

CAROLINE MARCANTONIO FERREIRA

**PAPEL E MECANISMOS DA HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA
NA INFECÇÃO CAUSADA POR *Strongyloides venezuelensis* EM
RATOS**

BELO HORIZONTE – MG

2007

CAROLINE MARCANTONIO FERREIRA

**PAPEL E MECANISMOS DA HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA
NA INFECÇÃO CAUSADA POR *Strongyloides venezuelensis* EM
RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientador: Profa. Dra. Deborah Negrão-Correa

BELO HORIZONTE – MG

2007

Dedico este trabalho a Fernando Augusto de Oliveira Ribeiro, meu esposo, pela compreensão e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, e de maneira especial:

À Deus e a minha família, pelo apoio e por ser a base de minhas conquistas.

Ao meu orientador Mauro Martins Teixeira, pelo estímulo, confiança e pelos momentos engraçados (ele é naturalmente engraçado). Uma pessoa muito humana e totalmente família, características que podem não ser fundamentais para um orientador, mas com certeza são para uma pessoa de bem.

À professora Déborah pelos ensinamentos e competente orientação na área de parasitologia.

Aos amigos do laboratório de parasitologia e imunofarmacologia, por toda ajuda nos experimentos e críticas.

Agradeço também aos meus orientadores no exterior Lawrence H. Pinto e Julian Solway por toda confiança, ensinamento e oportunidade.

Ao CNPq, que financiou grande parte do meu doutorado.

Às minhas eternas amigas Patrícia de Paula, Maria Camila Almeida e Daniela Oliveira pelo incentivo desde o mestrado.

RESUMO

Alterações funcionais pulmonares e sintomas pulmonares têm sido descrito em pacientes infectados por helmintos com ciclo pulmonar. Previamente foi demonstrado que a infecção com nematódeo *Strongyloides venezuelensis* induz um significativo aumento na hiperreatividade brônquica em ratos infectados. O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese que a broncodilatação durante a fase de migração da larva pelo pulmão favorece o ciclo parasitário e o número de vermes que alcança o intestino. Para este propósito, ratos infectados com *S. venezuelensis* foram tratados com salbutamol durante as primeiras 48 horas após a infecção. A dose de salbutamol utilizada (0.25 mg/mL por 10 min a cada 4 horas) preveniu mudanças na função pulmonar durante a migração parasitária. Isto foi acompanhado por um aumento de parasitos nos pulmões e intestino. Em seguida investigamos os mecanismos da hiperreatividade brônquica e observamos que IL-13 não é essencial para essa alteração funcional pulmonar, mas é importante para produção de ovos no intestino. Por outro lado, as fibras nervosas sensoriais sensíveis a capsaicina mostram relevante papel na hiperreatividade brônquica independente da inflamação pulmonar.

Palavras Chaves: *S. venezuelensis*, hiperreatividade brônquica, infecção, capsaicina, fibras C, inflamação neurogênica e IL-13

ABSTRACT

Alterations in lung function and pulmonary symptoms have been described in patients infected with helminthes with a lung cycle. We have previously shown that infection with the nematode *Strongyloides venezuelensis* induced a significant increase in airway hyperreactivity in infected rats. The aim of the present study was to test the hypothesis that bronchodilation during the lung phase of parasite migration would favor completion of the life cycle and infection indices. For this purpose, *Strongyloides venezuelensis* infected rats were treated with salbutamol during the first 48 h after the nematode infection. At the dose used (0.25 mg/mL for 10 min every 4 h), treatment with salbutamol prevented changes in lung function during the parasite migration. This was accompanied by a significant increase in parasite burden, as assessed in the lung and the small intestine. We also investigated the mechanisms of airway hyperresponsiveness and observed that IL-13 does not have effect on this lung alteration. On the other hand, sensory C fibers have an important role in the airway hyperresponsiveness independent of lung inflammation.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*; Airway responsiveness; inflammation; infection, capsaicin, C Fibers, neurogenic inflammation and IL-13

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1. Parasito: <i>Strongyloides venezuelensis</i> e <i>Strongyloides stercoralis</i> ...	02
2. Definição e avaliação da hiperreatividade brônquica.....	03
3. Hiperreatividade brônquica e asma.....	04
4. Fase pulmonar da infecção e hiperreatividade brônquica causada por helminto.....	07
5. Interleucina 13 e inflamação pulmonar.....	09
6. Interleucina 13 e infecção por nematódeos.....	11
7. Terminações nervosas sensitivas e sensíveis à capsaicina nas vias aéreas.....	13

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. Justificativa.....	17
2. Objetivo geral.....	17
3. Objetivos específicos.....	17

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais.....	20
2. Parasito.....	20
3. Obtenção da larva filarióide.....	21
4. Modelo experimental de asma.....	21
5. Tratamento com salbutamol.....	22

6. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13.....	22
7. Tratamento neonatal com capsaicina.....	22
8. Resposta da dor à formalina sobre o tempo de resposta comportamental (teste de “licking time”).....	23
9. Avaliação parasitológica da infecção.....	23
10. Cultura dos parasitos.....	25
11. Medida da função intestinal.....	25
12. Avaliação da função pulmonar.....	26
13. Lavado broncoalveolar e contagens de células.....	26
14. Contagem de diferencial de leucócitos.....	27
15. Quantificação da Peroxidase de eosinófilo (EPO).....	28
16. Avaliação da expressão das citocinas.....	29
17. Análise histológica.....	29
18. Análise estatística.....	30
19. Grupos experimentais.....	30

RESULTADOS

1. A hiperreatividade brônquica em diferentes doses de larvas do <i>S.</i> <i>venezuelensis</i> em ratos.....	35
2. Papel da hiperreatividade brônquica na infecção causada por <i>S.</i> <i>venezuelensis</i>	42
3. Papel da IL-13 nas alterações funcionais pulmonares e na infecção induzidas por <i>S. venezuelensis</i> em ratos.....	58

4. Papel das fibras sensitivas sensíveis a capsaicina nas alterações funcionais pulmonares induzidas por <i>S. venezuelensis</i> em ratos.....	70
--	----

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

1. Discussão.....	79
2. Conclusão.....	94

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
--	-----------

Introdução

1) Parasito: *Strongyloides venezuelensis* e *Strongyloides stercoralis*.

O *Strongyloides venezuelensis* é um parasito com ciclo pulmonar, natural de ratos (Takamura, 1995). A infecção experimental por *S. venezuelensis* tem sido uma ferramenta importante para o estudo da estrogiloidíase humana e também para a compreensão da relação parasito/hospedeiro. Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem à classe Rhabditea, ordem Rhabditida e família Strongyloididae. O *S. venezuelensis* não afeta o homem; no entanto, o *S. stercoralis* é o principal causador da estrogiloidíase humana, afetando de 30 a 100 milhões de pessoas em 70 países no mundo (GENTA, 1989; SIDDIQUI & BERK, 2001; BOULWARE ET AL., 2007).

O desenvolvimento do *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* ocorre no ambiente (ciclo de vida livre) e no hospedeiro (ciclo de vida parasitária). A fase parasitária inicia-se com a penetração das larvas filarióides (L3) através da mucosa e da pele, e chegam ao intestino delgado onde atingem a maturidade. O parasito é eliminado através das fezes do hospedeiro na forma de ovos e/ou larvas rhabditóides. Essa via de infecção é similar a vários parasitos que infectam o homem tais como *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. As infecções crônicas por *S. stercoralis* não apresentam sintomas. Porém, em muitos casos, podem ocorrer manifestações cutâneas, gastrintestinais e sintomas pulmonares (Genta, 1989). Os sintomas pulmonares muitas vezes não são específicos, mas podem incluir hemoptise alveolar, hiperreatividade brônquica (HRB) e dispnéia. O diagnóstico da estrogiloidíase é difícil na fase pulmonar e, na maioria das vezes, é erroneamente tratado com altas doses de

corticóide, o que piora o processo da infecção (Boulware *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 1985; Woodring *et al.*, 1994; Woodring *et al.*, 1996).

2) Definição e avaliação da hiperreatividade brônquica

A hiperreatividade brônquica (HRB) é um excessivo estreitamento do lúmen das vias aéreas causado por algum estímulo que ocasionaria pouco ou nenhum efeito em indivíduos normais (Black & Johnson, 1996; Nadel & Busse, 1998; Woolcock *et al.*, 1984). O estímulo usado para mensurar HRB pode ser diferenciado em direto e indireto. O estímulo direto (acetilcolina, metacolina, histamina) atua diretamente nos receptores da musculatura das vias aéreas (muscarínicos e receptores H₁, respectivamente). Os indiretos atuam através de mais de uma via de liberação de células inflamatórias (mastócitos, etc.) e incluem os estímulos físicos (exercício, ar frio, hiperventilação) e certos estímulos químicos, como por exemplo, manitol.

As técnicas para estudo da hiperreatividade brônquica diferem-se em invasivas e não invasivas (Irvin & Bates, 2003). Os métodos invasivos são usados em situações em que se necessita estudar a função pulmonar do animal apenas uma vez, pois é uma técnica terminal. Os métodos invasivos requerem que os animais sejam anestesiados cuidadosamente para prevenir esforços ventilatórios, um fator que pode complicar a interpretação da HRB. Dentre as desvantagens dessa técnica incluem-se o uso de anestésicos e de instrumentos invasivos para vias aéreas. Por outro lado, técnicas não invasivas podem ser realizadas mais de uma vez no mesmo animal, sem anestesia ou cirurgia. Um

exemplo é a pletismografia de corpo inteiro, em que o animal é colocado em uma caixa, utilizando-se o Penh (pausa expiratória) como medida (Bates & Irvin, 2003). A desvantagem dessa técnica é a falta de acurácia, pois, muitas vezes, alterações do Penh não correspondem apenas à broncoconstrição (Lundblad *et al.*, 2002).

Os métodos invasivos vêm sendo de grande importância para os estudos genéticos da hiperreatividade brônquica bem como para a análise das alterações funcionais pulmonares em patologias inflamatórias.

3) Hiperreatividade Brônquica e Asma

A HRB vem sendo exaustivamente estudada na asma e correlacionada, principalmente, com inflamação pulmonar. Há vários estudos que correlacionam células inflamatórias, geralmente do lavado broncoalveolar (LBA), com HRB. Esses estudos freqüentemente usando estímulos diretos, como a metacolina (Ferguson & Wong, 1989; Jeffery, 1991), no entanto há estudos que correlacionam a HRB com inflamação apenas quando usam estímulos indiretos como AMP (Polosa *et al.*, 1998; van den *et al.*, 2001). Muitos estudos não detectam relação entre células inflamatórias e HRB independente do estímulo utilizado (Kirby *et al.*, 1987).

Os indutores mais comuns de HRB são as respostas alérgicas mediadas por IgE (Knisz & Rothman, 2007); a maioria dos pacientes com asma são atópicos (Contopoulos-Ioannidis *et al.*, 2007). Asma atópica é caracterizada por eosinofilia e produção de citocinas CD4⁺ T_H2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13). O papel dos

eosinófilos na indução da HRB pela alergia tem sido investigado no nível de citocinas T_H2 , $CD4^+$. A IL-5 esta dentre as citocinas que esteve em grande evidência.

A interleucina 5 (IL-5) é responsável pelo crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos. Há vários trabalhos mostrando que a IL-5 atua na HRB e inflamação (Hamelmann *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1998). Por outro lado, há alguns trabalhos mostrando que a HRB induzida por antígenos pode desenvolver-se independentemente de IL-5 (Corry *et al.*, 1996; Proust *et al.*, 2003). Juntamente com a IL-5, as IL-4 e IL-13, estão sendo alvo de estudos na inflamação pulmonar e HRB (Nag *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2006a; Yang *et al.*, 2004).

Aliados aos estudos que relacionam inflamação e hiperreatividade brônquica, os estudos genéticos da HRB nativa em animais laboratoriais vêm trazendo importante conhecimento para este fenômeno (Chen *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado que a HRB “intrínseca” está sob controle genético, em camundongos e ratos. Um grande número de raças de camundongos vem sendo estudado e observa-se que diferentes raças apresentam distintos graus de HRB em resposta a broncoconstritores (De Sanctis *et al.*, 2001; De Sanctis *et al.*, 1995; Ackerman *et al.*, 2005; Ewart *et al.*, 1996). A raça dos ratos Fisher 344 apresenta maior grau de HRB inata quando comparada a outras raças (Pauwels, 1989; Pauwels *et al.*, 1985). É interessante notar que raça de camundongos que são hiperreativas (AJ, Balb/c e DBA/J2), quando expostas a alérgenos, desenvolvem mais inflamação pulmonar que as linhagens hiporreativas (C57B/L6 e C3H/HeJ) (Ewart *et al.*, 2000). De maneira

interessante, alguns estudos com gêmeos estimam a hereditabilidade da HRB a metacolina em 66%. Muitos dados apontam para uma predisposição genética a asma que pode ocorrer independente da atopia e que a hiperreatividade brônquica pode ser necessária se não suficiente para o desenvolvimento da doença clínica (Van Eerdewegh *et al.*, 2002; Ewart *et al.*, 2000). Isso levanta a grande questão: Qual a importância da inflamação para a hiperreatividade brônquica ou vice-versa?

Recentemente, tem sido demonstrado que a musculatura lisa das vias aéreas vem mostrando um papel importante na inflamação pulmonar. Trabalhos mostram que danos na contração e relaxamento da musculatura lisa causam obstrução aguda e persistente do fluxo da vias aéreas. Isto contribui para a inflamação das vias aéreas por expressar poderosas quimiocinas, tais como eotaxina (CCL11) e RANTES (CCL5) (Oliver *et al.*, 2007; Fredberg, 2000). Muitos tratamentos já trazem alguns benefícios para musculatura lisa. Novas terapias que atuam na musculatura lisa vêm sendo objeto de estudo de alguns laboratórios (Solway & Irvin, 2007).

Em suma, há vários fatores envolvidos na HRB e na patogênese da asma, tais como, inflamação, predisposição genética e alterações na musculatura das vias aéreas.

Os estudos citados acima favorecem o conhecimento sobre HRB. No entanto, os fatores relacionados a este fenômeno durante a infecção por helminto podem ser completamente diferentes ou muito semelhantes aos fatores envolvidos na asma. Em adição, o estudo da HRB em helmintos pode ser

modelo importante e interessante para entender a relação entre inflamação e HRB.

4) Fase pulmonar da infecção e hiperreatividade brônquica causada por helminto

Os pulmões são órgãos alvos de muitos nemátodeos gastrointestinais – incluindo *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lombricoides*, os quais têm migração pulmonar em seu ciclo de vida (Chan *et al.*, 1994; Miller, 1979; Phills *et al.*, 1972).

A fase pulmonar das infecções causadas por parasitos tem sido bastante investigada desde o surgimento de importantes trabalhos científicos mostrando que os parasitos com ciclo pulmonar são capazes de causar prolongadas alterações imunológicas nos pulmões (Marsland *et al.*, 2005; Pinelli *et al.*, 2005). Por exemplo, os níveis de inflamação pulmonar causada por alérgicos foram menores em animais infectados previamente com *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) (Maizels *et al.*, 2004).

Mudanças na função pulmonar e sintomas pulmonares, tais como produção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas, são descritos em pacientes com infecções helmínticas com ciclo pulmonar (Coyle *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 1994). O modelo de infecção por *S. venezuelensis* é caracterizado por alterações imunológicas e patológicas tipicamente vistas em modelos experimentais de asma alérgica, predominante resposta local Th2 que resulta em inflamação pulmonar eosinofílica, aumento da concentração local de

IgE, exagerada produção de muco e hiperreatividade brônquica (Silveira *et al.*, 2002; Negrao-Correa *et al.*, 2003).

Experimentalmente, HRB pode ser definida como um estreitamento exagerado das vias aéreas em resposta a vários agentes broncoprovocativos (Brusasco *et al.*, 1998). É descrita na infecção experimental por *Brugia malayi* (Hall *et al.*, 1998) e *Nippostrongylus brasiliensis* (Coyle *et al.*, 1998), em camundongos, e *S. venezuelensis* (Silveira *et al.*, 2002) em ratos. Esses e outros helmintos de importância na saúde pública possuem fase obrigatória de migração nos pulmões do hospedeiro durante a fase de desenvolvimento larval. Alguns trabalhos mostram que a passagem pelos pulmões no início do ciclo parasitário é extremamente importante para o desenvolvimento do parasito. Por outro lado, existe pouco conhecimento sobre moléculas e alterações fisiológicas que beneficiam (ou não) os parasitos nos pulmões. A HRB é uma alteração fisiológica pulmonar intrigante quanto aos seus benefícios para o parasito, pois, como demonstrado por Silveira *et al.* (2002), ela não coincide com a presença de pico de larvas de *S. venezuelensis* nos pulmões (2º dia após infecção), porém coincide com um aumento da produção de eosinófilos e TNF- α nos pulmões. A infecção por *S. venezuelensis* induz um aumento na HRB ao 2º dia e pico ao 5º dia após (Silveira *et al.*, 2002). Demonstrou-se também que ratos imunizados e desafiados com OVA apresentam HRB e, quando são infectadas com *S. venezuelensis* concomitantemente à imunização e desafio com OVA, a HRB é reduzida (ao tempo que a larva passa pelo pulmão). Teoricamente, a indução

da contração das vias aéreas ao redor da larva poderia prevenir e facilitar a morte por mecanismos imunológicos.

O nosso estudo visa a compreender melhor as alterações funcionais pulmonares, especialmente a HRB ocasionada por *S. venezuelensis*, além disso, a mostrar a importância das alterações funcionais pulmonares para a infecção. A maioria dos trabalhos que estuda a HRB causada pela infecção parasitária não demonstra sua importância para infecção, focando apenas os efeitos de interleucinas na hiperreatividade brônquica (Coyle *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1998; Mehlotra *et al.*, 1998; Mehlotra *et al.*, 2001).

5) Interleucina 13 e inflamação pulmonar

A interleucina 13 (IL-13) é uma citocina imunomodulatória produzida por células T e muitos outros tipos celulares, mastócitos e células dendríticas (Akiho *et al.*, 2002; Hershey, 2003; Kibe *et al.*, 2003). Em humanos, os níveis de IL-13 são aumentados tanto sistemicamente quanto nos pulmões durante ataque asmático (Prieto *et al.*, 2000). Alguns polimorfismos da IL-13 são associados com altos níveis de soro de IgE e ataque de asma (Vercelli, 2002). Adicionalmente, a IL-13 exibe atividade estimulatória para múltiplos tipos de células envolvidas na asma, incluindo células B, mastócitos, eosinófilos, células epiteliais pulmonares, fibroblastos e células da musculatura lisa (Wynn, 2003). Em estudos com animais, a administração de IL-13 recombinante ou o aumento na expressão de IL-13 nos pulmões induz sintomas similares a asma, como

inflamação, produção de muco e remodelamento; sabe se que todos esses fatores estão envolvidos com HRB.

A literatura apresenta dados interessantes a respeito da IL-13 em modelos de asma alérgica em camundongos. A administração de anticorpo anti-IL-13 (Yang *et al.*, 2004) e receptor $\alpha 2$ de IL-13 (Leigh *et al.*, 2004) diminuem a HRB. Por outro lado, há evidências sugerindo que a HRB ocorre na ausência de IL-13 (Proust *et al.*, 2003).

O remodelamento das vias aéreas é uma característica importante da asma. O remodelamento constitui de hiperplasia das células caliciformes e fibrose subepitelial. A indução da hiperplasia das células caliciformes não é devida à proliferação de células *in vivo* (Vargaftig & Singer, 2003) mas é devida à diferenciação de células epiteliais em secretoras (Zuhdi *et al.*, 2000). Muitos estudos demonstram que a administração de um recombinante murino (rm) IL-13 nos pulmões de camundongos induz hiperplasia de células caliciformes, eosinofilia e HRB (Grunig *et al.*, 1998; Kibe *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2002; Vargaftig & Singer, 2003; Wills-Karp, 2000).

Em resumo, a IL-13 está envolvida em múltiplos processos fisiológicos e patológicos nos pulmões, incluindo HRB. Essa interleucina poderia ter também um papel importante na HRB e produção de muco causada por helminto.

6) Interleucina 13 e infecção por nematódeos

As citocinas T_H2 são instrumentos protetores contra a infecção por helmintos e alguns resultados demonstram um papel dominante para IL-13.

Estudos com *Nippostrongylus brasiliensis* foram os primeiros a revelar que a IL-13 tem um papel importante e não redundante na imunidade do hospedeiro (Kibe *et al.*, 2003; McKenzie *et al.*, 1998; Urban, Jr. *et al.*, 1998). Desde então vários vermes vêm sendo estudados: *Trichuris muris*, *Heligmooides polygyrus*, *Trichinella spiralis* e *N. brasiliensis*.

Embora alguns estudos venham mostrando que a expulsão de parasitos requer resposta celular T_H2 $CD4^+$ (Katona *et al.*, 1988), IL-4, sozinha, não é tão importante devido ao fato de camundongos tratados com anti IL-4 e knockout para essa citocina serem tão resistentes à infecção quanto animais selvagens (Madden *et al.*, 1991; Kopf *et al.*, 1993). Esses estudos foram os primeiros a sugerir que outro mediador da resposta celular T_H2 poderia ser importante para expulsão do verme. IL-13 foi um forte candidato devido ao fato de animais deficientes de IL-4 α -, deficientes em STAT6, IL-13 e IL-4 serem mais susceptíveis do que animais deficientes em IL-4 apenas (Barner *et al.*, 1998; Kibe *et al.*, 2003; McKenzie *et al.*, 1998; Urban, Jr. *et al.*, 1998).

Negrão-Correa (2006) mostraram que a expressão do receptor de IL-4 em células não derivadas da medula óssea é necessária para eliminação do *S. venezuelensis*, mas não para a produção de IL-4 intestinal; e que animais IL-4 α KO infectados por *S. venezuelensis* excretam mais ovos quando comparados a animais controle infectados. Somado a isso, demonstrou se

também que a indução de IL-13 é parcialmente dependente do receptor IL-4 α . Esse estudo foi o primeiro a demonstrar a relação da IL-13 com a infecção por *S. venezuelensis*.

A IL-4 e IL-13 apresentam alguns efeitos que se sobrepõem, no entanto muitos efeitos podem ser independentes. Essas interleucinas contribuem para expulsão dos vermes, incluindo estimulação por IgE, mastócitos, eosinófilos, produção de muco, indução de mudanças específicas nas células epiteliais e células da musculatura lisa (Grunig *et al.*, 1998; Kibe *et al.*, 2003). Elas dividem os mesmos componentes dos receptores. Há três tipos de receptores que se ligam a IL-4 e/ou à IL-13. O receptor tipo 1 é composto de uma cadeia comum IL-4R α 1. Já o receptor tipo 2 é composto das cadeias IL-4R α 1 e IL-13 R α 1. A ligação da IL-4 ao receptor tipo 1 ou tipo 2, e da IL-13 ao receptor tipo 2, leva à fosforilação da IL-4 α 1 e à ativação do fator de transcrição nuclear STAT6 (Morimoto *et al.*, 2006). Uma segunda cadeia, liga-se à IL-13 com alta afinidade, mas atua independentemente de STAT6; a ação deste receptor permanece incerta. Há alguns trabalhos mostrando que ele inibe a ação da IL-13R α 2 *in vivo* (Wood *et al.*, 2003; Chiaramonte *et al.*, 2003).

Há uma carência de trabalhos a respeito da importância da IL-13 para fase pulmonar do ciclo parasitário de diversos helmintos. Por outro lado há vários trabalhos mostrando o papel da IL-13 na fase intestinal do helminto. Ela é importante para supressão da produção de ovos e expulsão de vermes do intestino na infecção por *N. brasiliensis* (Finkelman *et al.*, 2004). A defesa contra o parasito pode ser desenvolvida pela ação da IL-13 em células não derivadas

da medula óssea como por exemplo, células da musculatura lisa intestinal, epitélio e células caliciformes (Akiho *et al.*, 2002). Em alguns helmintos a ação da IL-13 sozinha não é tão eficaz para expulsão de verme quanto em ação conjunta com IL-4.

7) Terminações nervosas sensitivas sensíveis à capsaicina nas vias aéreas

Estímulos nocivos à pele ou ao tecido subcutâneo, como articulações, ativam classes de terminais nociceptivos, classificados como periféricos dos neurônios sensitivos primários, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios do trigêmeo. Há três importantes tipos de nociceptores: térmicos, mecânicos e polimodais. Os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas extremas e possuem fibras A δ , que são fibras mielinizadas. Os nociceptores polimodais são ativados por estímulos mecânicos, químicos e térmicos, possuem fibras C de pequeno diâmetro e não mielinizadas que conduzem sinais lentamente. As fibras aferentes nociceptivas terminam em neurônios de projeção no corno dorsal da medula espinhal e transmitem a informação dolorosa para centros superiores, como tálamo, amígdala e córtex, por cinco vias ascendentes. O papel das fibras sensoriais sensitivas não mielinizadas pode ser estudado pelo tratamento de capsaicina em ratos neonatos, que ocasiona perda da capacidade desses neurônios, resultando em diminuição da resposta inflamatória neurogênica e dor (Jancso *et al.*, 1977).

A capsaicina é uma substância da pimenta vermelha, e é popularmente usada como comida na Índia, América do Sul, sudoeste da Ásia e da África. Os

efeitos farmacológicos da capsaicina foram reportados pela primeira vez em 1878, quando foi notado que ela produzia uma sensação de queimadura quando em contato com pele (Monserenusorn *et al.*, 1982). Desde então os efeitos da capsaicina vêm sendo investigados. Esses efeitos são dependentes da rota de aplicação, dosagem, idade, raça e espécies de animais. Quando a capsaicina é aplicada em estágio neonatal, atua como uma neurotoxina e induz destruição irreversível e específica de neurônios sensoriais primários. Em contraste, quando aplicada em adultos causa perda reversível de estoques de neuropeptídeos.

A depleção de neurocinina pelo tratamento neonatal com capsaicina produz danos irreversíveis das fibras sensoriais, levando à perda permanente e degeneração de 50 a 90% de todas as fibras não mielinizadas aferentes (Jancso *et al.*, 1977). Descobriu-se um novo receptor de capsaicina, chamado vaniloide (VR) (Caterina *et al.*, 1997). Ele tem facilitado o entendimento dos efeitos da capsaicina nas fibras nervosas sensoriais aferentes primárias. As fibras nervosas sensoriais são as maiores fontes de taquicininas (Holzer, 1998).

A inflamação resultou da liberação de substâncias de fibras nervosas sensoriais primárias é denominada de inflamação neurogênica. Substância P e neurocinina A são membros da família de peptídeos chamados de taquicininas que são potentes vasodilatadores e vasoconstritores. As taquicininas estão presentes nas terminações nervosas primárias. Estudos em roedores têm demonstrado que as taquicininas são neurotransmissores que medeiam o sistema nervoso não adrenérgico e não colinérgicos (NANC)(Barnes, 1996).

As taquicininas, podem também exercer numerosos efeitos nas células do trato respiratório. Os efeitos broncoconstritores da substância P exógena foram reportados pela primeira vez em 1977 em porcos da Índia e gatos. Desde então as taquicininas vêm sendo exaustivamente estudadas. A neurocinina A (NKA) causa constrição da musculatura das vias aéreas em humanos, *in vivo*, via receptores NK2 (Frossard & Barnes, 1991). Na asma, a administração da neurocinina A intravenosamente ou por inalação leva à broncoconstrição. (Frossard & Barnes, 1991; Lundberg & Saria, 1982; Shore *et al.*, 1988); adicionalmente muitos estudos demonstram que a depleção de neuropeptídeos pode influenciar a hiperreatividade brônquica causada por alérgeno (Warth *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997).

As taquicininas exercem outros efeitos no trato respiratório, tais como secreção glandular, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estimulação dos nervos colinérgicos, estimulação de células mastócitos, estimulação dos linfócitos T e B, estimulação de macrófagos, quimioatração de eosinófilos e neutrófilos e adesão vascular de neutrófilos (Barnes, 1996).

Em resumo, muitos estudos demonstram o papel do neuropeptídeos na vias aéreas e na asma, porém não há estudos a respeito do papel dos neuropeptídeos na HRB causada por helminto.

Justificativa e objetivos

Justificativa:

Esse estudo visa a desvendar a importância e os mecanismos das alterações funcionais pulmonares causadas por *S. venezuelensis*. A alergia induz mudanças na função das vias aéreas que podem afetar a migração da larva através dos pulmões em animais infectados por *S. venezuelensis* com alergia experimental. Desta maneira, resposta funcional pulmonar induzida pela larva, como a hiperreatividade brônquica, poderia ser um mecanismo protetor importante para hospedeiro.

1) Objetivo geral:

Avaliar a importância e os possíveis mecanismos das alterações funcionais pulmonares durante a infecção causada por *S. venezuelensis* em ratos.

2) Objetivos específicos:

- Avaliar a hiperreatividade brônquica induzida por diferentes cargas de larvas do parasito (150, 500, 1.500 e 4.500) inoculadas em ratos.
- Investigar se a hiperreatividade brônquica altera o curso da infecção parasitária.
- Investigar o papel da IL-13 na inflamação induzida pela infecção, avaliando seus efeitos na hiperreatividade brônquica e infecção, utilizando-se de anticorpo monoclonal anti-IL-13.

- Investigar se a hiperreatividade brônquica causada por *S. venezuelensis* em ratos tem como mecanismo a ativação das fibras sensoriais sensitivas capsaicina.

Material e Métodos

1) Animais:

Ratos Wistar machos pesando entre 250-300 gramas foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG e Fundação Oswaldo Cruz na Bahia (Fiocruz-BA). Os animais receberam água e ração (Nuvilab, Brasil). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFMG (019/05). Todos os animais tiveram suas fezes examinadas e foram rotineiramente vermifugados. O tratamento foi realizado com Ivermectina, via oral, durante uma semana (0,8 ml de Ivermectina 1% - Chemitac ® / litro de água, fornecida *ad libidum*). Depois do tratamento, os ratos foram mantidos em um local isolado, em gaiolas contendo maravalha e ração autoclavada, assim como água filtrada, para evitar uma reinfecção.

Antes de serem infectados com *S.venezuelensis*, os ratos ficaram em descanso por 10 dias, para evitar qualquer efeito residual da Ivermectina, e passaram por um novo exame de fezes para garantir que estivessem sem nenhuma infecção.

2) Parasito:

S. venezuelensis foi usado em todos os experimentos. O nematódeo foi isolado de *Rattus norvegicus* (BRENER & CHAIA, 1960), sendo posteriormente separado do *S. rattii* em ciclos de passagem em ratos Wistar machos no Biotério do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais da UFMG.

3) Obtenção das larvas filarióides:

As larvas filarióides (L3) usadas na infecção dos ratos foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Para a coleta das fezes, ratos com 7-21 dias de infecção foram transferidos para uma gaiola de arame e as fezes foram coletadas numa caixa coletora encaixada no fundo da gaiola fisiológica. Esta caixa foi coberta com jornal molhado, que evitava o ressecamento das fezes. As fezes coletadas foram misturadas com vermiculita, na proporção de 1:2. A coprocultura era umedecida e mantida em estufa a 28°C, onde permanecia por 72h, para que se desenvolvessem as larvas filarióides (L3). As larvas filarióides foram recuperadas pela técnica de Baerman-Moraes (Neves *et al.*, 2003), lavadas em solução fisiológica 0,85% (NaCl) e quantificadas através da contagem das larvas vivas em 3 amostras de volume conhecido da solução de larvas. Para a infecção dos ratos, foram utilizadas 1.500 larvas filarióides para cada animal, que foram inoculados subcutaneamente na região abdominal.

4) Modelo experimental de asma - Modelo de imunização e desafio com ovalbumina:

Para imunização os animais foram anestesiados levemente, realizou-se uma incisão na região dorsal, para implantação subcutânea da ovalbumina coagulada. Após o implante suturou-se o local. O desafio foi feito pela aerolização com 2% de ovalbumina (Sigma), como descrito por Silveira *et al.* (2002).

5) Tratamento com Salbutamol:

Verificamos o efeito broncodilatador do Aerolin[®] (Sulfeto de Salbutamol solução para nebulização-GlaxoWellcom) em ratos imunizados e desafiados com ovalbumina. Os animais infectados foram então tratados com salbutamol via inalação (0.25 mg/mL; veículo solução fisiológica durante 10 minutos, de 4 em 4 horas). O aerosol com Salbutamol foi realizado dentro de uma câmara adaptada acoplada a um nebulizador ultra-sônico (Pulmosonic Star-Marc: Sonicler).

6) Tratamento com anticorpo monoclonal anti –IL13:

Ratos Wistar foram tratados intraperitonealmente com 500 uL de anticorpo monoclonal anti-IL13 ou mesmo volume do veículo (anti-soro de carneiro), durante os seguintes dias de infecção: 2°, 4°, 6°, 8°, 10°.

7) Tratamento neonatal com capsaicina:

Ratos Wistar foram tratados no segundo dia de vida com capsaicina (50 mg/Kg, s.c) ou veículo (10% de etanol e 10% de tween 80 em 0.9% w/v solução de NaCl), como previamente descrito (Jancso *et al.*, 1977). Os animais foram infectados com *S. venezuelensis* na idade adulta (aproximadamente 3 meses após tratamento com capsaicina).

8) Resposta comportamental à dor pela injeção de formalina sobre o tempo (teste de “licking time”):

Para confirmar a eficácia da depleção das terminações nervosas sensitivas sensíveis à capsaicina, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina (3% em PBS, 100 µL por pata) e o efeito comportamental foi avaliado por 10 min (fase inicial) e de 20 a 30 min (fase tardia) (Jancso *et al.*, 1977). Anotava-se o tempo no qual o animal lambia a pata e/ou permanecia com esta suspensa ou não apoiada completamente no piso.

9) Avaliação parasitológica da infecção:

Os dias escolhidos para avaliação parasitológica foram de acordo com o ciclo do parasito e o objetivo dos tratamentos. Em geral os ratos infectados foram sacrificados no 2º dia pós-infecção para a recuperação de larvas do pulmão; e no 12º dia pós-infecção para recuperação de vermes adultos do intestino delgado e coleta de porções do intestino delgado para análise imunológica. A coleta de fezes foi realizada 5, 7 e 10 dias após infecção no protocolo de tratamento com anti-IL13. Em cada período da infecção foram examinados 4 a 5 animais de cada grupo experimental, e cada experimento foi repetido pelo menos 2 vezes.

Para a recuperação das larvas, os pulmões de cada rato foram lavados com salina e o tecido foi fragmentado para facilitar a saída das larvas durante a incubação do material a 37°C por 4h. Para a recuperação dos vermes adultos, a região anterior do intestino delgado, que compreende o duodeno e a porção

proximal do jejuno, foi separada, aberta longitudinalmente e limpa com salina. Tanto na recuperação de larvas quanto na recuperação de vermes adultos, o pulmão ou intestino delgado foi individualmente colocado num cálice contendo salina e uma rede de malha fina, o que permitia que o parasito, ao ser atraído pelo calor do banho-maria (37°C/4h), saísse do tecido e sedimentasse no fundo do cálice. Depois disso, tanto as larvas como os vermes adultos recuperados no fundo do cálice, assim como os vermes que permaneciam no intestino delgado foram quantificados em microscópio estereoscópico.

Os ovos de *S. venezuelensis* eliminados nas fezes de cada animal necropsiado foram quantificados nos sedimentos de fezes coletados na região do reto. As fezes formadas recolhidas do reto de cada animal foram pesadas e homogeneizadas com 1mL de salina, e, posteriormente, conservadas com a adição de 4mL de solução de formalina tamponada a 10%. A contagem dos ovos foi feita em 100 µL da solução, em 02 lâminas, para que fosse estimado o número de ovos por grama de fezes (OPG). A partir do OPG e da contagem de vermes adultos de cada rato infectado, estimou-se a quantidade de ovos produzidos por cada verme/grama de fezes naquele período da infecção: considerado como índice de fecundidade.

A região posterior do intestino delgado recolhido dos ratos necropsiados foi dividida em dois segmentos e lavada com solução fisiológica, acondicionada em microtubos e imediatamente armazenada em freezer a -20°C, até a utilização. Este material foi utilizado para quantificação de citocinas (jejuno

distal) e do nível de peroxidase no tecido – EPO (íleo), conforme descrição detalhada abaixo.

10) Cultura *in vitro* de vermes adultos de *S. venezuelensis*:

Vermes adultos foram obtidos da porção superior do intestino delgado ao 7º dia após infecção em ratos. Os vermes que emergiram do tecido foram lavados várias vezes com PBS 1X, pH=7.2 contendo 500U/mL de penicilina e 500 mg/mL de estreptomicina (Sigma), ressuspendido em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis MO, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Rockville MD, USA), 100U/mL de penicilina, 100U/mL de estreptomicina, e plaqueado em placa de cultura de tecido contendo Salbutamol em concentrações diferentes (10^{-4} e 10^{-6} M Sigma); cultura controle sem Salbutamol foi realizada. Cada tratamento com droga foi testado em triplicata. A cultura foi incubada a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 48 horas. O número de vermes e sua mobilidade, juntamente com os números de ovos, foram quantificados após incubação de 24 e 48 horas.

11) Medida da função intestinal:

Segmento duodenal (1 cm) foi suspenso longitudinalmente em um recipiente de vidro preenchido com 10 mL de solução de Tyrode mantido a 37° e continuamente ventilado com 95% de O₂ e 5% CO₂. Uma das porções finais do tecido foi fixada a um transdutor de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA) e outra a uma superfície mais baixa da

solução de banho. Tecidos foram estendidos a uma força de 9.9 mN (2 g). Os tecidos permaneciam na solução de banho durante 30 minutos iniciais e depois o banho era renovado a cada 15 minutos. O sinal de tensão foi processado em um amplificador (TBM-4; World Precision Instruments, Inc.). Os dados foram expressos como porcentagem de aumento da tensão em comparação à linha basal depois de cada dose de acetilcolina (10^{-6} a 10^{-2} M-Sigma).

12) Avaliação da função pulmonar:

Avaliamos a hiperreatividade brônquica das vias aéreas em ratos imunizados e desafiados com OVA e em ratos infectados com *S. venezuelensis* ao 2º e 5º dia após a infecção e em ratos normais (sem infecção ou tratamento). Os ratos foram anestesiados com uretana (1.400 mg/Kg ip., Sigma) e a variação da pressão intratraqueal a doses crescentes de acetilcolina (10, 100 e 300 ug/Kg) foi avaliada como descrito por Silveira et al. (2002) usada como medida indireta da resistência pulmonar. Dados foram expressos como porcentagem de aumento da pressão da pressão intratraqueal em comparação à linha basal.

13) Lavado broncoalveolar (LBA) e Contagem total de células:

Após a avaliação da função pulmonar, os animais foram eutanaziados para realização do lavado broncoalveolar (LBA) através da instilação na traquéia de 6 mL de PBS(pH=7.4) acrescido de 0.1 % de albumina bovina (BSA-Sigma) e de inibidor de proteases (Complete Protease Inibidor Cocktail-Boeringer Mannheim Biochemical-1 tablete em 25 mL de PBS). Essa solução foi injetada e

aspirada por 3 vezes, através de uma cânula inserida na traquéia. O LBA obtido foi centrifugado (1.200 rpm – 7 min), as células foram separadas do sobrenadante, que foi estocado (-20°C) para dosagem de citocinas. O sedimento de células foi ressuspenso em 0.1 mL de PBS, acrescido de 0.3% de BSA e utilizado para a contagem de total e diferencial de células, como descrito por Silveira et al. (2002).

14) Contagem diferencial de leucócitos:

A amostra de células presentes no LBA, suspensas em 100 µL de albumina 3%, foi depositada (20 µL de cada suspensão) em lâminas de vidro, previamente preparadas com papel de filtro, contendo 2 poços com 0,5 cm de diâmetro. Posteriormente as lâminas foram coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa.

Foram contadas 100 células por 3 vezes em cada lâmina e realizada uma média para se obter o número das células diferenciadas por critérios morfológicos. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

15) Quantificação da Peroxidase de eosinófilo (EPO):

A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia pulmonar e intestinal. Para tanto, aproximadamente 100 mg de tecido foi pesado e homogeneizado em PBS (pH 7.2), usando um homogeneizador de tecido;

obtendo-se um volume final de 2ml. O homogenato foi centrifugado a 3.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O *sedimento* foi sujeito à lise hipotônica em salina 0,2%, seguido pela adição de salina 1,6% e glicose 5%. Depois disso, o material foi novamente centrifugado a 3.000g por 10 minutos, para que o sobrenadante fosse desprezado e o *sedimento* ressuspenso em PBS (pH 7.4), contendo HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide; Sigma) 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato foi separado em alíquotas de 1 ml/*ependorf*, congelado 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 3.000g por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificar a peroxidase (Silveira *et al.*, 2002).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75µl de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75µl de substrato (1,5µM de OPD em tampão Tris-HCl 0,075µM pH 8 acrescida de H₂O₂ 6,6µM). A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ 1M e a leitura era realizada em leitor de Elisa com filtro de 492 nm.

Os níveis de EPO no tecido correlacionam com a quantidade de eosinófilos no mesmo; utilizamos o método descrito por Silveira *et al.* (2002) para sua detecção. O pulmão direito foi utilizado e o processo de preparo do tecido para quantificação foi de acordo com a descrição feita em publicações (Silveira *et al.*, 2002).

16) Avaliação da expressão de citocinas:

As concentrações de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF e IFN- γ foram estimadas no homogenato do pulmão e intestino delgado reservado para a análise de citocinas, através da técnica de ELISA. Pares de anticorpos foram gentilmente doados por Stephen Poole (National Institute for Biological Standards and Control, England) e os ensaios foram avaliados como descrito por Silveira *et al.* 2002.

17) Análise histológica:

Ao final de cada experimento os pulmões foram lavados para remover o sangue, em seguida, o pulmão foi inflado, via cânula inserida na traquéia, com 10% de formoldeído em PBS, sendo fixado na mesma solução. Após desidratação em álcool e diafanização em xilol, o tecido foi incluído em parafina e foram obtidas sessões de 4 μ m. As sessões foram coradas com periodic acid-Schiff (PAS) e/ou hematoxilina eosina. Para avaliar a frequência de coloração, a razão da área do parênquima por área corada foi analisada sob microscópio com uma régua microscopia em quadrantes.

18) Análise estatística:

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos

19) Grupos experimentais:

Protocolo experimental 1: Avaliar hiperreatividade brônquica em diferentes doses de larvas do *S. venezuelensis* em ratos

Para esse objetivo os animais foram separados em 5 grupos:

Grupo 1: Animais não foram infectados com larvas. Esse grupo foi denominado grupo controle (n=5).

Grupo 2: Animais infectados com 150 larvas (n=5).

Grupo 3: Animais infectados com 500 larvas (n=5).

Grupo 4: Animais infectados com 1.500 larvas (n=5).

Grupo 5: Animais infectados com 4.500 larvas (n=5)

EPO no tecido pulmonar de cada grupo descrito acima foi realizado e o número de vermes recuperados no intestino dos grupos 2, 3,4 e 5 foi determinado.

Protocolo experimental 2: Avaliar se a hiperreatividade brônquica altera o curso da infecção causada por *S. venezuelensis* em ratos

Para esse objetivo os animais foram separados em 4 grupos:

Grupo 1: Animais não infectados com larvas sem tratamento com salbutamol. Esse grupo foi denominado grupo controle (n=6).

Grupo 2: Animais infectados com larvas tratados com salbutamol durante as primeiras 48 horas após infecção (n=6).

Grupo 3: Animais infectados com 1.500 larvas e sem tratamento com salbutamol. Esse grupo foi denominado infectado (n=8).

Grupo 4: Animais infectados com 1.500 larvas tratados com salbutamol durante as primeiras 48 horas após infecção. Esse grupo foi denominado infectado mais salbutamol (n=8)

Ao 2° e 5° dias após infecção foram avaliados HRB e células inflamatórias do BAL, EPO e citocinas no tecido pulmonar de cada grupo. A presença de ovos e vermes foi avaliada nos grupos infectados no 12° dia após a infecção. A contratilidade intestinal foi avaliada aos 2° e 12° dias após infecção. Animais tratados com OVA foram utilizados para provar a eficácia do salbutamol em broncodilatar as vias aéreas na dose de 0.25 mg/mL.

Protocolo experimental 3: Avaliar o papel da IL-13 nas alterações funcionais pulmonares e na infecção induzida por *S. venezuelensis* em ratos

Para esse objetivo os animais foram separados em 3 grupos:

Grupo 1: Animais não infectados e sem tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL13. Esse grupo foi denominado controle (n=5).

Grupo 2: Animais infectados sem tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL13. Esse grupo foi denominado infectado (n=5).

Grupo 3: Os animais infectados tratados com anticorpo monoclonal anti-IL13. Esse grupo foi denominado infectado mais anti-IL-13 (n=5).

O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 foi realizado durante os seguintes dias de infecção: 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dia.

Ao 5º dia após infecção foram avaliados HRB, presença de células inflamatórias do LBA, atividade de EPO e detecção de citocinas no tecido pulmonar de cada grupo. A presença de ovos nas fezes foram avaliados ao 5º, 7º, 10º, 12º dia após infecção. O número de vermes foi avaliado ao 12º dia após infecção.

Protocolo experimental 4: Avaliar o papel da fibras nervosas sensoriais sensitivas à capsaicina nas alterações funcionais pulmonares e na induzida por *S. venezuelensis* em ratos

Para esse objetivo os animais foram separados em 3 grupos:

Grupo 1: Animais não infectados e sem tratamento com capsaicina. Esse grupo foi denominado controle (n=5).

Grupo 2: Animais infectados e tratados com capsaicina no 2º dia de vida. Esse grupo foi denominado infectado mais capsaicina (n=5).

Grupo 3: Animais não infectados tratados com capsaicina no 2º dia de vida (n=5).

Ao 5º dia após infecção foram avaliados HRB, presença de células inflamatórias do LBA, atividade de EPO e detecção de citocinas no tecido pulmonar de cada grupo. A presença de ovos nas fezes foram avaliadas ao 5º para confirmar a infecção. O teste de analgesia foi realizado para confirmar a eficácia do tratamento com capsaicina.

Resultados

**OBJETIVO 1: AVALIAR A HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA INDUZIDA
POR DIFERENTES CARGA DE LARVAS DO PARASITO (150, 500, 1.500 e
4.500) DO *S. venezuelensis* EM RATOS**

1) As via aéreas de ratos infectados com 1500 larvas apresentaram maior responsividade à acetilcolina

Experimentos iniciais foram realizados para avaliar a melhor dose de larvas utilizada para os estudos das alterações funcionais pulmonares causadas por *S. venezuelensis*. A administração i.v. de doses crescentes de acetilcolina induziu aumento na resistência das vias aéreas em ratos infectados e ratos normais. Ratos infectados com 1.500 e 4.500 larvas apresentaram-se mais responsivos ao tratamento quando comparados a ratos infectados com 150 e 500 larvas. No entanto, a dose de 1.500 larvas apresentou aumento significativo da resistência das vias aéreas quando comparado aos animais que receberam 4.500 larvas infectivas (Figura 1).

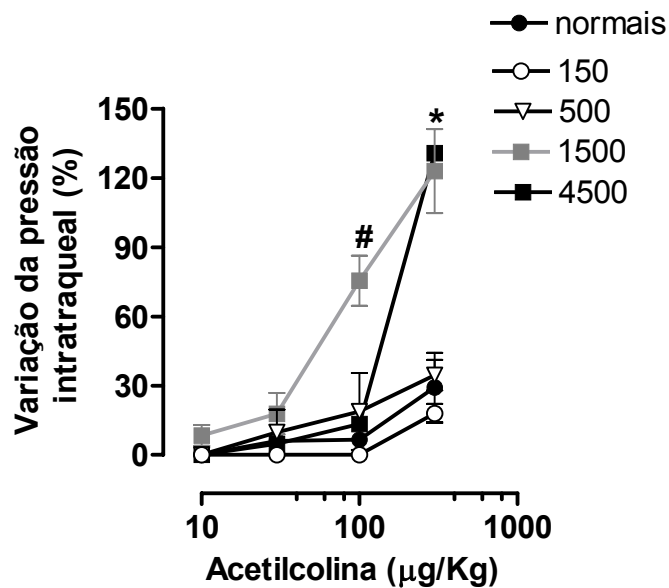
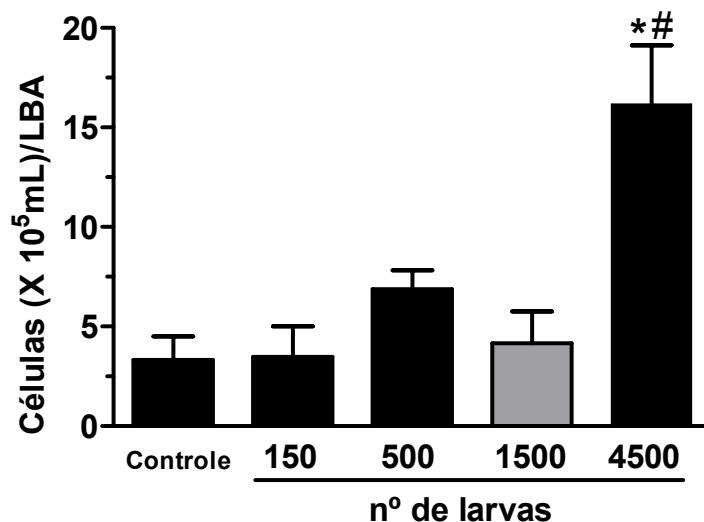


Figura 1: Efeito da dose de larvas na hiperreatividade brônquica ao 5º dia após a infecção. Variação da pressão intratraqueal em resposta a acetilcolina (10, 30, 100, 300 ug/kg) em animais normais (sem infecção) e infectados com 150, 500, 1500 e 4500 larvas de *S. venezuelensis* (5 dias após infecção). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 5 animais. * $p < 0,05$, comparando-se infectado com 4.500 e 1.500 em relação aos demais grupos e # $p < 0,05$, comparando-se grupo infectado com 1.500 aos demais grupos.

2) Infecção pulmonar em ratos infectados com 150, 500, 1.500 e 4.500 larvas de *S. venezuelensis*

A migração das larvas através dos pulmões induziu um aumento significativo de número total de células no lavado broncoalveolar ao 5º dia após a infecção nos animais infectados com 4.500 larvas quando comparado a animais não infectados. Por outro lado, o número de células totais não aumentou significativamente em animais infectados com 150, 500, 1.500 (Figura 2A). O número de eosinófilos no lavado broncoalveolar aumentou a partir da infecção com 500 larvas, acentuando-se com a infecção de 1.500 e 4.500 larvas (Figura 2B). Apenas a dose de 4.500 larvas produziu significativo aumento da peroxidase eosinofílica no lavado broncoalveolar (Figura 2C).

A)



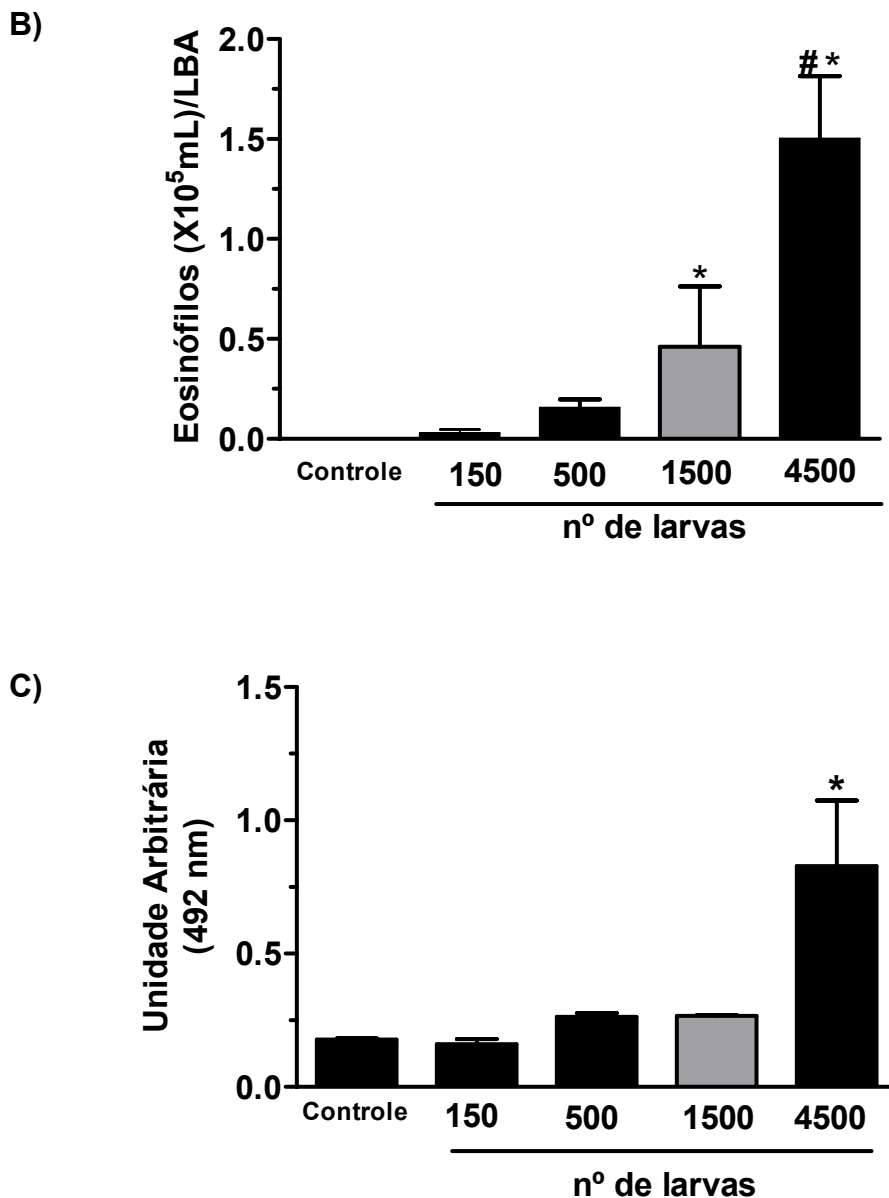


Figura 2: Efeito da dose de larvas na inflamação pulmonar. O número de células totais (A) e eosinófilos (B) no lavado broncoalveolar (LBA) e nível de peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar de ratos foram avaliados 5 dias após infecção com 150, 500, 1500, 4500 larvas de *S. venezuelensis*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 5 animais. * $p < 0,05$, comparando-se grupo infectado com 4500 de *S. venezuelensis* em relação aos grupos infectados com 150, 500 e 1500 larvas de *S. venezuelensis* e animais normais.

3) Vermes recuperados no intestino após a infecção de doses crescentes de larvas

A Figura 3 mostra um aumento no número de vermes do intestino de ratos infectados com 1.500 e 4.500 larvas quando comparados com ratos infectados com 150 e 300 larvas (Figura 3).

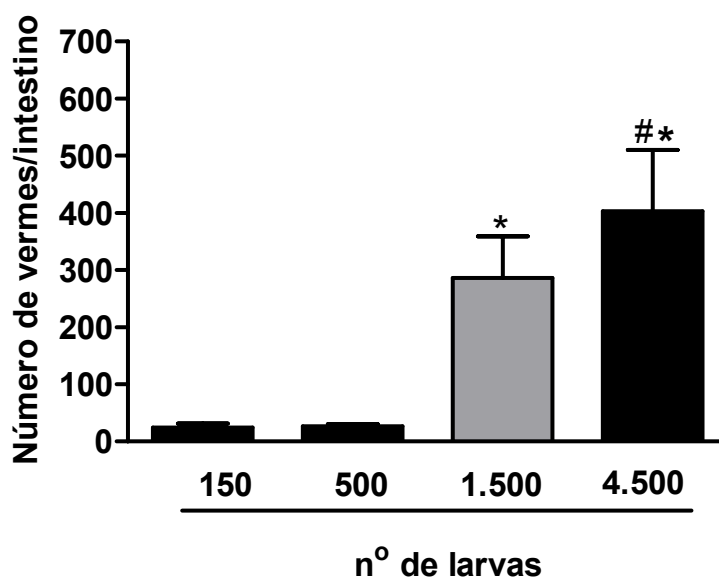


Figura 3: Efeito da dose de larvas no número de vermes recuperados do intestino. O número total de vermes adultos no intestino foi avaliado ao 5º dia após infecção com 150, 500, 1500, 4500 larvas de *S. venezuelensis*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 5 animais. # $p < 0,05$, comparando-se infectado com 1500 em relação a de 4.500 larvas de *S. venezuelensis*. * $p < 0,05$ comparando-se o grupo infectado com 4.500 e 1.500 de *S. venezuelensis* em relação aos grupos infectados com 150, 500 larvas de *S. venezuelensis*.

**OBJETIVO 2 : INVESTIGAR SE A HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA AFETA
O CURSO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *S. venezuelensis* EM RATOS**

1) Salbutamol preveniu o aumento da HRB induzida por acetilcolina após a infecção por *S.venezuelensis* em ratos

Experimentos iniciais foram realizados para confirmar se a dose usada de salbutamol foi suficiente para prevenir mudanças nas funções das vias aéreas. A administração i.v. de doses crescentes de acetilcolina induziu aumento significativo na resistência das vias aéreas em ratos que foram previamente imunizados e desafiados com OVA. O tratamento desses animais com salbutamol reduziu a HRB induzida restaurando os níveis de pressão intratraqueal àqueles dos animais não imunizados e desafiados por OVA (Figura 4).

Nosso grupo mostrou previamente que a infecção por *S.venezuelensis* causou uma alteração significativa da HRB em resposta à acetilcolina que se iniciou ao 2° dia após a infecção com pico ao 5° dia após a infecção (Silveira *et al.*, 2002). A broncodilatação induzida pelo tratamento com salbutamol preveniu significativamente o aumento da responsividade das vias aéreas à acetilcolina no 2° dia após a infecção (Figura 5). Por outro lado, ocorreu um aumento significativo da HRB no 5° dia após infecção em animais infectados tratados e não tratados com salbutamol (Figura 6).

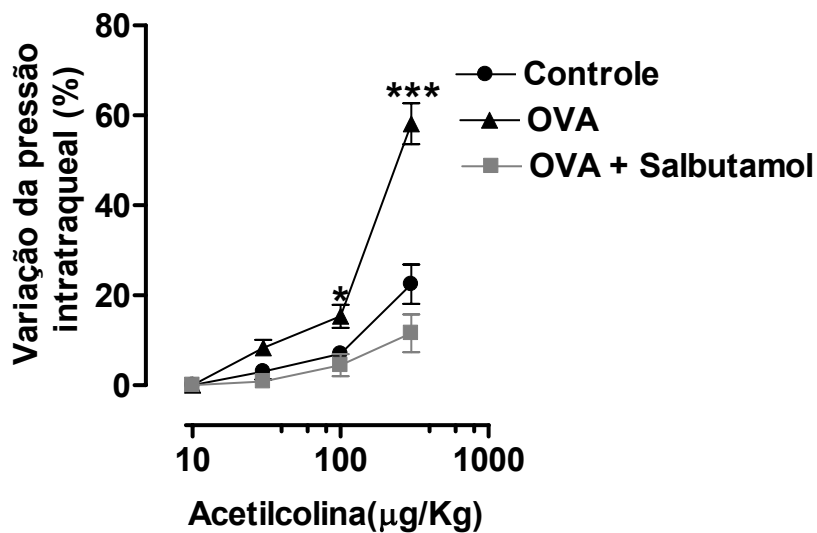


Figura 4: Efeito do tratamento com salbutamol em ratos imunizados e desafiados com ovalbumina. Para avaliarmos a eficácia da dose utilizada de salbutamol em provocar broncodilatação, investigamos a variação da pressão intratraqueal em resposta à acetilcolina (10, 30, 100, 300 ug/kg) em animais desafiados e imunizados com OVA (ovalbumina) e tratados ou não com salbutamol. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$, comparando-se grupo OVA em relação ao grupo OVA tratado com salbutamol e controle.

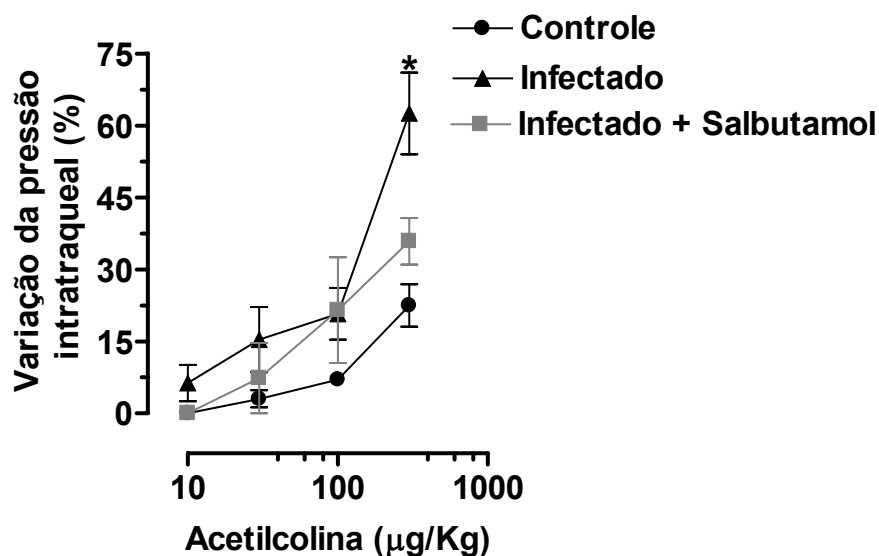


Figura 5: Efeito do tratamento com salbutamol na hiperreatividade brônquica durante o 2º dia após infecção. Os dados representam a variação da pressão intratraqueal em resposta à acetilcolina (10, 30, 100, 300 µg/kg) de animais normais (sem infecção), infectados (2 dias após infecção) e infectados (2 dias após infecção) mais tratados com salbutamol (4 em 4 horas) durante o período de 48 horas após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais.; * $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado *em relação* ao grupo infectado tratado com salbutamol e controle.

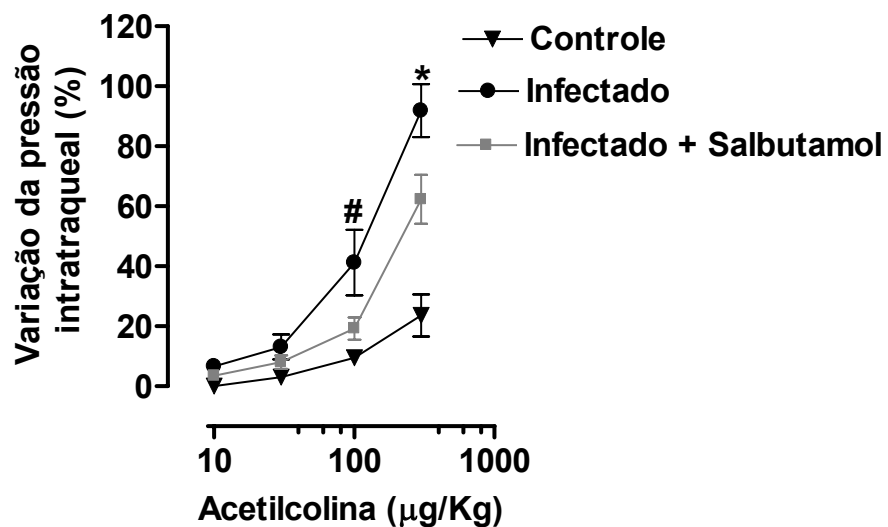


Figura 6: Efeito do tratamento com salbutamol na hiperreatividade brônquica durante o 5º dia após infecção com *S.venezuelensis*. Avaliamos a variação da pressão intratraqueal em resposta à acetilcolina (10, 30, 100, 300 ug/kg) em animais normais (sem infecção), infectados (5 dias após infecção) e infectados (5 dias após infecção) mas tratados com salbutamol durante o período de 48 horas após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. # $p < 0,05$, comparando-se grupo infectado em relação grupo normal; * $p < 0,05$, comparando-se o grupo infectado em relação grupo infectado mas tratado com salbutamol.

2) Efeito do tratamento com salbutamol na infecção

Houve um aumento do número de larvas nos pulmões de ratos tratados com salbutamol quando comparado ao controle (Figura 7). Além disso, o número de vermes recuperados do intestino delgado ao 12° dia após infecção com *S. venezuelensis* nos ratos tratados com salbutamol foi significativamente maior do que o de animais controle (Figura 7). Por outro lado, ratos tratados com salbutamol eliminaram um reduzido número de ovos quando comparados aos animais não tratados (Figura 8). O reduzido número de ovos recuperados foi devido à significativa redução da fecundidade (Figura 8).

Devido ao fato de o tratamento com salbutamol afetar a recuperação de larvas nos pulmões e de vermes no intestino, avaliou-se os efeitos da droga no parasito. Salbutamol nas concentrações de 10^{-6} a 10^{-2} M não alterou significativamente a sobrevivência dos vermes e sua habilidade de depositar ovos. Observou-se, também, que os vermes permaneceram vivos durante e depois de 48 horas em cultura com salbutamol e eliminaram números similares de ovos, independentemente da concentração de salbutamol (Figura 9).

Para testar a hipótese de que o tratamento com salbutamol poderia influenciar a contratilidade intestinal, foi realizada ao 2° dia após infecção (dados não apresentados) e 12° dias após infecção. O tratamento com salbutamol foi capaz de abolir, a uma pequena resposta, a acetilcolina observada ao 2° dia após infecção. Por outro lado, infecção induziu um aumento na tensão ($P < 0,05$) que foi similar nos animais controle e tratados com salbutamol ao 12° dia de infecção (Figura 10).

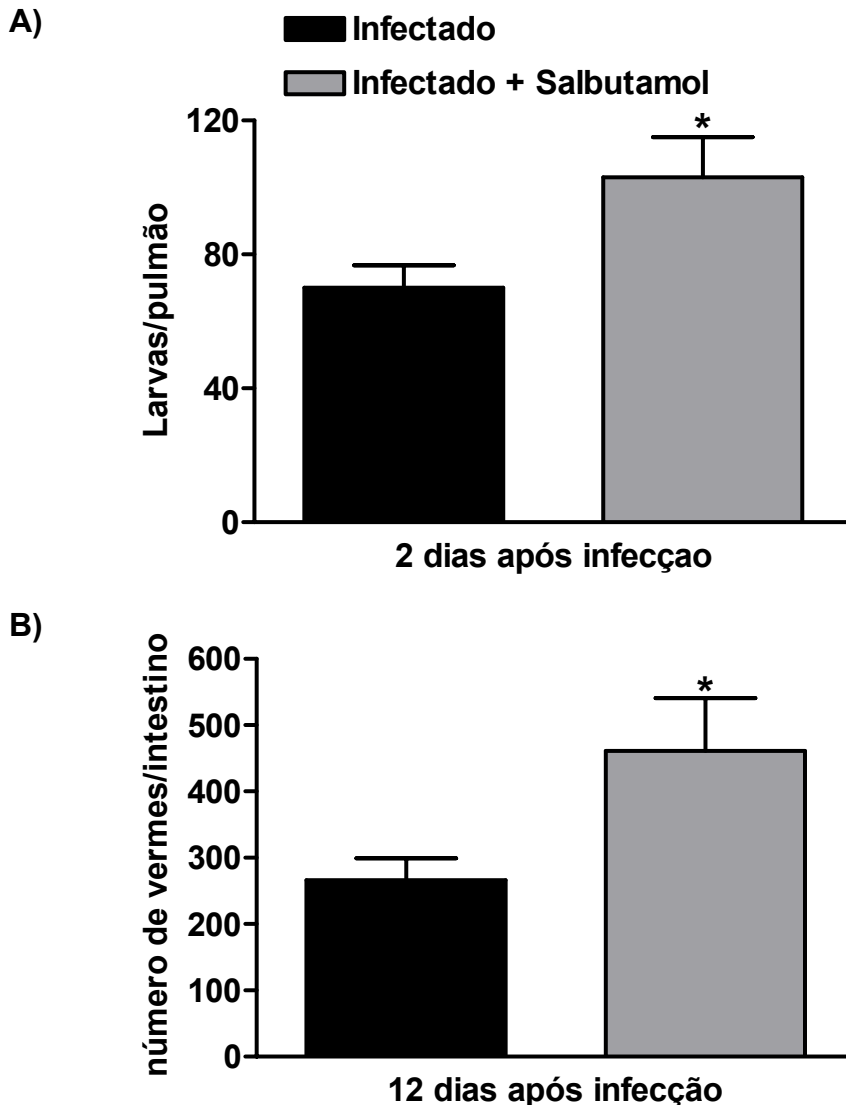


Figura 7: Efeito do tratamento com salbutamol no número de larvas recuperadas nos pulmões e de vermes recuperados no intestino após infecção com *S. venezuelensis*. Resultados expressam o total de números de larvas no pulmão (A) ao 2º dia após infecção e vermes adultos no intestino (B) ao 12º dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. * $p < 0.05$, comparando-se o grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com salbutamol.

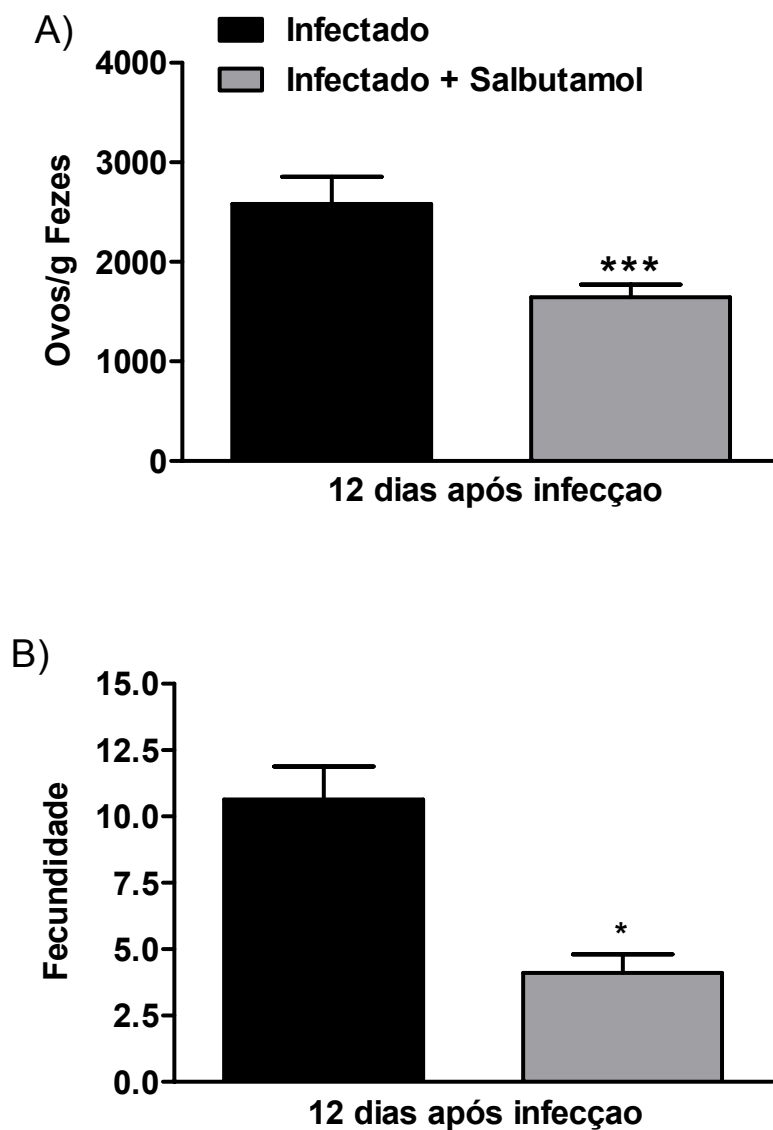


Figura 8: Efeito do tratamento com salbutamol no número de ovos e fecundidade de animais infectados com *S.venezuelensis*. O número de ovos nas fezes (A) ao 12º dia após infecção foi avaliado. Número de ovos por vermes adultos (fecundidade) foi avaliado ao 12º (B) dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. * $p < 0.05$, comparando-se o grupo infectado em relação grupo infectado tratado com salbutamol.

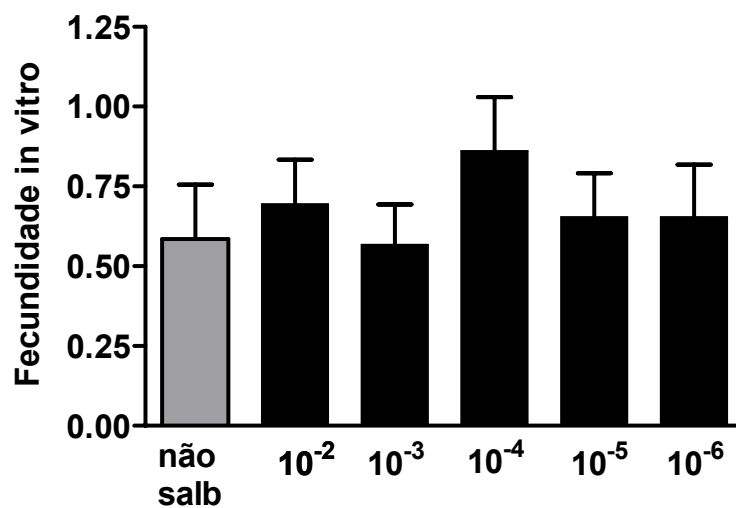


Figura 9: Efeito direto do tratamento com salbutamol em diferentes concentrações (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M) na fecundidade dos parasitos. A fecundidade foi calculada dividindo-se o número de vermes vivos pelo número de ovos. Os parasitos em cultura sem salbutamol foram comparados com os que tiveram tratamento com salbutamol.

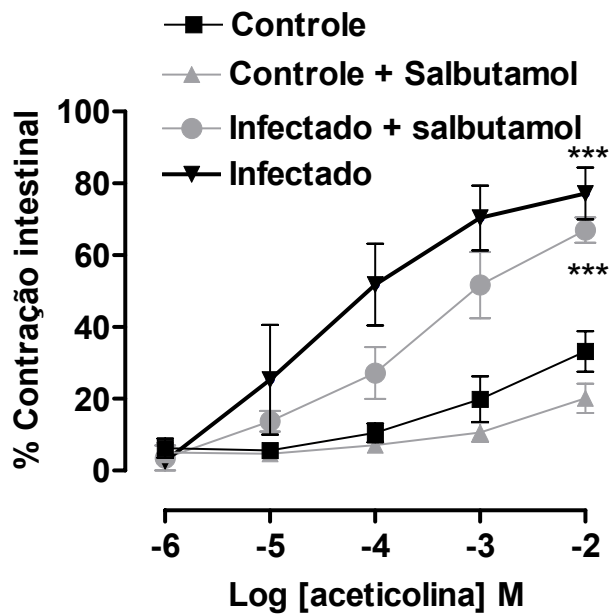


Figura 10: Efeitos do tratamento com salbutamol na contratilidade intestinal. A contração intestinal em resposta a acetilcolina foi avaliada em ratos não infectados e infectados no 12º dia de infecção por *S.venezuelensis*. Resultados são mostrados como porcentagem de aumento da tensão em comparação aos valores basais, depois de cada sucessiva dose de acetilcolina. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. *** $p < 0.01$, comparando-se aos grupos controle e controle mais salbutamol em relação aos grupos infectado e infectado tratado com salbutamol.

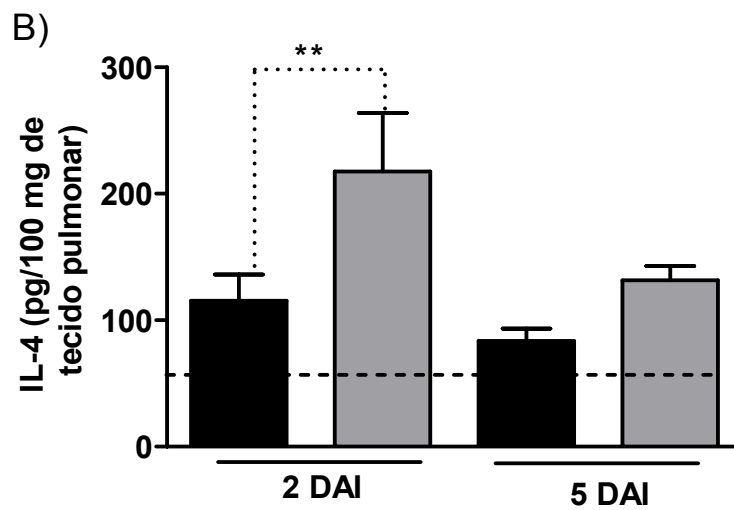
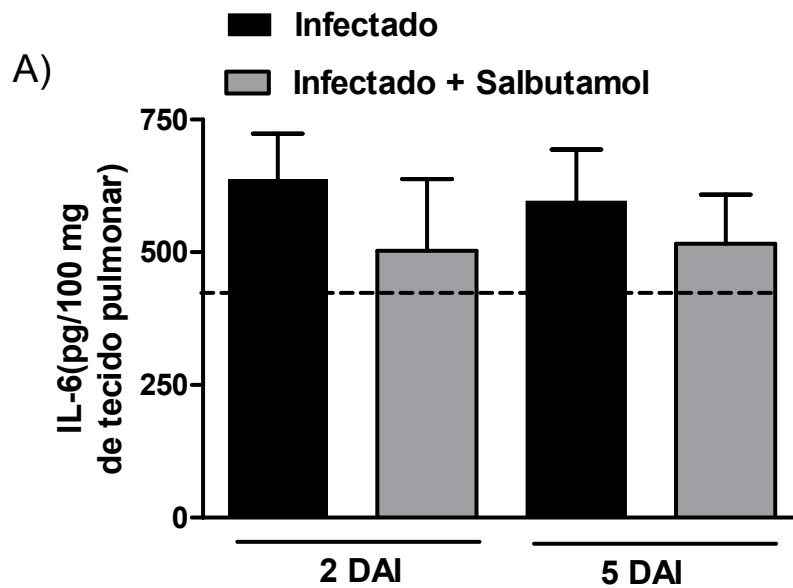
3) Efeito do tratamento com salbutamol na inflamação pulmonar induzida pelo parasito

O tratamento com salbutamol não alterou os níveis basais de citocinas nos pulmões de ratos não infectados. Os níveis de IFN- γ foram abaixo do limite de detecção para o ensaio. Os níveis de citocinas IL-6 e TNF- α não aumentaram significativamente nos ratos infectados quando comparados aos ratos não infectados, porém o salbutamol não afetou os níveis dessas citocinas (Figura 11 A). A concentração da IL-10 foi aumentada em ambos os grupos infectados, no entanto, ocorreu um grande aumento no grupo tratado com salbutamol (Figura 11 C). Os níveis de IL-4 aumentaram para ambos os grupos infectados e novamente o grupo tratado com salbutamol teve um aumento mais pronunciado (Figura 11 B).

A migração das larvas induziu um aumento no número total de células no lavado broncoalveolar ao 2° e 5° dias após a infecção, mas não houve diferença entre o grupo tratado com salbutamol e o não tratado (Figura 12 A). O número de eosinófilos no lavado broncoalveolar aumentou depois da infecção, especialmente ao 5° dia depois da infecção (Figura 12 B), ocorreu também um aumento da atividade da peroxidase eosinofílica (Figura 12 C). O tratamento com salbutamol aumentou significativamente o número de eosinófilos e atividade da peroxidase eosinofílica no lavado broncoalveolar apenas no 5° dia após a infecção (Figura 12 C)

A patologia pulmonar no grupo infectado e tratado com salbutamol foi diferente dos animais infectados não tratados, apresentando infiltrado pulmonar difuso e

mais evidente, ao contrário dos animais infectados com *S. venezuelensis* que apresentam infiltrado mais local (Figura 13).



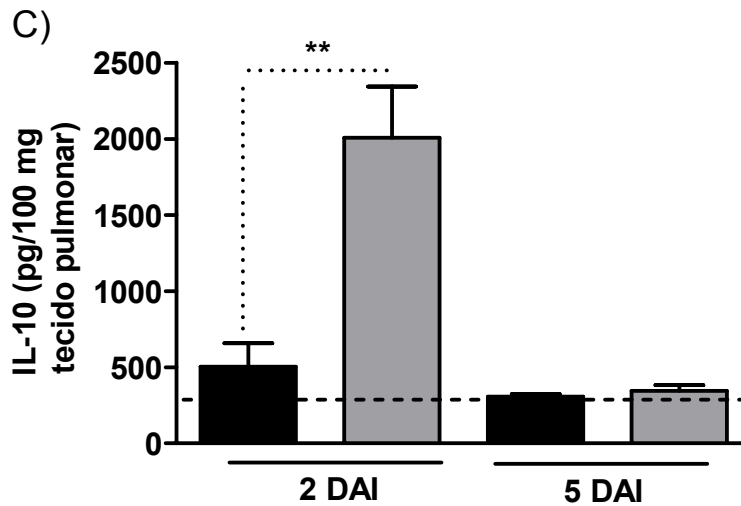
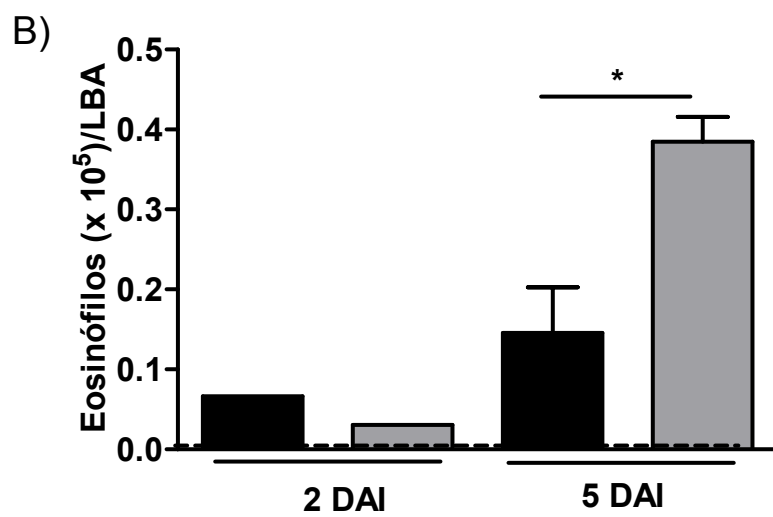
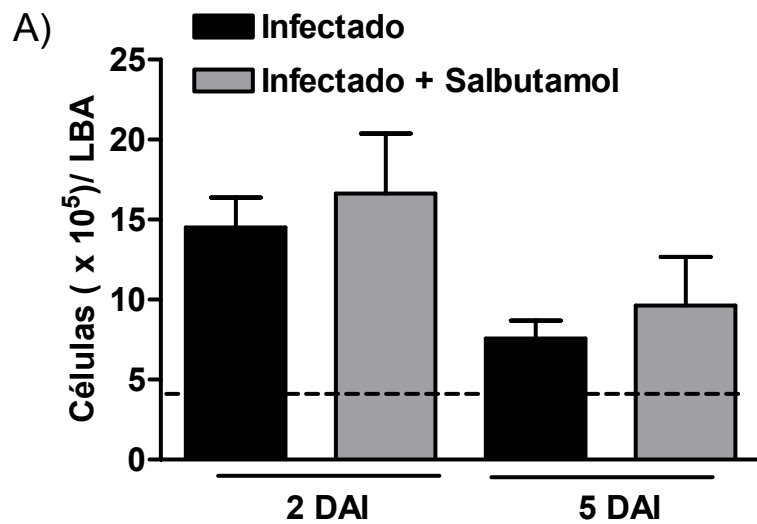


Figura 11: Efeito do tratamento com salbutamol na produção de citocinas em ratos infectados com *S. venezuelensis*. Níveis de IL-6 (A), IL-4(B) e IL-10 (C) registrados no homogenato do tecido pulmonar nos 2º e 5º dias após infecção. Níveis de citocinas foram mensurados por ELISA como descrito nos Materiais e Métodos. As linhas tracejadas indicam os níveis basais de IL-6, IL-4 e IL-10 em ratos não infectados (normais). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. ** $p < 0.001$, comparando-se grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com salbutamol.



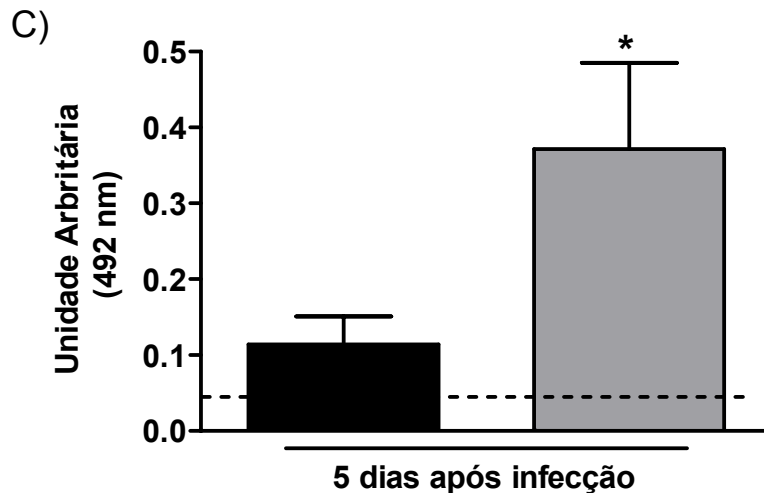


Figura 12: Efeitos do tratamento com salbutamol na inflamação pulmonar de ratos infectados com *S. venezuelensis*. O número de células totais (A) e eosinófilos (B) no LBA foram avaliados ao 5° e 12° dias após infecção; nível de peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar de ratos foi avaliada 5° dia após infecção (C). As linhas tracejadas indicam os níveis basais de células e eosinófilos totais e EPO em ratos não infectados. Os níveis de eosinófilos totais de animais normais foram significativamente diferentes dos de animais tratados e não tratados com salbutamol ao 2° e 5° dia após infecção. Níveis de EPO no pulmão de ratos normais foram significativamente diferentes dos de animais tratados com salbutamol ao 5° dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 a 8 animais. * $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado em relação grupo infectado tratado com salbutamol

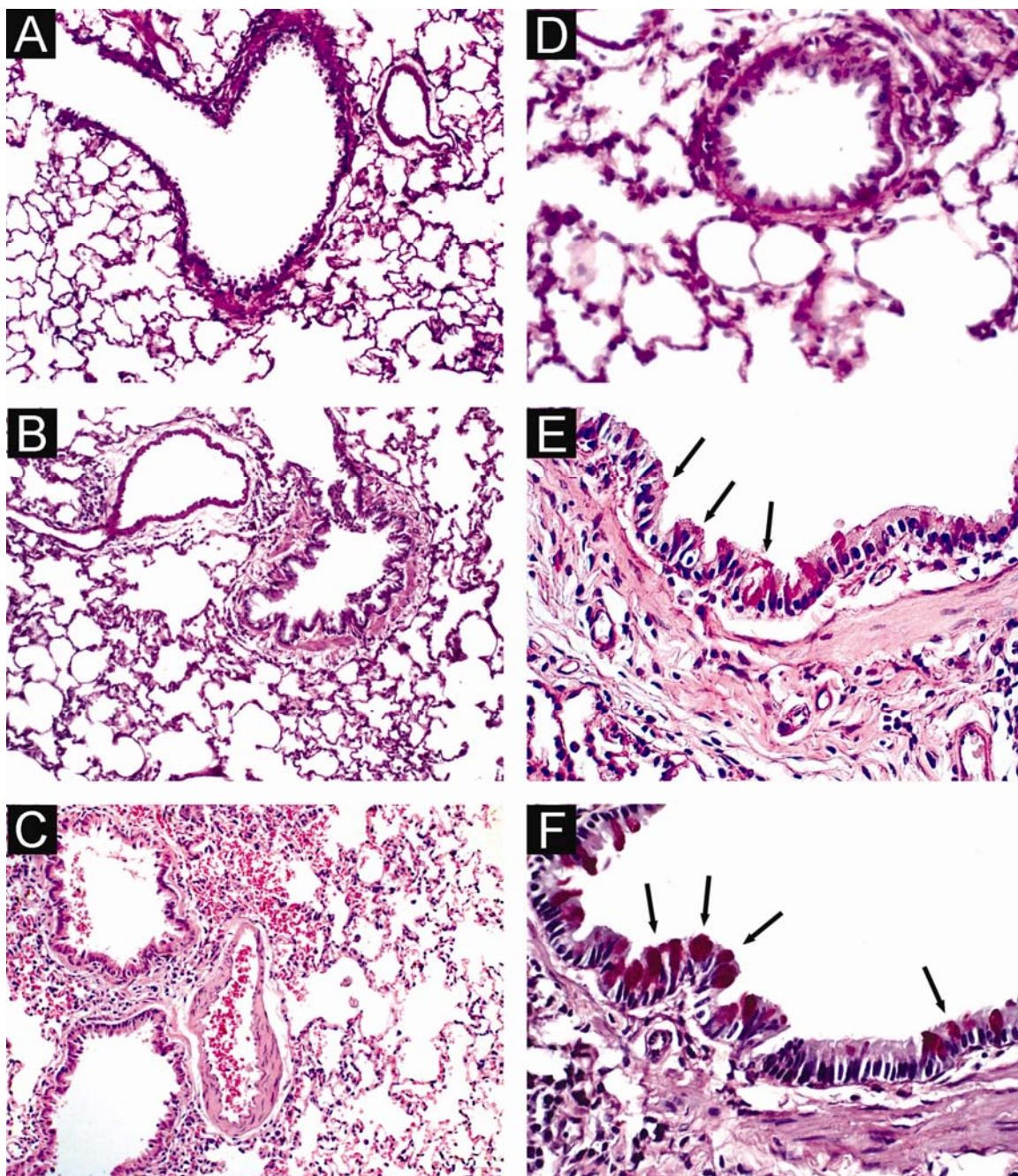


Figura 13: Corte histológico do pulmão de rato no 2º dia após a infecção com *S. venezuelensis*. O corte foi corado com PAS. As fotos histológicas do painel A, B e C (animal sem infecção, infectado e infectado tratado com salbutamol, respectivamente). As fotos D, E e F (animal sem infecção, infectado e infectado tratado com salbutamol, respectivamente). Os cortes histológicos B e C estão no aumento de 20 X, A e D no aumento de 40 X e E e F no aumento de 60 X. As setas indicam para células caliciformes do epitélio respiratório.

**OBJETIVO 3: AVALIAR O PAPEL DA IL-13 NAS ALTERAÇÕES
FUNCIONAIS PULMONARES E NA INFECÇÃO INDUZIDAS POR S.
venezuelensis EM RATOS**

1) O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 não alterou a hiperreatividade das vias aéreas à acetilcolina ao 5º dia após infecção com *S. venezuelensis*

A administração i.v. de doses crescentes de acetilcolina induziu grandes alterações na resistência das vias aéreas em ratos infectados que receberam tratamento com anti-IL-13 e em ratos que não receberam tratamento. A IL-13 parece não participar do aumento da resistência das vias aéreas ao 5º dia após a infecção (Figura 14).

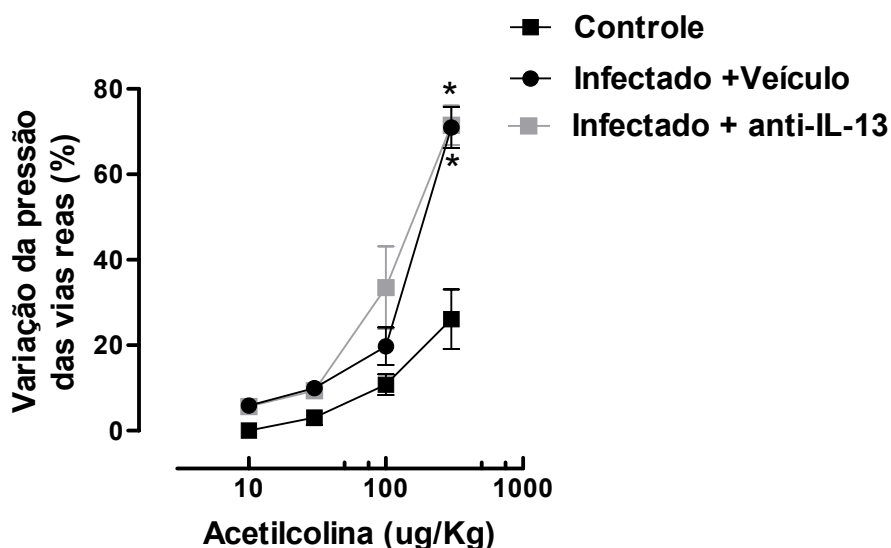


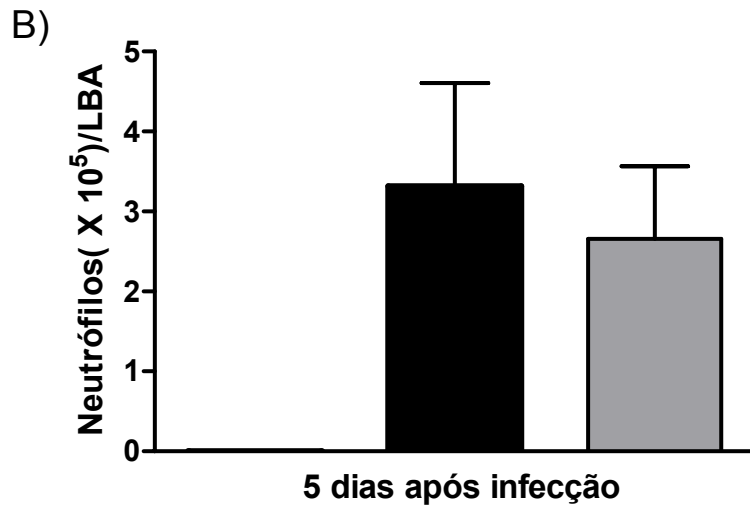
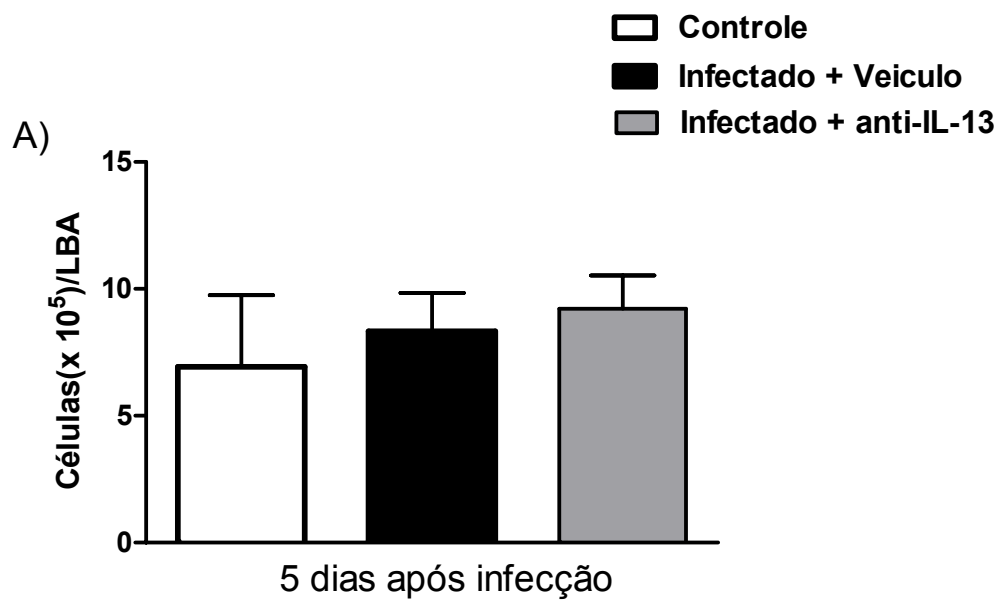
Figura 14: Efeitos do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL13 na hiperreatividade brônquica de ratos infectados com *S.venezuelensis*. Avaliamos a variação da pressão intratraqueal em resposta à acetilcolina (10, 30, 100, 300 ug/kg) em ratos infectados (5 dias após infecção), tratados com veículo, e infectados (5 dias após infecção), tratados com anti-IL13. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais

2) Efeito do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 na inflamação pulmonar induzida pelo parasito

A migração de larvas através dos pulmões levou ao aumento de células totais, eosinófilos e neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar ao 5º após infecção, mas não causou diferença entre o grupo infectado tratado com anti-IL-13 e o veículo no número de células totais e neutrófilos, apenas no número de eosinófilos (figura 15). O tratamento com anti-IL13 não alterou o nível de peroxidase eosinofílica nos pulmões de animais infectados (Figura 15).

Os níveis de IFN- γ e IL-6 apresentaram-se abaixo dos limites de detecção do ensaio. Os níveis pulmonares de IL-10, IL-4 e TNF- α foram acentuados nos animais infectados quando comparados a animais não infectados, porém o tratamento com anti-IL-13 alterou apenas os níveis de IL-4 (Figura 16). A IL-13 foi dosada ao 5º dia após infecção no tecido pulmonar de animais infectados (93.04 ± 2.4 , n=4) onde foi significativamente maior que animais não infectados (29.74 ± 9.9 , n=5), dados não apresentados.

A infecção por *S.venezuelensis* aumentou o número de células caliciformes no epitélio respiratório. O tratamento com anti-IL-13 reduziu o número de células caliciformes induzida pela infecção (Figura 17).



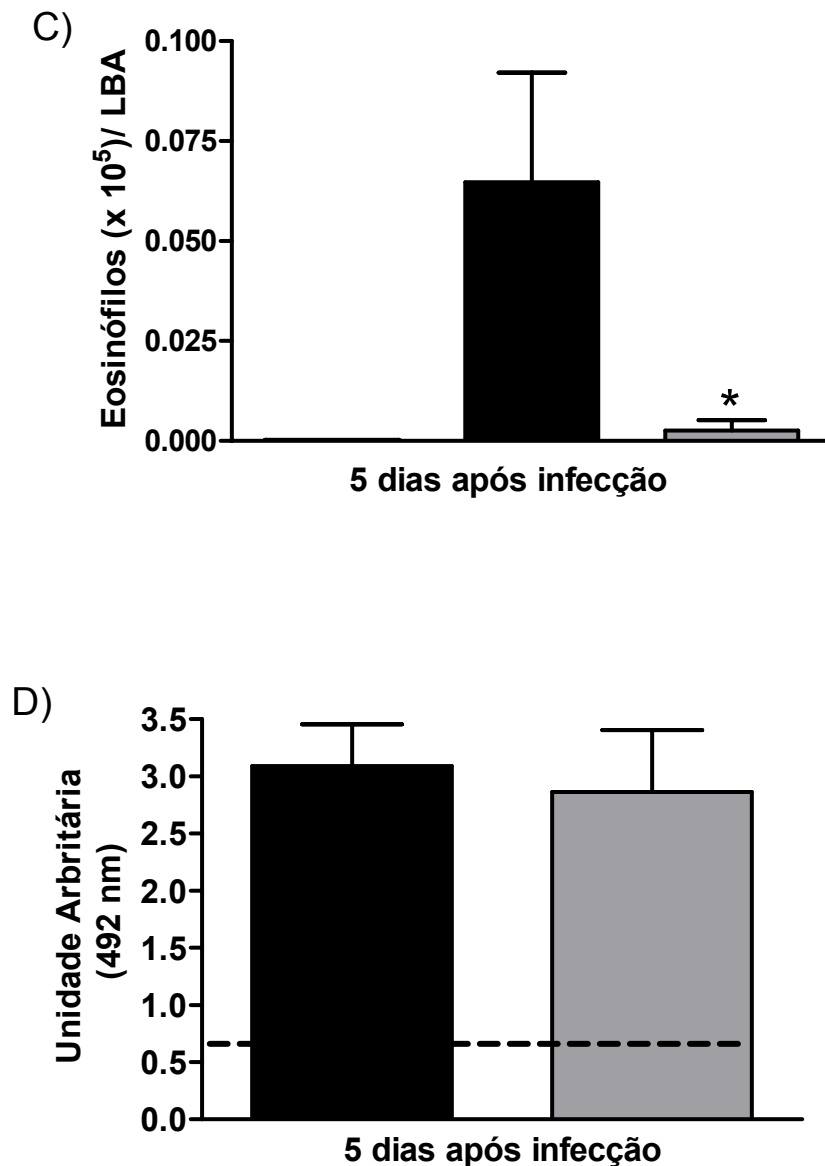
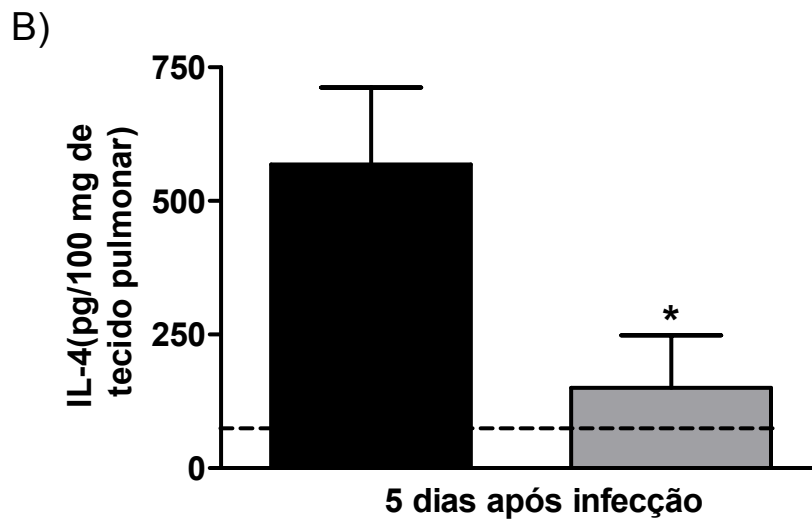
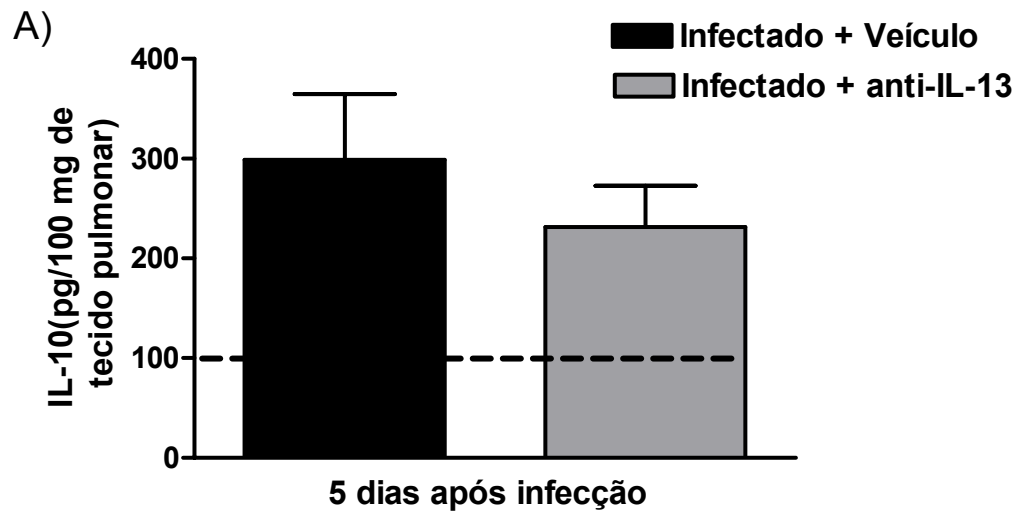


Figura 15: Efeito do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 na inflamação pulmonar de ratos infectados com *S. venezuelensis*. O número de células (A), neutrófilos (B) e eosinófilos (C) no LBA e nível de peroxidase eosinofílica (EPO, figura D) no tecido pulmonar avaliado ao 5º dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais. * $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado *em relação ao* grupo infectado tratado com anti-IL-13; linha rachurada representa o grupo controle em D.



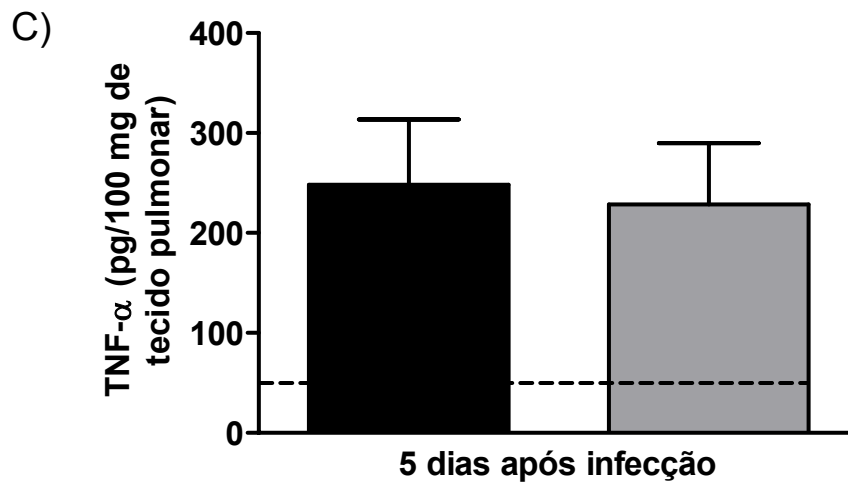


Figura 16: Efeitos do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 na produção de citocinas pulmonares de ratos infectados com *S.venezuelensis*. Níveis de IL-10, IL-4 e TNF- α registrados no homogenato do tecido pulmonar no 5º dias após infecção. Níveis de citocinas foram mensurados por ELISA como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais.* $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com anti-IL13; linha rachurada representa o grupo controle.

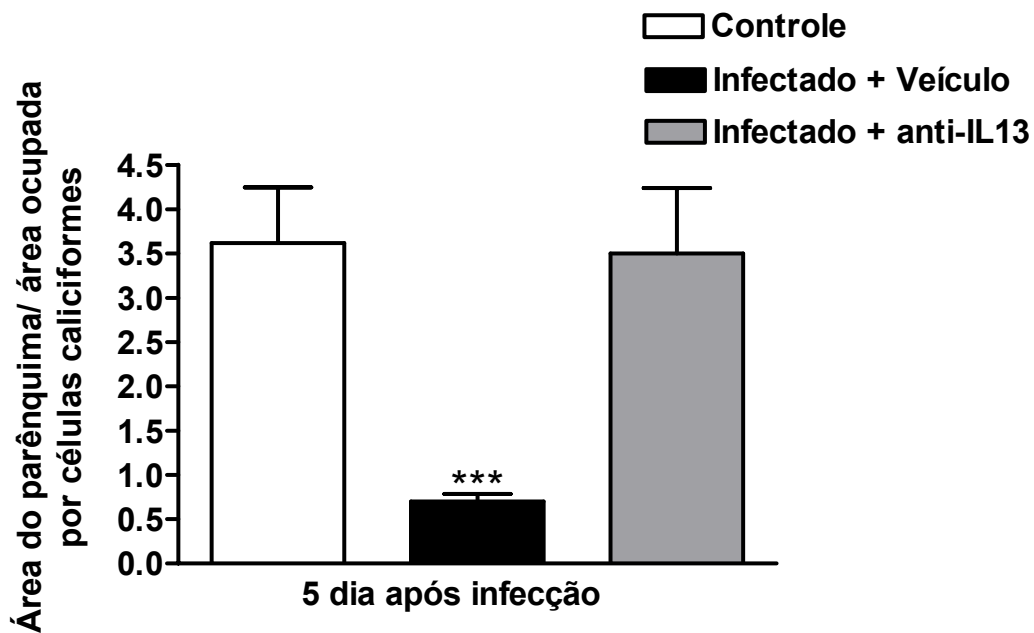


Figura 17: Quantificação de células caliciformes. O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 inibiu a hiperplasia de células caliciformes pulmonares ao 5° dia de infecção por *S. venezuelensis*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais. *** $p < 0.001$, comparando-se grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com anti-IL-13.

3) Efeito do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 no número de parasitos e ovos

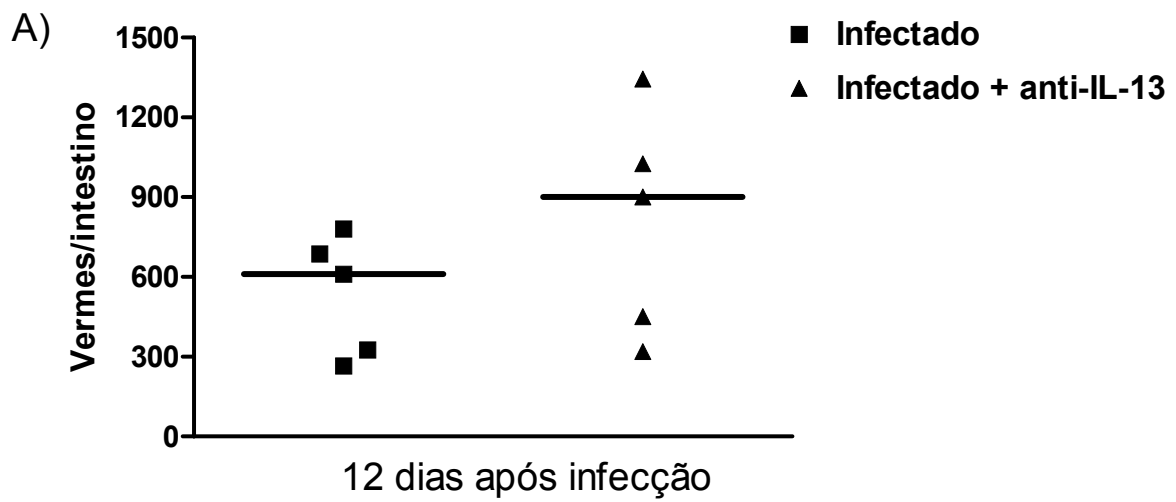
O número de vermes recuperados do intestino delgado no 12° dia após infecção com *S. venezuelensis* nos ratos tratados com anti-IL-13 foi similar aos animais tratados com veículo (figura 18). Em adição, o número de ovos eliminados no grupo tratado com anti-IL13 e tratado com veículo foi similar no 5° e 12° dia após infecção. Por outro lado, ratos tratados com anti-IL-13 eliminaram um número maior de ovos quando comparados aos animais tratados com veículo no 7° e 10° dia após infecção (figura 19). A fecundidade foi similar entre os grupos ao 12° dia após infecção.

4) Efeito do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 na inflamação intestinal induzida pelo parasito

Os níveis de IFN- γ e IL-4 apresentaram-se abaixo dos limites de detecção do ensaio. O nível de IL-13 intestinal (dados não apresentados) foi acentuado nos animais infectados (68.8 ± 8.8 , n=4) quando comparados a animais não infectados (0, n=4) ao 7° dia após infecção. O nível intestinal de TNF- α foi acentuado nos animais infectados quando comparados a animais não infectados, porém tratamento com anti-IL-13 não alterou o nível dessa interleucina durante a infecção (figura 19).

A infecção com *S. venezuelensis* aumentou o nível de peroxidase eosinofílica e o tratamento com anti-IL-13 reduziu esse aumento ao 7° dia após a infecção (figura 20).

A análise histológica das células caliciformes do tecido intestinal foi realizada qualitativamente e não demonstrou diferença entre o grupo infectado tratado com veículo e tratado com anti-IL-13.



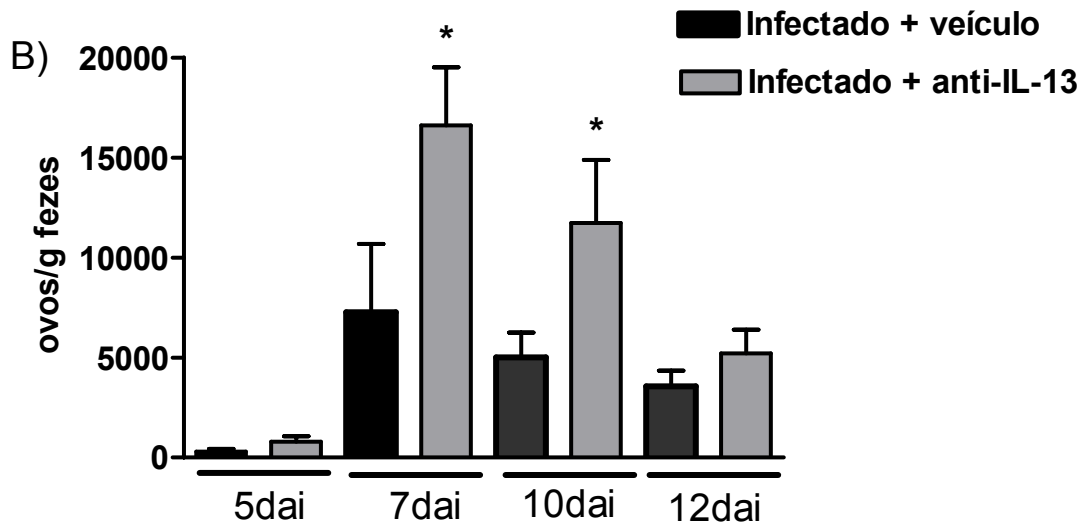


Figura 18: Efeito do tratamento com anti-IL-13 no número de vermes recuperados do intestino e ovos após infecção com *S. venezuelensis*. Avaliamos o total de números de vermes adultos no intestino (A) ao 12º dia após infecção e de ovos (B) ao 5º, 7º, 10º, 12º dia após infecção(dai) foram avaliados. Todos esses parâmetros foram avaliados em animais infectados e animais infectados mas tratados com anti-IL-13 durante o 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia após infecção . Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 5 animais. * $p < 0.05$, comparando-se o grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com anti-IL-13

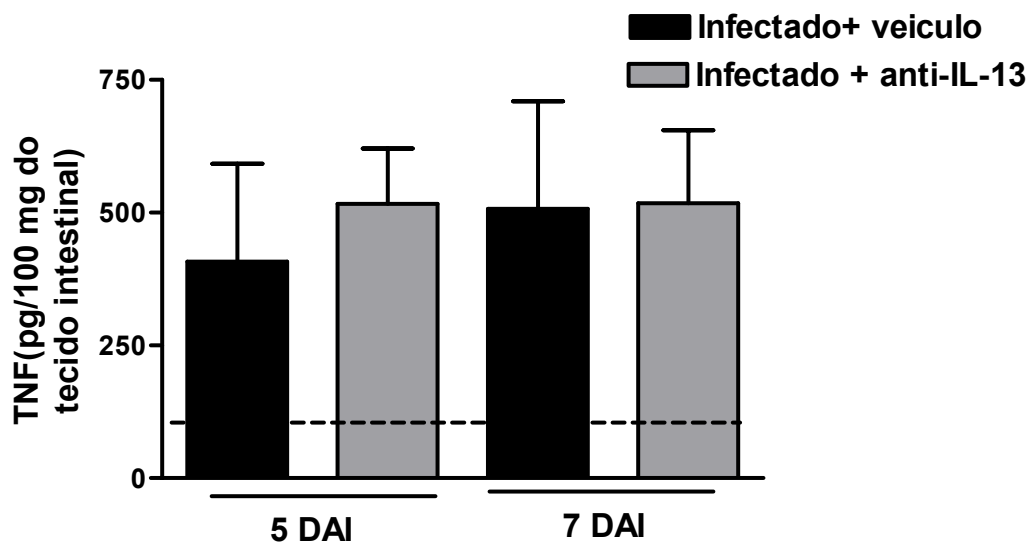


Figura 19: Efeitos do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 na produção de citocina intestinal de ratos infectados com *S.venezuelensis*. Níveis de TNF- α registrado no homogenato do tecido intestinal ao 5^o e 7^o dia após infecção (DAI). Nível de TNF- α foi mensurado por ELISA como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais. Linha rachurada representa o grupo controle.

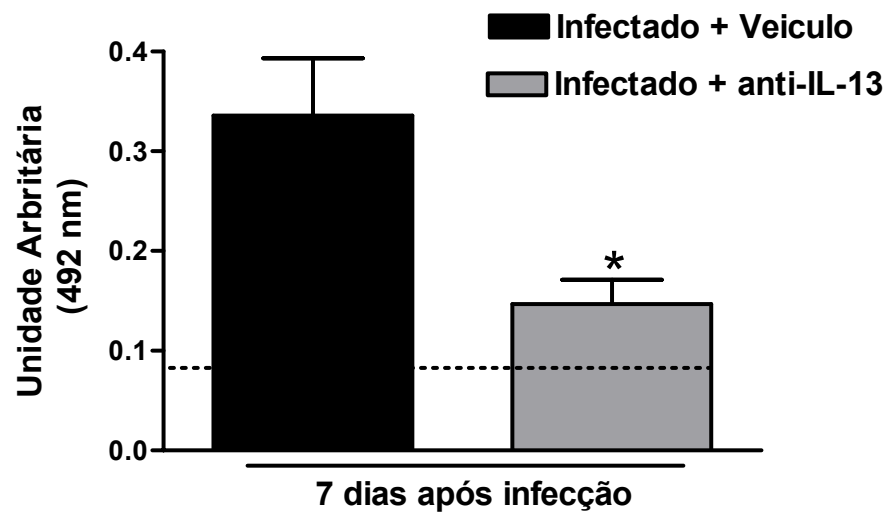


Figura 20: Efeito do tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 nos níveis de peroxidase eosinofílica intestinal de ratos infectados com *S. venezuelensis*. O nível de peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido intestinal avaliado ao 7º dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais. * $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado em relação ao grupo infectado tratado com anti-IL-13. Linha rachurada representa o grupo controle.

**OBJETIVO 4: AVALIAR O PAPEL DAS FIBRAS SENSITIVAS SENSÍVEIS A
CAPSAICINA NAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS PULMONARES INDUZIDAS
POR *S. venezuelensis* EM RATO**

1) Avaliação da depleção das fibras aferentes desmielinizadas pelo tratamento neonatal com capsaicina

Avaliou-se a depleção dos nervos sensoriais sensitivos à capsaicina pelo teste da formalina. Os animais tratados com capsaicina no período neonatal mostraram significativa redução do teste comportamental denominado “licking time” quando comparado ao grupo veículo. (figura 21).

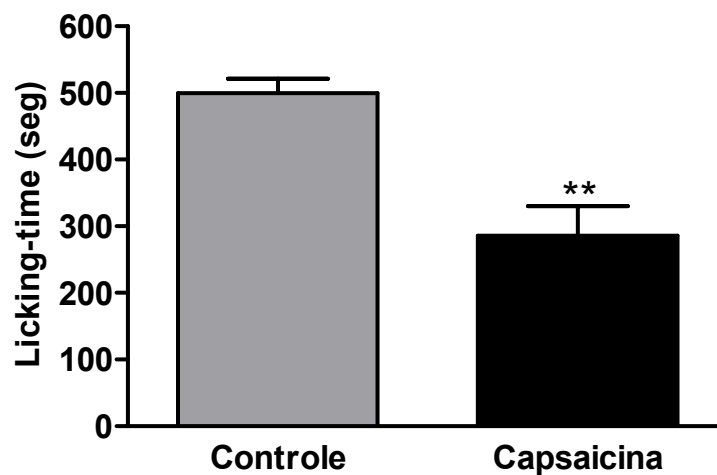


Figura 21: Efeito da administração intraplantar de formalina sobre o “licking time”. Os animais tratados com capsaicina e veículo infectado com *S. venezuelensis* (5º dia após infecção) receberam uma injeção intraplantar de formalina 3% (100 µL) e o efeito comportamental foi avaliado por 10 min (1ª fase). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão de 4-5 animais em cada grupo. ** P < 0,01, em relação ao grupo controle.

2) O tratamento neonatal com capsaicina atenuou o aumento da responsividade das vias aéreas à acetilcolina ao 5º dia após infecção com *S. venezuelensis*

A administração i.v. de doses crescentes de acetilcolina induziu grandes alterações na resistência das vias aéreas em ratos que receberam capsaicina durante o período neonatal e foram infectados por *S.venezuelensis* (Negrao-Correa *et al.*, 2003) mostraram que a infecção por *S.venezuelensis* foi acompanhada por um significativo aumento na resistência das vias aéreas à acetilcolina ao 5º dia após a infecção.

Os animais tratados com capsaicina e infectados com *S. venezuelensis* apresentaram atenuação da hiperreatividade brônquica ao 5º dia após infecção quando comparados com ratos infectados não tratados com capsaicina (figura 22); logo, as fibras C são importantes para hiperreatividade brônquica induzida por helminto.

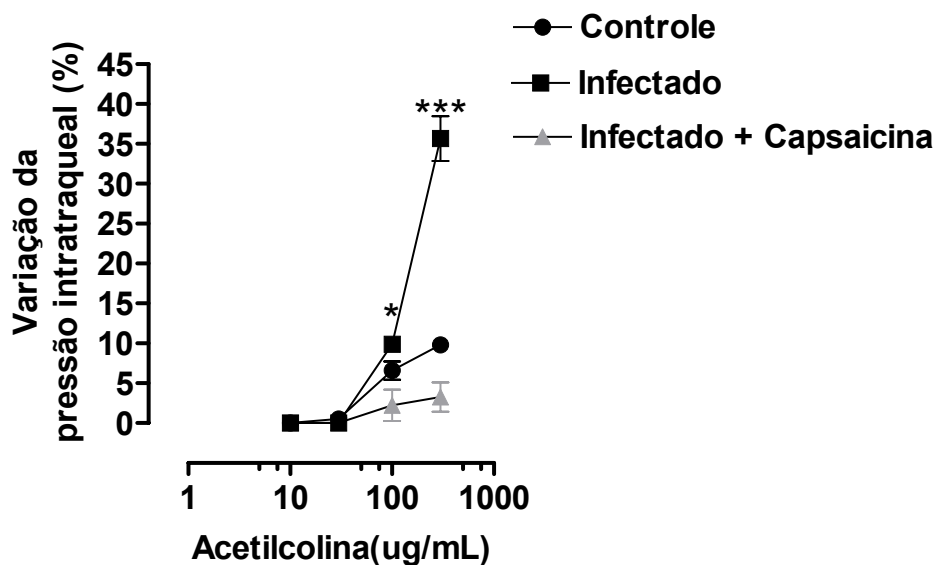


Figura 22: Efeitos do tratamento com capsaicina na hiperreatividade brônquica de ratos infectados com *S.venezuelensis*. Variação da pressão intratraqueal em resposta à acetilcolina (10, 30, 100, 300 ug/kg) em animais infectados (5 dias após infecção) tratados com veículo e infectados (5 dias após infecção) tratados com capsaicina no período pré-natal. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais.;*** $p < 0.001$ comparando-se o grupo infectado em relação ao infectado tratado com capsaicina e controle. * $p < 0.05$, comparando-se o grupo infectado *em relação ao* tratado com capsaicina mais infectado.

3) Efeito do tratamento neonatal com capsaicina na inflamação pulmonar induzida pelo parasito

O tratamento com capsaicina não teve efeito significativo na expressão basal de citocinas nos pulmões de ratos não infectados (dados não apresentados). Os níveis de INF- γ e IL-10 apresentaram-se abaixo dos limites de detecção do ensaio. Os níveis pulmonares de IL-6, IL-4 e TNF- α foram acentuados nos animais infectados quando comparados a animais não infectados, porém o tratamento com capsaicina não alterou os níveis dessas citocinas (figura 23). A migração de larvas através dos pulmões levou ao aumento de células totais, eosinófilos e neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar ao 5º após infecção, mas não causou diferença entre o grupo infectado tratado com capsaicina e o veículo (figura 24). Porém, o tratamento com capsaicina aumenta o nível de peroxidase eosinofílica nos pulmões de animais infectados (figura 24).

A figura histológica mostra que os animais infectados e tratados com capsaicina apresentam um número maior de eosinófilos quando comparado ao grupo infectado tratado com veículo (figura 25).

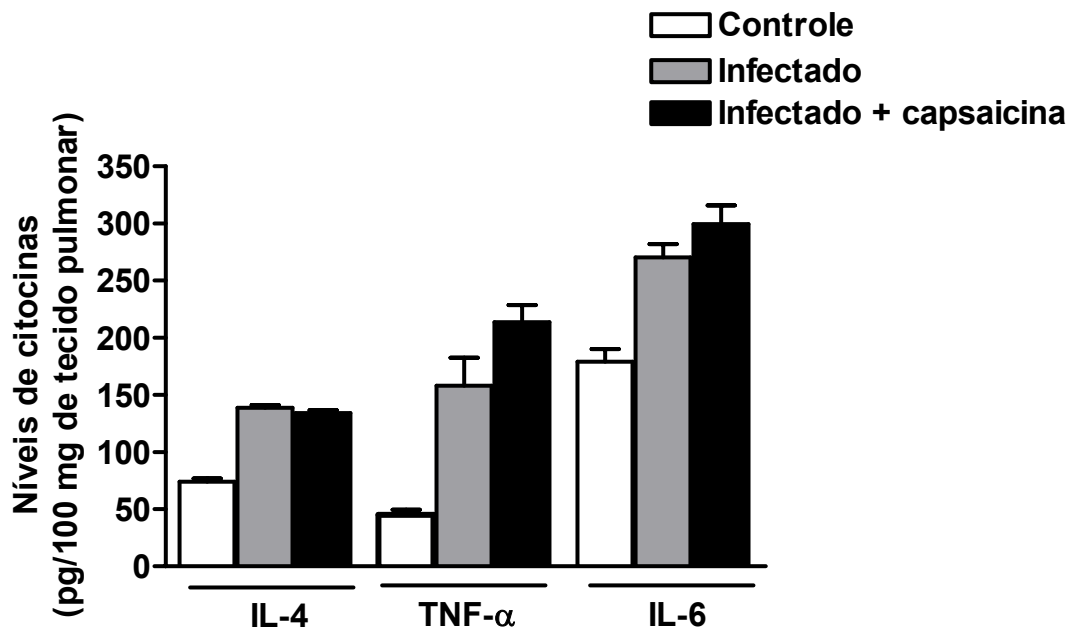


Figura 23: Efeitos do tratamento com capsaicina nos níveis de citocinas pulmonares de ratos infectados com *S.venezuelensis*. Avaliamos os níveis de IL-4, TNF- α e IL-6 registrados no homogenato do tecido pulmonar no 5º dia após infecção. Níveis de citocinas foram mensurados por ELISA como descrito nos Material e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm ERRO PADRÃO de 4 a 5 animais.

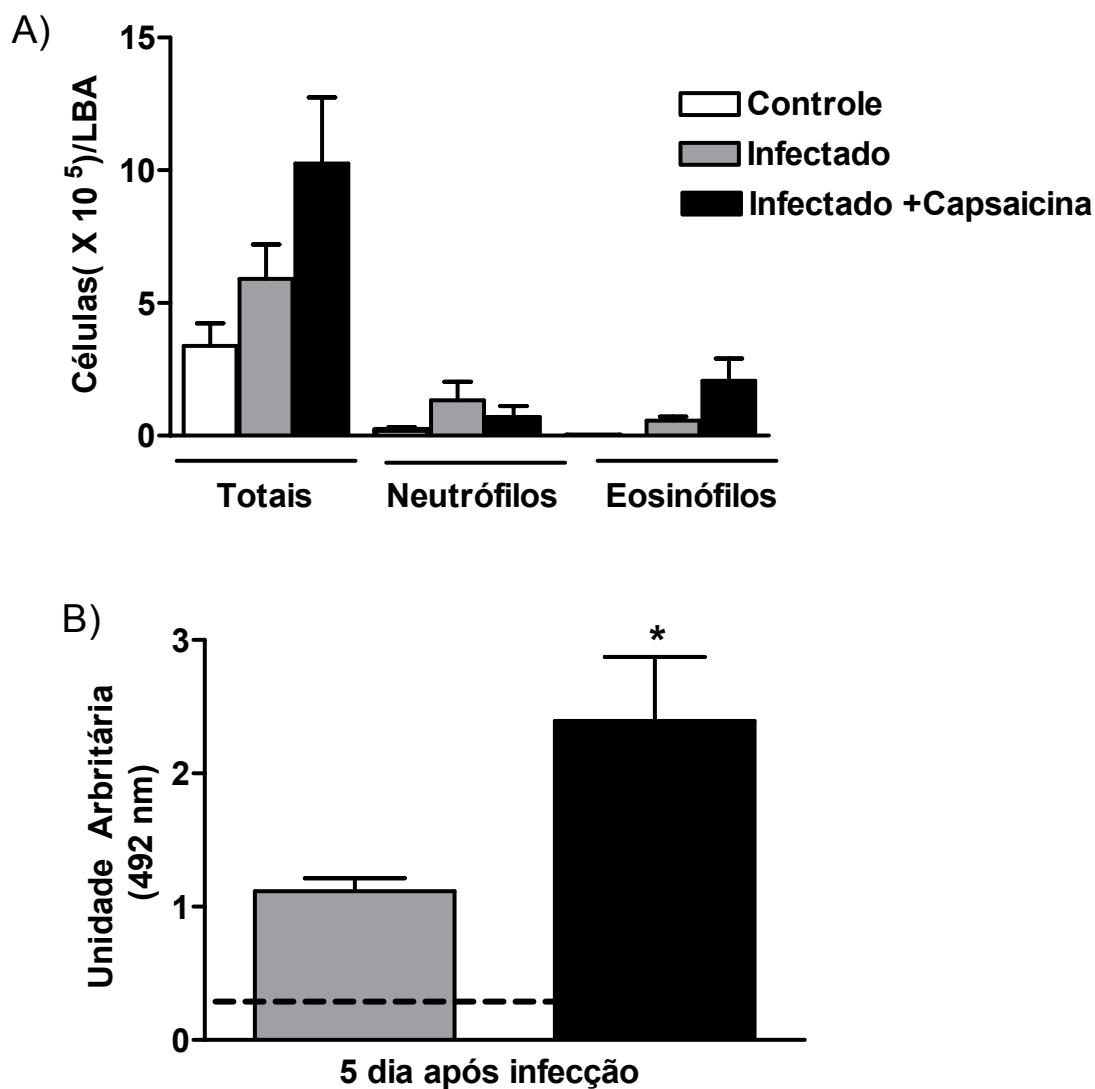


Figura 24: Efeitos do tratamento com capsaicina nos níveis inflamação pulmonar de ratos infectados com *S.venezuelensis*. O número de células totais, neutrófilos e eosinófilos no LBA (A) e nível de peroxidase eosinofílica (EPO) (B) no tecido pulmonar foi avaliado ao 5º dia após infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais. * $p < 0.05$, comparando-se grupo infectado *em relação ao* grupo infectado tratado com capsaicina; linha rachurada representa o grupo controle

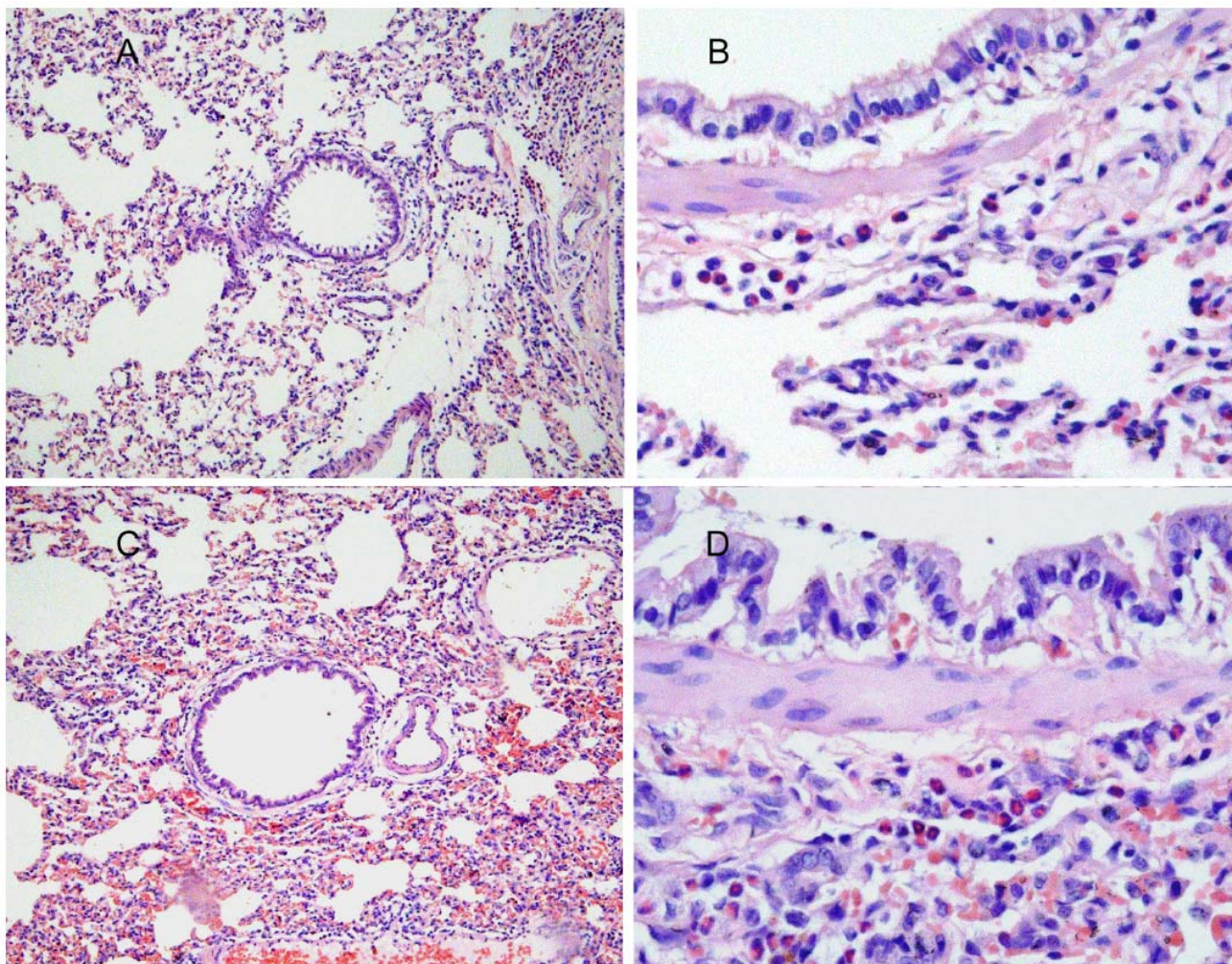


Figura 25: Corte histológico do pulmão de rato ao 5º dia após a infecção com *S. venezuelensis*. O corte foi corado com H&E. As fotos histológicas do painel A e B estão no aumento de 20X (animal infectado e infectado tratado com capsaicina, respectivamente). As fotos C e D estão no aumento de 40X (infectado e infectado tratado com capsaicina, respectivamente).

4) A infecção dos animais foi avaliada pelo número de ovos nas fezes

A infecção dos animais por *S.venezuelensis* foi comprovada pela presença de ovos nas fezes (figura 26).

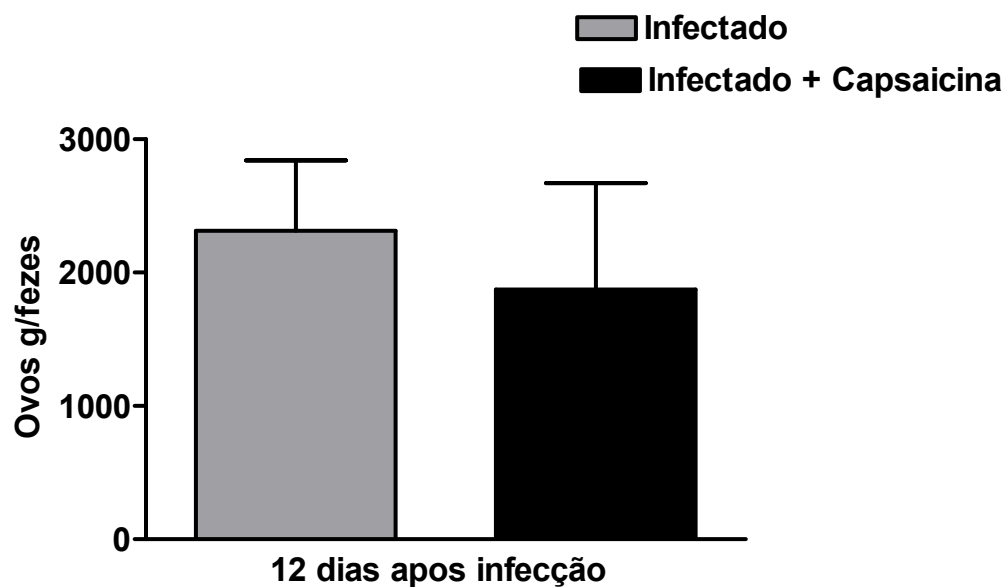


Figura 26: Número de ovos de animais infectados e tratados com capsaicina. O total de números de ovos no intestino foi avaliado ao 12º dia após infecção em animais tratados com capsaicina e tratados com veículo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 4 a 5 animais.

Discussão

1) Importância das alterações funcionais pulmonares na infecção causada por *S. venezuelensis*

Strongyloides venezuelensis é um parasito gastrointestinal que apresenta uma fase obrigatória de passagem pulmonar antes de se estabelecer na mucosa intestinal de ratos (Silveira *et al.*, 2002). As infecções por nematódeos induzem uma significativa mudança na função das vias aéreas do hospedeiro, como por exemplo, aumento da HRB em resposta à acetilcolina (Silveira *et al.*, 2002). Alguns estudos clínicos têm demonstrado que mudanças na função pulmonar podem ocorrer após a infecção por parasitos com ciclo pulmonar (Miller, 1979; Phills *et al.*, 1972), incluindo infecção por *S. stercoralis* (Ochoa *et al.*, 2003; Wehner *et al.*, 1994). Nossos resultados mostram que o tratamento com droga broncodilatadora durante os primeiros dois dias de infecção preveniu a HRB induzida pela infecção e facilita o ciclo parasitário, ou seja, um maior número de parasitas consegue chegar ao intestino. O tratamento com salbutamol também diminui a resposta contráctil do intestino em resposta a acetilcolina no 2º dia após infecção. Porém, ao mesmo tempo, a resposta intestinal dos animais infectados foi muito mais baixa e não foi diferente da dos animais sem infecção. Sabe-se que a maioria das larvas do *S. venezuelensis* alcança o intestino 60 horas após a infecção subcutânea (Silveira *et al.*, 2002). Somado a este fato, o salbutamol é rapidamente metabolizado pelo hospedeiro, sua meia-vida é calculada em 3.4 ± 1.1 horas em ratos (Narasimha & Hiremath, 2004), o que justifica a falta de efeito da droga nas alterações funcionais pulmonares ao 5º dia

após infecção e na contratilidade intestinal observada em animais tratados e infectados ao 12º dia após infecção. Logo, está claro que nenhum efeito precoce do salbutamol teria efeito no intestino e no estabelecimento do verme no intestino. Esses resultados indicam que a indução da contração das vias aéreas poderia afetar a progressão da larva através dos pulmões e facilitar a morte por mecanismos das imunidades inata e adquirida.

A falta de efeitos diretos do salbutamol no verme e a falta de efeitos do tratamento precoce com salbutamol na resposta intestinal tardia favorecem a hipótese apresentada acima. O mecanismo que explicaria a habilidade de o tratamento com salbutamol aumentar a infecção poderia ser a inibição da inflamação no pulmão, conseqüentemente facilitando a progressão das larvas. Vários estudos têm demonstrado claramente a habilidade do tratamento com salbutamol por curto período e outros B2-adrenoreceptores agonista para inibir o influxo de eosinófilos *in vivo* (Teixeira *et al.*, 1995) e produção de citocinas (Sekut *et al.*, 1995). Porém, no nosso modelo experimental o tratamento com salbutamol induz um significativo aumento na produção de citocinas (IL-10 e IL4) desenvolvido por aumento do infiltrado inflamatório nos pulmões de ratos infectados. Os dados presentes confirmam os prévios estudos do nosso laboratório segundo os quais a produção da IL-10 coincide com a passagem do parasito através dos pulmões e reduz ao 5º dia após a infecção, quando a inflamação pulmonar é mais evidente. Como o salbutamol parece facilitar a passagem do parasito através dos pulmões, o aumento nos níveis de IL-10 reflete o grande número de parasitos (Negrao-Correa *et al.*, 2003; Silveira *et al.*,

2002). Uma explicação para o aumento dos níveis de IL-10 observados depois do tratamento com salbutamol seria corroborado por estudos do nosso grupo, mostrando que ligantes TLR2 induz produção de IL-10 por macrófagos na presença de agentes que elevam o AMP cíclico, tais com salbutamol (Procopio *et al.*, 1999). Embora agonista TLR2 do *S. venezuelensis* não tenha sido demonstrado, outros helmintos, tais como *S. mansoni*, expressam ligantes para TLR2 e induzem a expressão de IL-10 por células dendríticas (van der *et al.*, 2002). O tratamento com salbutamol também aumentou a expressão de IL-4 nos pulmões de ratos infectados em estágios precoces da infecção. Embora poucos estudos demonstrem que agonistas B2-adrenoreceptores favoreçam a resposta Th2 (Lang *et al.*, 1988), uma possível explicação para este aumento da IL-4 poderia ser o tratamento com salbutamol somado à infecção por *S. venezuelensis*. Além disso, agonistas B2- adrenérgicos têm demonstrado facilitar o aumento de histamina e liberação de IL-4 em células mastócitos em linhagens de camundongos (Cho *et al.*, 2001). Embora a IL-4 seja importante para os mecanismos imunes que controlam o estabelecimento parasitário no intestino, nossos estudos não mostram um papel precoce dessa citocina no curso primário da infecção (Negrao-Correa *et al.*, 2003). Além disso, durante a migração parasitaria através dos pulmões, o aumento nos níveis de IL-4 não está associado com aumento da inflamação eosinofílica, possivelmente devido aos efeitos anti-inflamatórios da IL-10 que foram elevados juntamente com a IL-4 (Negrao-Correa & Teixeira, 2006; Negrao-Correa *et al.*, 2003). O elevado número de eosinófilos e maior infiltrado inflamatório foram detectados em ratos

tratados com salbutamol apenas no 5º dia após infecção; neste tempo o parasito já se estabeleceu no intestino do hospedeiro, logo os mecanismos pelos quais o tratamento com salbutamol aumentou os níveis de IL-10 e IL4 parecem não ser importantes para o estabelecimento do parasito no intestino. As ações broncodilatadoras do salbutamol são o principal mecanismo pelo qual a droga facilita o estabelecimento do parasito no intestino.

Um inesperado achado foi o número de ovos nas fezes ao 12º dia após infecção, que diminui nos animais tratados com salbutamol, em consequência da baixa fecundidade neste grupo. Uma possível explicação para esses achados seria que o aumento do número de parasitos no intestino, em resposta ao tratamento com salbutamol, poderia levar à competição entre parasitas e, conseqüentemente, à diminuição da fecundidade. A competição entre parasitos é um fenômeno bem estabelecido nos estudos em helmintos adultos em seus hospedeiros (Hesselberg & Andreassen, 1975) e poderia explicar a baixa fecundidade na presença de um número aumentado de vermes. Outra alternativa mais especulativa é que os parasitos precisam receber sinais dos hospedeiros que favoreceriam a maturação e a ovoposição. No caso dos animais *PAFR*^{-/-} infectados por *S. venezuelensis*, esses exibiram atraso na eliminação dos vermes e uma diminuição na fecundidade (Negrao-Correa *et al.*, 2004). Como o salbutamol facilitou a passagem dos vermes através dos pulmões, eles podem não ter recebido adequados sinais para sua maturação.

Como conclusão, os nossos dados sugerem que as alterações funcionais pulmonares são respostas do hospedeiro contra o parasito com ciclo pulmonar,

com papel na prevenção da excessiva infecção. No entanto, ainda não estão claros os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na hiperreatividade brônquica causada pelo parasito com ciclo pulmonar.

2) Papel da IL-13 nas alterações funcionais pulmonares e infecção induzidas por *S. venezuelensis*

A interleucina 13 é uma citocina envolvida em múltiplos processos fisiológicos e patológicos do organismo. Nossos dados mostram que IL-13 está aumentada nos pulmões no 5º dia após a infecção e no intestino no 7º dia após a infecção por *S. venezuelensis*. Muitos dados indicam que a IL-13 tem importante participação na infecção causada por helmintos (Urban, Jr. *et al.*, 1998); no entanto há poucos estudos sobre o papel da IL-13 nas alterações funcionais pulmonares causadas por parasito. O presente estudo demonstra que o tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13 não alterou a HRB induzida por *S. venezuelensis*. Corroborando com os nossos estudos, (Proust *et al.*, 2003) demonstraram que a HRB induzida por antígeno pode desenvolver-se independentemente de IL-4, IL-5, IL-13 e do receptor IL-4 α , em camundongos BALB/c experimentalmente alérgicos. Em contraste, outro estudo mostra que a inibição da IL-13 pode, quase que completamente, inibir a HRB mesmo com modesto efeito na inflamação (Leigh *et al.*, 2004).

O tratamento com anti-IL-13 levou a uma redução no número de eosinófilos e dos níveis de IL-4. Uma possível explicação para a redução de eosinófilos é o fato de a IL-13 ser importante para induzir a expressão de

eotaxina nas células epiteliais (Li *et al.*, 1996). Além disso, sabe-se que a eotaxina estimula eosinófilos a secretar IL-4. Exógena administração (Grunig *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2002; Wills-Karp, 2000) ou expressão exagerada de IL-13 induz infiltração celular de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares dentro dos pulmões com estimulação de muitas quimiocinas, como eotaxina (CCL11) e KC. O número reduzido de eosinófilos e IL-4 secundários à redução da IL-13 não causaram alteração na HRB. No entanto, a IL-4, como vem sendo relatada, está envolvida independentemente de IL-13 na HRB em asma experimental e na hiperplasia de células caliciformes (Perkins *et al.*, 2006b). Além disso, alguns estudos mostram a importância da IL-4 para HRB induzida por filaria (Mehlotra *et al.*, 2001) já outros estudos mostram a importância da IL-5 e eosinófilos (Hall *et al.*, 1998). Em nosso modelo de infecção, a redução da IL-4, juntamente com a IL-13, não alterou a HRB na infecção causada por *S. venezuelensis*. Provavelmente, essas interleucinas não possuem papéis centrais na hiperreatividade brônquica causada por *S. venezuelensis*, mas podem ter efeitos importantes quando somadas a outros fatores. Ações conjuntas da IL-13 com TNF- α para produção de eotaxina vêm sendo demonstrado (Li *et al.*, 1999). Além disso, receptores de TNF- α são expressos na musculatura lisa das vias aéreas; em adição o TNF- α aumenta a contratilidade *in vitro* das vias aéreas em camundongos (Chen *et al.*, 2003). De maneira interessante, os níveis de TNF- α encontram-se aumentados ao 5º dia após infecção em nosso modelo e coincide com o pico de hiperreatividade

brônquica (Silveira *et al.*, 2002). O tratamento com anti-IL-13 não influenciou os níveis de TNF- α no pulmão.

Muitos estudos mostram que HRB em modelos experimentais de asma é dissociada da inflamação; da mesma forma alguns estudos com helmintos também mostram que a HRB na infecção parasitária é independente de eosinófilos (Coyle *et al.*, 1998). Paralelamente à diminuição da inflamação eosinofílica, houve uma diminuição de células caliciformes nos animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-13 e infectados com *S.venezuelensis* quando comparados a animais infectados sem tratamento. Sabe-se que IL-13 também apresenta papel importante no remodelamento, das vias áreas de asmáticos, (Leigh *et al.*, 2004) caracterizado por hiperplasia de células caliciformes e fibrose subepitelial. Estudo associa a HRB ao aumento de muco em modelo de asma experimental (Morcillo & Cortijo, 2006), outros não encontram associação entre os dois fenômenos (Cohn *et al.*, 1999). Igualmente, os nossos dados mostram que a diminuição do muco não causou alterações na hiperreatividade brônquica. Estudos prévios demonstram que a indução de células caliciformes pela IL-13 é dependente parcialmente da inflamação (Shim *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002). Logo, a diminuição da inflamação em animais infectados e tratados com anti-IL-13 pode ter contribuído para a redução de células caliciformes.

Embora a IL-13 possa agravar a eosinofilia em modelos de inflamação alérgica (Park *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2001; Wills-Karp, 2000), ela também pode exibir importantes propriedades anti-inflamatórias. A IL -13 pode induzir a expressão de antagonista IL-1R (Vannier *et al.*, 1996) e diminuir a regulação de

citocinas pró-inflamatórias e IL-12 em monócitos. Ela tem sido também reportada como tendo efeitos anti-inflamatórios em encefalite experimental autoimune (Cash *et al.*, 1994), modelos de artrite (Isomaki *et al.*, 1996) e em alguns modelos de inflamação alérgica aguda (Lentsch *et al.*, 1999).

Em suma, a IL-13 não é essencial para HRB causada por *S. venezuelensis*. Por outro lado, esses dados diferem da maior parte dos modelos experimentais de asma que mostram que a IL-13 é fundamental para HRB. Em seguida, podemos sugerir que no nosso modelo de infecção a hiperreatividade brônquica não é totalmente dependente de eosinófilo e da produção de muco.

O tratamento com anti-IL-13 não afetou a hiperreatividade brônquica induzida pelo *S. venezuelensis*, mas afetou significativamente a produção de ovos no 7° e 10° dia após a infecção. O número de vermes e ovos no 12° dia após infecção não foi significativamente afetado pelo tratamento com anti-IL-13.

É bem conhecido o papel dominante da resposta Th2, para expulsão de um número de parasitos entéricos, incluindo *T. spiralis*, *N.brasiliensis*, *H. polygyrus* e *T.muris* (Akiho *et al.*, 2002; Urban, Jr. *et al.*, 1998). As IL-4 e IL-13 quando se ligam ao receptor IL-4 tipo2 (IL-4R α /IL-13 α 1) são unicamente ligada a sinalização da STAT 6. A importância da IL-4 e IL-13, na expulsão do parasito é reforçada por muitos estudos. O nosso grupo estudou camundongos deficientes em receptor de IL-4 ou STAT 6 e infectados com *S. venezuelensis* e mostrou atraso na eliminação de vermes juntamente com abolição da produção de IgE mas sem alteração da eosinofilia tecidual induzida pela infecção. O presente estudo não mostrou significativo atraso na eliminação do parasito no 12° dia após

infecção em ratos tratados com anti-IL-13 pois o número de vermes não foi diferente entre o grupo tratado com anti-IL-13 e veículo, no entanto não podemos afirmar que o tratamento com anti-IL-13 não afetaria a expulsão de parasitos em dias anteriores no 12° dia. Ao 7° e 10° dia após a infecção houve maior produção de ovos coincidindo com diminuição dos níveis de peroxidase eosinofílica no intestino no 7° dia.

Esses resultados mostram que a IL-13 é importante para a fase intestinal da infecção, especialmente na produção de ovos pelo *S. venezuelensis* e eosinofilia intestinal.

3) Papel das fibras nervosas sensíveis à capsaicina na hiperreatividade brônquica induzida por *S. venezuelensis*

O sistema nervoso excitatório e o sistema não adrenérgico e não colinérgico (NANC) têm-se demonstrado importantes nas mudanças observadas nas vias aéreas de humanos e animais. A ativação das fibras sensoriais C nas vias áreas libera neurocininas tais como, substância P e neurocinina A (Barnes, 1996). Esses peptídeos são importantes neuromediadores de efeitos biológicos dentro dos pulmões, tais como a contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas. A depleção de neurocinina pelo tratamento neonatal com capsaicina produz irreversível dano das fibras sensoriais, levando à perda permanente e degeneração de 50 a 90% de todas as fibras não mielinizadas aferentes (Jancso *et al.*, 1977). As fibras nervosas sensoriais são a maior fonte de taquicinas (Holzer, 1998).

A infecção por neomatódeos induz uma mudança significativa nas funções das vias aéreas do hospedeiro. O *S. venezuelensis* induz HRB com pico ao 5º dia de infecção (Silveira *et al.*, 2002). Os nossos dados demonstram que a perda permanente das fibras C inibe a HRB induzida pelo parasito. Algumas hipóteses poderiam explicar esses achados. Primeiro, a estimulação das fibras sensoriais das vias aéreas por helmintos liberaria substância P e neurocinina A que levariam à broncoconstrição por diferentes mecanismos, tanto pela ativação direta dos receptores NK2 quanto por estimulação ou facilitação da contração colinérgica causada por taquicininas ou degranulação de mastócitos. (De Swert & Joos, 2006). Em segundo, Sakae *et al.* (1994) sugerem que a acetilcolina requer nervos sensitivos à capsaicina para realizar seus efeitos no tecido pulmonar e que, por isso, animais tratados com capsaicina seriam menos responsivos à metacolina. Por último, e igualmente importante, durante a infecção por helminto a produção de muco aumenta e isso levaria a HRB, visto que o aumento de muco pode ser mediado pelas neurocininas (Sakae *et al.*, 1994). No entanto, nossos resultados indicam que a HRB não diminui em animais que possuem diminuição do muco conseqüente ao tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-13.

O *S. venezuelensis* tem uma rápida passagem pelos pulmões (6 a 72 horas). O número de larvas ao 5º dia após infecção é insignificante. No entanto, o pico de HRB ocorre no momento em há um número insignificante de larvas nos pulmões e não durante o pico de larvas neste órgão (Silveira *et al.*, 2002). Quando as vias aéreas são dilatadas durante o período de pico de larvas nos

pulmões (2º dia após infecção), o número de vermes que atingem a maturidade e de vermes que alcançam o intestino é maior do que na ausência da broncodilatação, portanto a HRB ao 2º dia após infecção poderia impedir a passagem de vermes dos pulmões para o intestino. O tratamento neonatal com capsaicina diminui HRB ao 5º dia após infecção; no entanto, a diminuição da HRB poderia também acontecer durante o 2º dia após infecção e facilitar a chegada dos vermes ao intestino. O 2º dia após infecção não foi estudado, pois objetivamos desvendar o mecanismo da HRB, e o 5º dia após infecção é pico de HRB, além disso, como já demonstrado (Negrao-Correa *et al.*, 2003), os parasitos podem modular alterações na HRB no 2º dia após infecção e poderiam mascarar os possíveis resultados.

Alguns estudos demonstram que o tratamento neonatal com capsaicina aumenta a inflamação ao ozônio (Sterner-Kock *et al.*, 1996) e aumenta a HRB quando exposto ao gás SO₂ (Long *et al.*, 1997), o mesmo ocorrendo durante a infecção por *Mycoplasma pulmonis* (Bowden *et al.*, 1996) e em ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina (Medeiros *et al.*, 2001). Quando as fibras C são estimuladas por agentes nocivos pode ocorrer uma variedade de respostas fisiológicas que protegem os pulmões contra possíveis danos; como, por exemplo, secreção de muco (Richardson & Peatfield, 1987), alteração na frequência do batimento ciliar (Eljamal *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1991) e tosse; todas essas alterações poderiam auxiliar na expulsão de agentes nocivos e na limpeza pulmonar. A broncoconstrição das vias aéreas também é um mecanismo protetor que pode ser ocasionado pela ativação das

fibras C (Bergren & Rendell, 2004). No caso da infecção ocasionada por *S. venezuelensis*, a broncoconstrição impediria a progressão da infecção; por outro lado, a produção de muco, a tosse e o aumento da frequência do batimento ciliar poderiam facilitar a saída do parasito dos pulmões para o intestino, e, dessa forma, não ter um papel protetor para o hospedeiro. Apesar de o muco conter células responsáveis pela defesa do hospedeiro, não seria surpreendente que o muco favorece o parasito, como saída do pulmão ao intestino. Essa hipótese necessita de maior esclarecimento, visto que não há evidências na literatura que a suportem.

Além da diminuição da HRB, nossos resultados também mostram que o tratamento neonatal com capsaicina em ratos infectados por *S. venezuelensis* aumentou a peroxidase eosinofílica (EPO). A degranulação de eosinófilos leva a liberação de proteínas catiônicas, tais como EPO que podem, através da estimulação das fibras, C levar à inflamação e HRB (Lee *et al.*, 2001). Nossos resultados anteriores mostram que eosinófilos não são fundamentais para HRB, em nosso modelo de infecção. Alguns trabalhos não encontram aumento de eosinófilo após tratamento neonatal com capsaicina. (Medeiros *et al.*; Davies *et al.*, 1994). MEDEIROS *et al.* (2001) demonstraram que o tratamento neonatal com capsaicina aumentou o número de neutrófilos, mas não de eosinófilos no lavado broncoalveolar em ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina. Outros trabalhos mostram que, após degeneração das fibras C por tratamento neonatal de capsaicina, ocorre aumento na inflamação, concluindo-se que a fibra C tem papel protetor contra a inflamação (Vesely *et al.*, 1999; Lee *et al.*,

2001; Sterner-Kock *et al.*, 1996). Esses dados estão de acordo com os nossos resultados que demonstram aumento de eosinófilos no pulmão em animais infectados com degeneração das fibras C quando comparados a animais infectados que possuem as fibras C intactas.

Nossos estudos demonstram que HRB ocasionada por *S. venezuelensis* em ratos é independente de eosinófilos, IL-13, IL-4 e muco, e que, a diminuição da hiperreatividade brônquica em animais infectados e tratados com capsaicina, não foi acompanhada por queda nos níveis de TNF- α , sugerindo que essa citocina pode não ter papel fundamental na HRB induzida por *S. venezuelensis* como discutido no tópico acima. Há contradições sobre o efeito do tratamento pré-natal com capsaicina na inflamação e HRB e isso possivelmente se deva a uso de diferentes espécies de animais. Em porcos da Índia, a SP e NKA são ambos potentes broncoconstritores; em ratos, dependendo da linhagem, as taquicininas são tanto potentes broncoconstritores (Joos *et al.*, 1986) quanto broncodilatadores (Devillier *et al.*, 1992). Além disso, os diferentes modelos de inflamação também levam a diferentes resultados sobre o papel da fibra C.

A ausência permanente de fibras C no nosso modelo experimental levou a um aumento da inflamação; no entanto, houve uma diminuição da HRB, indicando mais uma vez que essas alterações são independentes no nosso modelo de hiperreatividade brônquica causada por helminto. Múltiplos estudos, como os desafios com OVA, demonstram dissociação entre componentes celulares inflamatórios (particularmente eosinófilos) e HRB (Taube *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004).

Em suma, a perda permanente da fibra C reduz a HRB induzida por helminto ao 5º dia de infecção e aumenta a inflamação, sugerindo novamente que a HRB induzida por *S.venezuelensis* pode ser independente da inflamação. A relevância das fibras C para alterações funcionais pulmonares durante a infecção por helminto leva-nos a acreditar que elas seriam importantes para a infecção e isso vem sendo investigado em nosso laboratório.

Conclusão

Baseando-se nos nossos resultados podemos concluir que:

1. O parasito induz hiperreatividade brônquica e é inóculo-dependente.
2. A broncoconstrição é uma importante alteração funcional pulmonar durante a infecção, visto que sua diminuição leva a maior passagem de larvas através do pulmão e a maior recuperação de vermes no intestino porém reduzido número de ovos.
3. A IL-13 não é fundamental para hiperreatividade brônquica ocasionada por *S. venezuelensis* em ratos, mas é importante para aumento de células caliciformes no pulmão, aumento de eosinófilos no LBA, produção de ovos pelo parasito e eosinófilos no intestino durante a infecção.
4. A hiperreatividade brônquica ocasionada por *S. venezuelensis* em ratos é dependente de terminações sensoriais sensitivas, sensíveis à capsaicina.

Referências

Referências

ACKERMAN, K. G., HUANG, H., GRASEMANN, H., PUMA, C., SINGER, J. B., HILL, A. E., LANDER, E., NADEAU, J. H., CHURCHILL, G. A., DRAZEN, J. M.; BEIER, D. R. Interacting genetic loci cause airway hyperresponsiveness. **Physiol Genomics**. (21): 105-111.2005

AKIHO, H., BLENNERHASSETT, P., DENG, Y.; COLLINS, S. M. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. **Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol**. (282): G226-G232.2002

BARNER, M., MOHRS, M., BROMBACHER, F.; KOPF, M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. **Curr.Biol**. (8): 669-672.1998

BARNES, P. J. Neuroeffector mechanisms: the interface between inflammation and neuronal responses. **J.Allergy Clin.Immunol**. (98): S73-S81.1996

BATES, J. H. & IRVIN, C. G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **J.Appl.Physiol**. (94): 1297-1306.2003

BERGREN, D. R. & RENDELL, M. S. Depressed ventilatory reflexes after capsaicin challenge in streptozotocin-treated rats. **Life Sci**. (75): 2103-2116.2004

BLACK, J. L. & JOHNSON, P. R. Airway smooth muscle in asthma. **Respirology**. (1): 153-158.1996

BOULWARE, D. R., STAUFFER, W. M., HENDEL-PATERSON, B. R., ROCHA, J. L., SEET, R. C., SUMMER, A. P., NIELD, L. S., SUPPARATPINYO, K., CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of Strongyloides infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **Am.J.Med**. (120): 545-548.2007

BOWDEN, J. J., BALUK, P., LEFEVRE, P. M., SCHOEB, T. R., LINDSEY, J. R.; MCDONALD, D. M. Sensory denervation by neonatal capsaicin treatment exacerbates Mycoplasma pulmonis infection in rat airways. **Am.J.Physiol**. (270): L393-L403.1996

BRUSASCO, V., CRIMI, E.; PELLEGRINO, R. Airway hyperresponsiveness in asthma: not just a matter of airway inflammation. **Thorax**. (53): 992-998.1998

CASH, E., MINTY, A., FERRARA, P., CAPUT, D., FRADELIZI, D.; ROTT, O. Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. **J.Immunol.** (153): 4258-4267.1994

CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. (389): 816-824.1997

CHAN, M. S., MEDLEY, G. F., JAMISON, D.; BUNDY, D. A. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. **Parasitology**. (109 (Pt 3)): 373-387.1994

CHEN, B., LIU, G., SHARDONOFKY, F., DOWELL, M., LAKSER, O., MITCHELL, R. W., FREDBERG, J. J., PINTO, L. H.; SOLWAY, J. Tidal breathing pattern differentially antagonizes bronchoconstriction in C57BL/6J vs. A/J mice. **J.Appl.Physiol.** (101): 249-255.2006

CHEN, H., TLIBA, O., VAN BESIEN, C. R., PANETTIERI, R. A., Jr.; AMRANI, Y. TNF-[alpha] modulates murine tracheal rings responsiveness to G-protein-coupled receptor agonists and KCl. **J.Appl.Physiol.** (95): 864-872.2003

CHIARAMONTE, M. G., MENTINK-KANE, M., JACOBSON, B. A., CHEEVER, A. W., WHITTERS, M. J., GOAD, M. E., WONG, A., COLLINS, M., DONALDSON, D. D., GRUSBY, M. J.; WYNN, T. A. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. **J.Exp.Med.** (197): 687-701.2003

CHO, S. H., HARTLEROAD, J. Y.; OH, C. K. (S)-albuterol increases the production of histamine and IL-4 in mast cells. **Int.Arch.Allergy Immunol.** (124): 478-484.2001

COHN, L., HOMER, R. J., MACLEOD, H., MOHRS, M., BROMBACHER, F.; BOTTOMLY, K. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ralpha, but not on eosinophils. **J.Immunol.** (162): 6178-6183.1999

CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. G., KOURI, I. N.; IOANNIDIS, J. P. Genetic predisposition to asthma and atopy. **Respiration**. (74): 8-12.2007

CORRY, D. B., FOLKESSON, H. G., WARNOCK, M. L., ERLE, D. J., MATTHAY, M. A., WIENER-KRONISH, J. P.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. **J.Exp.Med.** (183): 109-117.1996

COYLE, A. J., KOHLER, G., TSUYUKI, S., BROMBACHER, F.; KOPF, M. Eosinophils are not required to induce airway hyperresponsiveness after nematode infection. **Eur.J.Immunol.** (28): 2640-2647.1998

DAVIES, D., SPICER, B. A., SMITH, H.; HAYNES, L. W. Effect of neonatal capsaicin on peptide-containing primary afferent fibres, eosinophil distribution and hyperresponsiveness in rat lung tissue following experimentally induced eosinophilia. **Neuroimmunomodulation.** (1): 308-314.1994

DE SANCTIS, G. T., DAHESHIA, M.; DASER, A. Genetics of airway hyperresponsiveness. **J.Allergy Clin.Immunol.** (108): 11-20.2001

DE SANCTIS, G. T., MERCHANT, M., BEIER, D. R., DREDGE, R. D., GROBHOLOZ, J. K., MARTIN, T. R., LANDER, E. S.; DRAZEN, J. M. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. **Nat.Genet.** (11): 150-154.1995

DE SWERT, K. O. & JOOS, G. F. Extending the understanding of sensory neuropeptides. **Eur.J.Pharmacol.** (533): 171-181.2006

DEVILLIER, P., ACKER, G. M., ADVENIER, C., MARSAC, J., REGOLI, D.; FROSSARD, N. Activation of an epithelial neurokinin NK-1 receptor induces relaxation of rat trachea through release of prostaglandin E2. **J.Pharmacol.Exp.Ther.** (263): 767-772.1992

ELJAMAL, M., WONG, L. B.; YEATES, D. B. Capsaicin-activated bronchial- and alveolar-initiated pathways regulating tracheal ciliary beat frequency. **J.Appl.Physiol.** (77): 1239-1245.1994

EWART, S. L., KUPERMAN, D., SCHADT, E., TANKERSLEY, C., GRUPE, A., SHUBITOWSKI, D. M., PELTZ, G.; WILLS-KARP, M. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.** (23): 537-545.2000

EWART, S. L., MITZNER, W., DISILVESTRE, D. A., MEYERS, D. A.; LEVITT, R. C. Airway hyperresponsiveness to acetylcholine: segregation analysis and evidence for linkage to murine chromosome 6. **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.** (14): 487-495.1996

FERGUSON, A. C. & WONG, F. W. Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children. Correlation with macrophages and eosinophils in bronchial lavage fluid. **Chest.** (96): 988-991.1989

FINKELMAN, F. D., SHEA-DONOHUE, T., MORRIS, S. C., GILDEA, L., STRAIT, R., MADDEN, K. B., SCHOPF, L.; URBAN, J. F., Jr. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol.Rev.** (201): 139-155.2004

FREDBERG, J. J. Frozen objects: small airways, big breaths, and asthma. **J.Allergy Clin.Immunol.** (106): 615-624.2000

FROSSARD, N. & BARNES, J. Effect of tachykinins in small human airways. **Neuropeptides.** (19): 157-161.1991

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Rev.Infect.Dis.** (11): 755-767.1989

GRUNIG, G., WARNOCK, M., WAKIL, A. E., VENKAYYA, R., BROMBACHER, F., RENNICK, D. M., SHEPPARD, D., MOHRS, M., DONALDSON, D. D., LOCKSLEY, R. M.; CORRY, D. B. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. **Science.** (282): 2261-2263.1998

HALL, L. R., MEHLOTRA, R. K., HIGGINS, A. W., HAXHIU, M. A.; PEARLMAN, E. An essential role for interleukin-5 and eosinophils in helminth-induced airway hyperresponsiveness. **Infect.Immun.** (66): 4425-4430.1998

HAMELMANN, E., CIESLEWICZ, G., SCHWARZE, J., ISHIZUKA, T., JOETHAM, A., HEUSSER, C.; GELFAND, E. W. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (160): 934-941.1999

HERSHEY, G. K. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. **J.Allergy Clin.Immunol.** (111): 677-690.2003

HESELBERG, C. A. & ANDREASSEN, J. Some influences of population density on *Hymenolepis diminuta* in rats. **Parasitology**. (71): 517-523.1975

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen.Pharmacol.** (30): 5-11.1998

IRVIN, C. G. & BATES, J. H. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. **Respir.Res.** (4): 4.2003

ISOMAKI, P., LUUKKAINEN, R., TOIVANEN, P.; PUNNONEN, J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** (39): 1693-1702.1996

JANCSO, G., KIRALY, E.; JANCSO-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**. (270): 741-743.1977

JEFFERY, P. K. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. **Am.Rev.Respir.Dis.** (143): 1152-1158.1991

JOOS, G., KIPS, J., PAUWELS, R.; VAN DER, Straeten M. The effect of tachykinins on the conducting airways of the rat. **Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.** (280): 176-190.1986

KATONA, I. M., URBAN, J. F., Jr.; FINKELMAN, F. D. The role of L3T4+ and Lyt-2+ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. **J.Immunol.** (140): 3206-3211.1988

KIBE, A., INOUE, H., FUKUYAMA, S., MACHIDA, K., MATSUMOTO, K., KOTO, H., IKEGAMI, T., AIZAWA, H.; HARA, N. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (167): 50-56.2003

KIRBY, J. G., HARGREAVE, F. E., GLEICH, G. J.; O'BYRNE, P. M. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. **Am.Rev.Respir.Dis.** (136): 379-383.1987

KNISZ, J. & ROTHMAN, P. B. Suppressor of cytokine signaling in allergic inflammation. **J.Allergy Clin.Immunol.** (119): 739-745.2007

KOPF, M., LE GROS, G., BACHMANN, M., LAMERS, M. C., BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. **Nature.** (362): 245-248.1993

LANG, R. M., BOROW, K. M., NEUMANN, A., CARROLL, J. D., WEINERT, L., MURPHY, M. B., GHALI, J.; RAJFER, S. I. Role of the beta 2 adrenoceptor in mediating positive inotropic activity in the failing heart and its relation to the hemodynamic actions of dopexamine hydrochloride. **Am.J.Cardiol.** (62): 46C-52C.1988

LEE, L. Y., GU, Q.; GLEICH, G. J. Effects of human eosinophil granule-derived cationic proteins on C-fiber afferents in the rat lung. **J.Appl.Physiol.** (91): 1318-1326.2001

LEIGH, R., ELLIS, R., WATTIE, J., DONALDSON, D. D.; INMAN, M. D. Is interleukin-13 critical in maintaining airway hyperresponsiveness in allergen-challenged mice? **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (170): 851-856.2004

LENTSCH, A. B., CZERMAK, B. J., JORDAN, J. A.; WARD, P. A. Regulation of acute lung inflammatory injury by endogenous IL-13. **J.Immunol.** (162): 1071-1076.1999

LI, L., XIA, Y., NGUYEN, A., LAI, Y. H., FENG, L., MOSMANN, T. R.; LO, D. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. **J.Immunol.** (162): 2477-2487.1999

LI, X. M., CHOPRA, R. K., CHOU, T. Y., SCHOFIELD, B. H., WILLS-KARP, M.; HUANG, S. K. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. **J.Immunol.** (157): 3216-3219.1996

LONG, N. C., MARTIN, J. G., PANTANO, R.; SHORE, S. A. Airway hyperresponsiveness in a rat model of chronic bronchitis: role of C fibers. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (155): 1222-1229.1997

LUNDBERG, J. M. & SARIA, A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta Physiol Scand.** (116): 473-476.1982

LUNDBLAD, L. K., IRVIN, C. G., ADLER, A.; BATES, J. H. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. **J.Appl.Physiol.** (93): 1198-1207.2002

MADDEN, K. B., URBAN, J. F., Jr., ZILTENER, H. J., SCHRADER, J. W., FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. **J.Immunol.** (147): 1387-1391.1991

MAIZELS, R. M., BALIC, A., GOMEZ-ESCOBAR, N., NAIR, M., TAYLOR, M. D.; ALLEN, J. E. Helminth parasites--masters of regulation. **Immunol.Rev.** (201): 89-116.2004

MARSLAND, B. J., CAMBERIS, M.; LE GROS, G. Secretory products from infective forms of *Nippostrongylus brasiliensis* induce a rapid allergic airway inflammatory response. **Immunol.Cell Biol.** (83): 40-47.2005

MCKENZIE, G. J., BANCROFT, A., GRENCIS, R. K.; MCKENZIE, A. N. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. **Curr.Biol.** (8): 339-342.1998

MEDEIROS, M. V., MACEDO-SOARES, M. F., DE LUCA, I. M., HYSLOP, S., DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Contribution of C-fibers to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in the rat. **Eur.J.Pharmacol.** (421): 133-140.2001

MEHLOTRA, R. K., HALL, L. R., HAXHIU, M. A.; PEARLMAN, E. Reciprocal immunomodulatory effects of gamma interferon and interleukin-4 on filaria-induced airway hyperresponsiveness. **Infect.Immun.** (69): 1463-1468.2001

MEHLOTRA, R. K., HALL, L. R., HIGGINS, A. W., DRESHAJ, I. A., HAXHIU, M. A., KAZURA, J. W.; PEARLMAN, E. Interleukin-12 suppresses filaria-induced pulmonary eosinophilia, deposition of major basic protein and airway hyperresponsiveness. **Parasite Immunol.** (20): 455-462.1998

MILLER, T. A. Hookworm infection in man. **Adv.Parasitol.** (17): 315-384.1979

MONSEREENUSORN, Y., KONGSAMUT, S.; PEZALLA, P. D. Capsaicin--a literature survey. **Crit Rev.Toxicol.** (10): 321-339.1982

MORCILLO, E. J. & CORTIJO, J. Mucus and MUC in asthma. **Curr.Opin.Pulm.Med.** (12): 1-6.2006

MORIMOTO, M., MORIMOTO, M., ZHAO, A., MADDEN, K. B., DAWSON, H., FINKELMAN, F. D., MENTINK-KANE, M., URBAN, J. F., Jr., WYNN, T. A.; SHEA-DONOHUE, T. Functional importance of regional differences in localized gene expression of receptors for IL-13 in murine gut. **J.Immunol.** (176): 491-495.2006

NADEL, J. A. & BUSSE, W. W. Asthma. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (157): S130-S138.1998

NAG, S. S., XU, L. J., HAMID, Q.; RENZI, P. M. The effects of IL-5 on airway physiology and inflammation in rats. **J.Allergy Clin.Immunol.** (111): 558-566.2003

NARASIMHA, Murthy S. & HIREMATH, S. R. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of transdermal drug delivery systems of salbutamol sulfate. **Int.J.Pharm.** (287): 47-53.2004

NEGRAO-CORREA, D., PINHO, V., SOUZA, D. G., PEREIRA, A. T., FERNANDES, A., SCHEUERMANN, K., SOUZA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **Int.J.Parasitol.** (36): 1185-1195.2006

NEGRAO-CORREA, D., SILVEIRA, M. R., BORGES, C. M., SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. **Infect.Immun.** (71): 2607-2614.2003

NEGRAO-CORREA, D., SOUZA, D. G., PINHO, V., BARSANTE, M. M., SOUZA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. **Infect.Immun.** (72): 1135-1142.2004

NEGRAO-CORREA, D. & TEIXEIRA, M. M. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chem.Immunol.Allergy.** (90): 14-28.2006

NEVES, D.; MELO, A.; GENARO, O.; LINARDI, P. (2003). *Parasitologia Humana* Atheneu, Belo Horizonte.

OCHOA, M. D., RAMIREZ-MENDOZA, P., OCHOA, G., VARGAS, M. H., ALBA-CRUZ, R.; RICO-MENDEZ, F. G. [Bronchial nodules produced by *Strongyloides stercoralis* as the cause of bronchial obstruction]. **Arch.Bronconeumol.** (39): 524-526.2003

OLIVER, M. N., FABRY, B., MARINKOVIC, A., MIJAILOVICH, S. M., BUTLER, J. P.; FREDBERG, J. J. Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason? **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.** (37): 264-272.2007

PARK, J. W., TAUBE, C., YANG, E. S., JOETHAM, A., BALHORN, A., TAKEDA, K., MIYAHARA, N., DAKHAMA, A., DONALDSON, D. D.; GELFAND, E. W. Respiratory syncytial virus-induced airway hyperresponsiveness is independent of IL-13 compared with that induced by allergen. **J.Allergy Clin.Immunol.** (112): 1078-1087.2003

PAUWELS, R., VAN DER, Straeten M., WEYNE, J.; BAZIN, H. Genetic factors in non-specific bronchial reactivity in rats. **Eur.J.Respir.Dis.** (66): 98-104.1985

PAUWELS, R. A. Genetic factors controlling airway responsiveness. **Clin.Rev.Allergy.** (7): 235-243.1989

PERKINS, C., WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. **J.Allergy Clin.Immunol.** (118): 410-419.2006a

PERKINS, C., WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. **J.Allergy Clin.Immunol.** (118): 410-419.2006b

PHILLS, J. A., HARROLD, A. J., WHITEMAN, G. V.; PERELMUTTER, L. Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. **N.Engl.J.Med.** (286): 965-970.1972

PINELLI, E., WITHAGEN, C., FONVILLE, M., VERLAAN, A., DORMANS, J., VAN LOVEREN, H., NICOLL, G., MAIZELS, R. M.; VAN DER, Giessen J. Persistent

airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice. **Clin.Exp.Allergy**. (35): 826-832.2005

POLOSA, R., RENAUD, L., CACCIOLA, R., PROSPERINI, G., CRIMI, N.; DJUKANOVIC, R. Sputum eosinophilia is more closely associated with airway responsiveness to bradykinin than methacholine in asthma. **Eur.Respir.J.** (12): 551-556.1998

PRIETO, J., LENSMAAR, C., ROQUET, A., VAN, Der Ploeg, I, GIGLIOTTI, D., EKLUND, A.; GRUNEWALD, J. Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations. **Respir.Med.** (94): 806-814.2000

PROCOPIO, D. O., TEIXEIRA, M. M., CAMARGO, M. M., TRAVASSOS, L. R., FERGUSON, M. A., ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF-alpha and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. **Br.J.Pharmacol.** (127): 1195-1205.1999

PROUST, B., NAHORI, M. A., RUFFIE, C., LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4Ralpha knockout mice. **Clin.Exp.Allergy**. (33): 119-131.2003

RICHARDSON, P. S. & PEATFIELD, A. C. The control of airway mucus secretion. **Eur.J.Respir.Dis.Suppl.** (153): 43-51.1987

SAKAE, R. S., LEME, A. S., DOLHNIKOFF, M., PEREIRA, P. M., DO, Patrocínio M., WARTH, T. N., ZIN, W. A., SALDIVA, P. H.; MARTINS, M. A. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. **Am.J.Physiol.** (266): L23-L29.1994

SEKUT, L., CHAMPION, B. R., PAGE, K., MENIUS, J. A., Jr.; CONNOLLY, K. M. Anti-inflammatory activity of salmeterol: down-regulation of cytokine production. **Clin.Exp.Immunol.** (99): 461-466.1995

SHI, H. Z., XIAO, C. Q., ZHONG, D., QIN, S. M., LIU, Y., LIANG, G. R., XU, H., CHEN, Y. Q., LONG, X. M.; XIE, Z. F. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (157): 204-209.1998

SHIM, J. J., DABBAGH, K., UEKI, I. F., DAO-PICK, T., BURGEL, P. R., TAKEYAMA, K., TAM, D. C.; NADEL, J. A. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.** (280): L134-L140.2001

SHORE, S. A., STIMLER-GERARD, N. P., COATS, S. R.; DRAZEN, J. M. Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. Enhancement by inhibitors of neutral metalloendopeptidase and angiotensin-converting enzyme. **Am.Rev.Respir.Dis.** (137): 331-336.1988

SIDDIQUI, A. A. & BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clin.Infect.Dis.** (33): 1040-1047.2001

SILVEIRA, M. R., NUNES, K. P., CARA, D. C., SOUZA, D. G., CORREA, A., Jr., TEIXEIRA, M. M.; NEGRAO-CORREA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect.Immun.** (70): 6263-6272.2002

SINGER, M., LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Granulocyte depletion and dexamethasone differentially modulate airways hyperreactivity, inflammation, mucus accumulation, and secretion induced by rmlL-13 or antigen. **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.** (26): 74-84.2002

SMITH, B., VERGHESE, A., GUITERREZ, C., DRALLE, W.; BERK, S. L. Pulmonary strongyloidiasis. Diagnosis by sputum gram stain. **Am.J.Med.** (79): 663-666.1985

SOLWAY, J. & IRVIN, C. G. Airway smooth muscle as a target for asthma therapy. **N.Engl.J.Med.** (356): 1367-1369.2007

STERNER-KOCK, A., VESELY, K. R., STOVALL, M. Y., SCHELEGLE, E. S., GREEN, J. F.; HYDE, D. M. Neonatal capsaicin treatment increases the severity of ozone-induced lung injury. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (153): 436-443.1996

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int.J.Parasitol.** (25): 907-911.1995

TAUBE, C., DUEZ, C., CUI, Z. H., TAKEDA, K., RHA, Y. H., PARK, J. W., BALHORN, A., DONALDSON, D. D., DAKHAMA, A.; GELFAND, E. W. The role of IL-13 in established allergic airway disease. **J.Immunol.** (169): 6482-6489.2002

TEIXEIRA, M. M., WILLIAMS, T. J.; HELLEWELL, P. G. Anti-inflammatory effects of a short-acting and a long-acting beta 2-adrenoceptor agonist in guinea pig skin. **Eur.J.Pharmacol.** (272): 185-193.1995

URBAN, J. F., Jr., NOBEN-TRAUTH, N., DONALDSON, D. D., MADDEN, K. B., MORRIS, S. C., COLLINS, M.; FINKELMAN, F. D. IL-13, IL-4 α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunity.** (8): 255-264.1998

VAN DEN, Berge M., MEIJER, R. J., KERSTJENS, H. A., DE REUS, D. M., KOETER, G. H., KAUFFMAN, H. F.; POSTMA, D. S. PC(20) adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC(20) methacholine. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** (163): 1546-1550.2001

VAN DER, Kleij D., VAN REMOORTERE, A., SCHUITEMAKER, J. H., KAPSENBERG, M. L., DEELDER, A. M., TIELENS, A. G., HOKKE, C. H.; YAZDANBAKHSI, M. Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc. **J.Infect.Dis.** (185): 531-539.2002

VAN EERDEWEGH, P., LITTLE, R. D., DUPUIS, J., DEL MASTRO, R. G., FALLS, K., SIMON, J., TORREY, D., PANDIT, S., MCKENNY, J., BRAUNSCHWEIGER, K., WALSH, A., LIU, Z., HAYWARD, B., FOLZ, C., MANNING, S. P., BAWA, A., SARACINO, L., THACKSTON, M., BENCHEKROUN, Y., CAPPARELL, N., WANG, M., ADAIR, R., FENG, Y., DUBOIS, J., FITZGERALD, M. G., HUANG, H., GIBSON, R., ALLEN, K. M., PEDAN, A., DANZIG, M. R., UMLAND, S. P., EGAN, R. W., CUSS, F. M., RORKE, S., CLOUGH, J. B., HOLLOWAY, J. W., HOLGATE, S. T.; KEITH, T. P. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature.** (418): 426-430.2002

VANNIER, E., DE WAAL, Malefyt R., SALAZAR-MONTES, A., DE VRIES, J. E.; DINARELLO, C. A. Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein. **Blood.** (87): 3307-3315.1996

VARGAFTIG, B. B. & SINGER, M. Leukotrienes, IL-13, and chemokines cooperate to induce BHR and mucus in allergic mouse lungs. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.** (284): L260-L269.2003

VERCELLI, D. Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants. **Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.** (2): 389-393.2002

VESELY, K. R., HYDE, D. M., STOVALL, M. Y., HARKEMA, J. R., GREEN, J. F.; SCHELEGLE, E. S. Capsaicin-sensitive C-fiber-mediated protective responses in ozone inhalation in rats. **J.Appl.Physiol.** (86): 951-962.1999

WALTER, D. M., MCINTIRE, J. J., BERRY, G., MCKENZIE, A. N., DONALDSON, D. D., DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. **J.Immunol.** (167): 4668-4675.2001

WARTH, Mdo P., MALDONADO, E. A., FERNEZLIAN, S. M., LEME, A. S., PERINI, A., SALDIVA, P. H.; MARTINS, M. A. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. **Am.J.Physiol.** (268): L781-L788.1995

WEHNER, J. H., KIRSCH, C. M., KAGAWA, F. T., JENSEN, W. A., CAMPAGNA, A. C.; WILSON, M. The prevalence and response to therapy of *Strongyloides stercoralis* in patients with asthma from endemic areas. **Chest.** (106): 762-766.1994

WILLS-KARP, M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. **Respir.Res.** (1): 19-23.2000

WONG, L. B., MILLER, I. F.; YEATES, D. B. Stimulation of tracheal ciliary beat frequency by capsaicin. **J.Appl.Physiol.** (68): 2574-2580.1990

WONG, L. B., MILLER, I. F.; YEATES, D. B. Pathways of substance P stimulation of canine tracheal ciliary beat frequency. **J.Appl.Physiol.** (70): 267-273.1991

WOOD, N., WHITTERS, M. J., JACOBSON, B. A., WITEK, J., SYPEK, J. P., KASAIAN, M., EPPHIMER, M. J., UNGER, M., TANAKA, T., GOLDMAN, S. J., COLLINS, M., DONALDSON, D. D.; GRUSBY, M. J. Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2. **J.Exp.Med.** (197): 703-709.2003

WOODRING, J. H., HALFHILL, H., BERGER, R., REED, J. C.; MOSER, N. Clinical and imaging features of pulmonary strongyloidiasis. **South.Med.J.** (89): 10-19.1996

WOODRING, J. H., HALFHILL, H.; REED, J. C. Pulmonary strongyloidiasis: clinical and imaging features. **AJR Am.J.Roentgenol.** (162): 537-542.1994

WOOLCOCK, A. J., SALOME, C. M.; YAN, K. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. **Am.Rev.Respir.Dis.** (130): 71-75.1984

WU, Z. X., MORTON, R. F.; LEE, L. Y. Role of tachykinins in ozone-induced airway hyperresponsiveness to cigarette smoke in guinea pigs. **J.Appl.Physiol.** (83): 958-965.1997

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu.Rev.Immunol.** (21): 425-456.2003

YANG, G., VOLK, A., PETLEY, T., EMMELL, E., GILES-KOMAR, J., SHANG, X., LI, J., DAS, A. M., SHEALY, D., GRISWOLD, D. E.; LI, L. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. **Cytokine.** (28): 224-232.2004

ZUHDI, Alimam M., PIAZZA, F. M., SELBY, D. M., LETWIN, N., HUANG, L.; ROSE, M. C. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways. **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.** (22): 253-260.2000