamatórias pela imunidade inata, com elevados níveis de IL-6, TNF e IL-5 em relação ao grupo controle (Fig. 7A, C e E). Os níveis de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-17A foram abaixo do limite de detecção do teste, indicando baixa ou inexistente produção dessas citocinas durante a migração larval de *Ascaris* no pulmão.

Os animais infectados apresentaram, de forma interessante, uma alteração no padrão da citocina IL-6 durante a ascaridíase pulmonar (Fig. 7A). Níveis basais de IL-6 foram observados no pulmão no tempo zero e quatro dias após a infecção (0.00 e 13.35 pg/100 mg de tecido, respectivamente). Entretanto, foi observado um aumento significativo na produção desta citocina no tecido pulmonar no oitavo dia de infecção (145.47 pg/100 mg de tecido), seguido de uma ligeira diminuição após dez dias de infecção (111.92 pg/100 mg de tecido), porém ainda significativo em relação ao grupo controle. Por fim, ao final da migração pulmonar, no décimo segundo dia de infecção, os níveis de IL-6 já diminuíram consideravelmente (47.65 pg/100 mg de tecido). A análise de correlação demonstrou uma consistente e positiva relação ($P = 0,016$) entre os níveis de IL-6 no pulmão de camundongos infectados, com o número de larvas presente no tecido, sugerindo que a produção de IL-6 nesta infecção seja dependente da presença da migração das larvas (Fig. 7B).

Quando avaliado os níveis de TNF no pulmão de camundongos infectados, observou-se um aumento significativo na produção desta citocina no décimo e décimo segundo dias de infecção (36.54 e 150.75 pg/100 mg de tecido, respectivamente), quando comparado com animais controles (Fig. 7C). Entretanto, devido a esse aumento tardio de TNF nos pulmões de camundongos infectados, não foi observado correlação dos níveis dessa citocina com a presença das larvas no tecido (Fig. 7D). Além disso, a migração das larvas pelos pulmões de camundongos BALB/c induziu um aumento significativo nos níveis de IL-5 ($P = 0.041$) em comparação aos animais controles. Essa diferença ocorreu logo no início da migração pulmonar, no quarto dia após a infecção, quando as primeiras larvas atingem o órgão (Fig. 7E). E devido a essa produção precoce de IL-5, não foi observada correlação desta citocina com o número de larvas de *Ascaris* no tecido (Fig. 7F).

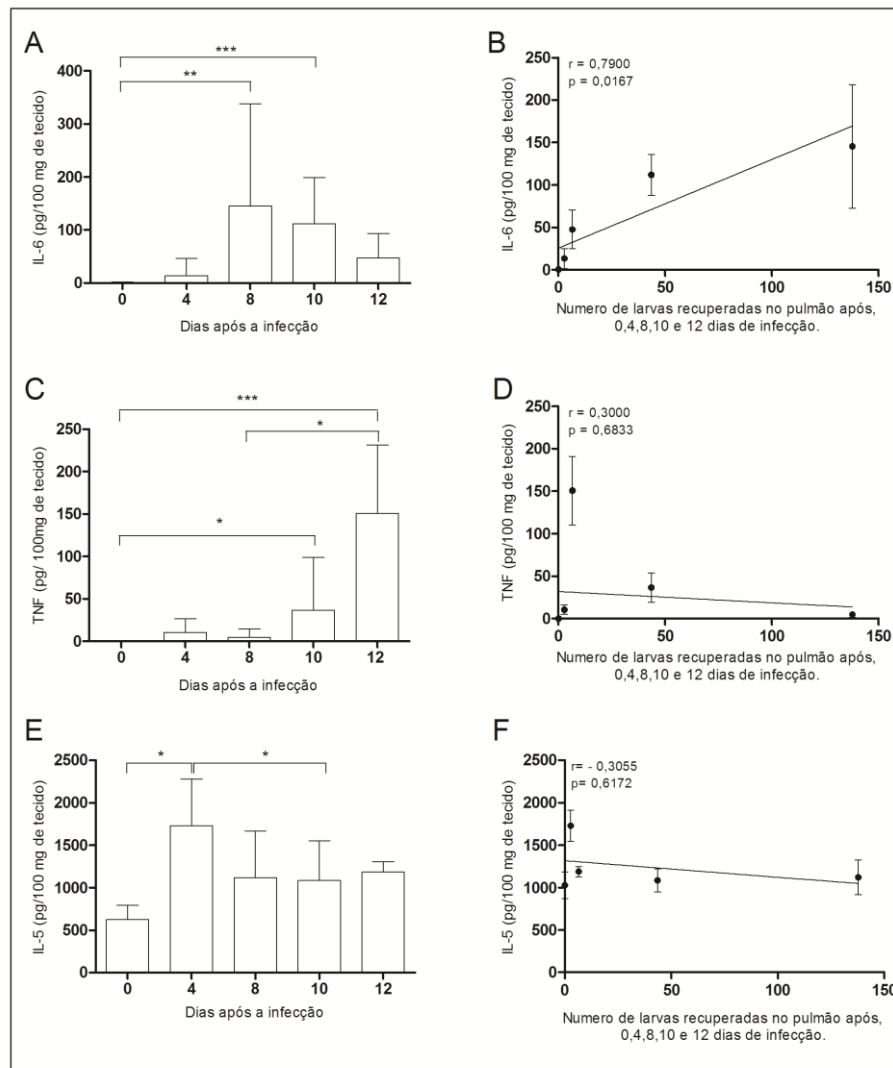


Figura 7: Perfil de citocinas nos pulmões de camundongos BALB/c durante a migração das larvas de *Ascaris suum* pelo órgão. Os níveis de IL-6 (A), TNF (C) e IL-5 (E) foram avaliados nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *A. suum* após 0, 4, 8, 10 e 12 dias de infecção. Os níveis de IL-6, TNF e IL-5 (B, D e F, respectivamente) foram também correlacionados com o número total de larvas de *A. suum* encontradas nos pulmões após 0, 4, 8, 10 e 12 dias de infecção. Os dados apresentados nos gráficos representam a média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas nos gráficos com os valores significativos de P: * $P \leq 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Os valores de P e R, nos gráficos representam a análise estatística da correlação.

Com relação ao perfil sistêmico da resposta imune, observou-se que os camundongos BALB/c infectados por *A. suum* apresentaram uma diminuição significativa no número de linfócitos T CD4⁺, quando comparados com os animais não infectados (P = 0,0018) (Fig. 8A). Além disso, a análise funcional dos linfócitos T CD4⁺, oriundos do baço, demonstrou que a infecção larval por *A. suum* induziu uma diminuição significativa na frequência de células T CD4⁺IL-4⁺ (P = 0,0033) (Fig. 8B) e células T CD4⁺TNF- α ⁺ (P = 0,0132) (Fig. 8C) em comparação com o grupo controle. Os números de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ (Fig. 8D), T CD4⁺IL-10⁺ (Fig. 8E) e T CD4⁺TGF- β ⁺ (Fig. 8F) não sofreram alterações durante a ascaridíase larval.

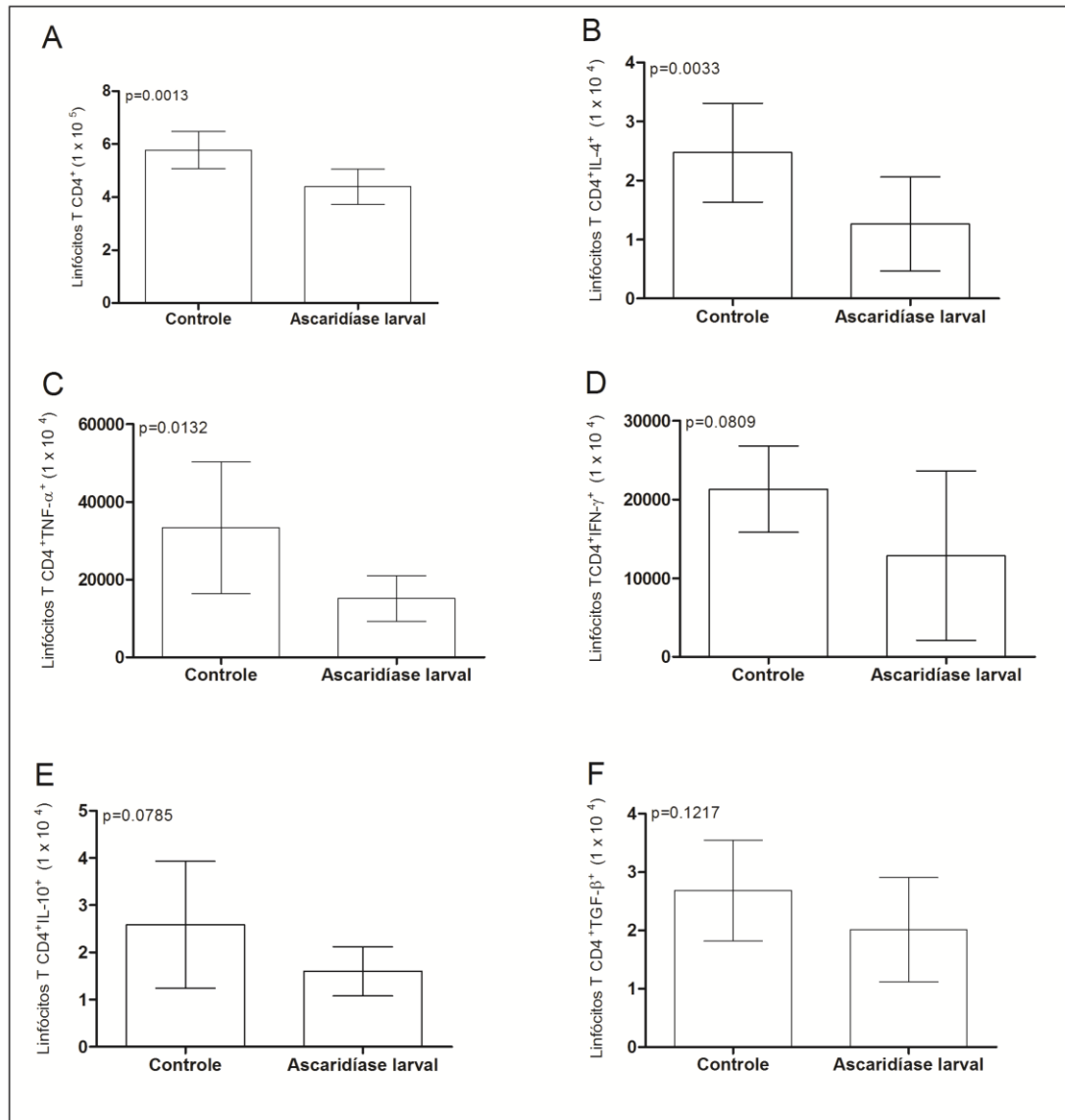


Figura 8: Perfil de citocinas sistêmicas em camundongos BALB/c com ascaridíase larval. O número de linfócitos T CD4⁺ oriundos dos baços de dez camundongos infectados com *A. suum*, no oitavo dia de infecção (A), bem como a produção de IL-4 (B), TNF-α (C), IFN-γ (D), IL-10 (E) e TGF-β (F) por essas células, foram avaliados por meio da técnica de citometria de fluxo e os resultados comparados com os obtidos pelo grupo controle. Os dados representam o valor da média ± EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados pelos valores P indicados nos gráficos.

4. DISCUSSÃO

A utilização de camundongos como um modelo alternativo para o estudo da ascaridíase larval permitiu-se hoje uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro (Enobe et al, 2006; Arizono et al, 2010), uma vez que os estudos sobre *A. lumbricoides* em hospedeiros humanos são limitados devido a considerações éticas (Dold e Holanda, 2011). A linhagem de camundongos BALB/c foi escolhida para o presente estudo, em parte, porque tem sido frequentemente utilizada em estudos biológicos relacionados à infecção por *Ascaris*, especialmente no estudo de alterações imunológicas induzidas por antígenos do parasito (Paterson et al., 2002) e os seus efeitos de proteção após o desafio subsequente com larvas de *A. suum* (Tsuji et al, 2003; Islam et al, 2005). No entanto, estudos voltados para a análise parasitológica e imunopatológica em camundongos BALB/c infectados permanecem escassos. De fato, estudos sobre a imunidade humoral da ascaridíase larval usando este modelo, já foi realizado (Crandall e Crandall, 1971), até mesmo recentemente, quando Enobe et al. (2006) avaliaram a indução da inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica durante a infecção experimental com o nematódeo. Entretanto, informações adicionais sobre a biologia do parasito ainda são necessárias.

Neste estudo, demonstramos que a cinética da migração das larvas de *Ascaris* spp. no fígado e pulmões de camundongos BALB/c foram semelhantes aos descritos para esta linhagem por Lewis et al. (2006). No entanto, em contraste com o que é descrito na literatura, a partir do nono até o décimo terceiro dia de infecção, a migração das larvas foi observada no intestino delgado. Esta descrição permite que novos estudos avancem principalmente sobre a imunidade de mucosa, o que permanece obscura para a infecção larval por *Ascaris* spp. Além disso, observamos uma maior suscetibilidade nos

animais de oito semanas de idade em comparação com animais mais velhos, o que confirma que hospedeiros mais jovens são mais suscetíveis à infecção por *Ascaris*, o que também acontece para a infecção por *A. lumbricoides* em humanos (Holland, 2009).

Não foram observadas diferenças significativas na carga parasitária ou padrão de migração entre *A. suum* e *A. lumbricoides* na infecção experimental, sugerindo que o método para a infecção experimental aqui descrito para *A. suum*, também pode ser usado para *A. lumbricoides*. E com isso, essa abordagem poderia contribuir para a resolução do intrigante debate taxonômico sobre os dois parasitos. De fato, os percentuais de recuperação de larvas para as duas espécies em camundongos BALB/c com oito semanas de idade, correspondeu ao que foi anteriormente observado por Massara et al., (1990) usando camundongos heterogênicos infectados por uma cepa brasileira de *A. lumbricoides*. Entretanto, em um estudo recente (Peng et al., 2012), camundongos C57-BL/6 foram infectados com vários genótipos de *Ascaris* spp. da China. Este estudo demonstrou diferenças nos padrões de migração e distribuição de larvas em tecidos do hospedeiro, entre dois genótipos (um predominantemente de origem humana e o outro derivado de um suíno). Além disso, dependendo do genótipo do parasito, foram sugeridas peculiaridades sobre o desenvolvimento dos ovos.

Neste estudo, nós percebemos que a eclosão, infectividade e/ou migração das larvas do parasito no hospedeiro são dependentes do tempo em que os ovos de *Ascaris* ficam em cultura. Apesar dos ovos de *A. suum* se tornarem infectantes a partir do trigésimo quinto dia de cultura, uma maior infectividade foi observada entre o centésimo e ducentésimo dia de cultura em H₂SO₄. Essa padronização é extremamente importante, uma vez que diferentes tempos de cultura para o embrionamento de ovos de *Ascaris* têm sido utilizados para a infecção em modelos experimentais (Anderson, 1995; Boes et al, 1998; Lewis et al, 2006), e certamente, o número de larvas recuperadas e a

resposta inflamatória induzida pelo parasito podem ser afetados por esse parâmetro. Nesse contexto, este resultado sugere que mais atenção deve ser dada para o tempo de embrionamento dos ovos na cultura, aos futuros estudos que projetem experimentos relacionados à infecção por *A. suum* ou *A. lumbricoides*.

No presente estudo, também foi realizado uma avaliação da resposta imune celular durante a ascaridíase larval, por meio da análise conjunta da cinética da migração das larvas, da histopatologia e da análise das citocinas em diferentes tempos de infecção e órgãos do hospedeiro. A primeira citocina produzida em níveis elevados, quando comparados com animais controles, no pulmão de camundongos BALB/c infectados por *Ascaris suum* foi IL-5. Curiosamente, na infecção murina por *Toxocara canis*, outro ascaridídeo, a produção precoce e significativa de IL-5 foi observada no cérebro dos animais no terceiro dia de infecção, como resultado da migração de larvas (Hamilton et al., 2008). Estes autores sugeriram que esse aumento de IL-5 induzido pelas larvas no cérebro resulta na infiltração de eosinófilos e sua subsequente degranulação e liberação de mediadores tóxicos (Bandeira-Melo e Weller, 2005; Hamilton et al, 2008).

Na ascaridíase larval experimental, a produção inicial da IL-5 pulmonar parece estar associada com os eventos imunopatológicos iniciais induzidos pelas primeiras larvas que atingem o órgão a partir do terceiro e/ou quarto dia após a infecção e com a ativação da resposta imune protetora eosinófilo-dependente. Este resultado dos níveis elevados de IL-5 tecidual no início da infecção larval, antes mesmo da possibilidade de se estabelecer uma resposta T_H2 , é surpreendente e difícil de explicar, porque normalmente a fonte típica desta citocina na infecção helmíntica são linfócitos $T CD4^+$, como parte da resposta imune adaptativa (Artis, 2006). No entanto, a hipótese mais interessante é que durante a migração larval pulmonar, a IL-5 pode ter sido originada a

partir da resposta imune inata de células pulmonares residentes. Recentemente, alguns estudos têm destacado o papel das populações de células inatas no desencadeamento da imunidade do tipo 2. Maizels et al. (2012) discutiram o papel de células linfóides inatas [(*ILC – innate lymphoid cells*) também denominadas nuócitos] como uma provável fonte de IL-5 no pulmão durante a fase inicial de infecções helmínticas. A hipótese proposta então é que as larvas de *Ascaris suum* ao atingirem os pulmões, induziriam a produção de citocinas denominadas de alarminas (IL-25 e IL-33) por células epiteliais, as quais estimulariam as células linfóides inatas em produzir citocinas do tipo 2, principalmente IL-5 e IL-13 (Moro et al, 2010; Neill et al, 2010; Saenz et al, 2010). Além disso, a migração de larvas de *A. suum* nos pulmões do hospedeiro induzem manifestações semelhantes aquelas observadas no broncoespasmo (asma) (Richards et al., 1983) e recentemente tem sido observado em modelos murinos de asma alérgica que células linfóides inatas pulmonares são também importante produtores de IL-5 e IL-13 (Klein Wolterink et al. de 2012). Nesse contexto, sem dúvida, o papel das células linfóides inatas no estabelecimento da resposta imune da fase inicial de infecções helmínticas precisa ser elucidado. Além disso, existem outras evidências que a citocina IL-5 também pode ser produzida por outras células das vias respiratórias, em particular, os mastócitos (Bradding et al., 1994).

Não obstante, já foi demonstrado que a citocina IL-5, que é encontrada em níveis elevados nos hospedeiros infectados por helmintos durante a resposta imune Th2, é a responsável pela indução de eosinofilia (Behm e Ovington, 2000). De fato, no presente estudo, muitos eosinófilos foram observados por meio da análise histopatológica do pulmão dos animais infectados por *A. suum*, após 10 e 12 dias de infecção. Este resultado corrobora com estudos anteriores que mostraram um maior número de eosinófilos circulantes no sangue periférico e aumento dos níveis de

atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) no pulmão de animais infectados por *Ascaris* durante o fim da segunda semana de infecção (Enobe et al., 2006). De forma interessante, inúmeros estudos avaliaram a relação dependente de IL-5 com a resposta eosinofílica protetora (Meeusen e Balic, 2000), incluindo *Strongyloides venezuelensis* (Korenaga et al., 1991; Korenaga and Tada, 1994), *Strongyloides ratti* (Ovington et al., 1998), *Angiostrongylus cantonensis* (Sasaki et al., 1993; Sugaya et al., 1997) e *Onchocerca lienalis* (Folkard et al., 1996). Curiosamente, foi demonstrado em humanos que a citocina IL-5 apresenta uma forte associação negativa com a reinfecção por nematódeos gastrointestinais (Turner et al, 2003; Jackson et al, 2004.). Este achado está de acordo com os estudos que sugerem o papel crucial da IL-5 na fase inicial da infecção para eliminar a fase larval do parasito (Maizels e Balic, 2004).

Paralelo a interessante discussão sobre o papel da IL-5 na ascariíase aguda, o presente trabalho demonstrou também uma correlação significativa entre o número de larvas recuperadas e os níveis da citocina IL-6 nos pulmões dos animais infectados. Curiosamente, somada a essa correlação, o maior número de neutrófilos no infiltrado inflamatório foi observado no oitavo dia de infecção, que coincide exatamente com o pico de migração das larvas de *A. suum* no pulmão. Durante a resposta inflamatória aguda, os neutrófilos podem produzir IL-6 (Riedemann et al., 2004). IL-6 desempenha um papel importante na regulação do tráfego de neutrófilos (Fielding et al., 2008) e, como resultado, pode regular a transição de neutrófilos para células mononucleares durante a resposta inflamatória por meio da mudança do perfil da quimiocina IL-8 para MCP-1 (Barnes et al., 2011). De fato, a citocina IL-6 induz a apoptose de neutrófilos e por isso controla a acumulação de infiltrado inflamatório neutrofílico após a resolução da inflamação aguda (Marin et al, 2002; McLoughlin et al, 2003). Além disso, IL-6 tem propriedades pró-fibrogênicas e tem sido relacionada com o aumento da produção de

colágeno pelos fibroblastos e de glicosaminoglicanos (Duncan e Berman, 1991; Mihara et al, 1995.). Assim, o aumento na deposição de fibras de colágeno observada nos dias oito e doze após a infecção, também pode ser correlacionada com a produção de IL-6 durante a fase inicial da ascaridíase pulmonar.

Após o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar, observou-se um aumento do número de células mononucleares através da análise histopatológica durante a progressão da infecção larval, o que poderia explicar o aumento observado nos níveis da citocina TNF. De fato, já foi demonstrado que estas células são uma fonte comum de TNF (Tracey e Cerami, 1990), embora outros tipos de células, tais como eosinófilos e células epiteliais, também estão envolvidos na sua produção nas vias aéreas (Finotto et al, 1994;. Khair et al, 1994).

Em ensaios de imunização, em que os antígenos de *A. suum* (AS24 kDa ou AS16 kDa) foram administrados em camundongos BALB/c, observou-se um perfil misto de resposta imune, caracterizado por elevados níveis de IL-2, IFN- γ e IL-10, e que esta poderia estar associada a uma proteção parcial contra a infecção por *A. suum*. (Oksanen et al, 1990;. Duncan e Berman, 1991). No entanto, no presente estudo, a resposta imune induzida pela migração das larvas de *Ascaris* foi polarizada para um perfil de resposta inflamatória, caracterizada por níveis elevados de IL-6 e TNF-a, seguido por uma modulação sistêmica de linfócitos T CD4⁺ que expressam a citocina IL-4. Nossos resultados corroboram com os resultados de outros pesquisadores que utilizando modelo murino de asma (camundongos C57BL/6 e B10.A), demonstraram que a estimulação das células do lavado broncoalveolar de camundongos com extrato bruto de *A. suum* induziu supressão da produção de IL-4 e IL -5 (Lima et al., 2002).

A imunomodulação dos linfócitos T CD4⁺ sistêmicos observada no oitavo dia de infecção, poderia sugerir um padrão de baixa reatividade celular induzida pelas larvas de *Ascaris* spp. Este fenômeno poderia contribuir para a sobrevivência do parasito durante a fase de migração larval, considerada crucial para o estabelecimento da infecção crônica e persistência do parasito no hospedeiro. A regulação negativa da resposta imune do hospedeiro também pode ser observada em outros modelos de nematódeos intestinais, tais como: apoptose de células T CD4⁺ (Chow et al, 2000; Gazzinelli-Guimarães et al, 2013); a modulação da resposta pró-inflamatória induzida por sulfato de sódio de dextran (DSS) (Cançado et al, 2011), e a ativação de células T regulatórias (Treg) (Ricci et al., 2011), todas induzidas pela excreção/secreção de produtos do metabolismo dos ancilostomídeos.

Na ascariíase humana experimental, a migração das larvas também induz infiltrações pulmonares substanciais, principalmente entre dez e quatorze dias após a infecção, caracterizadas por um intenso infiltrado eosinofílico tardio (Phills et al., 1972). Por outro lado, Cooper et al. (2000) demonstraram que indivíduos infectados cronicamente por *A. lumbricoides*, provenientes de áreas endêmicas, apresentam uma resposta imune polarizada para o tipo 2. Este dado suporta a hipótese de que a mudança no perfil da resposta pró-inflamatória, para uma resposta Th2, ocorre no final da fase de migração das larvas no tecido, ou talvez, logo após o estabelecimento dos vermes adultos no lúmen intestinal do hospedeiro, caracterizando a infecção crônica.

Em conclusão, diante de todos os dados apresentados e discutidos, o presente estudo fornece uma caracterização detalhada sobre a imunobiologia da fase inicial da infecção por *Ascaris suum*, possibilitando uma melhor compreensão dos eventos imunopatológicos que ocorrem durante a migração das larvas, principalmente pelos

pulmões do hospedeiro, contribuindo dessa forma para a elaboração de novos estudos voltados para ensaios de imunização e imunoprofilaxia da ascariíase.

Avaliação da resposta imune celular, com ênfase no papel dos eosinófilos, na ascaridíase larval.

Submetido:

Gazzinelli-Guimaraes et al. Eosinophils drive cellular innate immunity activation to control helminth larvae migration and promote lung tissue remodeling by a TNF-dependent pathway during Ascaris infection. Infection and Immunity. IAI-D-14-00738.

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais que estão envolvidos na patogênese de diversos processos inflamatórios, incluindo infecções helmínticas, doenças alérgicas, inflamatórias intestinais e gastrointestinais (Gleich et al., 1984; Weller 1994; Rothenberg et al., 1998; Rothenberg et al., 2006; Woodruff et al., 2011). Os mecanismos de regulação da resposta imune relacionados aos eosinófilos são inúmeros, incluindo apresentação de antígeno (Shi et al., 2000; MacKenzie et al., 2001) e exacerbação da resposta inflamatória através de sua capacidade de, quando ativados, degranular uma gama de citocinas pré-formadas, quimiocinas, mediadores lipídicos e proteínas granulares citotóxicas (Gleich et al., 1986; Weller, 1994; Walsh, 2001; Rothenberg et al., 2006). Além disso, vários fatores de crescimento e citocinas expressos por eosinófilos têm sido implicados em promover remodelamento tecidual e fibrose em doenças de vias aéreas (Levi-Schaffer et al., 1997; Kay et al., 2004; Luo et al., 2005; Brightling et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que os eosinófilos estão associados com resistência à infecção por helmintos (Kazura et al., 1980; Greene et al., 1981; Lee et al., 1991; Venturiello et al., 1995; Rainbird et al., 1998; Galioto et al., 2006). Nestes trabalhos, foi demonstrado que os eosinófilos atuam de forma independente ou em conjunto com componentes da resposta imune humoral, como anticorpos ou sistema do complemento; ou em conjunto com a resposta imune celular inata, como por exemplo, com os neutrófilos. Além disso, o papel anti-helmíntico dos eosinófilos já foi comprovado para os diferentes estágios evolutivos dos helmintos, como por exemplo, para as larvas de *Trichinella spiralis* (Lee et al., 1991; Venturiello et al., 1995), para os

vermes adultos de *Nippostrongylus brasiliensis* e *Heligmosomoides polygyrus* (Behm et al., 2000), e por fim, para as microfilárias de *Brugia malayi* (Simons et al., 2005).

Entretanto, o papel dos eosinófilos na ascaridíase larval ainda não foi elucidado. Com os resultados obtidos descritos no primeiro capítulo desta tese, já foi possível entender que a migração das larvas de *Ascaris suum*. no pulmão de animais experimentalmente infectados, induz uma robusta resposta imunológica inata, caracterizada por uma elevada produção inicial de IL-5 (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). A provável fonte desta citocina, embora ainda não comprovada para a ascaridíase, parece ser células linfóides inatas, como já demonstrado para outras infecções helmínticas e doenças alérgicas (Klein et al., 2012). No caso da ascaridíase aguda, as ILCs seriam ativadas pelas primeiras larvas que atingem o órgão durante a migração. Como mencionado anteriormente, a citocina IL-5 está fortemente associada com a infiltração de eosinófilos para o local da inflamação.

Também foi observado, que no oitavo dia da infecção, quando as larvas estão no pico da migração pulmonar, ocorre uma elevada produção da citocina IL-6 que se correlaciona positivamente com um influxo de neutrófilos para o foco inflamatório. E posteriormente, quando as larvas começam a sair dos pulmões, e migrar para o intestino delgado por meio das vias aéreas, o infiltrado neutrofílico é substituído por células mononucleares, e principalmente por eosinófilos (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013). A migração tardia destas células para o foco inflamatório coincide com o aumento gradual da citocina TNF- α no tecido pulmonar (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013).

Diante o exposto e das inúmeras perguntas elaboradas a partir dos primeiros resultados obtidos neste trabalho, percebemos que para entendermos os eventos imunopatológicos causados pela migração das larvas, seria de grande importância

avaliarmos o papel da resposta imune celular, com ênfase na função anti-helmíntica e anti ou pró-homeostática dos eosinófilos na ascaridíase pulmonar.

Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar o papel funcional dos eosinófilos no controle da migração das larvas de *A. suum*, bem como, avaliar o papel dessas células na patogênese da inflamação pulmonar provocada pela migração das larvas no órgão. Este estudo foi realizado por meio da infecção experimental murina, e a função destas células determinadas após a infecção experimental em uma linhagem de camundongos deficientes de eosinófilos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Comitê de ética

A manutenção e o uso de animais foram realizados em suma concordância com as recomendações do COBEA. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Protocolo # 45/2012) (Anexo 2).

2.2. Parasitos

Os vermes adultos de *Ascaris suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os ovos de *A. suum* foram isolados dos úteros dos vermes adultos fêmeas por meio de maceração mecânica, purificados por filtração e colocados em cultura com solução de ácido sulfúrico a 0,2M, como descrito por Boes et al. (1998). No 150º dia de cultura, pico de infectividade dos ovos, de acordo com primeiro capítulo deste trabalho (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013), os ovos foram usados para as infecções experimentais.

2.3. Camundongos

Para avaliar o papel dos eosinófilos durante a migração das larvas de *Ascaris suum* por meio dos ensaios parasitológicos e imunopatológicos, foi utilizada a infecção experimental em camundongos deficientes na diferenciação de eosinófilos devido a uma mutação no fator de transcrição GATA 1 (Δ dblGATA, machos com oito semanas de idade) e em camundongos BALB/c (machos com oito semanas de idade) como *background*.

2.4. Análise parasitológica

Trinta camundongos BALB/c (machos, oito semanas de idade) e 30 camundongos Delta dblGATA foram infectados por via intra-gástrica com 2500 ovos embrionados de *A. suum*, incubados por 150 dias em cultura com H₂SO₄ 0,2M. A carga parasitária em ambos os grupos foi avaliada com base na recuperação total das larvas no fígado após quatro dias de infecção, nos pulmões após oito dias de infecção, e no intestino delgado, após doze dias de infecção. Nesses tempos de infecção, os respectivos órgãos foram coletados, picotados com tesoura cirúrgica e colocados em um aparato de Baermann por 4 horas em PBS a 37°C. As larvas foram recuperadas no pellet do aparato, fixadas em formalina 10% e quantificadas por microscopia óptica.

2.5. Análise hematológica

O perfil hematológico de camundongos BALB/c infectados por *A. suum* foi avaliado durante a migração completa das larvas nos animais. A infecção foi realizada conforme descrito no item 2.3 deste capítulo. Basicamente, 200µL de sangue foram coletados por capilaridade, contendo EDTA, nos sinos retroorbitais de sete camundongos BALB/c no momento da infecção e nos 26 dias seguintes. A contagem global de leucócitos foi realizada pelo contador automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA), e o percentual e número absoluto de eosinófilos foram determinados por microscopia óptica por meio do esfregaço sanguíneo corado por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL)

2.6. Análise imunopatológica do pulmão de camundongos BALB/c WT e GATA infectados, durante a migração das larvas pelo órgão

O perfil de citocinas $T_H1/T_H2/T_H17$ e as alterações histológicas foram avaliados nos pulmões de camundongos BALB/c WT e $\Delta dbiGATA$, durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão em diferentes tempos (8, 10 e 12 dias após a infecção). Camundongos BALB/c WT e $\Delta dbiGATA$ não infectados foram usados como grupo controle (Tempo 0). Basicamente 30 camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) e 30 camundongos $\Delta dbiGATA$ (machos, oito semanas de idade) foram infectados conforme descrito no item 2.4 deste capítulo, e foram eutanasiados e tiveram os pulmões removidos em diferentes fases da migração das larvas (n= 10 animais por tempo de infecção). Os lobos direitos dos pulmões foram usados para a quantificação de citocinas e grânulos citotóxicos (EPO e MPO), e os lobos esquerdos, para a histopatologia.

Para a análise do perfil inflamatório do lavado broncoalveolar (BALF) durante a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões, seis camundongos BALB/c WT e seis camundongos $\Delta dbiGATA$ foram eutanasiados aos oito e 12 dias de infecção. Animais não infectados foram usados como grupo controle (Tempo 0). BALF foi coletado por lavagem intratraqueal de cinco mL de PBS contendo albumina sérica bovina 0,3% (Sigma, EUA) e inibidores de protease (Mannheim, Alemanha). Em seguida o lavado foi centrifugado 600 x g por 10 min e a quantificação das células inflamatórias foi realizada por microscopia óptica em câmara de Neubauer.

2.6.1. Perfil de citocinas teciduais

Para avaliar o perfil de citocinas teciduais, os lobos direitos dos pulmões foram pesados e 100 mg de tecido foram macerados por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) em 1 mL de PBS suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. Em seguida o homogenato de pulmão foi centrifugado a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração das citocinas. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-17A foram quantificadas por citometria de fluxo usando o kit CBA *Cytometric Bead Array* (CBA – BD Biosciences, EUA).

2.6.2. Quantificação de peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase

As enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) foram quantificadas no homogenato dos pulmões dos animais BALB/c e GATA durante a migração das larvas pelo órgão, conforme descrito por Strath e colaboradores (1985) com algumas modificações. As produções de EPO e MPO foram mensuradas para avaliar a ativação de eosinófilos e neutrófilos respectivamente, na ascariíase pulmonar.

Após a maceração do lobo direito dos pulmões, como descrito no item 2.6.1 deste capítulo, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das citocinas e o pellet restante foi usado para a quantificação de EPO e MPO. Para o ensaio de EPO, após a lise dos eritrócitos, o pellet foi homogeneizado em HBSS + 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma, EUA) e congelado e descongelado três vezes usando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado a 1500 x g, 4° C, por 10 minutos e em seguida o sobrenadante usado para o ensaio enzimático. Em placas de 96 poços, foram

adicionados 75 uL do sobrenadante por poço, seguidos de 75 uL do substrato (1.5 mM de OPD, 6,6 mM H₂O₂ em 0,05M de Tris-HCl, pH 8.0). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 75 uL de H₂SO₄ e a absorbância das amostras foi determinada a 492 nm.

Para o ensaio de MPO, após a lise dos eritrócitos, o pellet foi homogeneizado em 200 uL de uma solução tampão contendo NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,2 M, Na₂EDTA 0,015M, pH 4,7). Em seguida o pellet foi centrifugado a 1.500 x g, 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi novamente homogeneizado por uma solução tampão contendo NaPO₄ 0,05M, 0.5% de brometo hexadeciltrimetilamônio (Sigma, EUA), e congelado e descongelado três usando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado a 1500 x g, 4° C, por 10 minutos e em seguida o sobrenadante usado para o ensaio enzimático. Em placas de 96 poços, foram adicionados 25 uL do sobrenadante por poço, seguidos de 25 µL do substrato (TMB + 1,6 mM de DMSO). Após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de H₂O₂ 0,5 mM. Novamente após cinco minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 1M e a absorbância das amostras foi determinada a 450 nm.

2.6.3. Análise histológica

Os camundongos BALB/c e ΔdbIGATA infectados foram eutanasiados aos oito, dez e doze dias de infecção. Os lobos esquerdos dos pulmões foram fixados em formalina tamponada 10% (pH 7,2). Em seguida, os tecidos foram gradualmente desidratados em etanol (70%, 90%, 100%), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados a 4-5 µM de espessura e em seguida

corados com Hematoxilina e Eosina para avaliação das alterações histológicas provocadas pela migração das larvas. A coloração por Tricromo de Masson também foi realizada para a avaliação da deposição de fibras de colágeno. Por fim, a coloração polarizada por Picrosírio vermelho foi utilizada para a quantificação do processo inflamatório, deposição de fibras de colágeno e para determinar o tipo de fibras de colágeno presente no tecido. Todas as imagens dos cortes histológicos foram coletadas por um microscópio ótico (Leica DM5000). Dez camundongos BALB/c e dez camundongos GATA (oito semanas de idade, machos) não infectados foram usados como grupo controle.

2.6.4. Análise morfométrica

A quantificação do número de células inflamatórias presente no tecido pulmonar foi realizada por meio da análise morfométrica do pulmão. Basicamente, a análise morfométrica baseou-se em imagens de 15 campos randomicamente selecionados (área total: $1.12 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) dos cortes histológicos de uma lâmina por animal. O infiltrado inflamatório no pulmão foi quantificado pela contagem do número de núcleos presentes nos cortes histológicos. A diferença entre o número de núcleos presentes nos animais BALB/c e GATA infectados em diferentes tempos, e o número de núcleos observados nos animais controles determinou o número de células inflamatórias.

O estudo morfométrico da neoformação de fibras de colágeno baseou-se na análise de 20 campos randomicamente selecionados (área total: $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) dos cortes histológicos de uma lâmina por animal. A neoformação de colágeno no pulmão, indicativo de fibrose tecidual, foi quantificada pela diferença entre a área de colágeno depositada nos pulmões de animais BALB/c e GATA infectados em diferentes tempos, com a área de colágeno depositada nos animais não infectados. Os cortes histológicos

foram visualizados em objetivas de 40x e as imagens foram digitalizadas por uma microcâmara Leica DFC340FX, associada ao microscópio ótico Leica DM5000B. Todas as imagens foram analisadas usando o *software* Leica Qwin V3 (Leica Microsystems, Alemanha) do Laboratório de multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

2.7. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. A análise de variância ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni foram utilizados para avaliar as diferenças no ensaio de dosagem de EPO e MPO e a análise de variância ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Tukey para a análise morfométrica do tecido pulmonar entre os grupos avaliados. Para a avaliação das citocinas teciduais entre os grupos, foi utilizado o teste Kruskal–Wallis seguido do teste de comparação múltipla Dunn. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para a análise da avaliação da carga parasitária entre camundongos BALB/c e Δ dblGATA. A análise correlação foi realizada pelo teste de Spearman. As diferenças estatísticas foram consideradas existentes nesse estudo quando o valor de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. A ascaridíase larval é marcada por uma eosinofilia periférica e tecidual

Para avaliar o papel dos eosinófilos na fase larval da infecção por *Ascaris suum* foi primeiro necessário confirmar a presença destas células durante a migração das larvas no modelo experimental. A eosinofilia periférica e tecidual foi quantificada na circulação sanguínea por um contador hematológico e pela morfometria histológica do pulmão, respectivamente (Fig. 1). A análise do perfil hematológico de camundongos BALB/c WT infectados, demonstrou que após quatro dias de infecção, o número absoluto de eosinófilos circulantes já se encontrava consideravelmente elevado em relação aos mesmos animais no tempo 0 ($475 \pm 315.7/\text{mm}^3$ eosinófilos X 60 ± 22.11 eosinófilos/ mm^3). Além disso, o número de eosinófilos aumentou significativamente com a progressão da migração das larvas nos animais, atingindo o pico de eosinofilia periférica aos 14 dias de infecção (3847 ± 1620.62 eosinófilos/ mm^3 , $P=0.0079$). Após esse tempo de infecção, o número de eosinófilos circulantes diminuiu gradativamente. (Fig. 1A).

A eosinofilia tecidual também foi avaliada pela análise morfométrica dos cortes histológicos de pulmão de camundongos BALB/c WT infectados. A análise inicial revelou um aumento significativo de eosinófilos no tecido no quarto dia de infecção quando comparado com os animais controles (52 ± 5 eosinófilos X 18 ± 3 eosinófilos/ $350\mu\text{m}^2$ de tecido). Além disso, a eosinofilia tecidual também aumentou significativamente e gradativamente com a progressão da migração das larvas pelo pulmão até o décimo segundo dia de infecção (137 ± 13 eosinófilos/ $350\mu\text{m}^2$ de tecido) (Fig. 1B).

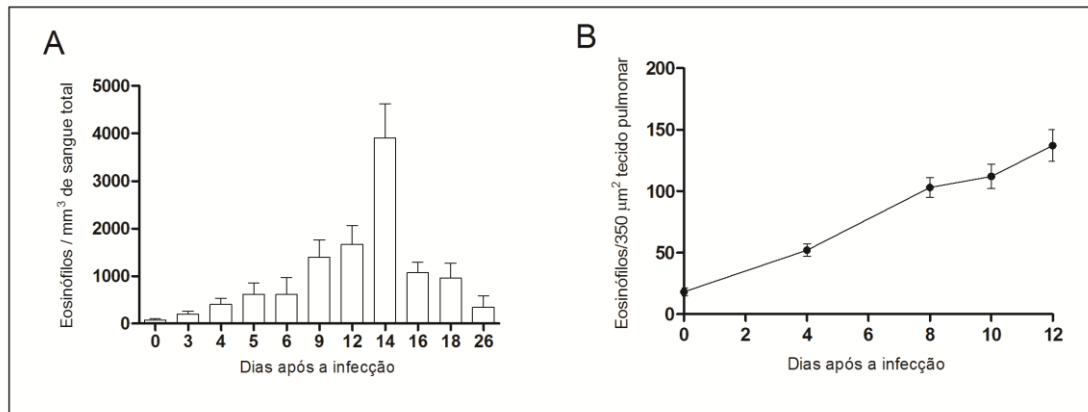


Figura 1: Quantificação de eosinófilos na circulação periférica e no tecido pulmonar durante a ascaridíase larval. Para a contagem dos eosinófilos na circulação sanguínea (A), dez camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) foram infectados com 2500 ovos embrionados de *Ascaris suum* por via intragástrica. Os eosinófilos foram quantificados diariamente até o 26º dia por um contador hematológico. Já a análise morfométrica do tecido pulmonar (B) foi realizada aos quatro, oito, dez e doze dias de infecção em 10 camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) para cada tempo. Dez camundongos não infectados foram usados como grupo controle (tempo 0). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM.

3.2. A ausência de eosinófilos está associada com o aumento da carga parasitária na ascaridíase larval

Uma vez comprovada a eosinofilia periférica e tecidual, o próximo passo foi entender o papel destas células durante a ascaridíase larval. Dessa forma, a capacidade dos eosinófilos em controlar a carga parasitária na ascaridíase larval foi avaliada pela infecção experimental de camundongos BALB/c WT e camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA). A carga parasitária foi avaliada durante a migração hepática,

pulmonar e intestinal das larvas, aos quatro, oito e doze dias de infecção respectivamente. (Fig. 2). Os resultados demonstraram que o número total de larvas foi significativamente maior no fígado, pulmões e intestino delgado de camundongos Δ dblGATA, quando comparados com os animais BALB/c selvagens ($570 \pm 40,2$ larvas X $402 \pm 50,0$ larvas no fígado, $P=0,0051$; $320 \pm 99,0$ larvas X $171 \pm 83,0$ larvas nos pulmões, $P=0,0317$; $3,92 \pm 0,9$ larvas X $9,09 \pm 1,013$ larvas no intestino delgado) (Fig. 2A, B e C).

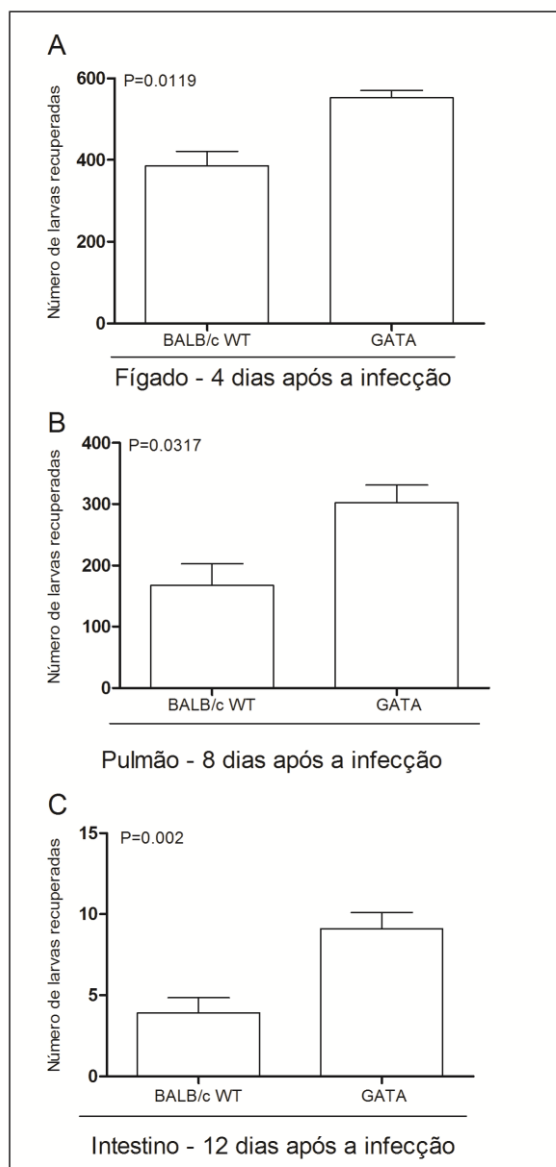


Figura 2: Análise parasitológica de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a ascaridíase larval. O número total de larvas de *A. suum* foi avaliado no fígado após quatro dias de infecção (A), nos pulmões após oito dias de infecção (B), e no intestino delgado após doze dias de infecção (C) em 10 camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) e 10 camundongos Δ dblGATA (machos, oito semanas de idade). Todos os animais foram infectados por 2500 ovos embrionados de *A. suum* por via intragástrica. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados pelos valores P indicados nos gráficos.

3.3. Camundongos deficientes em eosinófilos apresentam uma importante redução na resposta inflamatória pulmonar durante a migração das larvas de *A. suum*

A migração das larvas de *A. suum* induz um relevante infiltrado inflamatório no pulmão de camundongos BALB/c WT a partir do oitavo dia de infecção, quando comparados com animais não infectados. Este fenômeno se intensifica consistentemente após 12 dias de infecção (Fig. 3). Os neutrófilos foram observados qualitativamente em abundância no tecido no oitavo dia de infecção, o que de acordo com o capítulo um desta tese corresponde com o pico de migração das larvas no órgão. Por outro lado, após 12 dias de infecção, o infiltrado inflamatório foi mais evidente e exudativo, porém formado principalmente por células mononucleares e eosinófilos (Fig. 3B e C). Essa observação pode ser comprovada pela análise morfométrica quantitativa do infiltrado celular no pulmão de camundongos GATA. Os dados revelaram que a deficiência de eosinófilos induziu uma diminuição significativa no número de células inflamatórias no tecido após 12 dias de infecção quando comparado com animais WT ($330 \pm 20,23$ X 484 ± 95 , respectivamente) (Fig. 3G). O mesmo padrão de resposta foi observado na análise quantitativa do lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c WT e GATA (Fig. 3H). Os camundongos deficientes em eosinófilos apresentaram uma relevante diminuição no número total de células inflamatórias no BALF em comparação com animais WT, após oito dias de infecção ($1,2 \pm 0,3 \times 10^6$ células X $3,8 \pm 1,1 \times 10^6$ células, respectivamente, $P=0,0500$), e após 12 dias de infecção ($7,5 \pm 1,9 \times 10^6$ células X $37,1 \pm 12,0 \times 10^6$ células, respectivamente, $P=0.0442$).

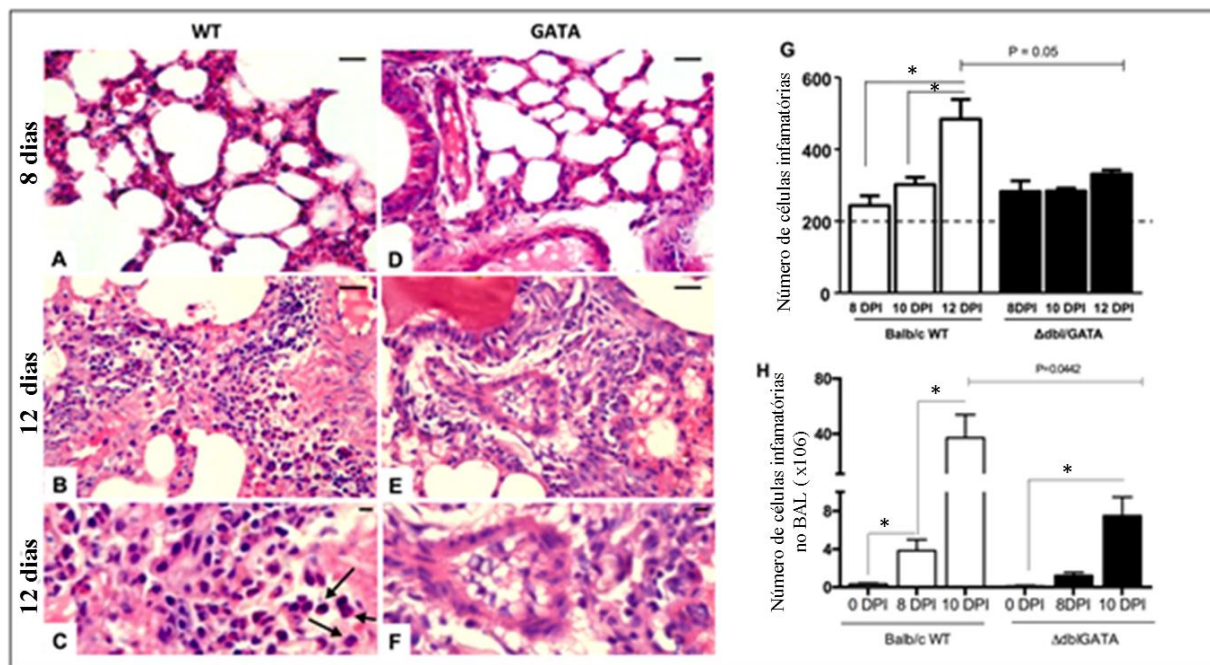


Figura 3: Avaliação histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão.

A histopatologia do pulmão de camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) foi analisada pela coloração HE após oito dias de infecção (A) e doze dias de infecção (B – 10x, C – 40x), e foi comparada com camundongos Δ dblGATA (machos, oito

semanas de idade) nos mesmos tempos de infecção (D, E e F, respectivamente). As setas apontam para os eosinófilos nos cortes histológicos. A análise morfométrica do pulmão foi avaliada nos tempo zero, oito, dez e doze dias de infecção em ambos os grupos de animais. A linha pontilhada representa o número basal de células no pulmão de animais não infectados (G). A análise da celularidade do lavado broncoalveolar foi realizada nos tempos zero, oito, dez e doze dias de infecção em ambos os grupos de animais (H). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados pelos valores P indicados nos gráficos.

3.4. A ausência de eosinófilos regula negativamente a ativação da resposta imune celular inata na inflamação pulmonar causada pela migração das larvas de *A. suum*

O papel dos eosinófilos na ativação da imunidade celular inata na inflamação pulmonar foi indiretamente avaliado pela produção da citocina IL-6 e do grânulo citotóxico MPO produzidos no pulmão de camundongos BALB/c WT e GATA durante a migração das larvas pelo órgão (Fig. 4). Os principais resultados revelaram de forma interessante que a ausência de eosinófilos resultou em uma diminuição significativa da produção de IL-6 no oitavo dia de infecção, produzida por neutrófilos/macrófagos, em comparação com os animais BALB/c WT infectados (Fig.4A). Esse dado sugere que a ausência de eosinófilos influencia diretamente na ativação de neutrófilos e/ou macrófagos. Essa hipótese é suportada pela significativa redução de MPO também observada no pulmão de camundongos deficientes em eosinófilos aos 8, 10 e 12 dias de infecção, quando comparados com animais selvagens (Fig. 4B).

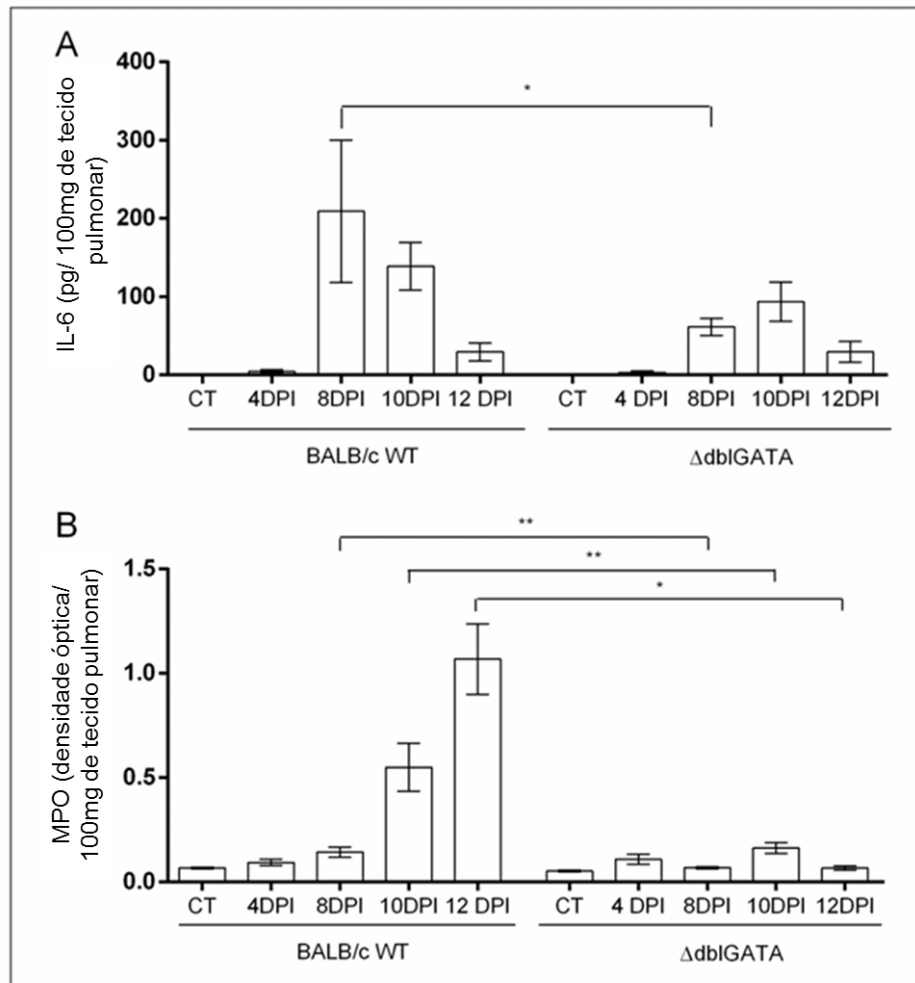


Figura 4: Produção de IL-6 e MPO nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão. Camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) e Δ dblGATA (machos, oito semanas de idade) foram infectados com 2500 ovos embrionados de *A. suum* e a produção de IL-6 (A) e MPO (B) foi avaliada em diferentes tempos de infecção no tecido pulmonar. Animais não infectados foram usados como grupo controle. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$).

3.5. As produções de TNF e peroxidase eosinofílica dependentes de eosinófilos estão elevadas durante a ascaridíase pulmonar e estão associadas com o remodelamento tecidual do pulmão após a migração das larvas

A imunopatologia da ascaridíase pulmonar foi avaliada durante 12 dias de migração de larvas pelo órgão. Como já mencionado no capítulo 1 desta tese, e nos resultados do capítulo 2, a migração das larvas de *A. suum* induz um influxo significativo de eosinófilos para o pulmão no 10º e principalmente 12º dia de infecção. Dessa forma, é notável que este influxo não se correlacione positivamente com a migração das larvas pelo órgão ($P=0.300$, $r=0.600$), uma vez que a partir do décimo dia de infecção, momento que os eosinófilos começam a aparecer em destaque no pulmão, as larvas de *A. suum* praticamente já deixaram o órgão. Com isso, esse dado sugere que esses eosinófilos têm outro importante papel no tecido pulmonar, além de simplesmente controlar a carga parasitária durante a ascaridíase larval.

De fato, a análise da imunopatologia demonstrou que o influxo de eosinófilos para o pulmão está associado positivamente com uma elevada produção de TNF e EPO em camundongos BALB/c WT aos 10 e 12 dias de infecção. A produção de TNF e EPO dependente de eosinófilos foi comprovada pela análise imunopatológica do pulmão de camundongos deficientes em eosinófilos, demonstrando que os camundongos GATA não produziram nenhum desses mediadores inflamatórios durante a migração das larvas de *A. suum* pelo pulmão (Fig. 5A e B e Fig. 6A e B).

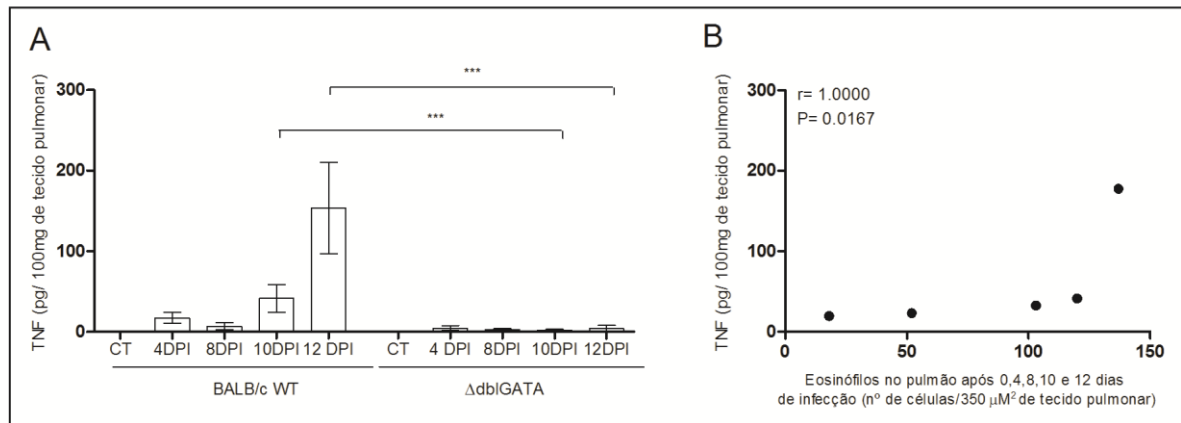


Figure 5: Produção de TNF nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão. Camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) e Δ dblGATA (machos, oito semanas de idade) foram infectados com 2500 ovos embrionados de *A. suum* e a produção de TNF (A) foi avaliada em diferentes tempos no tecido pulmonar. Animais não infectados foram usados como grupo controle. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representadas por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$). (B) Análise de correlação entre a produção de TNF no tecido pulmonar em diferentes tempos de infecção com a migração de eosinófilos para o pulmão. Os valores de P e R, no gráfico à direita representam a análise estatística da correlação.

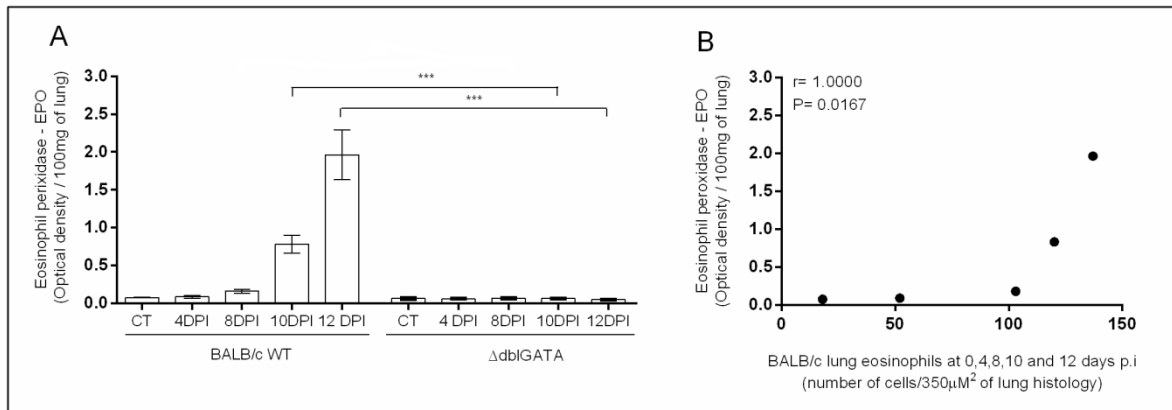


Figure 6: Produção de EPO nos pulmões de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a migração das larvas de *A. suum* pelo órgão. Camundongos BALB/c WT (machos, oito semanas de idade) e Δ dblGATA (machos, oito semanas de idade) foram infectados com 2500 ovos embrionados de *A. suum* e a produção de TNF (A) foi avaliada em diferentes tempos de infecção no tecido pulmonar. Animais não infectados foram usados como grupo controle. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$). (B) Análise de correlação entre a produção de EPO no tecido pulmonar em diferentes tempos de infecção com a migração de eosinófilos para o pulmão. Os valores de P e R, no gráfico a direita representa a análise estatística da correlação.

Por fim, quando finalmente foi avaliado o papel dos eosinófilos no processo de remodelamento tecidual do pulmão pela análise histológica, foi observado que camundongos GATA, deficientes em eosinófilos, falharam em restaurar a homeostasia do tecido pulmonar após a migração das larvas, evidenciada pela grande quantidade de fibras colágenas ainda depositadas no tecido após 12 dias de infecção, o que não mais ocorria no pulmão dos animais BALB/c WT no mesmo período de infecção ($P=0.020$) (Fig. 7, Painel A e B).

A análise da neoformação de colágeno pela coloração polarizada de Picrosítio, revelou que a matriz extracelular que ainda permanecia no pulmão dos animais GATA após 12 dias de infecção era formada por fibras colágenas do tipo 1 (Fig. 7 Painel C). Esses resultados sugerem que os eosinófilos possivelmente promovem o remodelamento da inflamação pulmonar causada por larvas de nematódeos por via dependente de TNF e EPO, e que durante a cicatrização/remodelamento do tecido, esses mediadores podem estar associados com a degradação das fibras colágenas do tipo 1.

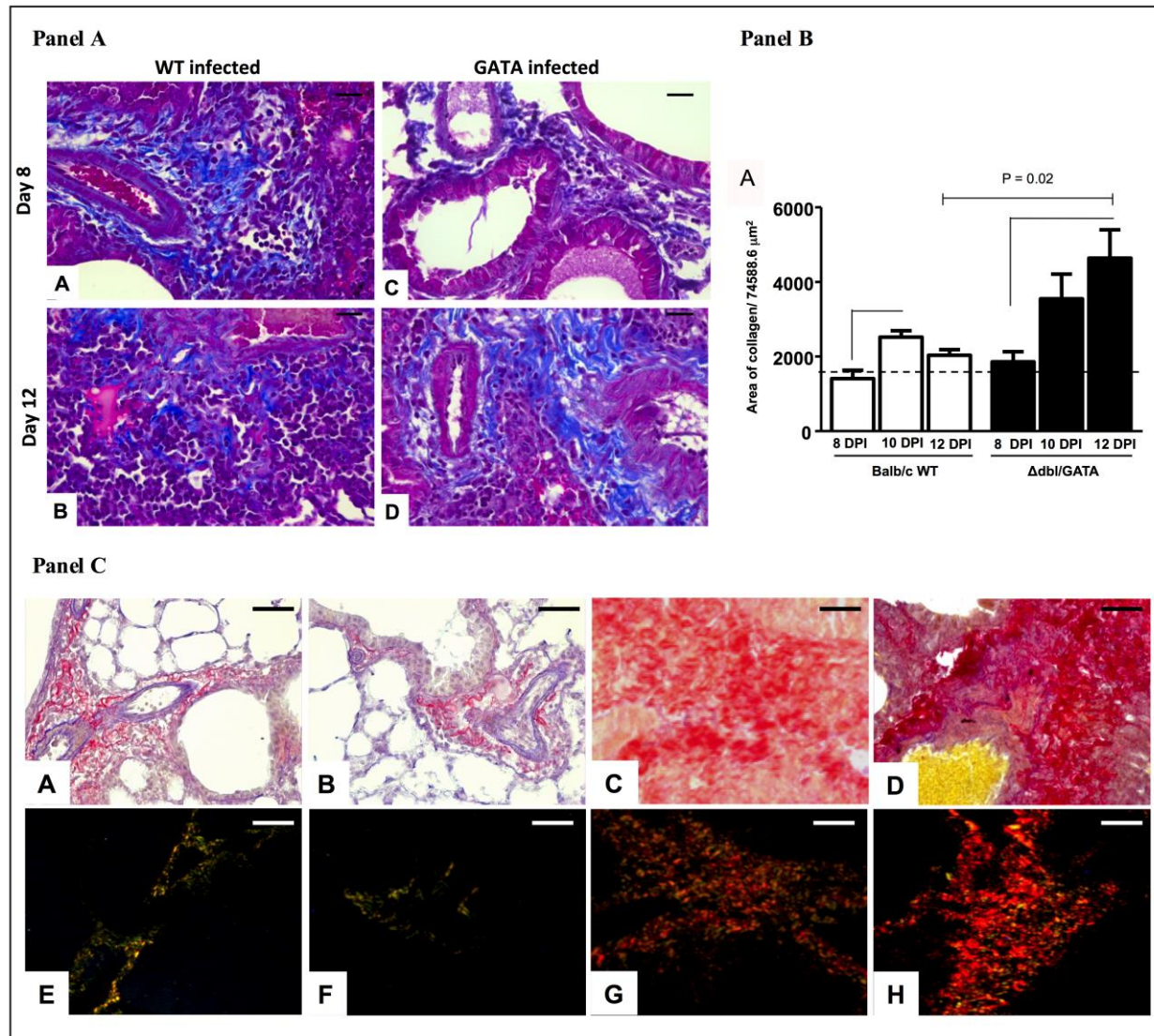


Figura 7: Fotografia representativa da análise da inflamação e fibrose pulmonar durante a ascaridíase larval. Painel A: Remodelamento tecidual pela deposição de matrix extracelular no pulmão de camundongos BALB/c WT (A e B) e Δ dblGATA (C e D) aos oito e doze dias de infecção, evidenciada pela coloração por Tricoma de Masson que cora as fibras colágenos em azul. Painel B: Análise quantitativa da deposição de fibras de colágeno em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA em diferentes tempos de infecção (oito, dez e doze dias). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados pelos valores P indicados nos gráficos. A linha pontilhada representa a deposição de colágeno no pulmão de animais não infectados (Tempo 0). **Painel C:** A e B: Corte histológico do pulmão de animais BALB/c WT e Δ dblGATA, respectivamente, com oito dias de infecção, apresentando leves alterações histológicas com pouca deposição de fibras colágenos. C: aumento considerável de fibras colágenos no tecido dos animais BALB/c WT após dez dias de infecção. D: Intensa deposição de colágeno no pulmão de camundongos Δ dblGATA após doze dias de infecção. E, F, G e H: Análise histológica pela coloração de Picrosítio polarizado, destacando a predominância de fibras colágenos do tipo 1 [coradas em vermelho (G e H)] no pulmão dos animais de ambos os grupo após doze dias infecção e a predominância de fibras colágeno do tipo 3 [coradas em verde (E e F)] no pulmão dos animais após oito dias de infecção.

4. DISCUSSÃO

Estudos sobre a imunobiologia da ascaridíase em suínos e humanos foram muito importantes para a elucidação do papel dos eosinófilos nas infecções helmínticas (Rhodes et al., 1982; Archer et al., 1985; Urban et al., 1988; Sugane, 1988; Helwigh et al., 1999; Jungersen et al., 1999; McSharry et al., 1999; Enobe et al., 2006; Lewis et al., 2007; Masure et al., 2013a, Masure et al., 2013b). No presente estudo, o papel dos eosinófilos durante a fase inicial da infecção por *Ascaris suum* foi caracterizado, utilizando um modelo de camundongos deficientes em eosinófilos.

Nossos principais resultados confirmaram um papel protetor dos eosinófilos durante a ascaridíase larval uma vez que na ausência dessas células verificou-se um aumento significativo do número de larvas migrando pelo hospedeiro. Em paralelo, na ausência de eosinófilos verificou-se uma relevante redução na resposta inflamatória durante a migração pulmonar das larvas de *A. suum*, caracterizada inicialmente pela diminuição do número de células no infiltrado inflamatório; diminuição da produção de citocinas inflamatórias e grânulos citotóxicos, como IL-6 e MPO, respectivamente; e pela diminuição da produção de TNF e EPO no pulmão dos animais após a migração das larvas pelo órgão, o que posteriormente, foi indiretamente correlacionado com um comprometimento do processo de remodelamento tecidual, caracterizado por elevados níveis de fibras colágenos depositadas no pulmão de animais GATA, quando comparadas com animais selvagens.

Baseado nesses resultados nós traçamos uma hipótese sobre o papel dos eosinófilos na ascaridíase larval (Figura 8). Os eosinófilos desempenham um papel fundamental no controle da infecção, reduzindo o número de larvas que migram pelo hospedeiro, enquanto também são responsáveis por mediar o processo de remodelamento e cicatrização tecidual do pulmão após a migração das larvas pelo

órgão, a princípio por uma via dependente da produção de TNF e EPO. Por outro lado, os eosinófilos também participam da regulação da resposta imune inata no tecido pulmonar, ativando indiretamente a produção de IL-6 e MPO, que resultam em inflamação e asma. Dessa forma, a proteção parcial da infecção por *Ascaris* e restauração da homeostasia tecidual por vias dependente de eosinófilos são heranças de uma intensa resposta inflamatória que ocorre no pulmão, associada ao desenvolvimento de asma. Essa hipótese contribui para o melhor entendimento da ocorrência periódica de casos de pneumonites eosinofílicas e asma, observada em crianças e adultos da Arábia Saudita e África do Sul expostos naturalmente e experimentalmente a larvas de *Ascaris lumbricoides* (Gelpi et al., 1967; Phills et al., 1972; Joubert et al., 1979; Aderle et al., 1982).

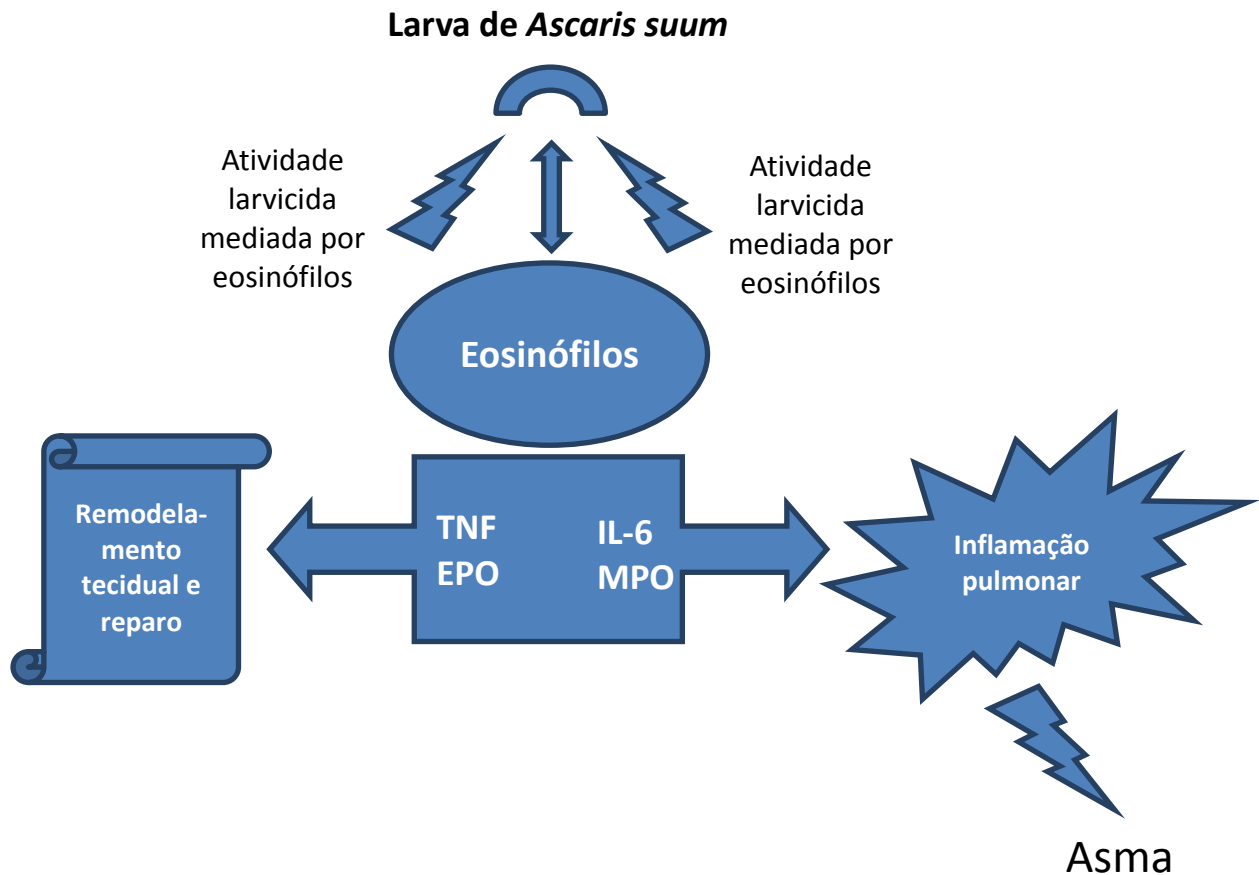


Figura 8: Hipótese sobre o papel dos eosinófilos durante a ascaridíase larval. Os eosinófilos desempenham um papel fundamental no controle da infecção, reduzindo o número de larvas que migram pelo hospedeiro, enquanto também são responsáveis por mediar o processo de remodelamento e cicatrização tecidual do pulmão após a migração das larvas pelo órgão, a princípio por uma via dependente da produção de TNF e EPO. Por outro lado, os eosinófilos também participam da regulação da resposta imune inata no tecido pulmonar, ativando indiretamente a produção de IL-6 e MPO, que resultam em inflamação e asma.

A habilidade dos eosinófilos em controlar a migração das larvas de nematódeos têm sido extensivamente relatada na literatura nas últimas décadas, principalmente durante reinfecções. E não existe dúvida que essas células possuem um papel crucial na primeira resposta do hospedeiro frente à infecção levando a morte das larvas desses

nematódeos (Kelley et al., 1964; Rhodes et al., 1982; Sugane et al., 1988; Eriksen et al., 1992; Helwigh et al., 1999; Jungersen et al., 1999; Knott et al., 1997).

De fato, a elevada carga parasitária durante a migração hepática e pulmonar apresentada por camundongos deficientes em eosinófilos também sugere um papel de resistência dessas células contra as larvas de *Ascaris suum*. Além disso, a associação da carga parasitária com a redução da resposta inflamatória na ausência de eosinófilos indica que a inflamação pulmonar é fundamental na resistência do hospedeiro frente à migração dessas larvas na primoinfecção. Entretanto, a importância da imunidade de mucosa intestinal e imunidade hepática no controle da infecção primária também não devem ser descartadas, uma vez que os camundongos deficientes em eosinófilos com quatro dias de infecção apresentaram um aumento significativo no número de larvas que migram pelo fígado. Urban e colaboradores (1988), estudando a imunobiologia da ascaridíase larval, propuseram a existência de uma imunidade intestinal protetora, denominada de barreira pré-hepática, que é responsável em bloquear o acesso das larvas à migração hepato-traqueal. Entretanto, muitos trabalhos ao longo dos anos focaram seus objetivos nesta fase da resposta imune frente à infecção por *Ascaris suum* tornando desconhecidos os mecanismos da patogênese da inflamação pulmonar e o papel do órgão em controlar a migração do parasito.

Os dados obtidos nesta tese, até o momento, demonstraram que a inflamação pulmonar induzida por larvas de *A. suum* é caracterizada inicialmente por um intenso influxo de neutrófilos para o foco inflamatório, que se correlaciona positivamente com o pico de migração das larvas pelo órgão (oitavo dia de infecção), assim como, com uma relevante produção da citocina IL-6 e de MPO no órgão. Paralelamente, com a evolução da migração das larvas, o número de eosinófilos na corrente sanguínea aumenta significativamente, e o infiltrado inflamatório neutrofílico é gradualmente substituído

por um influxo de células mononucleares e eosinófilos para o pulmão (dez a doze dias de infecção).

Foi observado, de forma interessante, que a ausência de eosinófilos diminuiu consideravelmente o número de células inflamatórias no tecido pulmonar, assim como no lavado broncoalveolar durante a migração das larvas pelo órgão. Essa observação, somada ao intrigante resultado que demonstra que a ausência de eosinófilos modula negativamente a produção de IL-6 e MPO por outras células inflamatórias, provavelmente neutrófilos, sugere que os eosinófilos têm importante papel em ativar indiretamente a resposta imune inata durante a migração das larvas de *A. suum* pelo pulmão.

De fato, os papéis de IL-6 em induzir inflamação tecidual e de MPO matar larvas de nematódeos são extensivamente relatados na literatura. IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua na resposta imune mediada por antígenos e em reações inflamatórias (Kishimoto et al., 2006). Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013) observaram uma forte correlação entre a produção de IL-6 no pulmão com a migração de larvas de *A. suum* pelo órgão. Neste capítulo, foi observado, de forma interessante, que camundongos deficientes em eosinófilos, apresentaram um aumento relevante no número de larvas que migram pelo pulmão e uma redução significativa da produção de IL-6 e na resposta inflamatória tecidual, sugerindo que os eosinófilos estão envolvidos na síntese/secreção de IL-6 e que esta citocina participa na patogênese da inflamação pulmonar durante a ascaridíase larval. Não obstante, MPO é o principal constituinte dos grânulos primários dos neutrófilos (Moraes et al., 2006), que desempenham um importante papel na atividade microbicida de fagócitos (Klebanoff et al., 2005).

Embora alguns estudos baseados em outros modelos de infecções por helmintos, como *Trichinella spiralis* e *Strongyloides stercoralis*, suportarem o papel redundante de

eosinófilos e neutrófilos no controle de larvas de nematódeos (Buys et al., 1984; O'Connell et al., 2011), parece que na infecção inicial por *Ascaris suum*, esse padrão de compensação não ocorre, e os eosinófilos e neutrófilos desenvolvem um trabalho colaborativo na morte das larvas. Essa teoria é suportada pelos resultados que demonstraram que camundongos Δ dblGATA apresentaram um comprometimento na capacidade de controlar a migração das larvas, que poderia ser explicado pela regulação negativa da ativação de neutrófilos e outras células da imunidade inata. Neste contexto, o presente estudo sugere que os eosinófilos estão envolvidos na ativação de células da imunidade inata que resulta no desenvolvimento da resposta imune protetora da ascaridíase larval.

Paralelamente, como mencionado anteriormente, os eosinófilos passaram a ser predominante no pulmão após a migração das larvas pelo órgão. Dessa forma, os níveis de EPO produzidos por essas células foram insignificantes durante o pico da migração das larvas pelo órgão. Entretanto, a produção de EPO por eosinófilos tem sido associada com um dos mais importantes mecanismos no controle de larvas de nematódeos (Specht et al., 2006; Hamann et al., 1990). Dessa forma, diante dos intrigantes resultados obtidos, este estudo sugere que os eosinófilos assim como EPO têm diferentes funções na imunopatologia da ascaridíase larval.

Depois de demonstrar que os eosinófilos ativam indiretamente a imunidade inata, e que estas outras células estão associadas com o controle da migração das larvas de *A. suum*, este estudo sugere que os eosinófilos podem apresentar dois papéis distintos durante a ascaridíase larval, devido à migração e ativação tardia dessas células para o foco inflamatório. É possível separar a sua função pelos eventos que ocorrem durante a migração das larvas pelo pulmão, e pelos eventos que ocorrem no pulmão após este processo. Esta hipótese baseia-se nos dados obtidos da análise imunopatológica do

pulmão de camundongos deficientes em eosinófilos, indicando um importante papel paralelo para estas células no remodelamento do tecido pulmonar após a migração das larvas.

É muito comum estudos associarem as infecções helmínticas regulando a inflamação das vias aéreas induzida por componentes alérgicos ou doenças crônicas. No entanto, a caracterização da inflamação das vias aéreas induzida por helmintos ainda não está clara e deve ser elucidada. De fato, Enobe e colaboradores, (2006) demonstraram que a migração de larvas de *A. suum*, em modelo murino, induz uma grave inflamação das vias aéreas, caracterizada por hemorragia intra-alveolar, intenso infiltrado inflamatório e relevante hiperreatividade brônquica. Este estudo corrobora com esses resultados, e sugere que o influxo de eosinófilos para o pulmão após a inflamação tecidual, é crucial para caracterizar a inflamação helmíntica das vias aéreas dependente de eosinófilos e seus grânulos proteicos.

Em condições normais, a migração das larvas de *A. suum* em camundongos BALB/c induz um aumento progressivo de eosinófilos na circulação periférica e no tecido pulmonar, assim como a produção de TNF e EPO dependentes de eosinófilos. Esses fenômenos estão associados com um aumento da deposição de matrix extracelular no tecido e posteriormente com a restauração da homeostasia pulmonar. Entretanto, a ausência de eosinófilos e consequente falta de produção de EPO e surpreendente ausência de TNF apresentados pelos animais Δ dblGATA foram associadas com um relevante aumento de fibras colágenos do tipo 1 depositadas no pulmão, após a migração das larvas pelo órgão. Esses achados sugerem que o remodelamento tecidual na ascaridíase larval é caracterizada pela deposição de matrix extracelular composta por fibras colágenos do tipo 1, e a sua regulação é mediada por EPO e TNF dependente de eosinófilos.

Embora eosinófilos, TNF e EPO já foram associados com o processo de remodelamento tecidual em diferentes modelos, tais como inflamação das vias aéreas; este é o primeiro relato na literatura que associam eosinófilos e a dependente produção de TNF e EPO com o processo de remodelamento tecidual induzido por larvas de nematódeos. Cheng e colaboradores (2012) revisaram que os eosinófilos estão envolvidos no processo de remodelamento tecidual e que TNF- α já foi associada com a ativação e proliferação de fibroblastos, hiperplasia de células epiteliais, hipertrofia e contração da musculatura lisa e com atividade pró-angiogênese (Norrby et al., 2002; Luo et al., 2005; Theiss et al., 2005; Brightling et al., 2008). Estes são os principais fenômenos que ocorrem durante o processo de remodelamento tecidual. Além disso, eosinófilos produtores de TNF- α e seus papéis em desordens inflamatórias pulmonares já foram extensivamente discutidos na literatura. Kolobovnikova e colaboradores (2012) demonstraram um aumento significativo de TNF- α produzidos por eosinófilos em pacientes com tuberculose pulmonar. Além disso, *Staphylococcus aureus* têm sido associado com o aumento da produção de TNF- α por eosinófilos, com consequente exacerbação da inflamação eosinofílica asmática.

Recentemente, Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013), demonstraram que a ascaridíase pulmonar induz relevante aumento de TNF no tecido, mas que esta produção não se correlaciona com o momento da migração das larvas do parasito pelo órgão. Neste estudo, várias evidências sugerem que a produção de TNF no pulmão de animais infectados é dependente de eosinófilo, tais como: forte e positiva correlação entre a produção de TNF com a migração de eosinófilos para o pulmão e a não produção de TNF nos pulmões de camundongos deficientes em eosinófilos.

Considerando o papel dos eosinófilos e TNF no remodelamento tecidual, já foi demonstrado que, em microambientes ricos em TNF, eosinófilos são importante fonte

de metaloproteinases (MMP), especialmente MMP-9 (Kelly et al., 2012), as quais são enzimas proteolíticas que estão envolvidas na degradação de matrix extracelular (Lechapt-Zalcman et al., 2000). Agreen e colaboradores (1998) sugeriram que os níveis de MMP-9 na fase inicial da inflamação prediz a quantidade de fibras colágenos depositadas no tecido no processo de remodelamento tecidual. Damjanovic e colaboradores (2011) demonstraram que a ausência de TNF- α no pulmão durante a inflamação pulmonar aguda pelo vírus influenza H1N1, induziu um aumento significativo na deposição de fibras colágenos no pulmão, exatamente como ocorreu no presente estudo, para a ascaridíase larval.

Todos esses achados nos ajudam a explicar porque os camundongos deficientes em eosinófilos apresentaram um relevante aumento na deposição de fibras colágenos e um conseqüente comprometimento no remodelamento tecidual do pulmão afetado pelas larvas de *A. suum*. E torna-se possível sugerir que a produção de TNF dependente de eosinófilos é crucial para promover o reparo tecidual da inflamação pulmonar causada por larvas de nematódeos que migram pelo pulmão.

Diante de todo o exposto, os dados obtidos no presente capítulo, utilizando um modelo experimental murino deficiente em eosinófilo, sugerem funções adicionais para estas células durante a ascaridíase larval, como o controle da carga parasitária e a promoção do remodelamento tecidual após a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões de animais experimentalmente infectados. Essas funções adicionais também podem ocorrer para as outras infecções helmínticas com ciclo pulmonar e dessa forma sugere uma nova hipótese na evolução dos eosinófilos na relação parasito-hospedeiro.

CAPÍTULO 3

Influência da ascaridíase larval na resposta imunológica de camundongos concomitantemente infectados por *Vaccinia virus*

Submetido:

Gazzinelli-Guimaraes et al. The concomitant larval Ascaris sp. infection downmodulates Vaccinia virus-specific immune response. Journal of Virology. JVI03547-14. 2014.

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conforme já apresentado nos primeiros capítulos, a ascaridíase é considerada a doença mais prevalente nas áreas de pobreza do mundo (Hotez et al., 2014). Nesse contexto, a sobreposição geográfica de áreas endêmicas para diversos patógenos humanos, frequentemente associam a ascaridíase com doenças concomitantes, como por exemplo, àquelas causadas por vírus: HIV (Fedaku et al., 2013; Roka et al., 2013; Tian et al., 2012), HTLV-1 (Robinson et al., 1991); bactérias: *Mycobacterium tuberculosis* (Li et al., 2014) e *Vibrio cholera* (Saha et al., 2008); protozoários: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* (Degarege et al., 2012; Abanyie et al., 2013; Mulu et al., 2013), *Leishmania sp.* (Mengesha et al., 2014), *Giardia duodenalis* (Hagel et al., 2011), *Entamoeba histolytica/díspar* (Gelaw et al., 2013); e inúmeros helmintos parasitos (Phongluxa et al., 2013; Sanchez et al., 2013).

Somado a isso, a potencial coinfeção com *Ascaris sp.* pode representar importantes implicações para as estratégias de controle de doenças tropicais e emergentes, uma vez que as infecções helmínticas tem a capacidade de modular negativamente a resposta imunológica de doenças não associadas, e também podem reduzir consideravelmente a eficácia vacinal para outras doenças (Elias et al., 2001; Cooper et al., 2001).

A explicação para tal fenômeno pode estar associada com o tipo de resposta imunológica apresentada por indivíduos infectados pelo nematódeo. A ascaridíase humana é caracterizada por uma resposta imune T_H2 e regulatória (Cooper et al., 2000; Cooper et al., 2004), embora IL-6 e TNF- α parecem apresentar papel fundamental na patogênese da inflamação pulmonar causada pela migração das larvas pelo órgão (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). Além disso, sabe-se que o estabelecimento da

resposta T_H2 específica a helmintos, normalmente coincide com a modulação negativa da resposta T_H1 , considerada crucial para o controle e resolução de infecções virais.

Neste contexto, o objetivo do presente capítulo foi demonstrar, pela primeira vez, o impacto da infecção concomitante por *Ascaris suum* e o vírus *Vaccinia virus* (VACV), com o intuito de compreender os mecanismos imunopatológicos de como os helmintos influenciam o curso das infecções virais, os mecanismos de imunoregulação envolvidos durante a coinfeção e avaliar o papel da inflamação pulmonar induzida pelo VACV respiratório no controle da migração de larvas de *A. suum* na fase inicial da infecção.

A escolha do vírus *Vaccinia* para o estudo da influência da ascaridíase larval no percurso de infecções virais ocorreu devido ao grande interesse recente neste vírus. O *Vaccinia virus* é considerado uma vacina viva e foi extensivamente utilizado para erradicar a varíola no mundo. Atualmente, é amplamente usado como vetor para a expressão de genes de outros patógenos e é considerado um dos melhores modelos para se estudar a interação patógeno-hospedeiro (Smith et al., 2013). Além disso, a infecção intranasal por VACV afeta consistentemente o trato respiratório do hospedeiro, induzindo uma inflamação aguda, caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório para o pulmão, e por sua vez a ascaridíase larval também é caracterizada por uma intensa inflamação das vias aéreas. Dessa forma, com esse modelo, seria possível avaliar o papel de um microambiente inflamatório no controle da migração das larvas do nematódeo. Não obstante, em condições naturais, o *Vaccinia virus* é o agente etiológico de uma zoonose emergente que afeta bovinos e humanos em inúmeras regiões do Brasil (Trindade et al., 2006), e o número de casos de humanos naturalmente e acidentalmente infectados tem aumentado de forma considerável (Megid et al., 2012; Lewis-Jones et al., 2004).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Comitê de ética

A manutenção e o uso de animais foram realizados em suma concordância com as recomendações do COBEA. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Protocolo # 45/2012) (Anexo 2).

2.2. Parasitos

Os vermes adultos de *Ascaris suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os ovos de *A. suum* foram isolados dos úteros dos vermes adultos fêmeas por maceração mecânica, purificados por filtração e colocados em cultura com solução de ácido sulfúrico a 0,2M, como descrito por Boes et al. (1998). No 150º dia de cultura, pico de infectividade dos ovos, de acordo com primeiro capítulo deste trabalho (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013), os ovos foram usados para as infecções experimentais.

2.3. Vírus

Células de macacos verdes africanos (células BSC-40; ATCC, EUA) foram usadas para a replicação do vírus e titulação. A cultura de células foi estabelecida em meio de cultura celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle medium*) a 37°C, suplementado com L-glutamina 2 mM e 5% soro fetal bovino (FBS, Gibco - EUA). A cepa de *Vaccinia virus* utilizada neste estudo foi a cepa selvagem WR (*Western Reserve*) (doada gentilmente pelo Dr. Bernard Moss, NIH/NIAID,EUA). O vírus foi

mantido e titulado em células BSC-40 cells. Antes do uso nas infecções experimentais, os vírus foram purificados por gradiente de concentração em solução saturada.

2.4. Camundongos e infecção experimental

Trezentos e quarenta camundongos BALB/c (machos, oito semanas de idade) foram divididos em quatro grupos experimentais. Grupo um: 40 camundongos não infectados; grupo dois: 100 camundongos monoinfectados por *Vaccinia virus* WR; Grupo três: 100 camundongos monoinfectados por *Ascaris suum*; Grupo quatro: 100 camundongos coinfectados, simultaneamente, por *Vaccinia virus* WR e *Ascaris suum*.

Para a infecção viral, os grupos dois e quatro foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de 40 µL de Xilazina/Cetamina (10/75 mg/Kg). A infecção viral foi realizada via inoculação intranasal de 1×10^5 PFU de VACV. Para a infecção helmíntica, os grupos três e quatro foram inoculados via intragástrica com 2500 ovos embrionados de *A. suum*, incubados por 150 dias em cultura com H₂SO₄ 0,2M. Animais do grupo um foram submetidos as mesmas condições, entretanto o inóculo foi realizado com PBS e água filtrada respectivamente.

2.4.1. Quantificação da carga viral nos pulmões de camundongos BALB/c monoinfectados por VACV e co-infectados por VACV e *A. suum*

Dez animais BALB/c (machos, oito semanas de idade) do grupo dois e dez do grupo quatro foram eutanasiados após quatro e oito dias de infecção, conforme descrito anteriormente. Os pulmões dos animais foram assepticamente removidos para a quantificação da carga viral no órgão, pesados e armazenados a -80°C até o

processamento. Os órgãos foram homogeneizados em nitrogênio líquido e o homogenato pulmonar foi eluído em um mL de PBS. Em seguida, os homogenatos foram congelados e descongelados ($-80^{\circ}/37^{\circ}\text{C}$) três vezes e centrifugados a $450 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, sonicados e depois diluídos de forma seriada em meio DMEM. Em seguida, as diluições seriadas foram adicionadas a monocamadas de células plaqueadas em placas de cultura de seis poços, incubadas por uma hora a 37°C e 5% CO_2 , e posteriormente, dois mL do meio foram adicionados em cada poço plaqueado para mais 48 horas de incubação nas mesmas condições. Após a cultura, as células BSC-40 foram coradas com solução cristal de violeta (cristal de violeta 0,5%, etanol 70% e paraformaldeído 1%) por 30 minutos. Após a coloração, as células foram lavadas e a quantificação viral foi realizada pela contagem das placas virais formadas. O número de placas virais foi multiplicado pelo respectivo fator de diluição e convertido para a unidade p.f.u/g.

2.4.2. Avaliação da carga parasitária

Trinta camundongos BALB/c (machos, oito semanas de idade) e 30 camundongos Delta dblGATA foram infectados por via intra-gástrica com 2500 ovos embrionados de *A. suum*, incubados por 150 dias em cultura com H_2SO_4 0,2M. A carga parasitária em ambos os grupos foi avaliada com base na recuperação total das larvas no fígado após quatro dias de infecção, nos pulmões após oito dias de infecção, e no intestino delgado, após doze dias de infecção. Nesses tempos de infecção, os respectivos órgãos foram coletados, picotados com tesoura cirúrgica e colocados em um aparato de Baermann modificado (Morais, 1948) por 4 horas em PBS a 37°C . As larvas foram

recuperadas no pellet do aparato, fixadas em formalina 10% e quantificadas por microscopia óptica.

2.4.3. Avaliação da morbidade e mortalidade da coinfeção por VACV e *A. suum*

A morbidade da coinfeção por VACV e *A. suum* ocorreu pela avaliação da perda de peso dos animais monoinfectados e coinfectados. 10 animais BALB/c (machos, oito semanas de idade) de cada grupo foram acompanhados após a infecção e pesados diariamente durante 12 dias consecutivos no mesmo horário e condições. A análise foi realizada considerando o peso de cada dia de infecção, ao longo dos 12 dias de avaliação, sobre o peso inicial antes da infecção (Tempo 0). Neste acompanhamento, a mortalidade dos animais também foi avaliada nos grupos de estudo.

2.4.4. Perfil de citocinas sistêmicas de camundongos coinfectados por VACV e *A. suum*

Para a avaliação do perfil da resposta sistêmica dos grupos de estudo deste capítulo, a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como a frequência de citocinas intracitoplasmáticas IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β produzidas por linfócitos T CD4⁺ oriundos do baço dos animais, foram avaliadas por citometria de fluxo.

Dez camundongos BALB/c (oito semanas de idade, machos) de cada grupo conforme descrito no item 2.4 foram eutanasiados após oito dias de infecção. Os baços foram removidos dos animais em capela de fluxo laminar e transferidos imediatamente para meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA), suplementado com soro fetal bovino

10%, L-glutamina 1,6% e antibiótico penicilina/estreptomicina 3% (Invitrogen, EUA). Para purificar os esplenócitos, os órgãos foram mecanicamente macerados e o produto da maceração foi filtrado a 70 μM (BD Falcon, EUA). Em seguida, os esplenócitos purificados foram lisados por 10 minutos em solução de cloreto de amônio 0,15 M e cerca de 1×10^6 células/poço foram incubadas em cultura em placas de 24 poços, na presença ou ausência (controle não estimulado) de 1×10^4 partículas de VACV inativadas, por 24 horas. Nas últimas quatro horas de cultura, Brefeldina A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, USA) foi adicionada nas células em cultura.

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos monoclonais de superfície CD4, conjugado com FITC (BD Biosciences, EUA) e CD8, conjugado com PerCP (BD Biosciences, EUA) por 30 minutos, ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS-W (albumina sérica bovina – BSA 0,5% e azida sódica 0,1%) por 10 minutos a 400 x g. Em seguida foram permeabilizadas com PBS-P (albumina sérica bovina – BSA 0,5%, azida sódica 0,1% e saponina 0,5%) por dez minutos. Após a permeabilização, as células, já marcadas com anticorpos de superfície anti-CD4 e anti-CD8, foram transferidas para tubos de poliestirenos (BD, Biosciences, EUA), contendo anticorpos anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-TGF- β conjugados com PE (ficoeritrina) (BD, Biosciences, EUA) um anticorpo por tubo. As células foram incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente, as células marcadas foram lavadas com PBS-W e fixadas com solução fixadora (paraformaldeído 10g/L, cacodilato de sódio 10,2 g/L, e cloreto de sódio 6.65 g/L) por 15 minutos a 4°C.

Em seguida, as células marcadas foram levadas ao citômetro de fluxo *FACScan* (BD Biosciences, USA) para a análise funcional da população de linfócitos T CD4+ dos

animais infectados e não infectados por *A. suum*. A análise dos dados foi realizada pelo programa *Cell Quest Pro*TM (BD Biosciences, EUA).

2.4.5. Análise imunopatológica do pulmão de camundongos coinfectedados por VACV e *Ascaris suum*

A análise imunopatológica do pulmão de camundongos dos diferentes grupos avaliados baseou-se na análise histológica e no perfil de citocinas teciduais do pulmão em diferentes tempos de infecção (quatro, oito, e doze dias de infecção). Foram eutanasiados 10 animais de cada grupo e seus pulmões foram removidos. Os lobos direitos dos pulmões foram usados para a quantificação de citocinas teciduais, e os lobos esquerdos, para a histopatologia.

2.4.5.1. Perfil de citocinas teciduais

O perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 foi avaliado nos pulmões dos camundongos dos diferentes grupos deste capítulo. Os pulmões dos animais foram removidos nos diferentes tempos e condições de infecção, macerados por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) em um mL de PBS suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. Em seguida o homogenato de pulmão foi centrifugado a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-17A pela técnica de citometria de fluxo usando o kit CBA *Cytometric Bead Array* (CBA – BD Biosciences, EUA).

2.4.5.2. Análise histológica e morfométrica do tecido pulmonar

Os lobos esquerdos dos pulmões dos animais dos diferentes grupos deste capítulo foram fixados em solução de formalina tamponada 10%. Em seguida, os tecidos foram gradualmente desidratados em etanol (70%, 90%, 100%), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina que foram cortados a 4-5 μm de espessura e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina para avaliação das alterações histológicas provocadas pela monoinfecção por *A. suum*, monoinfecção por VACV e coinfeção por *A. suum* e VACV. A análise morfométrica baseou-se em imagens de 20 campos randomicamente selecionados (área 350 μm^2 por amostra), em aumento de 400x, dos cortes histológicos de uma lâmina por animal. O infiltrado inflamatório no pulmão foi quantificado pela contagem do número de núcleos presentes nos cortes histológicos.

2.5. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para avaliar as diferenças estatísticas do experimento de morbidade (variação do peso dos animais), foi realizada a análise de variância ANOVA pareada, seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni. Para a avaliação da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺, citocinas teciduais e sistêmicas entre os grupos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla Dunn. Teste T não pareado foi usado

para determinar as diferenças na análise da quantificação viral e carga parasitária entre os grupos. As diferenças estatísticas foram consideradas existentes nesse estudo quando o valor de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. A migração das larvas de *A. suum* induz uma grave morbidade/mortalidade em animais concomitantemente infectados por *Vaccinia virus*

Para avaliar o impacto da ascaridíase larval em uma infecção viral concomitante, camundongos BALB/c foram infectados simultaneamente com ovos embrionados de *A. suum* e partículas virais do VACV. Inicialmente a morbidade dos diferentes grupos avaliados foi testada pela medição da variação do peso dos animais ao longo de 12 dias de infecção em relação ao tempo 0 (Fig 1A). Os resultados revelaram que a monoinfecção por VACV WR induziu uma significativa perda de peso nos animais a partir do quarto dia de infecção, com o pico no sétimo e oitavo dia, quando comparados com animais não infectados e monoinfectados por *A. suum*. Além disso, a monoinfecção por VACV foi responsável pela mortalidade de 30% dos animais no oitavo dia de infecção, aumentando para 40% no nono dia (Fig 1B). Quando avaliado o impacto da migração das larvas de *A. suum* em animais infectados por VACV, os dados revelaram que a infecção concomitante induziu uma redução significativa no peso dos animais, quando comparados com animais monoinfectados por VACV, no sétimo e oitavo dia, que coincide com o pico de migração das larvas pelos pulmões dos animais (capítulo 1 desta tese). Além disso, a co-infecção por *A. suum* e VACV elevou para 50% a mortalidade dos animais no sétimo dia, aumentando para 70% no oitavo dia.

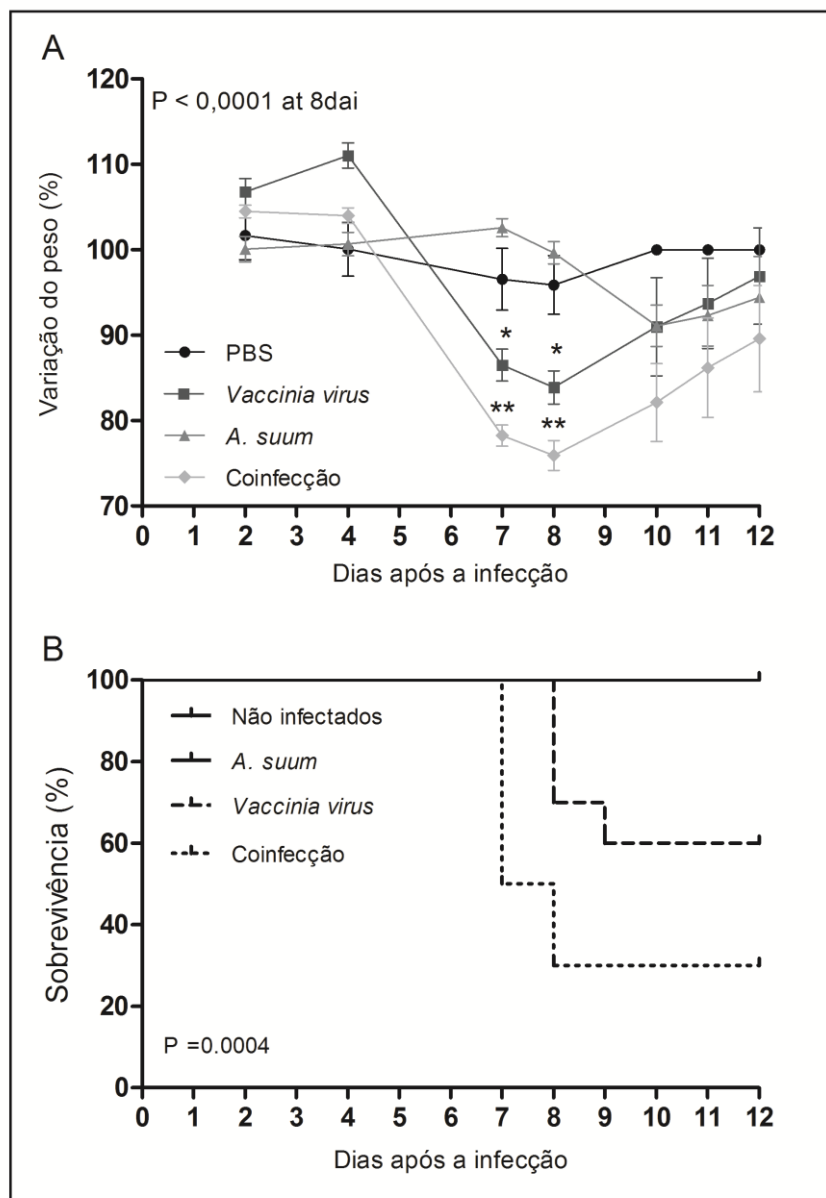


Figura 1. Avaliação da morbidade e mortalidade de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*. (A) A morbidade foi avaliada pela variação do peso de 10 animais BALB/c de cada grupo, ao longo de doze dias de infecção, em relação ao peso inicial no momento da infecção (100%). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$). (B) Avaliação da mortalidade dos mesmos animais analisados quanto a morbidade da coinfecção.

3.2. A migração das larvas de *A. suum* aumenta significativamente a carga viral de VACV nos pulmões de animais co-infectados

A hipótese que poderia explicar por que a ascaridíase larval potencializa a doença causada pelo VACV, seria que a infecção helmíntica favorece a replicação viral em hospedeiros coinfected. Neste contexto, a carga viral foi quantificada nos pulmões de camundongos coinfected e comparada com a respectiva infecção em animais monoinfectados. Dessa forma, a análise dos dados revelou que camundongos coinfected por VACV e *A. suum* apresentaram um aumento significativo da carga viral nos pulmões após quatro e oito dias de infecção, quando comparados com animais monoinfectados por VACV ($1,6 \times 10^4$ p.f.u/g X $2,3 \times 10^8$ p.f.u/g; $2,5 \times 10^4$ p.f.u/g X $3,7 \times 10^5$ p.f.u/g, $P=0.0095$, respectivamente) (Fig. 2). A análise dos pulmões de animais não infectados e monoinfectados por *A. suum* revelou ausência de vírus.

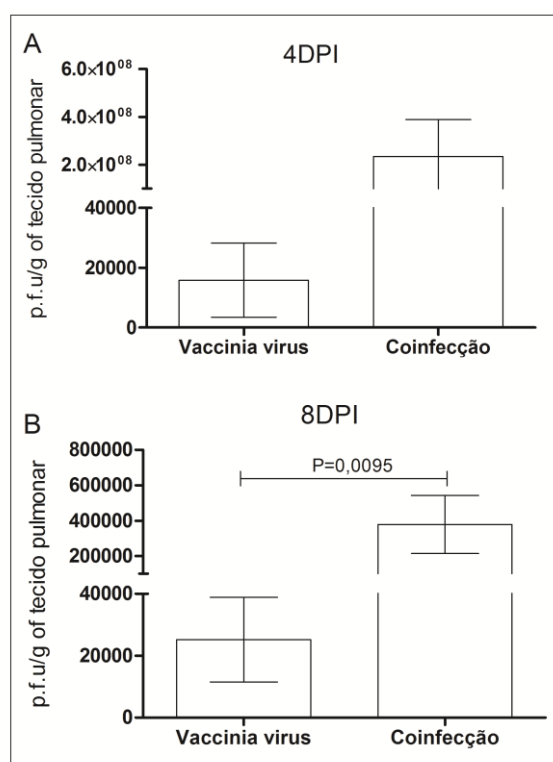


Figura 2: Carga viral dos pulmões de camundongos monoinfectados por VACV e coinfected por VACV e *A. suum*. Os títulos de VACV foram quantificados nos pulmões de 10 camundongos BALB/c de cada grupo após quatro dias de infecção (A) e oito dias de infecção (B). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representadas pelo valor de P nos gráficos.

3.3. A ascaridíase larval modula negativamente a resposta imune específica ao VACV

Com o objetivo de compreender como a migração das larvas de *A. suum* contribui para aumentar a carga viral durante a coinfeção, a resposta imune sistêmica dos animais dos diferentes grupos foi avaliada, com ênfase na resposta T_H1 , T_H2 , e regulatória. A frequência das citocinas intracelulares foi avaliada no contexto *ex vivo* e também após estimulação *in vitro* com partículas inativadas do VACV.

Inicialmente, a análise da frequência das populações de linfócitos T $CD4^+$ dos diferentes grupos revelou que camundongos monoinfectados por *A. suum* apresentaram uma redução significativa destas células, quando comparadas com os animais não infectados, a qual retornou aos níveis basais na coinfeção pelo VACV (Fig. 3). Além disso, a análise revelou de forma interessante, que camundongos coinfectados apresentaram uma redução significativa na frequência de linfócitos T $CD8^+$ quando comparados com animais monoinfectados por VACV (Fig. 3B).

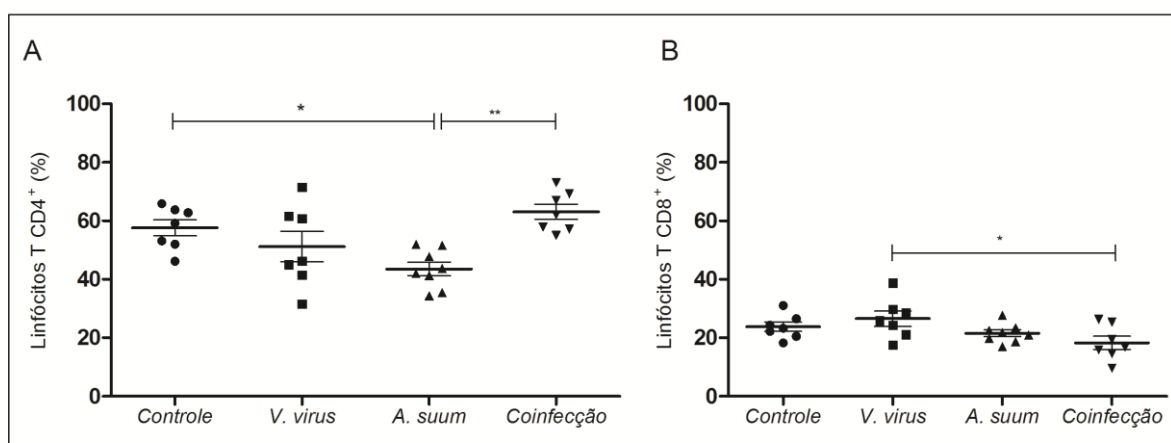


Figure 3: Frequência de linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos T $CD8^+$ em camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*. A frequência de células T $CD4^+$ (A) e células T $CD8^+$ (B) oriundas do baço de 10 camundongos BALB/c de cada grupo, no oitavo dia

de infecção, foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representadas por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$).

Para a análise do perfil funcional das células T CD4⁺, as citocinas intracelulares IFN- γ , TNF- α , IL-4 IL-10, TGF- β foram avaliadas (Fig. 4). A análise *ex vivo* demonstrou que camundongos monoinfectados por VACV apresentaram um aumento na frequência de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ quando comparados com animais não infectados. Entretanto, a coinfeção por *A. suum* parece modular consideravelmente essa resposta, uma vez que reduziu significativamente a frequência desses linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em comparação com animais monoinfectados pelo vírus. (Fig. 4A).

Outro resultado que suporta a ideia de modulação da resposta imune foi que as células de camundongos monoinfectados por VACV, quando estimuladas *in vitro* por partículas virais inativadas, foram capazes de responder, induzindo um aumento na produção de IFN- γ . Entretanto a mesma estimulação antigênica não foi capaz de ativar as células de camundongos coinfectados por *A. suum* e VACV.

Os animais coinfectados também apresentaram um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺TNF- α ⁺, quando comparados com animais monoinfectados por *A. suum* (Fig. 4B), e por fim, a coinfeção modula significativamente a produção de IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ em comparação com a monoinfeção por VACV (Fig. 4D).

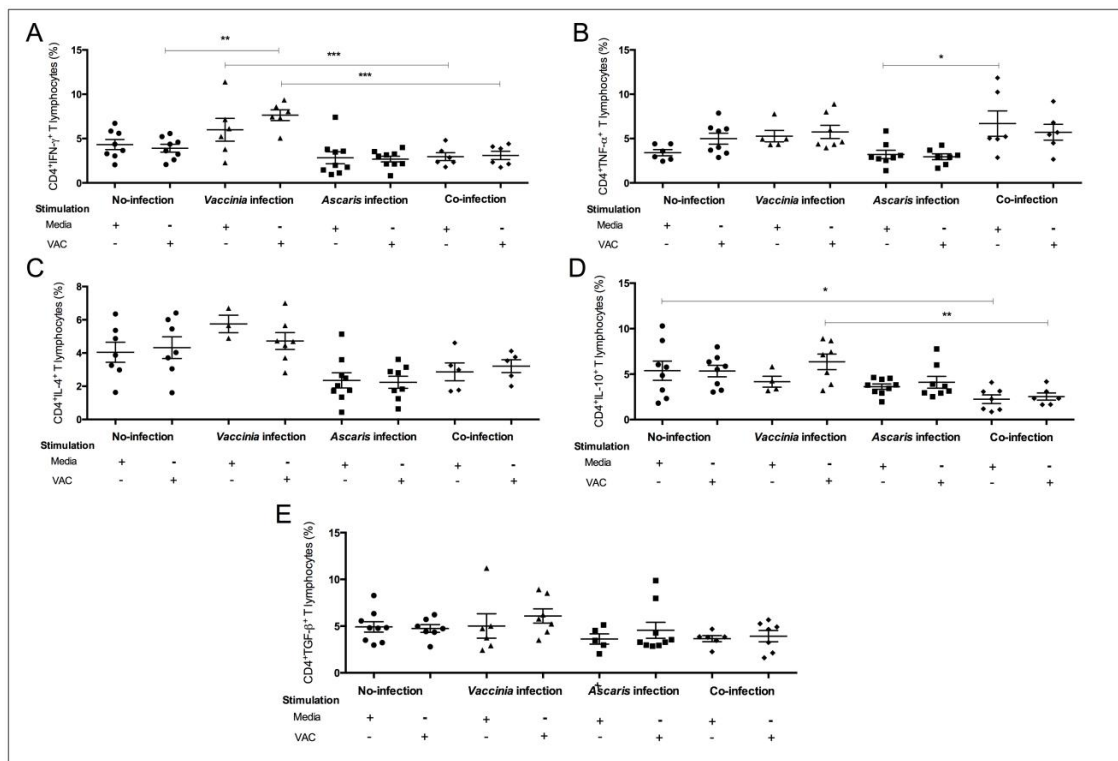


Figura 4: Frequência de citocinas T_{H1}, T_{H2} e regulatórias em linfócitos T CD4⁺ de camundongos não infectados, mono infectados por VACV, mono infectados por *A. suum* e co infectados por VACV e *A. suum*. A frequência de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ (A), TNF- α ⁺ (B), IL-4⁺ (C), IL-10⁺ (D), TGF- β ⁺ (E) oriundas do baço de 10 camundongos BALB/c de cada grupo, na ausência (media) e presença de estimulação *in vitro* (VAC), foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representadas por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$).

3.4. As células inflamatórias e o perfil de citocinas no tecido pulmonar estão alterados durante a coinfeção por *A. suum* e VACV

Após demonstrar que a resposta imune sistêmica de camundongos infectados por VACV é modulada negativamente durante a coinfeção por *A. suum*, o próximo passo foi avaliar o perfil da resposta imunológica no foco inflamatório. Neste contexto, a imunopatologia dos pulmões dos animais dos diferentes grupos foi avaliada com base na análise do influxo de células inflamatórias para o pulmão e da produção de citocinas no tecido (Fig. 5 e 6).

A análise morfométrica demonstrou que a monoinfeção por VACV induziu um aumento significativo no influxo de neutrófilos e macrófagos para o pulmão a partir do quarto dia de infecção (Fig 5A e D). Esse tráfego inicial de neutrófilos e macrófagos é acompanhado por um gradual e relevante influxo de linfócitos para o tecido até o décimo segundo dia de infecção, quando comparado com animais controles (Fig. 5C). Por outro lado, a análise dos pulmões de animais coinfectados demonstrou que a migração larval contribui consideravelmente para exacerbar o influxo de células inflamatórias para o tecido pulmonar, o qual apresentou um aumento significativo no número de neutrófilos e linfócitos durante a migração das larvas (4 a 12 dias após a infecção), em comparação com animais monoinfectados por VACV. Além disso, como esperado, a ascaridíase larval induziu um aumento significativo no número de eosinófilos nos animais monoinfectados por *A. suum*, quando comparados com animais controles e monoinfectados por VACV, o que também foi observado nos animais coinfectados (Fig 5B).

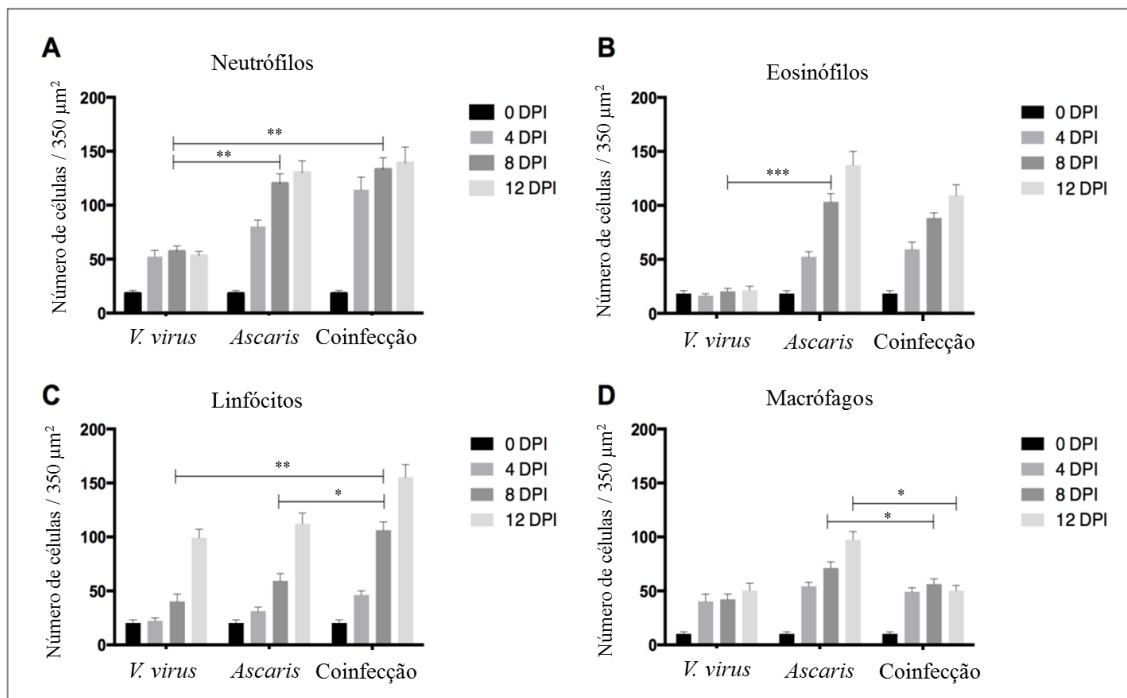


Figura 5: Análise morfométrica dos pulmões de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*. Neutrófilos (A), eosinófilos (B), linfócitos (C) e macrófagos (D) foram quantificados no tecido pulmonar de 10 camundongos BALB/c para cada grupo avaliado, em diferentes tempos de infecção (quatro, oito, e doze dias após a infecção). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representadas por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$).

Somado a estes resultados, a análise do perfil de citocinas no tecido pulmonar demonstrou que camundongos monoinfectados por *A. suum* e animais monoinfectados por VACV apresentaram um aumento significativo na produção de IL-6 no oitavo dia de infecção, em comparação com o grupo controle. Entretanto, animais coinfectados apresentaram uma diminuição significativa na produção de IL-6 no oitavo dia de infecção, quando comparados com os monoinfectados por *A. suum* (Fig. 6A). Além disso, os animais monoinfectados por VACV apresentaram um aumento de IFN- γ nos

pulmões em comparação com os animais controles. Entretanto a coinfeção induziu um aumento significativo desses níveis no oitavo dia de infecção, em comparação com animais controles e monoinfectados por VACV (Fig. 6B).

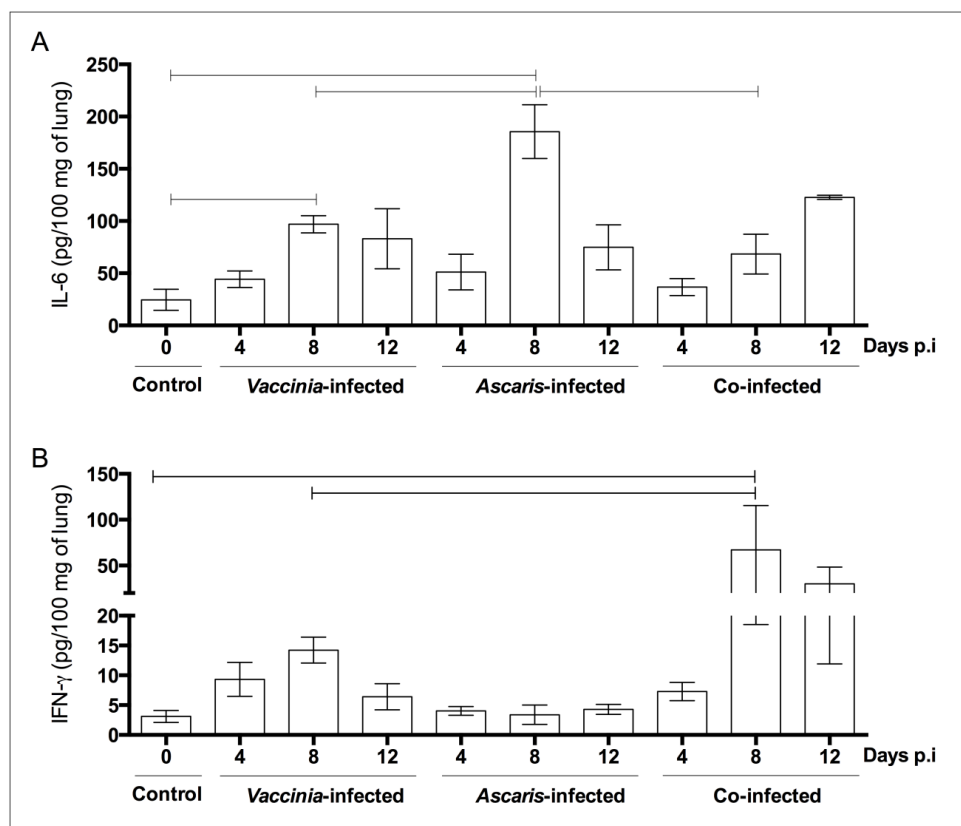


Figura 6: Produção de IL-6 e IFN- γ nos pulmões de camundongos não infectados, monoinfectados por VACV, monoinfectados por *A. suum* e coinfectados por VACV e *A. suum*. As produções de IL-6 (A) e IFN- γ (B) foram avaliadas no tecido pulmonar de 10 camundongos BALB/c para cada grupo de estudo após diferentes tempos de infecção (quatro, oito, e doze dias). Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados por * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) e *** ($P \leq 0,001$).

3.5. A infecção concomitante por VACV está associada a um aumento na resistência da infecção por *A. suum*

Está claro que a infecção concomitante por *A. suum* e VACV modula negativamente a resposta imune específica ao vírus, resultando em um aumento da carga viral nos pulmões, em uma potencialização da resposta inflamatória pulmonar, e por fim na exacerbação da morbidade e mortalidade dos animais coinfectados. Entretanto, quando avaliado o impacto da infecção viral na infecção helmíntica, foi observado, de forma surpreendente, que a presença do VACV resulta em uma diminuição significativa no número de larvas de *A. suum*, no fígado após quatro dias de infecção ($98,70 \pm 41,71$ X $232,40 \pm 89,29$ larvas, $P=0,019$), mas principalmente nos pulmões, no oitavo dia de infecção, onde os animais coinfectados apresentaram uma diminuição da carga parasitária de quase 20 vezes em comparação com os animais monoinfectados por *A. suum* ($10,20 \pm 7,59$ larvas X $180,60 \pm 34,44$ larvas, $p < 0,001$) (Fig. 7A, B e C).

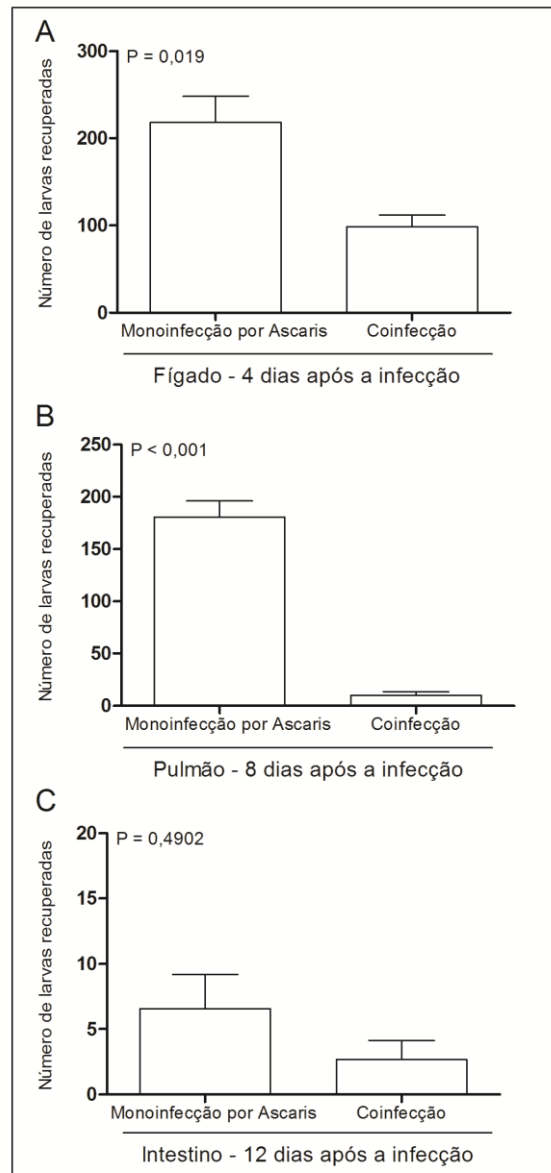


Figura 7: Quantificação do número total de larvas migrantes de *A. suum* durante a coinfecção por VACV. O número total de larvas de *A. suum* migrando pelo fígado após quatro dias de infecção (A), pulmão após oito dias de infecção (B), e intestino delgado após doze dias de infecção (C) foi quantificado em animais BALB/c (machos, oito semanas de idade) monoinfectados por *A. suum* e também em animais BALB/c (machos, oito semanas de idade) concomitantemente infectados por *A. suum* e VACV. Os dados estão representados pelo valor da média \pm EM. As diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$) estão representados pelo valor de P nos gráficos.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado e realizado, como um trabalho pioneiro, para avaliar o impacto da infecção inicial por *Ascaris* sp., em uma provável infecção viral concomitante. Inúmeros estudos já demonstraram a capacidade dos helmintos em alterar o curso de infecções por vírus, protozoários, bactérias e fungos, no entanto, a influência da infecção por *Ascaris suum* e os mecanismos de como a ascaridíase influencia outras infecções, precisa ser elucidado. A infecção intranasal com VACV afeta consistentemente o trato respiratório do hospedeiro e por sua vez a ascaridíase larval é caracterizada por uma intensa inflamação das vias aéreas. Nesse contexto, os principais resultados demonstraram que a ascaridíase pulmonar associada à infecção respiratória pelo VACV pode ser letal para o hospedeiro, e a biologia da coinfeção é caracterizada por um aumento significativo da replicação do vírus no pulmão, que induz uma grave morbidade e mortalidade; pela regulação negativa da resposta imune específica ao vírus; e por fim, por uma intensa inflamação pulmonar.

Considerando o uso comum nos laboratórios de investigação científica, o aumento do número de pessoas naturalmente e acidentalmente infectadas, a sua utilização como vetor para a expressão de genes, e a sólida padronização do modelo murino para a infecção experimental, o VACV, linhagem WR (potencialmente virulento), foi escolhido como o modelo para a avaliação da interação hospedeiro-patógenos durante a coinfeção pelo helminto *Ascaris suum*.

O VACV replica no pulmão do hospedeiro induzindo uma inespecífica infecção aguda associada a uma inflamação pulmonar, e em alguns casos, a pneumonia, a um edema intra-alveolar grave e hemorragia (Chen et al., 2001). Essas manifestações clínicas podem evoluir e causar grave morbidade e mortalidade (Hayasaka et al., 2007).

De acordo com Hayasaka e colaboradores (2007), a virulência do VACV respiratório se correlaciona fortemente com a carga viral nos pulmões do hospedeiro, e também com o fenótipo das subpopulações de células T na resposta inflamatória. A replicação do vírus no pulmão atinge o pico no sétimo dia de infecção, mesmo momento que ocorre o pico de migração das larvas de *Ascaris suum* também pelos pulmões do hospedeiro.

Diante o exposto, o primeiro cenário observado sobre a infecção concomitante por *A. suum* e VACV demonstrou que a coinfeção representa um sério risco para o hospedeiro. Os principais resultados demonstraram que a associação da ascaridíase pulmonar e VACV respiratório, induziu um aumento significativo na morbidade e mortalidade dos animais em comparação com a monoinfecção. A perda de peso foi mais grave durante a coinfeção, com os níveis mais baixos no oitavo dia, o que influenciou diretamente no aumento da mortalidade dos animais desse grupo.

A possível explicação para esse fenômeno vem dos resultados obtidos pela análise da replicação do vírus no pulmão de animais coinfectados e monoinfectados pelo VACV, a qual determina a virulência e o curso da infecção. A presença de larvas de *A. suum* migrando pelos pulmões do hospedeiro induziu um aumento significativo nos títulos virais dos órgãos, que resultou na grande maioria em morte do animal coinfectado. Por outro lado, os títulos virais nos pulmões de animais monoinfectados por VACV aparentemente estabilizaram-se, e a maioria dos animais recuperou-se da morbidade associada à infecção.

Após demonstrar o negativo impacto para o hospedeiro entre a associação da ascaridíase larval e o VACV respiratório, o próximo passo foi determinar os mecanismos imunobiológicos pelos quais os animais coinfectados apresentaram um aumento da replicação viral nos pulmões e conseqüentemente, maior morbidade e

mortalidade. Dessa forma, a resposta imunológica celular sistêmica e tecidual foi avaliada nestes animais e comparada com a resposta de animais mono infectados por VACV.

A análise da frequência das populações de células T CD4⁺ não revelou diferenças importantes para o melhor entendimento dessa questão. Entretanto, a análise da frequência de células T CD8⁺, demonstrou que os animais co infectados apresentaram uma relevante diminuição dessas células quando comparados com animais mono infectados por VACV.

Goulding e colaboradores (2012) mostraram que a resposta imunológica mediada por linfócitos T CD8⁺ frente ao VACV respiratório é fundamental para a defesa do hospedeiro, uma vez que camundongos deficientes em células T CD8 infectados por VACV WR intranasal, apresentaram grave caquexia, intenso infiltrado inflamatório nos pulmões, disseminação do vírus e 100% de mortalidade no oitavo dia de infecção. Além disso, Xu e colaboradores (2004) demonstraram que células T CD4⁺ e imunidade mediada por MHC de classe II, são essenciais para o controle da infecção aguda por VACV. Neste estudo, os autores observaram que linfócitos T CD4⁺ quando ativados pelo vírus produzem de forma específica uma gama de citocinas, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-2, e sugerem que estas podem estar associadas com proteção. No presente estudo, quando o perfil funcional dos linfócitos T CD4⁺ foi avaliado, foi demonstrado que os animais mono infectados por VACV apresentaram um aumento significativo de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ após estimulação específica *in vitro*. E não obstante, os animais co infectados por *A. suum* apresentaram uma diminuição significativa na frequência dessas células.

Em contrapartida, quando avaliado a influência da infecção viral na biologia da infecção helmíntica, os dados revelaram que a presença de um microambiente no

pulmão, consistentemente inflamado, mesmo que de forma inespecífica, controla de forma significativa a carga parasitária, reduzindo em mais de vinte vezes o número de larvas que migram pelo órgão. Esse resultado corrobora com os estudos prévios do nosso grupo, onde demonstramos que a resposta mediada por óxido nítrico (Cavalcanti et al., 2013) e a potencialização da resposta inflamatória por meio da infecção em camundongos ST2 (deficientes no receptor da citocina IL-33), são fundamentais para controlar a migração de larvas de *Ascaris* sp.; e sugere que a inflamação pulmonar é determinante na morte das larvas que migram pelo pulmão durante a ascaridíase larval.

Levando todas essas análises e discussões em consideração, o presente estudo sugere que a redução do número de linfócitos T CD8⁺ circulantes assim como a modulação negativa de linfócitos T CD4⁺IFN⁺ estão associadas com o aumento da virulência da infecção por VACV nos animais concomitantemente infectados por *A. suum*; e que a inflamação pulmonar é crucial para controlar o número de larvas que migram pelos pulmões, e conseqüentemente bloquear o ciclo biológico do parasito no hospedeiro, sem que ocorra a cronificação da infecção.

De um modo geral, extrapolando para o cenário atual e natural, este capítulo fornece evidências de como a coinfeção por helmintos e vírus, podem influenciar negativamente o curso das monoinfecções isoladas e mais ainda, podem potencialmente impactar na saúde pública de áreas endêmicas geograficamente sobrepostas para ambos patógenos.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos nos três capítulos desta tese de doutorado, que objetivaram avaliar os eventos imunopatológicos sistêmicos e teciduais induzidos pela migração das larvas de *Ascaris* sp. no hospedeiro, foi possível elucidar que a resposta imunológica associada à resistência da ascaridíase larval é predominantemente inata e inflamatória. Além disso, este estudo é o primeiro relato na literatura que aponta a inflamação pulmonar eosinofílica e neutrofílica com papel de destaque no controle da migração das larvas, assim como já descrito para imunidade de mucosa intestinal e inflamação hepática por Masure e colaboradores (2013) e Urban e colaboradores (1988), respectivamente.

Diferente da maioria das infecções helmínticas crônicas, caracterizadas pela polarização da resposta imune mediada por células T_H2 e regulatórias, na ascaridíase larval, a resposta inflamatória dependente de eosinófilos aparece como principal estratégia de resistência do hospedeiro infectado. De um modo geral, os principais resultados desta tese, que suportam essa teoria, demonstraram que a ausência de inflamação aguda nos pulmões de animais deficientes em eosinófilos resultou em um aumento da carga parasitária. Além disso, outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que, a reinfecção sucessiva por ovos embrionados de *Ascaris* sp. induz uma intensa inflamação tecidual eosinofílica, que está associada com uma redução significativa na carga parasitária (Nogueira et al., 2013). Somado a esses dados, camundongos da linhagem ST2, deficientes no receptor da citocina IL-33, resultando na exacerbação da resposta inflamatória, novamente apresentaram uma redução significativa no número de larvas circulantes (Nogueira et al., 2014 *em submissão*). Em contrapartida, camundongos deficientes em óxido nítrico, os quais desenvolvem uma

resposta inflamatória reduzida, apresentaram um aumento significativo no número de larvas durante a migração (Cavalcanti et al., 2013).

Dessa forma, acreditamos que o sinergismo entre as populações celulares inatas, com destaque para as células linfóides inatas, eosinófilos e neutrófilos, assim como seus mediadores inflamatórios, IL-5, IL-6, TNF, EPO e MPO são fundamentais para o controle e patogênese da ascaridíase larval e, necessários para a homeostasia tecidual após as lesões provocadas pelas larvas.

Nesse contexto, propomos que o modelo de proteção na ascaridíase larval seja mediado por uma intensa resposta inflamatória tecidual, caracterizada inicialmente pela ativação de eosinófilos por meio da produção de IL-5 por células pulmonares residentes. Estes eosinófilos, por sua vez, são responsáveis em ativar e potencializar a resposta imune celular inata, principalmente neutrófilos, que passam a produzir IL-6 e MPO, aumentando a inflamação pulmonar. A intensa inflamação reduz o número de larvas de *Ascaris* sp. no pulmão, mas por outro lado, provoca lesão e perda de função no tecido pulmonar. Por essa razão, após a migração das larvas pelos pulmões, os eosinófilos produzem TNF e EPO que irão participar ativamente no processo de cicatrização e remodelamento do tecido pulmonar lesado.

Para comprovarmos esse modelo de proteção para a ascaridíase larval, no capítulo três desta tese utilizamos um modelo de inflamação pulmonar induzido pelo VACV respiratório e o associamos à infecção concomitante por *A. suum*. Os resultados obtidos corroboraram com os dados previamente descritos e suportaram a nossa teoria proposta, uma vez que a exacerbação da inflamação pulmonar provocada pela infecção concomitante por *A. suum* e VACV respiratório reduziu em mais de vinte vezes o número total de larvas nos animais coinfectados.

Por fim, além do modelo de inflamação pulmonar, o estudo de coinfeção com o VACV, demonstrou que a migração das larvas de *A. suum* pode influenciar negativamente o percurso de infecções virais por meio da modulação da resposta imune específica ao vírus, representando um sério risco para o hospedeiro infectado, e extrapolando para o cenário atual, pode potencialmente impactar na saúde pública de áreas endêmicas geograficamente sobrepostas para ambos patógenos.

4. PERSPECTIVAS

4.1. Avaliação da resposta imune humoral na ascaridíase larval, com ênfase no papel do sistema do complemento na ativação da imunidade celular inata. (Colaboração com o Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo e Dr. Vladimir Fazito do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil).

4.2. Identificação e caracterização imunológica de epitopos de células B e T em *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides* e suas implicações em processos vacinais (Colaboração com o Dr. Peter Hotez, Dr^a. Maria Elena Bottazzi e Dr. Bin Zan do Sabin Vaccine Institute and Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development, Baylor College of Medicine, Texas, EUA).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abanyie FA, McCracken C, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland CV, et al. (2013). *Ascaris* co-infection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children. *Malaria journal.*;12:1.

Acevedo N, Sanchez J, Erler A, Mercado D, Briza P, et al. (2009). IgE cross-reactivity between *Ascaris* and domestic mite allergens: the role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1. *Allergy* 64: 1635-1643.

Aderele WI, Oduwole O. (1982). *Ascaris* and bronchial asthma in children. *Afr J Med Med Sci* 11: 161-166.

Agren MS, Jorgensen LN, Andersen M, Viljanto J, Gottrup F (1998) Matrix metalloproteinase 9 level predicts optimal collagen deposition during early wound repair in humans. *Br J Surg* 85: 68-71.

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

Archer GT, Coulits N, Jindra J, Robson JE. (1985). Eosinophilia, mast cell hyperplasia and antibody production in rats following an intraperitoneal injection of *Ascaris* cuticle including in-vitro studies of immune eosinophil granule lysis. *Pathology* 17: 101-107.

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

Artis, D. (2006). New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *Int. J. Parasitol.* 36, 723–733.

Bandeira-Melo, C., Weller, P.F. (2005). Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (Suppl. 1), 73–81.

Barnes, T.C., Anderson, M.E., Moots, R.J. (2011). The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int. J. Rheumatol.*, 721608.

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

Behm CA, Ovington KS. (2000). The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 16: 202-209.

Behm, C.A., Ovington, K.S. (2000). The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today* 16, 202– 209.

Boes J, Eriksen L, Nansen P. (1998). Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole , pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Vet Parasitol* 75: 181-190.

Borkow G, Bentwich Z. (2002). Host background immunity and human immunodeficiency virus protective vaccines, a major consideration for vaccine efficacy in Africa and in developing countries. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 505-507.

Bradding, P., Roberts, J.A., Britten, K.M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C.H., Howarth, P.H., Holgate, S.T. (1994). Interleukin-4, -5, and -6 and tumor

necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 471–480.

Boes J, Eriksen L, Nansen P. (1998). Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. *Vet Parasitol.* Feb 28;75(2-3):181-90.

Brightling C, Berry M, Amrani Y. (2008). Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121: 5-10; quiz 11-12.

Buys J, Wever R, Ruitenber EJ. (1984). Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the in vitro killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology* 51: 601-607.

Cançado, G.G., Fiuza, J.A., de Paiva, N.C., Lemos L. de, C., Ricci, N.D., Gazzinelli-Guimarães, P.H., Martins, V.G., Bartholomeu, D.C., Negrão-Corrêa, D.A., Carneiro, C.M., Fujiwara, R.T. (2011). Hookworm products ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2275–2286.

Caraballo L, Acevedo N. (2011). Allergy in the tropics: the impact of cross-reactivity between mites and *Ascaris*. *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 51-64.

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

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

Chen HD, Fraire AE, Joris I, Brehm MA, Welsh RM, Selin LK. (2001). Memory CD8+ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung. *Nature immunology*. Nov;2(11):1067-76.

Cheng E, Souza RF, Spechler SJ. (2012). Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G1175-1187.

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

Chow, S.C., Brown, A., Pritchard, D. (2000). The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol*. 22, 21–29.

Cooper PJ, Chico M, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Levine MM, et al. (2001). Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infection and immunity*. Mar;69(3):1574-80.

Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, et al. (2003). Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 111: 995-1000.

Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, Nutman TB. (2004). Atopic phenotype is an important determinant of immunoglobulin E-mediated inflammation and expression of T helper cell type 2 cytokines to ascaris antigens in children exposed to ascariasis. *The Journal of infectious diseases*. Oct 1;190(7):1338-46.

Cooper, P.J. (2002). Immune responses on humans. In: Holland, C.V., Kennedy, M.W. (Eds.), *The Geohelminths: Ascaris, Trichuris and Hookworm*, vol. 2. Springer, US, pp. 89–104.

Crandall, C.A., Crandall, R.B., (1971). *Ascaris suum*: immunoglobulin responses in mice. *Exp. Parasitol.* 30, 426–437.

Crompton DW. *Ascaris* and ascariasis. (2001). *Adv Parasitol.*48:285-375.

Damjanovic D, Divangahi M, Kugathasan K, Small CL, Zganiacz A, et al. (2011) Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF-alpha during acute influenza infection. *Am J Pathol* 179: 2963-2976.

de Silva, N.R., Brooker, S., Hotez, P.J., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L. (2003). Soil transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 19, 547–551.

Degarege A, Legesse M, Medhin G, Animut A, Erko B. (2012). Malaria and related outcomes in patients with intestinal helminths: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases.*;12:291.

Dold S, Heinrich J, Wichmann HE, Wjst M. (1998). *Ascaris*-specific IgE and allergic sensitization in a cohort of school children in the former East Germany. *J Allergy Clin Immunol* 102: 414-420.

Dold, C., Holland, C.V. (2011). Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. *Microbes Infect.* 13, 624–631.

Dold C, Holland CV. (2011). *Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect* 13: 632-637.

Duncan, M.R., Berman, B., (1991). Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* 97, 686–692.

Elias D, Wolday D, Akuffo H, Petros B, Bronner U, Britton S. (2001). Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clinical and experimental immunology.* Feb;123(2):219-25.

Enobe CS, Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, et al. (2006). Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. *Parasite Immunol* 28: 453-461.

Eriksen, L. (1990). *Ascaris suum*: influence of egg density on in vitro development from embryonated egg to infective stage. *Acta Vet. Scand.* 31, 489–491.

Eriksen L, Nansen P, Roepstorff A, Lind P, Nilsson O. (1992). Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. I. Studies on worm population kinetics. *Parasitol Res* 78: 241-246.

Fagerholm HP, Nansen P, Roepstorff A, Frandsen F, Eriksen L. (1988). Growth and structural features of the adult stage of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) from experimentally infected domestic pigs. *J Parasitol.* Apr;84(2):269-77.

Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. (2010). Neglected tropical diseases. *Br Med Bull* 93: 179-200.

Fielding, C.A., McLoughlin, R.M., McLeod, L., Colmont, C.S., Najdovska, M., Grail, D., Ernst, M., Jones, S.A., Topley, N., Jenkins, B.J. (2008). IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol.* 181, 2189–2195.

Finotto, S., Ohno, I., Marshall, J.S., Gauldie, J., Denburg, J.A., Dolovich, J., Clark, D.A., Jordana, M., (1994). TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J. Immunol.* 153, 2278–2289.

Folkard, S.G., Hogarth, P.J., Taylor, M.J., Bianco, A.E., (1996). Eosinophils are the major effector cells of immunity to microfilariae in a mouse model of onchocerciasis. *Parasitology* 112, 323–329.

Frontera E, Roepstorff A, Serrano FJ, Gazquez A, Reina D, et al. (2004) Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs. *Vet Parasitol* 119: 59-71.

Fujiwara RT, Loukas A, Mendez S, Williamson AL, Bueno LL, et al. (2006) Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine* 24: 501-509.

Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ, et al. (2006) Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 74: 5730-5738.

Galvin, T.J., (1968). Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. *J. Parasitol.* 54, 1085–1091.

Gaze, S., McSorley, H.J., Daveson, J., Jones, D., Bethony, J.M., Oliveira, L.M., Speare, R., McCarthy, J.S., Engwerda, C.R., Croese, J., Loukas, A., (2012). Characterising the

mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002520.

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

Gazzinelli-Guimaraes, P., Souza-Fagundes, E., Cançado, G.G.L., Martins, V.G., Lemos, L.C.D., Ricci, N.D., Fiuza, J.A., Bueno, L.L., Miranda, R.R.C., Guatimosim, S., Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., Bartholomeu, D.C., Fujiwara, R.T. (2013). Cell apoptosis induced by hookworm antigens: a strategy of immunomodulation. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 5, 662–675.

Geiger SM, Caldas IR, Mc Glone BE, Campi-Azevedo AC, De Oliveira LM, et al. (2007). Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunol* 29: 347-358.

Gelaw A, Anagaw B, Nigussie B, Silesh B, Yirga A, Alem M, et al. (2013). Prevalence of intestinal parasitic infections and risk factors among schoolchildren at the University of Gondar Community School, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC public health*;13:304.

Gelpi AP, Mustafa A. (1967). Seasonal pneumonitis with eosinophilia. A study of larval ascariasis in Saudi Arabs. *Am J Trop Med Hyg* 16: 646-657.

Gleich GJ, Loegering DA. (1984). Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol* 2: 429-459.

Gleich GJ, Adolphson CR. (1986). The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 39: 177-253.

Goulding J, Bogue R, Tahiliani V, Croft M, Salek-Ardakani S. (2012). CD8 T cells are essential for recovery from a respiratory vaccinia virus infection. *Journal of immunology*. Sep 1;189(5):2432-40.

Greene BM, Taylor HR, Aikawa M. (1981). Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J Immunol* 127: 1611-1618.

Guyatt HL, Chan MS, Medley GF, Bundy DA (1995) Control of *Ascaris* infection by chemotherapy: which is the most cost-effective option? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 16-20.

Hagel I, Cabrera M, Puccio F, Santaella C, Buvat E, Infante B, et al. Co-infection with *Ascaris lumbricoides* modulates protective immune responses against *Giardia duodenalis* in school Venezuelan rural children. *Acta tropica*. 2011 Mar;117(3):189-95.

Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, et al. (1990) In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol* 144: 3166-3173.

Hamilton, C.M., Brandes, S., Holland, C.V., Pinelli, E., 2008. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. *Parasite Immunol.* 30, 181–185.

Hayasaka D, Ennis FA, Terajima M. Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. *Virology journal*. 2007;4:22.

Helwigh AB, Nansen P (1999) Establishment of *Ascaris suum* in the pig: development of immunity following a single primary infection. *Acta Vet Scand* 40: 121-132.

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

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

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

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

Hosoki K, Nakamura A, Kainuma K, Sugimoto M, Nagao M, et al. (2013). Differential activation of eosinophils by bacteria associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 161 Suppl 2: 16-22.

Hotez PJ. (2007). Neglected diseases and poverty in "The Other America": the greatest health disparity in the United States? *PLoS Negl Trop Dis* 1: e149.

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

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

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

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

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

Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L, Ly NP, Liang C, et al. (2007) Sensitization to *Ascaris lumbricoides* and severity of childhood asthma in Costa Rica. *J Allergy Clin Immunol* 119: 654-661.

Islam, M.K., Miyoshi, T., Tsuji, N. (2005). Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 35, 1023–1030.

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

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

Joubert JR, de Klerk HC, Malan C. (1979). *Ascaris lumbricoides* and allergic asthma: A new perspective. *S Afr Med J* 56: 599-602.

Jungersen G, Eriksen L, Roepstorff A, Lind P, Meeusen EN, et al. (1999). Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: protective memory response after three immunizations and effect of intestinal adult worm population. *Parasite Immunol* 21: 619-630.

Kay AB, Phipps S, Robinson DS. (2004). A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 25: 477-482.

Kazura JW, Aikawa M. (1980). Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse: eosinophil-mediated destruction of newborn larvae in vitro. *J Immunol* 124: 355-361.

Kelley GW, Nayak DP. (1964). Acquired Immunity to Migrating Larvae of *Ascaris Suum* Induced in Pigs by Repeated Oral Inoculations in Infective Eggs. *J Parasitol* 50: 499-503.

Kelly EA, Liu LY, Esnault S, Quinchia Johnson BH, Jarjour NN. (2012) Potent synergistic effect of IL-3 and TNF on matrix metalloproteinase 9 generation by human eosinophils. *Cytokine* 58: 199-206.

Khair, O.A., Devalia, J.L., Abdelaziz, M.M., Sapsford, R.J., Tarraf, H., Davies, R.J., (1994). Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF α and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 7, 2109–2116.

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

Kishimoto T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2: S2.

- Klebanoff SJ. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77: 598-625.
- Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, et al. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 42: 1106-1116.
- Knott ML, Matthaei KI, Giacomini PR, Wang H, Foster PS, et al. (2007). Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *Int J Parasitol* 37: 1367-1378.
- Kolobovnikova UV, Urazova OI, Novitsky VV, Voronkova OV, Naslednikova IO, et al. (2012). Cytokine-secreting activity of blood eosinophils in pulmonary tuberculosis. *Bull Exp Biol Med* 153: 319-322.
- Korenaga, M., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Sato, Y., Takatsu, K., Tada, I. (1991). The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 72, 502–507.
- Korenaga, M., Tada, I. (1994). The role of IL-5 in the immune responses to nematodes in rodents. *Parasitol. Today* 10, 234–236.
- Lechapt-Zalcman E, Escudier E. (2000). Implication of extracellular matrix metalloproteinases in the course of chronic inflammatory airway diseases. *Morphologie* 84: 45-49.
- Lee MS, Roos JM, McGuigan LC, Smith KA, Cormier N, Cohen LK, et al. (1992). Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *Journal of virology*. May;66(5):2617-30.

Lee TD. (1991). Helminthotoxic responses of intestinal eosinophils to *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Infect Immun* 59: 4405-4411.

Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. (2006). Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 514-523.

Levi-Schaffer F, Weg VB. (1997). Mast cells, eosinophils and fibrosis. *Clin Exp Allergy* 27 Suppl 1: 64-70.

Lewis R, Behnke JM, Cassidy JP, Stafford P, Murray N, et al. (2007). The migration of *Ascaris suum* larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/Ca mice. *Parasitology* 134: 1301-1314.

Lewis, R., Behnke, J.M., Stafford, P., Holland, C.V. (2006). The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. *Parasitology* 132 (Pt 2), 289–300.

Lewis-Jones S. (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Current opinion in infectious diseases*. Apr;17(2):81-9.

Li XX, Chen JX, Wang LX, Tian LG, Zhang YP, Dong SP, et al. (2014). Intestinal parasite co-infection among pulmonary tuberculosis cases without human immunodeficiency virus infection in a rural county in China. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Jan;90(1):106-13.

Liu AH, Leung DY. (2006). Renaissance of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1063-1066.

Luo JC, Shin VY, Yang YH, Wu WK, Ye YN, et al. (2005). Tumor necrosis factor-alpha stimulates gastric epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G32-38.

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

MacKenzie JR, Mattes J, Dent LA, Foster PS. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167: 3146-3155.

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

Massara, CL, Costa, HMA, Carvalho, OS. (1990). Contribuição para o estudo do *Ascaris lumbricoides* em laboratório. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Mar. vol.23, no.1, p.43-47. ISSN 0037-8682

Masure D, Vlaminck J, Wang T, Chiers K, Van den Broeck W, et al. (2013). A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2138.

Masure D, Wang T, Vlaminck J, Claerhoudt S, Chiers K, et al. (2013). The intestinal expulsion of the roundworm *Ascaris suum* is associated with eosinophils, intra-epithelial T cells and decreased intestinal transit time. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2588.

McSharry C, Xia Y, Holland CV, Kennedy MW. (1999). Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infect Immun* 67: 484-489.

Megid J, Borges IA, Abrahao JS, Trindade GS, Appolinario CM, Ribeiro MG, et al. (2012). *Vaccinia virus* zoonotic infection, Sao Paulo State, Brazil. Emerging infectious diseases. Jan;18(1):189-91.

Mendez S, Valenzuela JG, Wu W, Hotez PJ. (2005). Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. Infect Immun 73: 3402-3407.

Mengesha B, Endris M, Takele Y, Mekonnen K, Tadesse T, Feleke A, et al. (2014). Prevalence of malnutrition and associated risk factors among adult visceral leishmaniasis patients in Northwest Ethiopia: a cross sectional study. BMC research notes. 7:75.

Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly SY, et al. (2010). At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells. J Immunol 184: 5375-5382.

Mitre E, Chien D, Nutman TB. (2008). CD4(+) (and not CD25+) T cells are the predominant interleukin-10-producing cells in the circulation of filaria-infected patients. J Infect Dis 197: 94-101.

Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. (2006). Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. Curr Opin Hematol 13: 21-27.

Morais, RG. (1948). Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidose no Brasil. Rev. Esp. Saúde Pública. 1:507-624.

Mulu A, Legesse M, Erko B, Belyhun Y, Nugussie D, Shimelis T, et al. (2013). Epidemiological and clinical correlates of malaria-helminth co-infections in Southern Ethiopia. *Malaria journal*.12:227.

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

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

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

Norrby K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 110: 355-371.

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

O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, et al. (2011). Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 79: 2770-2778.

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

Palmer LJ, Celedon JC, Weiss ST, Wang B, Fang Z, et al. (2002). *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1489-1493.

Paul WE, Zhu J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10: 225-235.

Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. (2012). Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 12: 39-41.

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

Peng W, Yuan K, Peng G, et al. (2012). *Ascaris*: development of selected genotypes in mice. *Exp Parasitol*. May; 131(1) :69-74.

Peterson ES, Huang S, Wang J, Miller LM, Vidugiris G, et al. (1997). A comparison of functional and structural consequences of the tyrosine B10 and glutamine E7 motifs in two invertebrate hemoglobins (*Ascaris suum* and *Lucina pectinata*). *Biochemistry* 36: 13110-13121.

Phills JA, Harrold AJ, Whiteman GV, Perelmutter L. (1972). Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *N Engl J Med* 286: 965-970.

Phongluxa K, Xayaseng V, Vonghachack Y, Akkhavong K, van Eeuwijk P, Odermatt P. (2013). Helminth infection in southern Laos: high prevalence and low awareness. *Parasites & vectors*. 6 (1):328.

Pulendran B, Artis D. (2012). New paradigms in type 2 immunity. *Science* 337: 431-435.

Rainbird MA, Macmillan D, Meeusen EN. (1998). Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol* 20: 93-103.

Reading PC, Smith GL. (2003). A kinetic analysis of immune mediators in the lungs of mice infected with vaccinia virus and comparison with intradermal infection. *The Journal of general virology*. Aug;84(Pt 8):1973-83.

Rhodes MB, Keralis MB, Staudinger LA. (1982). Immune responses of swine to oral inoculation with embryonated eggs of *Ascaris suum*. *Am J Vet Res* 43: 1604-1607.

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

Robinson RD, Murphy EL, Wilks RJ, Neva FA, Terry SI, Hanchard B, et al. (1991). Gastrointestinal parasitic infection in healthy Jamaican carriers of HTLV-I. *The Journal of tropical medicine and hygiene*. Dec;94(6):411-5.

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

Roka M, Goni P, Rubio E, Clavel A. (2013). Intestinal parasites in HIV-seropositive patients in the Continental Region of Equatorial Guinea: its relation with socio-

demographic, health and immune systems factors. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Aug;107(8):502-10.

Rothenberg ME. (1998). Eosinophilia. N Engl J Med 338: 1592-1600.

Rothenberg ME, Hogan SP. (2006). The eosinophil. Annu Rev Immunol 24: 147-174.

Saha DR, Rajendran K, Ramamurthy T, Nandy RK, Bhattacharya SK. (2008). Intestinal parasitism and *Vibrio cholerae* infection among diarrhoeal patients in Kolkata, India. Epidemiology and Infection. May;136(5):661-4.

Sanchez AL, Gabrie JA, Usuanlele MT, Rueda MM, Canales M, Gyorkos TW (2013). Soil-transmitted helminth infections and nutritional status in school-age children from rural communities in Honduras. PLoS neglected tropical diseases. 7(8):e2378.

Santiago HC, Bennuru S, Boyd A, Eberhard M, Nutman TB. (2011). Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the hygiene hypothesis. J Allergy Clin Immunol 127: 479-486.

Santiago HC, LeeVan E, Bennuru S, Ribeiro-Gomes F, Mueller E, et al. (2012). Molecular mimicry between cockroach and helminth glutathione S-transferases promotes cross-reactivity and cross-sensitization. J Allergy Clin Immunol 130: 248-256 e249.

Santos AB, Rocha GM, Oliver C, Ferriani VP, Lima RC, et al. (2008). Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. J Allergy Clin Immunol 121: 1040-1046 e1041.

Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. (2000). Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. J Clin Invest 105: 945-953.

Simons JE, Rothenberg ME, Lawrence RA. (2005). Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Eur J Immunol* 35: 189-197.

Smith GL, Benfield CT, Maluquer de Motes C, Mazzon M, Ember SW, Ferguson BJ, et al. (2013). *Vaccinia virus* immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *The Journal of general virology*. Nov; 94(Pt 11):2367-92.

Specht S, Saeftef M, Arndt M, Endl E, Dubben B, et al. (2006). Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun* 74: 5236-5243.

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

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

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

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

Sugane K. (1988). Eosinophilia in *Ascaris suum*-reinfected mice. *J Helminthol* 62: 51-57.

Takata, I. (1951). Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. *Kitasato Arch Exp Med*. Mar;23(4):151-9; English transl, 49-59.

Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. (2005). Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 280: 36099-36109.

Tian LG, Chen JX, Wang TP, Cheng GJ, Steinmann P, Wang FF, et al. (2012). Co-infection of HIV and intestinal parasites in rural area of China. *Parasites & vectors*. 5:36.

Trindade GS, Lobato ZI, Drumond BP, Leite JA, Trigueiro RC, Guedes MI, et al. (2006). Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Sep; 75(3):486-90.

Turner GS. 1967. Respiratory infection of mice with vaccinia virus. *The Journal of general virology*. Jul;1(3):399-402.

Urban JF, Jr., Alizadeh H, Romanowski RD. (1988). *Ascaris suum*: development of intestinal immunity to infective second-stage larvae in swine. *Exp Parasitol* 66: 66-77.

Venturiello SM, Giambartolomei GH, Costantino SN. (1995). Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasite Immunol* 17: 555-559.

Walsh GM. (2001). Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol* 8: 28-33.

Warner JO. (2007). Early life nutrition and allergy. *Early Hum Dev* 83: 777-783.

Weller PF. (1994). Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol* 6: 85-90.

Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, Robinson ZD, Furuta GT. (2011). Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 52: 650-661.

Xu R, Johnson AJ, Liggitt D, Bevan MJ. (2004). Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *Journal of immunology.* May 15;172(10):6265-71.

Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. (2005). The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5: 386-39

6. ANEXOS