

Ana Terezinha de Moura Pereira

Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934), em camundongos Balb/c.

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

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte, MG – Brasil

2008

Ana Terezinha de Moura Pereira

Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934) em camundongos Balb/c.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia. Orientação: Dr^a. Deborah Negrão-Corrêa – Depto. de Parasitologia – ICB/UFMG

Belo Horizonte, MG – Brasil

2008

Laboratórios envolvidos:

Imunologia de Helminhos – ICB/UFMG – Prof^a. Dr^a. Deborah Negrão-Corrêa

Imunofarmacologia – ICB/UFMG – Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Mecanismos gerais de infecções fúngicas – ICB/UFMG - Prof. Dr. Ary Corrêa Júnior

Fisiologia vascular – ICB/UFMG - Prof. Dr^a. Virgínia S. Lemos

Apoio:

Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

“Onde você se sentir gente, participando com sua contribuição pessoal na obra coletiva, aí está o seu lugar.” (Helvécio M. P. Neves)

Este trabalho é dedicado à Prof^a. Dr^a. Deborah Negrão-Corrêa, por ser muito mais que minha orientadora, pela paciência e amizade demonstradas ao longo destes anos. E ao Prof. Dr. Ary Corrêa Júnior pelas colaborações e carinho de sempre. Obrigada pelas muitas vezes em que abriram mão de seus próprios interesses para me ajudarem. Vocês são especiais!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar em todos os meus caminhos. “Quem me dera ao menos uma vez/ Fazer com que o mundo saiba que seu nome está em tudo e mesmo assim / Ninguém lhe diz ao menos obrigado”.

À João Pereira Netto e Maria Perpétua de Moura Pereira, por serem meus pais, meus exemplos, minha vida.

À Jardel, Josiane, Joelma, Jussara, Júnio, Juliana e João Paulo, por serem meus irmãos, cada um com sua imprescindível importância em minha vida.

Aos meus sobrinhos, meus amores, razões dos meus mais gostosos sorrisos.

Ao Fábio Rocha de Oliveira, meu companheiro, por me fazer querer ser melhor.

Às minhas amigas Adriana Fernandes e Juliana Froeseler por estarem sempre ao meu lado.

À Jaílza, Heide, Fernanda, Cíntia, Paula, Florence, Michelle e Maria porque tornaram esta caminhada muito mais divertida.

Aos meus colegas Lílian, Erlisson, Leonardo, Juliana, Lara, Fátima, Vladimir, Norine, Érika e Natasha pela convivência e colaboração, especialmente durante as disciplinas.

Ao José Carlos e Sr. Alberto pelo apoio de sempre.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e seus alunos pelas inúmeras colaborações, em especial à Caroline Marcantônio Ferreira por tudo o que, carinhosamente, me ensinou.

À Sumara Guilherme pela atenção de sempre.

À Prof^a. Dr^a. Amália Verônica Mendes da Silva pela disponibilidade e auxílio nas correções.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia.

A todos que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

RESUMO

Durante a infecção de *Strongyloides venezuelensis*, assim como outros nematódeos intestinais com migrações sistêmicas, a participação de eosinófilos no mecanismo de proteção bem como na imunopatologia é bastante controversa. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a infecção primária por *S. venezuelensis* induz inflamação eosinofílica pulmonar e intestinal que coincide com indução de hiperreatividade brônquica e eliminação dos vermes. Foram utilizados camundongos com deleção no sítio de alta afinidade do promotor GATA-1 (camundongos Δ dbiGATA), que afeta exclusivamente a diferenciação de eosinófilos, com o objetivo de avaliar diretamente a participação destas células na resposta protetora e nas alterações funcionais detectadas em camundongos infectados por *S. venezuelensis*. A infecção experimental nestes animais revelou que a ausência de eosinófilos resultou em aumento de carga parasitária e retardo na eliminação dos vermes intestinais em comparação com o observado em camundongos não deficientes. Análises histopatológicas do pulmão e intestino dos animais infectados juntamente com a quantificação da atividade enzimática (EPO e MPO) confirmaram a ausência de infiltração eosinofílica tecidual bem como revelaram uma redução de neutrófilos em camundongos Δ dbiGATA infectados, apesar dos neutrófilos serem normalmente produzidos na medula óssea destes camundongos. A ausência de eosinófilos e redução de neutrófilos podem ser diretamente responsáveis pelo aumento da carga parasitária detectada em camundongos Δ dbiGATA. Além disso, animais Δ dbiGATA infectados também mostraram um retardo na produção de citocinas de perfil TH2, como IL-5 e IL-4, comparado com os animais Balb/c não deficientes, sugerindo que além da participação direta na destruição de larvas de *S. venezuelensis*, a eosinofilia pode participar na indução da resposta imunológica protetora, apesar de não ser essencial para o seu estabelecimento. Neste mesmo modelo experimental foi verificado que a ausência de eosinófilos não modificou a cinética ou a intensidade das alterações funcionais induzidas no pulmão (hiperreatividade brônquica) ou no intestino (aumento da contratilidade

intestinal) durante a infecção por *S. venezuelensis* em camundongos. Os resultados indicam a participação de eosinófilos na resposta imunoprotetora, mas não na imunopatologia, desenvolvida em camundongos durante a infecção primária por *S. venezuelensis*.

ABSTRACT

Strongyloides venezuelensis infection in rats or mice, as well as most of the nematode infections induces an eosinophilic inflammation in lung and intestine of the host. The eosinophil infiltration is accomplished by airway hyperresponsiveness and worm elimination. However, the role of eosinophils in the protective mechanism or in the pathologic response detected during nematode infection is still controversial. In this experimental work we had directly addressed the participation of eosinophil in the immune response induced by *S. venezuelensis* by comparing the parasite infection in Balb/c and Δ dblGATA mice. The Δ dblGATA mice has the high affinity site located in GATA-1 promotor deleted and, as consequence, this mice showed a selective deficiency in eosinophil differentiation. *Strongyloides venezuelensis* infection in eosinophil deficient mice resulted in increased parasite burden and delayed worm elimination compared to non-deficient Balb/c mice. Δ dblGATA infected mice had no differentiated eosinophils in bone marrow, in lung or in the intestine. Although neutrophil differentiation was observed in bone marrow, the presence of this cell type was lower in lung and intestinal tissue of Δ dblGATA infected mice compared to Balb/c. Therefore, eosinophils and neutrophils could directly act on *S. venezuelensis* larvae and adults to control parasite burden during primary infection. Moreover, Δ dblGATA infected mice also showed a delayed production of IL-4 and IL-5 at the intestine site compared to non-deficient infected mice, suggesting that eosinophils would be important to the establishment of the protective immune response that leads to *S. venezuelensis* worm elimination. In this experimental model, *S. venezuelensis* induced airway hyperresponsiveness and increased the intestinal contractility in both, Δ dblGATA and Balb/c non-deficient infected mice. In conclusion, our data indicated that eosinophil do participate in the protective response of mice against *S. venezuelensis*, although it is not essential to the establishment of infection. In addition, eosinophils are not associated with the functional alterations observed during the infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental 1 _____	45
Figura 2 – Delineamento experimental 2 _____	46
Figura 3 – Células presentes em lavado da medula óssea de camundongos Balb/c não deficientes e de camundongos Δ dbiGATA durante a infecção por <i>S. venezuelensis</i> _____	61
Figura 4 – Células do lavado broncoalveolar de camundongos durante a infecção por <i>S. venezuelensis</i> _____	64
Figura 5 – Fotomicrografias de pulmões de camundongos corados por hematoxilina-eosina. _____	68
Figura 6 – Fotomicrografias do pulmão de camundongos corados por hematoxilina-eosina _____	69
Figura 7 – Fotomicrografias de pulmões de camundongos corados por tricrômico de Masson _____	70
Figura 8 – Fotomicrografias do intestino de camundongos coradas por hematoxilina-eosina _____	74
Figura 9 – Fotomicrografias do intestino de camundongos coradas por hematoxilina-eosina _____	75
Figura 10 – Fotomicrografias do intestino de camundongos corados por hematoxilina-eosina _____	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) 2 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **57**

Gráfico 2 - Número de vermes adultos recuperados do intestino delgado de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **58**

Gráfico 3 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **60**

Gráfico 4 – Fecundidade (Número de ovos/ g de fezes/ fêmeas) das fêmeas de *S. venezuelensis* presentes em camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. **60**

Gráfico 5 – Avaliação do número de leucócitos totais (A), células mononucleares (B) e neutrófilos (C) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos Δ dblGATA não infectados (dia 0) e aos 2, 4, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **63**

Gráfico 6 - Número de leucócitos totais, mononucleares, neutrófilos e eosinófilos no lavado broncoalveolar recuperado dos diferentes grupos experimentais aos 4 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. __ **64**

Gráfico 7 - Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato pulmonar de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **65**

Gráfico 8 – Níveis de mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **66**

Gráfico 9 – Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **72**

Gráfico 10 – Níveis de mieloperoxidase (MPO) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **72**

Gráfico 11 – Níveis de interferon- γ (IFN- γ) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ *S. venezuelensis*. _____ **77**

Gráfico 12 – Níveis de interleucina-10 (IL-10) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **78**

Gráfico 13 – Níveis de interleucina-4 (IL-4) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **79**

Gráfico 14 – Níveis de interleucina-13 (IL-13) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **79**

Gráfico 15 – Níveis de interleucina-4 (IL-4) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) não infectados e aos 6 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. ____ **80**

Gráfico 16 – Níveis de interleucina-5 (IL-5) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) não infectados (dia 0) e aos 6 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ *S. venezuelensis*. _____ **81**

Gráfico 17 – Níveis de IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ presentes no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) infectados por 6 dias com *S. venezuelensis*. _____ **82**

Gráfico 18 – Níveis de IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ presentes no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) infectados por 6 dias com *S. venezuelensis*. _____ **83**

Gráfico 19 – Níveis de IgG1 parasito específico no soro de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **84**

Gráfico 20 – Níveis de IgE total no soro de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) aos 2, 4, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **84**

Gráfico 21 – Porcentagem de aumento na pressão intratraqueal foi utilizada como medida da reatividade brônquica em resposta a doses sucessivas de metacolina 4 dias após a infecção de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **85**

Gráfico 22 – Porcentagem de aumento na tensão em comparação à linha basal após sucessivas doses de carbacol aplicadas à porção de 1 cm de intestino de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) não infectados e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. _____ **86**

LISTA DE SIGLAS

ADCC – citotoxicidade dependente de anticorpo
AIDS – síndrome da deficiência imunológica adquirida
Con-A – Concanavalina A
dpi – dias pós infecção
ECP - proteína catiônica eosinofílica
EDN - neurotoxina derivada de eosinófilo
EPO – peroxidase de eosinófilo
GM-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos granulócitos
HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HTLV-1 - vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1
IFN- γ - interferon- γ
IgE – imunoglobulina E
IgG1 - imunoglobulina G1
IgG2a - imunoglobulina G2a
IL-1 – interleucina-1
IL-10 – interleucina-10
IL-13 - interleucina-13
IL-4 – interleucina-4
IL-5 - interleucina-5
LBA – lavado broncoalveolar
MBP - proteína básica principal
MPO – mieloperoxidase/peroxidase de neutrófilo
OPG – ovos por grama de fezes
PAF - fator ativador de plaquetas
SCF – fator de crescimento de células tronco
TGF- β - fator de crescimento transformante- β
TNF- α - fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	17
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 – Biologia	21
2.2 - Aspectos patológicos	24
2.3 – Aspectos imunológicos	25
2.4 – Eosinófilos	31
2.5 – Eosinófilos e infecções helmínticas	33
3 - OBJETIVOS	38
3.1 - Objetivo geral	39
3.2 - Objetivos específicos	39
4 - METODOLOGIA	41
4.1 - Animais experimentais	42
4.2 - Parasito	43
4.3 - Obtenção de larvas - Infecção e produção de antígeno	43
4.4 - Delineamento experimental	44
4.5 - Avaliação da infecção	47
4.6 - Composição celular: medula óssea e infiltrado pulmonar	48
4.7 - Quantificação de citocinas	51
4.8 - Avaliação da resposta humoral	52
4.9 - Análise histopatológica	54
4.10 - Hiperreatividade brônquica	54
4.11 - Contração intestinal	55
4.12 - Análise estatística	55
5 - RESULTADOS	56
5.1 – Avaliação parasitológica	57
5.1.1 - Recuperação de larvas de <i>S. venezuelensis</i> do pulmão de camundongos	57
5.1.2 – Recuperação de vermes adultos no intestino delgado de camundongos	58
5.1.3 – Eliminação de ovos e fecundidade das fêmeas de <i>S. venezuelensis</i>	59
5.2 - Avaliação imunológica	61
5.2.1 - Composição celular da medula óssea	61
5.2.2 – Avaliação do infiltrado celular pulmonar	61

5.2.3 – Avaliação do infiltrado celular no intestino delgado _____	71
5.2.5 – Avaliação da resposta humoral _____	83
5.3 – Avaliação funcional _____	85
5.3.1 – Hiperreatividade brônquica _____	85
5.3.2 – Contração intestinal _____	85
6 - DISCUSSÃO _____	87
7 - CONCLUSÕES _____	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	99

1 – INTRODUÇÃO

Infecções produzidas por nematódeos gastrintestinais são altamente prevalentes na população humana. Estima-se que mais de ¼ da população mundial encontra-se infectada por nematódeos, especialmente em países em desenvolvimento localizados em regiões tropicais e subtropicais (CHANG, 1997; CROMPTON, 1999). A infecção produzida por nematódeos gastrintestinais está associada à mortalidade relativamente baixa, que ocorre principalmente em crianças severamente infectadas. Entretanto, a morbidade induzida por estes parasitos é bastante expressiva. Estudos epidemiológicos mostram que, além dos danos diretos ao hospedeiro, que incluem deficiência nutricional, anemia e perda de peso (STEPHENSON *et al.*, 2000), crianças intensamente infectadas podem apresentar retardo de crescimento, afetando também funções cognitivas e a produtividade na fase adulta do indivíduo (COOPER e BUNDY, 1988; NOKES *et al.*, 1992; GUYATT, 2000).

Entre os nematódeos parasitos intestinais de grande impacto na saúde humana e animal estão os do gênero *Strongyloides*. O gênero *Strongyloides* pertence ao Filo Nematoda, Classe Secernentia, Ordem Rhabditida e Família Strongyloididae (ADAMSOM, 1987). Segundo Speare (1989), são descritas 52 espécies de *Strongyloides*, das quais *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* infectam humanos. Esta última espécie tem sido relatada em habitantes da África e Papua Nova Guiné (GROVE, 1996; VADLAMUDI *et al.*, 2006).

A estrogiloidíase humana, doença causada pelo nematódeo *S. stercoralis*, é um importante problema médico e social que atinge 30 a 100 milhões de pessoas em cerca de 70 países, sendo a maioria destes países localizados em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Latina (SIDDIQUI e BERK, 2003). Infecção por *S. stercoralis* é considerada a quarta mais importante infecção por nematódeo intestinal, após *Ascaris lumbricoides*, ancilostomídeos e *Trichuris trichiura* (STEPHENSON *et al.*, 2000). A prevalência de humanos infectados em áreas endêmicas está em torno de 5%, sendo tipicamente concentrada em indivíduos mais jovens (VINEY e LOK, 2007). Indivíduos do sexo masculino, de raça branca e trabalhadores que mantêm contato direto com solo apresentam maior risco de adquirir esta doença (VADLAMUDI *et al.*, 2006). Cerca de 50% dos indivíduos infectados

cronicamente são assintomáticos e 75% manifestam eosinofilia. Um ciclo de auto-infecção interna permite que o parasito permaneça no hospedeiro por muitos anos, na maioria das vezes de forma assintomática (CONCHA *et al.*, 2005). As complicações da doença usualmente ocorrem quando o equilíbrio parasito-hospedeiro (mantido pelos mecanismos imunológicos em hospedeiros imunocompetentes) é comprometido, permitindo que a infecção assintomática se torne uma ameaça à vida (CONCHA *et al.*, 2005).

Dentre as principais espécies de interesse veterinário estão *Strongyloides papillosus* e *S. ransomi* que parasitam intestino delgado de ruminantes e suínos, respectivamente. Tais espécies infectam particularmente animais jovens, sendo responsáveis por perdas econômicas significativas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (CHANDRAWATHANI *et al.*, 1998; STEWART e HALE, 1988; LENTZE *et al.*, 1999; NAKAMURA e MOTOKAWA, 2000).

Diante disso, acredita-se ser relevante o estudo da infecção por *S. venezuelensis* em camundongos como um modelo experimental necessário para orientação de novas pesquisas buscando a melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos da infecção por *S. stercoralis* no hospedeiro humano.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Biologia

As espécies do gênero *Strongyloides* apresentam no ciclo biológico uma particularidade: alternância de gerações de vida livre e vida parasitária. Desta forma, larvas de 1º estágio (L₁) presentes no ambiente podem sofrer quatro mudas formando machos e fêmeas, que originam novas gerações de vida livre e/ou larvas infectantes que, após penetrarem no hospedeiro vertebrado, completam seu desenvolvimento. Este tipo de desenvolvimento é conhecido também como ciclo heterogônico ou indireto. Na maioria das espécies, particularmente *S. stercoralis*, observa-se somente uma geração de vida livre (YAMADA *et al.*, 1991; VINEY e LOK, 2007). Alternativamente, o desenvolvimento destes parasitos pode se processar de maneira direta (ciclo homogônico) no qual as larvas L₁ evoluem para larvas filarióides (L₃) infectantes.

Os possíveis mecanismos que determinam o modo de desenvolvimento direto ou indireto das larvas de *Strongyloides* ainda não foram completamente esclarecidos. CHANG e GRAHAM (1957), trabalhando com *S. papillosus*, propuseram que fêmeas partenogenéticas seriam triplóides (3n) e poderiam produzir, simultaneamente, três tipos de larvas rabditóides: triplóides (3n) que dariam origem a larvas filarióides infectantes; larvas diplóides (2n) que evoluiriam para fêmeas de vida livre; e larvas haplóides (n) que originariam machos de vida livre. Estudos em *S. ratti* demonstraram que certas cepas têm predileção para um ou outro tipo de desenvolvimento (GRAHAM, 1938). VINEY (1996), verificou que larvas fêmeas de *S. ratti* se desenvolvem preferencialmente em fêmeas adultas de vida livre em ambientes com temperaturas mais altas que a do hospedeiro que liberou as fezes. Cepas do parasito isoladas de regiões tropicais desenvolvem-se predominantemente pelo ciclo indireto, enquanto que cepas de regiões temperadas, tendem ao desenvolvimento direto, principalmente em temperaturas mais baixas (BEREZHNIAIA *et al.*, 1991). Em estudos com *S. stercoralis*, SHIWAKU *et al.* (1988), verificaram que tanto a temperatura como o grau de diluição das fezes não alteravam o surgimento de machos de vida-livre, mas o aumento desses fatores induzia aumento do número de larvas filarióides. Este estudo indica que a determinação de machos ocorre no ovo, enquanto o

desenvolvimento de fêmeas de vida-livre ou larvas filarióides é determinado de acordo com circunstâncias ambientais. Estudos posteriores de HARVEY e VINEY (2001), demonstraram que todas as formas evolutivas de *S. rattii* são diplóides e que a determinação sexual é genética. Além disso, VINEY e LOK (2007) mostraram que larvas de *S. rattii* oriundas de fêmeas que parasitam hospedeiro com resposta imunológica já estabelecida originam uma maior proporção de fêmeas de vida livre. Portanto, é provável que a diferenciação entre fêmeas de vida livre aconteça devido à diferenciação na expressão gênica, que pode ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes e temperatura ambiental, entre outros fatores (VINEY, 1999).

As larvas filarióides oriundas do desenvolvimento direto ou indireto são morfologicamente semelhantes e, geralmente, a infecção ocorre quando a larva penetra ativamente através da pele do hospedeiro. Entretanto, há evidências de transmissão transmamária para algumas espécies como *S. rattii* em ratos (KAWANABE *et al.*, 1988) e *S. papillosus* em ruminantes (MONCOL e GRICE, 1974). Segundo os autores, a transmissão transmamária ocorre com hipobiose ou dormência de parte das larvas L₃, as quais interrompem seu desenvolvimento e migram para as glândulas mamárias, sendo então reativadas durante o período de lactação. A larva filarióide secreta melanoproteases que auxiliam tanto na penetração na pele quanto na migração tecidual. Por via sangüínea (mais freqüente) ou tecidual, as larvas migram para os pulmões, ascendem pelas vias respiratórias até a faringe, são deglutidas e chegam ao intestino delgado, onde penetram na mucosa intestinal e sofrem duas mudas, finalizando o seu desenvolvimento, tornando-se fêmeas adultas partenogenéticas (GROVE, 1996; VINEY e LOK, 2007).

No caso específico de *S. stercoralis*, diferente da maioria dos nematódeos parasitos humanos ou mesmo de outras espécies do gênero *Strongyloides*, as larvas rabditóides possuem a capacidade de atingir a fase infectante ainda no homem, levando à auto-infecção. Esta auto-infecção pode ser interna, quando larvas rabditóides, ainda na luz intestinal, transformam-se em larvas filarióides que penetram na mucosa intestinal. Pode também ser externa, quando larvas rabditóides presentes na região perianal transformam-se em larvas filarióides

infectantes e aí penetram, completando o ciclo direto. A auto-infecção ocorre em todos os indivíduos, mas naqueles imunodeprimidos a auto-infecção interna pode acelerar-se, provocando a elevação do número de parasitos no intestino e nos pulmões (hiperinfecção) e pode ainda se disseminar por vários órgãos (forma disseminada), gerando os casos graves de estrogiloidíase humana (GROVE, 1996; VADLAMUDI *et al.*, 2006; CONCHA *et al.*, 2005).

Strongyloides venezuelensis é um parasito natural de ratos (HASEGAWA *et al.*, 1988) que possui uma rota de migração pela via clássica através da corrente sanguínea aos pulmões e então para o intestino delgado, semelhante àquela de *S. stercoralis* em humanos (SATO e TOMA, 1990). Maior número de larvas no pulmão é encontrado cerca de 48 horas após a infecção, causando intensa hemorragia neste órgão.

Em torno do 7º dia da infecção, encontramos maior quantidade de vermes adultos na superfície mucosa do intestino delgado, onde invadem o espaço intercelular das células epiteliais e se movem ativamente entre elas, deixando túneis por onde migraram (DAWKINS *et al.*, 1983). Eles não penetram na lâmina própria através da membrana basal, sugerindo que os vermes se movem para dentro e para fora da camada epitelial repetidamente durante o curso da infecção (DAWKINS, 1989). Substâncias adesivas de natureza glicoprotéica são secretadas oralmente pelo parasito permitindo invasão e estabelecimento na camada mucosa (MARUYAMA e NAWA, 1997). Neste mesmo período, grande parte dos ovos é eliminada nas fezes do hospedeiro, diferindo de *S. stercoralis* cuja forma evolutiva encontrada nas fezes é a larva rabaditóide.

Dez dias após a infecção, mais de 50% dos vermes já foram eliminados do intestino delgado, ocorrendo autocura entre 12 e 14 dias em camundongos (SATO e TOMA, 1990) e em ratos após 30 – 45 dias (BAEK *et al.*, 2003). Ao contrário da infecção humana por *S. stercoralis*, a infecção de roedores por *S. venezuelensis* não leva à auto-infecção (NEVA, 1986).

2.2 - Aspectos patológicos

A gravidade da estrogiloidíase humana depende essencialmente da resposta imunológica do hospedeiro e da habilidade do parasito em evadir desta resposta. Assim, são relatados casos de infecção solucionada pelo hospedeiro, infecção crônica e hiperinfecção/disseminação. Cerca de 50% dos indivíduos cronicamente infectados com *S. stercoralis* são assintomáticos (CONCHA *et al.*, 2005), enquanto outros têm uma variedade de sintomas cutâneos ou gastrintestinais pouco específicos.

Na pele ocorrem dois tipos de lesões: urticária e larva currens, sendo esta patognomônica para estrogiloidíase. Entre os principais sintomas gastrintestinais estão cólica e dilatação abdominais, diarreia aquosa, náuseas, vômitos, prurido anal e algumas vezes constipação (CONCHA *et al.*, 2005; VADLAMUDI *et al.*, 2006). Como as manifestações iniciais são vagas e mimetizam outras doenças, elas são freqüentemente subdiagnosticadas e tratadas sintomaticamente com o hospedeiro ainda abrigando o parasito levando ao estado crônico da doença (VADLAMUDI *et al.*, 2006), que pode durar meses ou anos (STEPHENSON *et al.*, 2000; COSTA-CRUZ, 2003).

Estima-se que a síndrome da hiperinfecção ocorra entre 1,5 a 2,5% dos pacientes com estrogiloidíase (MILDER *et al.*, 1981), observando-se dor abdominal severa, diarreia aquosa, perda de peso, náuseas, vômitos, constipação, prurido anal e, algumas vezes, sangramento gastrointestinal e obstrução intestinal subaguda (CONCHA *et al.*, 2005; VADLAMUDI *et al.*, 2006). O pulmão é o órgão extraintestinal mais freqüentemente afetado na hiperinfecção devido à migração das larvas, observando-se sintomas semelhantes à síndrome de Löffler: tosse, diminuição da taxa de respiração, chiado e infiltrado pulmonar transitório. CONCHA *et al.* (2005) relataram casos severos em pacientes apresentando asma bronquial, bronquite crônica e broncopneumonia.

Na estrogiloidíase disseminada, envolvimento de outros órgãos como sistema nervoso central pode ser visto (KOTHARY *et al.*, 1999), com sintomas incluindo dor de cabeça, estado mental alterado e, em casos extremos, coma

(CONCHA *et al.*, 2005). Além disso, meningite bacteriana é freqüente, sendo que a maior parte dessas infecções secundárias resulta da invasão de bactérias da flora intestinal que penetram através do epitélio danificado pelo verme e invadem os tecidos do hospedeiro. A maioria desses pacientes (83%-87%) vai a óbito (LINK *et al.*, 1999).

2.3 – Aspectos imunológicos

As principais dificuldades no controle desta helmintíase residem no difícil diagnóstico, na cronicidade associada à ausência de sintomatologia específica da parasitose e na ocorrência de auto-infecção.

Em indivíduos imunossuprimidos, através do uso prolongado de drogas imunossupressoras (SEN *et al.*, 1995) ou por infecções virais como pelo HTLV-1, o vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (PORTO *et al.*, 2001), a carga parasitária aumenta e o parasito pode disseminar no hospedeiro originando formas graves de estrogiloidíase, evoluindo para o óbito do paciente em até 87% dos casos (SIDDIQUI e BERK, 2003). É interessante notar que a AIDS é freqüentemente caracterizada por um aumento nas citocinas TH2 e decréscimo de citocinas TH1, sendo que esta resposta TH2 pode predispor a acelerada replicação do HIV-1. Desta forma, os poucos casos registrados de hiperinfecções por *S. stercoralis* em pacientes infectados com HIV parecem ser incidentais e não doenças oportunistas (CONCHA *et al.*, 2005)..

O uso de corticosteróides afeta a imunidade pelo aumento da apoptose de células TH2, redução do número de eosinófilos e inibição da resposta de mastócitos, levando à hiperinfecção ou infecção disseminada (CONCHA *et al.*, 2005). Tem sido proposto ainda que corticosteróides endógenos e exógenos aumentem os níveis de substâncias que agem como sinais para mudas, aumentando a produção de larvas filarióides auto-infectantes e levando à hiperinfecção ou infecção disseminada (VADLAMUDI *et al.*, 2006).

Indivíduos infectados pelo vírus HTLV-1 apresentam uma alta produção de IFN- γ e desvio da resposta imune para o tipo TH1, levando a uma redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, componentes participantes do mecanismo de

defesa contra *S. stercoralis*; estas anormalidades constituem a base para a ocorrência de maior frequência e de formas mais graves da estrogiloidíase em pacientes infectados pelo HTLV-1 (PORTO *et al.*, 2002). Este quadro ilustra a importância da resposta imunológica do hospedeiro na evolução da estrogiloidíase; entretanto, os mecanismos imunológicos envolvidos no controle deste helminto ainda não são completamente conhecidos.

As alterações mais comuns observadas durante a infecção por nematódeos intestinais, como é o caso da estrogiloidíase, compreendem eosinofilia, aumento dos níveis séricos de IgE e IgG1, e mastocitose (revisado por URBAN *et al.*, 1992; ALLEN e MAIZELS, 1996; FINKELMAN *et al.*, 1997). Estas alterações são características da resposta imunológica controlada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (linfócitos TH2), que são linfócitos T que expressam o determinante antigênico CD4 na superfície celular e que secretam principalmente as citocinas designadas de interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 em resposta à estimulação antigênica (MOSSMAN e COFFMAN, 1989; ABBAS *et al.*, 1996). Este tipo de resposta está associada com o controle da hiperinfecção por *S. stercoralis*, visto que produção reduzida de IL-4 e, conseqüentemente, baixa produção de IgE, associado ao aumento de interferon-gama (IFN- γ), estão presentes em pacientes co-infectados com HTLV-1 e estrogiloidíase grave (PORTO *et al.*, 2001). Desta forma, a resposta TH2 é muito importante na prevenção de infecções helmínticas intestinais, enquanto resposta TH1 predispõe à estrogiloidíase severa (CONCHA *et al.*, 2005). No entanto, os possíveis mecanismos reguladores destas citocinas e responsáveis pela proteção contra nematódeos ou, em alguns casos, pelo aumento da lesão e conseqüentemente da patologia associada à infecção, ainda não foram claramente estabelecidos.

Alguns estudos demonstraram a importância da produção de IL-4 para a eliminação de algumas espécies de nematódeos, como *Trichuris muris* e *Heligmosomoides polygyrus* (ELSE *et al.*, 1994; URBAN *et al.*, 1995; FINKELMAN *et al.*, 1997) através da utilização de camundongos tratados com IL-4 recombinante (em formulações que permitem uma meia vida prolongada desta citocina no hospedeiro), bem como camundongos geneticamente

deficientes na produção de IL-4. Entretanto, a produção de IL-4 não foi necessária para o desenvolvimento de uma resposta imunológica capaz de controlar a infecção experimental de *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos (LAWRENCE *et al.*, 1996; FINKELMAN *et al.*, 1997). Posteriormente, ficou demonstrado que IL-13 compartilha algumas atividades biológicas com IL-4, podendo atuar sinergicamente ou mesmo substituir IL-4 na indução de vários aspectos da resposta TH2 (MCKENZIE *et al.*, 1998). O sinergismo entre IL-4 e IL-13 pode ser justificado pelo fato destas citocinas compartilharem um receptor comum, o receptor de tipo II. Tanto o receptor de tipo I, que se liga a IL-4, como o de tipo II, que se liga a IL-4 e IL-13 são compostos pela cadeia alfa em associação com outra proteína, que é essencial para expressão destes receptores na parede celular. A associação da citocina (IL-4 ou IL-13) com o receptor é responsável pela indução da via de transdução de sinal que inclui a ativação do fator de transcrição nuclear STAT-6 (MCKENZIE *et al.*, 1998). Desta forma, infecções experimentais utilizando-se camundongos geneticamente deficientes para a produção da cadeia alfa, animais IL-4R $\alpha^{-/-}$, têm confirmado que IL-4 e/ou IL-13 e, conseqüentemente, a resposta tipo TH2 regulada por estas citocinas tem papel fundamental na eliminação da maioria dos nematódeos intestinais (ONAH e NAWA, 2000; FINKELMAN *et al.*, 2004).

Apesar dos nematódeos induzirem uma resposta predominantemente tipo TH2, o mecanismo responsável pela eliminação dos vermes pode ser diferente para cada espécie de nematódeo, possivelmente refletindo o microambiente do hospedeiro ocupado pelo parasito, sua fonte alimentar e possíveis mecanismos evasivos desenvolvidos por cada espécie de nematódeo (FINKELMAN *et al.*, 1997; NEGRÃO-CORRÊA, 2001; FINKELMAN e URBAN, 2001; ONAH e NAWA, 2000; LAWRENCE, 2003). Para exemplificar, podemos citar que IL-4, mas não IL-13 é requerido para eliminação de *Heligmosomoides polygyrus* (LAWRENCE *et al.*, 1998), uma espécie de nematódeo que inicialmente desenvolve-se na mucosa do intestino delgado e quando adulto vive na luz intestinal. Ao contrário, IL-13 e não IL-4 é essencial para eliminação de *Nippostrongylus brasiliensis* (URBAN *et al.*, 1998), nematódeo com ciclo pulmonar que posteriormente se estabelece na luz do intestino delgado. Por

outro lado, tanto IL-13 como IL-4 são necessários para eliminação de *Trichuris muris*, que vive na camada epitelial do ceco (BANCROFT *et al.*, 1998) e *Trichinella spiralis*, que habita o epitélio do intestino delgado (FINKELMAN *et al.*, 2004). Camundongos IL-4R α ^{-/-} ou STAT6^{-/-} também não são capazes de eliminar a infecção por *Strongyloides venezuelensis* no mesmo período que camundongos não deficientes, apesar de produzirem IL-4 localmente (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006; NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006).

As citocinas não atuam diretamente nos parasitos, sendo necessário entendermos os possíveis mecanismos imunológicos induzidos pela produção de IL-4 e/ou IL-13 e ativação de IL-4R/STAT6 responsáveis pela proteção do hospedeiro contra infecções por nematódeos, levando-se em consideração que alguns mecanismos possam atuar de maneira protetora para algumas espécies de nematódeos e não para outras. O aumento da produção de IL-4 e IL-13 estimula a multiplicação e diferenciação de células TH2, mastócitos e células caliciformes, que irão produzir outras quimiocinas e citocinas, como eotaxina e IL-5, responsáveis pela diferenciação e migração de eosinófilos para o sítio da infecção (CARA *et al.*, 2000). O aumento de citocinas TH2 também estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e a produção de alguns isotipos e classes de anticorpos, como IgG1 e IgE (ABBAS *et al.*, 1996). Finalmente, existem relatos recentes da atuação direta de IL-4 e/ou IL-13 na mucosa intestinal, alterando a contração muscular (ZHAO *et al.*, 2003) e a proliferação das células epiteliais intestinais (CLIFFE *et al.*, 2005).

Helmintos também podem influenciar a resposta imunológica, regulando-a para otimizar sua alimentação e reprodução. A indução de resposta imune tipo TH2 por helmintos parasitos não é simplesmente devido a uma falta de estimulação de resposta TH1, mas também se deve à existência de populações de células T regulatórias (MAIZELS *et al.*, 2004). Todas estas alterações imunológicas podem afetar a sobrevivência de nematódeos gastrintestinais, bem como ter efeito na patologia associada à infecção por nematódeos.

Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório (SILVEIRA *et al.*, 2002) demonstraram que, após a passagem de larvas de *S. venezuelensis* pelo

pulmão de ratos, ocorre uma resposta inflamatória eosinofílica local que coincide com um aumento da hiperreatividade brônquica, um sintoma tipicamente asmático. A hiperreatividade brônquica é definida como um excessivo estreitamento das vias respiratórias em resposta a uma variedade de estímulos químicos ou físicos que têm pouco ou nenhum efeito em indivíduos saudáveis (BRUSASCO e PELLEGRINO, 2003). Em ratos infectados com *S. venezuelensis*, o pico da inflamação pulmonar ocorre entre o 5º e 7º dias após infecção, sendo detectado aumento de IgE, produção de muco pelas células caliciformes do epitélio das vias respiratórias e intensa eosinofilia no tecido, bem como no lavado broncoalveolar. As alterações imunológicas bem como as funcionais (hiperreatividade) no pulmão retornam aos níveis normais no 12º dia após infecção. Tais alterações são pouco evidentes no 2º dia após infecção, quando as larvas encontram-se no parênquima pulmonar induzindo hemorragia e acentuada produção local de IL-10 (SILVEIRA *et al.*, 2002), demonstrando um importante papel desta citocina na regulação do processo inflamatório nos pulmões. Várias propriedades de IL-10 em diversos tipos de células têm sido descritas incluindo estimulação do crescimento de timócitos, mastócitos e células B e inibição da produção de citocinas por monócitos e macrófagos ativados, neutrófilos e eosinófilos (ZUANY-AMORIM *et al.*, 1995).

Ao atingirem o intestino delgado, as larvas de *S. venezuelensis* penetram na mucosa e completam o seu desenvolvimento para fêmeas adultas partenogênicas após 5 dias da infecção. A permanência dos vermes no intestino delgado induz aumento dos níveis de citocinas, especialmente IL-4, IL-13 e IL-5 (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004), resultando em mastocitose intestinal, aumento de células caliciformes e produção de muco, bem como infiltração eosinofílica.

Existem fortes evidências experimentais associando mastocitose intestinal e aumento de células caliciformes com a eliminação de alguns nematódeos. A participação de mastócitos no processo de eliminação de *Strongyloides ssp* foi inicialmente demonstrada em camundongos *W/W^V*, uma linhagem de camundongos que apresentam deficiência na diferenciação de mastócitos causada por uma mutação do gene *c-kit* e que eliminam a infecção por *S. rattii*

(NAWA *et al.*, 1985; ABE e NAWA, 1987) ou *S. venezuelensis* (KHAN *et al.*, 1993) muito mais lentamente que camundongos não deficientes. A eliminação das espécies de *Strongyloides* é ainda mais prejudicada em camundongos *W/W^V* que não possuem IL-3 e que, por isso, falham em produzir basófilos em resposta à infecção, além de não possuírem mastócitos funcionais (LANTZ *et al.*, 1998). Outra evidência experimental da importância de mastócitos no processo de eliminação de *Strongyloides* foi obtida em camundongos nude (camundongos que possuem um defeito tímico, não desenvolvendo células T). Nestes animais, a resposta protetora contra *S. ratti* foi restaurada após tratamento prolongado com IL-3, capaz de restaurar a mastocitose intestinal naqueles camundongos (ABE e NAWA, 1998). Este mesmo tratamento com IL-3 não restaura a capacidade dos camundongos nude eliminarem *Nippostrongylus brasiliensis* (ABE *et al.*, 1992). Mais recentemente, a importância da mastocitose intestinal no processo de eliminação de *S. venezuelensis* foi novamente confirmada durante a infecção em camundongos geneticamente deficientes em IL-3 (LANTZ *et al.*, 1998) e em camundongos deficientes na produção da subunidade $p85\alpha$ do complexo fosfatidylinositol-3 quinase (PI3K). Esta deficiência resulta em ausência de mastócitos no intestino e no peritônio, tornando os animais altamente susceptíveis a infecção por *S. venezuelensis* (FUKAO, 2002).

Mastócitos contêm grânulos com histamina, heparina e proteases e secretam citocinas como IL-4 e IL-5, bem como leucotrienos e quimiocinas após ativação (DE VEER *et al.*, 2007). Uma das hipóteses pela qual a mastocitose intestinal atua na eliminação dos vermes do intestino sugere que proteoglicanas fortemente sulfatadas presentes em grânulos de mastócitos e secretadas no intestino dificultam a fixação dos vermes no epitélio da mucosa intestinal e, conseqüentemente, facilitam a eliminação dos mesmos (MARUYAMA e NAWA, 1997; MARUYAMA *et al.*, 1998; MARUYAMA *et al.*, 2000; MARUYAMA *et al.*, 2003). Mecanismo semelhante também pode ocorrer com a secreção de mucinas sulfatadas produzidas por células caliciformes durante a infecção (ISHIKAWA *et al.*, 1995; MARUYAMA *et al.*, 2002). Também a capacidade de mastócitos desencadear a contração muscular pode

contribuir para a expulsão física dos patógenos do intestino (JANEWAY, 2002). Além disso, a histamina liberada por mastócitos pode ativar eosinófilos residentes (DE VEER *et al.*, 2007), contribuindo para a resposta eosinofílica típica de infecções por nematódeos.

Em contraste com os mastócitos intestinais, a participação de eosinófilos no processo de eliminação de nematódeos ainda é bastante discutida, sendo descrita uma associação entre proteção e eosinofilia especialmente em nematódeos que apresentam migrações sistêmicas de larvas (revisado por CARA *et al.*, 2000).

2.4 – Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos derivados de células da medula óssea, que estão presentes principalmente no sangue, onde compõem aproximadamente 1 a 3% dos leucócitos totais de um indivíduo saudável, e nos tecidos com interface epitelial com o ambiente, como trato respiratório e gastrointestinal. São produzidos a partir de células-tronco pluripotentes que primeiro se diferenciam em um precursor híbrido de basófilos e eosinófilos e então se diferenciam em eosinófilos pela interação de 3 fatores, incluindo GATA-1, PU.1 e C/EBP (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Embora estes fatores de transcrição sejam expressos em uma variedade de linhagens hematopoiéticas, seu mecanismo de ação nos eosinófilos é único. GATA-1 é claramente o mais importante fator para diferenciação final de eosinófilos, como revelado pela perda destas células em camundongos que tiveram deletado um sítio de ligação de alta afinidade no promotor GATA-1 (YU *et al.*, 2002), chamados Δ dbIGATA, cujas células progenitoras de eosinófilos demonstraram diminuída expressão de GATA-1 *ex vivo*. Entretanto, esta expressão diminuída não se mostrou suficiente para impedir diferenciação destas células progenitoras em eosinófilos *ex vivo* (DYER *et al.*, 2007).

Eosinófilos parecem não se multiplicar após deixar a medula óssea (HITOSHI *et al.*, 1991), tendo uma meia vida sanguínea de cerca de 18h (TEIXEIRA *et al.*, 1995). Estas células são liberadas constitutivamente a uma

pequena taxa na circulação sanguínea (BEHM e OVINGTON, 2000), sendo que a elevação destas células está freqüentemente associada com infecções helmínticas e reações alérgicas.

O fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e IL-3 atuam nas primeiras fases de diferenciação e na proliferação de eosinófilos, seguindo instruções especificadas pelos fatores de transcrição GATA-1, PU.1 e C/EBP. A atuação de IL-3 para aumentar o número de eosinófilos deve prescindir da cooperação de SCF, o fator de crescimento de células tronco (KIMURA *et al.*, 2006). A regulação da produção e as últimas fases de diferenciação de eosinófilos na medula óssea, bem como a sua migração e sobrevivência no tecido, são fortemente influenciadas pela presença de IL-5. Quimiocinas da família das eotaxinas cooperam com IL-5 na indução de eosinofilia tecidual, sendo que IL-5 aumenta a quantidade de células responsivas a eotaxinas e capacita eosinófilos para responder a ligantes de CCR3, um receptor de eotaxina (ROTHENBERG e HOGAN, 2006).

Em resposta a diversos estímulos, eosinófilos são recrutados da circulação para focos inflamatórios, onde modulam a resposta imune através de uma variedade de mecanismos. Estas células expressam receptores para várias moléculas, incluindo imunoglobulinas (IgE, IgG e IgA), complemento (C1q, C3b/C4b, iC3b, C5a), citocinas (IL-3, IL-5, GM-CSF), quimiocinas (eotaxina, eotaxina-2, RANTES, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13), mediadores lipídicos (PAF, LTB4) e esteróides (estrógenos, glicocorticóides) (Cara *et al.*, 2000). A ativação por citocinas, imunoglobulinas e complemento leva estas células a secretarem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL12. Tais moléculas regulam a permeabilidade vascular, modulam o tráfego celular, a secreção de muco e a contração do músculo liso.

Eosinófilos podem ainda iniciar a resposta imunológica específica agindo como células apresentadoras de antígenos (SHI, 2004). Além disso, podem liberar grânulos citotóxicos contendo EPO (tóxica e desencadeia a liberação de histamina pelos mastócitos), MBP (tóxica para parasitos e células de mamíferos; desencadeia a liberação de histamina pelos mastócitos), ECP e EDN (neurotoxinas) e mediadores lipídicos tais como PAF (atrai leucócitos, amplifica a

produção de mediadores lipídicos, ativa neutrófilos, eosinófilos e plaquetas) e leucotrienos (levam a contração do músculo liso, aumentam a permeabilidade vascular e a secreção de muco). Cerca de 25% dos grânulos secretados por eosinófilos são constituídos por EPO que catalisa oxidação de várias moléculas resultando em espécies de oxigênio e nitrogênio reativos que promovem *stress* oxidativo e subseqüentemente morte celular por apoptose e necrose. Secretado por eosinófilos, MBP altera diretamente a contração do músculo liso por desregular receptores muscarínicos e por induzir degranulação de mastócitos e basófilos (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). É importante salientar que eosinófilos só são capazes de degranular em camundongos que têm resposta T CD4⁺ intacta (SHINKAI *et al.*, 2002). Não se sabe se estes eosinófilos requerem sinais de células T para liberar citocinas e quimiocinas regulatórias, mas há a intrigante possibilidade de que granulócitos possam preparar o desenvolvimento da resposta imunológica, antes que simplesmente servir como células efetoras na expulsão do parasito.

Eosinófilos também podem polarizar a resposta imunológica induzida por células T, através da síntese deIDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), uma enzima envolvida na conversão do triptofano em KYN, uma molécula reguladora do balanço TH1/TH2, através de apoptose de células TH1 (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Eosinófilos parecem ainda promover proliferação de células T efetoras ativadas, mas não de células T naive. Eosinófilos murinos promovem secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 por células T CD4⁺, e, embora tanto eosinófilos quanto células T produzam IL-4, a produção desta citocina por células T é bem maior. Após se tornarem ativos, eles degranulam em/ou ao redor dos alvos e então morrem por apoptose e são fagocitados por outras células como macrófagos. A rotatividade de eosinófilos é bastante rápida no sítio inflamatório, onde eles sobrevivem apenas por 4 a 5 horas (BEHM e OVINGTON, 2000).

2.5 – Eosinófilos e infecções helmínticas

Em camundongos C57BL/6 deficientes em IL-5 (IL-5^{-/-}) a ausência de eosinófilos não afetou a carga parasitária na infecção com o cestódeo *Mesocostoides corti*. Entretanto, a infecção por *M. corti* em camundongos não

deficientes é crônica e eventualmente resulta em morte do hospedeiro, sendo possível que eosinófilos estejam envolvidos em outras interações parasito-hospedeiro após a infecção ser resolvida (KOPF *et al.*, 1996). Diminuição na eosinofilia não altera a infecção produzida por vários helmintos (CARA *et al.*, 2000), não sendo encontradas diferenças na carga de larvas musculares de *Trichinella spiralis* em camundongos tratados com anti-IL-5 (HERNDON e KAYES, 1992) em relação aos controles não-tratados ou transgênicos para IL-5 em comparação com animais normais (HOKIBARA *et al.*, 1997).

COFFMAN *et al.* (1989) demonstraram que a inoculação de anticorpos neutralizantes de IL-5 praticamente suprime o aumento de eosinófilos no sangue e tecido induzido pela infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos (embora a infecção não seja alterada). Estudos da infecção por *N. brasiliensis* em camundongos deficientes em IL-5 indicam que eosinófilos não têm um papel crítico na iniciação de resposta TH2 induzida por este parasito. Entretanto, durante infecção primária de camundongos com *N. brasiliensis*, eosinófilos produzindo IL-4 são ativamente recrutados para o local de migração da larva no pulmão (VOEHRINGER *et al.*, 2004).

Em modelos experimentais da infecção por *Strongyloides stercoralis* em camundongos, o eosinófilo foi a principal célula efetora responsável pela morte de larvas do parasito transferidas para a cavidade peritoneal de camundongos previamente imunizados (ROTMAN *et al.*, 1996). Posteriormente, HERBERT *et al.* (2000), utilizando camundongos deficientes e transgênicos para IL-5, relataram que a diminuição das larvas de *S. stercoralis* tanto na infecção primária como secundária estava associada à presença de eosinófilos. Camundongos transgênicos para IL-5 também foram capazes de eliminar mais rapidamente um grande número de larvas durante a migração tecidual de *S. venezuelensis* e de vermes adultos cirurgicamente transplantados no intestino delgado (EL-MALKY *et al.*, 2003).

No presente estudo, trabalhamos com a infecção experimental de camundongos por *S. venezuelensis*, nematódeo que naturalmente parasita roedores, sendo que nestes hospedeiros as larvas do parasito penetram na pele ou mucosas e posteriormente apresentam uma fase migratória através dos

pulmões, traquéia, esôfago e estômago antes de se estabelecerem na mucosa do intestino delgado (TAKAMURE, 1995).

Eosinófilos são capazes de matar larvas de vários nematódeos *in vitro* e *in vivo*, mas o mecanismo responsável pela habilidade em destruí-las não é bem determinado. Entretanto, têm sido freqüentemente relacionados com a secreção das várias proteínas citotóxicas e mediadores inflamatórios presentes nos grânulos destas células. A degranulação destes mediadores no intestino, entre outros efeitos, leva à hipercontratilidade da musculatura intestinal que contribui para bloquear a invasão da mucosa intestinal por *S. venezuelensis* adultos em camundongos (EL-MALKY *et al.*, 2003). A degranulação do eosinófilo é induzida por ativação do complemento e/ou, em uma fase mais tardia da infecção ou na re-infecção, mediada por anticorpos parasito-específicos, processo denominado de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC). Além de ser a citocina mais especialmente envolvida na geração de eosinofilia, IL-5 também é um fator estimulador de crescimento de células B (KINASHI *et al.* 1986) e da produção de IgA (YOKOTA *et al.*, 1987), sendo esta a principal imunoglobulina responsável pela degranulação de eosinófilos em superfícies mucosas durante infecções helmínticas (ABU-GHAZALEH *et al.*, 1989). Apesar destes mecanismos, eosinófilos não se mostram suficientes para a completa expulsão de vermes do intestino (EL-MALKY *et al.*, 2003).

Por outro lado, apesar da grande diversidade de alterações imunopatológicas relatadas em doenças alérgicas como asma, a infiltração de eosinófilos no pulmão de pessoas asmáticas tem sido freqüentemente documentada. Evidências em modelos experimentais e em pacientes têm mostrado uma correlação positiva entre número e/ou nível de mediadores derivados de eosinófilos com a gravidade dos sintomas e perda de função pulmonar observada na asma (revisado por WILLS-KARP, 1999; CARA *et al.*, 2000; WILLS-KARP e KARP, 2004). Estes trabalhos indicam a participação de eosinófilos na indução da hiperreatividade brônquica (LEE *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 1995), na lesão tecidual e gênese da imunopatologia peri-brônquica (WILLS-KARP e KARP, 2004; HUMBLETS *et al.*, 2004) observada na resposta asmática. Também a ausência de hiperreatividade brônquica em

camundongos deficientes em IL-5 demonstra que eosinófilos são responsáveis pela patofisiologia associada com infecção por *Brugia malayi* (HALL *et al.*, 1998).

A associação de eosinófilos com a patofisiologia da asma e a falta de confirmação direta do efeito desta célula na proteção de muitas infecções helmínticas sugere, para alguns autores, que a eosinofilia detectada durante infecções por nematódeos teria um efeito maior na imunopatologia do que na proteção do hospedeiro. Apesar de vários experimentos utilizando camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-5 ou protocolos de neutralização desta citocina *in vivo* terem sido realizados, a associação ou não de eosinófilos com proteção ou patologia nestes modelos não são definitivamente convincentes, pois a manipulação desta citocina pode interferir em outros elementos da resposta imunológica, além da diferenciação de eosinófilos. Por exemplo, camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-5 apresentam menos linfócitos B1 (CD5⁺) na cavidade peritoneal e na mucosa intestinal (KOPF *et al.*, 1996). Outra consideração importante é que na ausência de IL-5, apesar da significativa redução na diferenciação de eosinófilos, outras citocinas e quimiocinas, como GM-CSF, IL-3 e eotaxina, podem atuar na diferenciação e migração destas células. Além disso, há uma pequena população de eosinófilos que se desenvolvem e funcionam na ausência de receptores funcionais para IL-5, GM-CSF e IL-3 (NISHINAKAMURA *et al.*, 1996).

Recentemente, YU *et al.* (2002) desenvolveram a linhagem de camundongo Balb/c com deficiência completa e seletiva na diferenciação de eosinófilos, denominados Δ dbIGATA. O fator de transcrição GATA-1 expresso em quatro linhagens hematopoiéticas – eritrócitos, megacariócitos, mastócitos e eosinófilos - reprograma células mielóides para 3 diferentes linhagens: eritrócitos, megacariócitos e eosinófilos. A atividade específica de GATA-1 para eosinófilos parece ser mediada por um sítio palindrômico (duplo) de alta afinidade (DU *et al.*, 2002). A deleção deste sítio de ligação no promotor GATA-1 leva à perda seletiva de eosinófilos *in vivo*. A diferenciação de eosinófilos depende de níveis elevados da expressão de GATA-1, sendo que a deleção feita em Δ dbIGATA destrói uma autoregulação positiva (DYER *et al.*, 2007). Com a utilização destes camundongos, espera-se verificar diretamente a importância

da eosinofilia na proteção, imunopatologia e alterações funcionais induzidas pela infecção por *S. venezuelensis*. Este modelo de infecção poderá ser útil na busca de novas abordagens terapêuticas que visem evitar ou diminuir a patologia causada por *S. stercoralis* no hospedeiro humano através da manipulação de mecanismos da resposta imune, especialmente eosinófilos.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a influência de eosinófilos na resposta imunológica protetora bem como nas alterações patológicas e funcionais induzidas por *Strongyloides venezuelensis* durante a infecção em camundongos Balb/c.

3.2 - Objetivos específicos

I) Verificar comparativamente a cinética da infecção por *S. venezuelensis* em camundongos seletivamente deficientes em eosinófilos e seus respectivos controles, pela quantificação de:

- a) larvas recuperadas do pulmão;
- b) vermes adultos recuperados do intestino;
- c) fecundidade dos vermes adultos em diferentes períodos da infecção.

II) Avaliar a importância da eosinofilia na indução da resposta imunológica desencadeada pela infecção por *S. venezuelensis* em camundongos, pela quantificação de:

- a) citocinas IL-10, IL-4, IL-13, IL-5 e IFN- γ no homogenato intestinal;
- b) citocinas IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de células do linfonodo mesentérico após re-estimulação *in vitro*;
- c) IgE total e níveis de IgG parasito específico no sangue.

III) Verificar comparativamente as alterações histopatológicas induzidas pela infecção por *S. venezuelensis* em camundongos deficientes em eosinófilos e seus respectivos controles pela:

- a) identificação de eosinófilos na suspensão celular obtida da medula óssea;
- b) nível de infiltração celular tecidual pela estimativa da atividade de enzimas específicas (peroxidase de eosinófilos – EPO e

mieloperoxidase - MPO) e pela contagem diferencial de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar;

c) análise histopatológica do pulmão e intestino.

IV) Verificar comparativamente as alterações funcionais induzidas pela infecção por *S. venezuelensis* em camundongos deficientes em eosinófilos e seus respectivos controles pela:

a) análise de alterações na pressão intratraqueal ao 4º dia após infecção para avaliar a hiperreatividade brônquica;

b) análise de alterações na contração intestinal ao 10º dia após infecção.

4 - METODOLOGIA

4.1 - Animais experimentais

Camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de eosinófilos (Δ dblGATA) foram importados pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, colaborador nesta dissertação, e estão sendo mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia. Camundongos Balb/c não deficientes foram adquiridos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Todos os animais utilizados para os experimentos de avaliação parasitológica e imunopatológica apresentavam idade entre 6 e 8 semanas e peso médio de 22g. Para avaliação de alterações na pressão intratraqueal foram utilizados camundongos machos com idade entre 8 e 12 semanas e peso médio de 26g. Devido a possíveis diferenças na recuperação de vermes em hospedeiros machos e fêmeas (SATO e TOMA, 1990), foram utilizados camundongos machos em experimentos para avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos, sendo que fêmeas infectadas foram usadas para estudos de alterações histopatológicas e de indução de contração intestinal.

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongo (marca Labina, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e água potável *ad libitum*. Rotineiramente, todos os animais utilizados nos experimentos são submetidos ao tratamento oral com 4mg/kg de Ivermectina (laboratório Chemitec Agro – Veterinária, São Paulo, Brasil) por 7 dias consecutivos (KLEMENT *et al.*, 1986), seguido pela inoculação oral de Cestox (MERCK - 75mg/kg) em dose única. Após o término do tratamento há um intervalo mínimo de 8 dias antes da infecção por *S. venezuelensis* devido ao possível efeito residual da Ivermectina sobre a infecção por *Strongyloides*.

Os procedimentos experimentais realizados receberam aprovação prévia do Comitê de Ética Animal (CETEA – UFMG) sob protocolo número 104/07, que se encontra em anexo.

4.2 - Parasito

Strongyloides venezuelensis foi utilizado nos experimentos aqui apresentados. O parasito foi inicialmente isolado de *Rattus norvegicus* (BRENER e CHAIA, 1960) e é mantido por passagens seriadas em ratos Wistar no Departamento de Parasitologia do ICB - UFMG.

4.3 - Obtenção de larvas - Infecção e produção de antígeno

As larvas filarióides infectantes (L₃) de *S. venezuelensis* foram obtidas a partir de cultura de fezes de ratos Wistar infectados (entre 7 e 20 dias da infecção). A coprocultura foi realizada misturando-se as fezes contendo ovos do parasito e vermiculita na proporção de 1:2 e, posteriormente, umedecendo a mistura com água para promover umidade adequada para a eclosão das larvas. Após incubação em estufa a 28°C por 72h, as larvas filarióides foram concentradas pela técnica de Baermann-Moraes, lavadas em solução fisiológica (0,85% NaCl), quantificadas e usadas para infecção. Esta foi realizada pela inoculação subcutânea, na região abdominal do hospedeiro, de 100 µl de solução fisiológica contendo 700 L₃.

As larvas infectantes L₃ de *S. venezuelensis* também foram utilizadas para produção de antígeno total de L₃. Para este propósito, as larvas infectantes recuperadas pela técnica de Baermann-Moraes foram extensivamente lavadas em PBS e ressuspendidas em PBS contendo um coquetel de inibidor de protease (1 tablete em 25 mL de PBS; Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA). A suspensão de larva foi inicialmente rompida com pérolas de vidro (212-300 microns, SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, USA) misturadas em vortex (5 ciclos de 1 min.) e, posteriormente, as larvas processadas foram transferidas para outro tubo e destruídas em sonicador (PGC Scientific, Frederick MD) utilizando-se 5 ciclos de 30 segundos em alta potência com intervalos de 1 min. O homogenato foi centrifugado a 400 g por 30 min. As proteínas solúveis de larvas filarióides foram recuperadas com o

sobrenadante e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY (1951) antes de serem aliqüotadas e estocadas a -20°C .

4.4 - Delineamento experimental

Setenta e quatro (74) camundongos Balb/c normais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: infectados e não infectados. O mesmo ocorreu para 74 camundongos Balb/c deficientes em eosinófilos ($\Delta\text{dblGATA}$). Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes para confirmação dos resultados, totalizando a utilização de 296 camundongos.

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de ketamina (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda/Divisão Vetbrands Saúde Animal) na dose de 80 mg/kg e xilazina (Kensol, Laboratórios König S. A.) na dose de 16 mg/kg de peso do animal. A associação entre os anestésicos tem por objetivo diminuir os efeitos colaterais indesejáveis dos compostos aplicados, não somente pelas doses menores de cada um, como também pelo equilíbrio dos efeitos específicos.

Como apresentado na figura 1, vinte e quatro (24) camundongos Balb/c machos infectados, 24 camundongos $\Delta\text{dblGATA}$ machos infectados, 6 Balb/c e 6 $\Delta\text{dblGATA}$ machos não infectados foram inicialmente utilizados para avaliação parasitológica e imunológica. Aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção 6 animais de cada grupo experimental foram anestesiados e sangrados através do plexo braquial para obtenção de soro, sendo que o mesmo foi feito para os animais não infectados no primeiro dia de experimento. Após a morte do animal por overdose de anestésico/analgésico a traquéia foi canulada para lavagem broncoalveolar. Os pulmões foram então retirados, sendo que o lobo direito foi imediatamente congelado para posterior quantificação de citocinas e atividade enzimática: peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO). Nos animais infectados, aos 2 dias de infecção, o lobo pulmonar esquerdo foi utilizado para contagem de larvas do parasito. O intestino delgado destes animais também foi cirurgicamente retirado, sendo que a metade anterior (duodeno e jejuno proximal) foi utilizada para recuperação e contagem de

vermes e a metade posterior do intestino delgado foi congelada para quantificação de citocinas, EPO e MPO. Aos 7, 10 e 14 dias após infecção o reto de cada animal necropsiado foi retirado e as fezes coletadas para quantificação de ovos do parasito.

Para completar a análise imunológica foram utilizados 12 camundongos machos Balb/c e 12 camundongos machos Δ dblGATA, sendo que metade deles, ou seja, 6 Balb/c e 6 Δ dblGATA, foram individualmente infectados com *S. venezuelensis*. Todos os animais foram anestesiados e sacrificados após 6 dias de infecção, devido a resultados preliminares obtidos pela quantificação de citocinas no homogenato intestinal aos 7 dias após infecção, quando verificamos um possível atraso na produção de citocinas em animais Δ dblGATA. Os linfonodos mesentéricos destes animais foram aspticamente removidos para cultivo celular e quantificação de citocinas. Também foram retirados os pulmões e a metade distal do intestino delgado para posterior homogeneização e quantificação de citocinas.

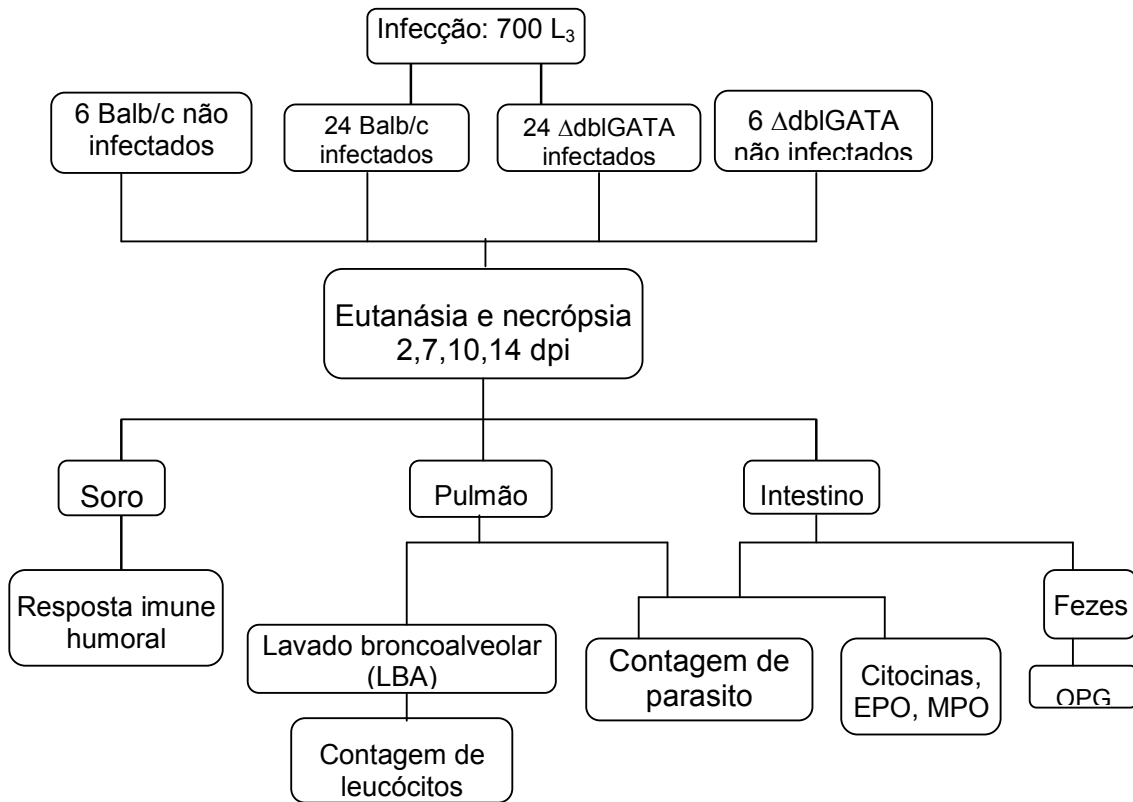


Figura 1 – Delineamento experimental

Em outro momento, 6 camundongos Balb/c e 6 camundongos Δ dbIGATA não infectados, 6 camundongos Balb/c e 6 camundongos Δ dbIGATA, todos machos, ao 4º dia de infecção, foram anestesiados para avaliação da reatividade brônquica a doses sucessivas de metacolina e submetidos à lavagem broncoalveolar e da medula óssea femural.

A análise histopatológica e a contratilidade intestinal foram realizadas em um grupo separado de animais composto por 20 fêmeas Balb/c e 20 fêmeas Δ dbIGATA, conforme detalhado na figura 2. Três camundongos Balb/c e três Δ dbIGATA não infectados foram usados como controles e tiveram retirados seu pulmão direito e intestino delgado para preparações histológicas. Três camundongos Balb/c e três Δ dbIGATA com 4 dias de infecção também tiveram seu pulmão esquerdo retirado para histologia. Aos 7 e 10 dias de infecção, 3 camundongos Balb/c e 3 Δ dbIGATA tiveram seu intestino delgado retirado para histologia. Também ao 10º de infecção mais 5 camundongos Balb/c e 5 camundongos Δ dbIGATA infectados, 3 camundongos Balb/c e 3 Δ dbIGATA não infectados, tiveram seu intestino retirado para medida da contração intestinal.

A metodologia utilizada nas análises parasitológica, imunológica, histopatológica e funcional está detalhadamente descrita nos itens seguintes.

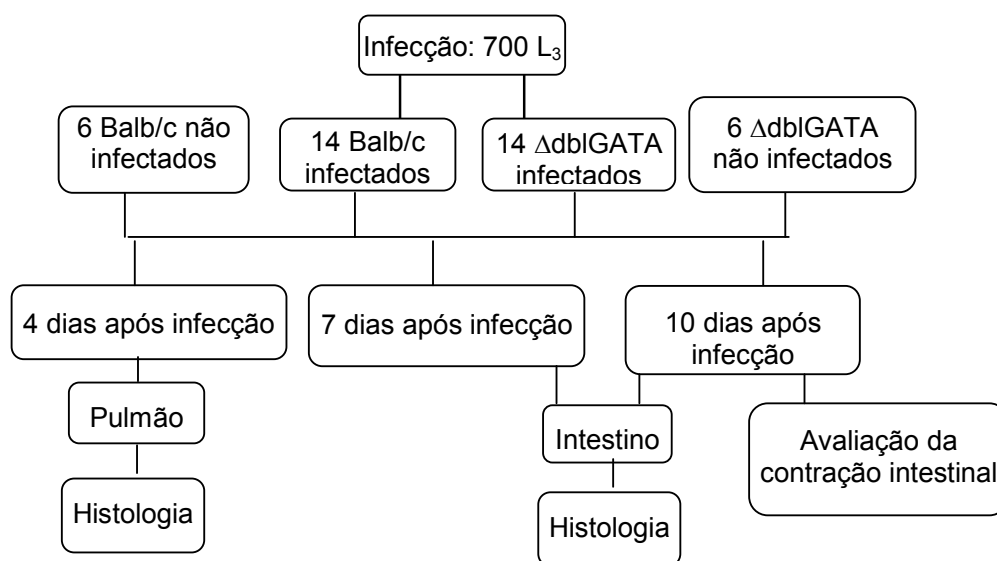


Figura 2 – Delineamento experimental

4.5 - Avaliação da infecção

A infecção por *S. venezuelensis* nos diferentes grupos experimentais foi avaliada pela quantificação de larvas recuperadas do pulmão 2 dias após a infecção, de ovos nas fezes e de vermes adultos recuperados do intestino de camundongos 7, 10 e 14 dias após a infecção, conforme metodologia descrita por NEGRÃO-CORRÊA *et al.* (2004).

As larvas presentes no pulmão 2 dias após a infecção foram quantificadas após a dissecação do lobo pulmonar esquerdo, que foi picotado e colocado sobre uma tela dentro de cálice de sedimentação contendo solução salina (0,85% NaCl), sendo os cálices incubados em banho-maria por 4h a 37°C. Após este período, as larvas depositadas no fundo dos cálices foram contadas através de microscópio estereoscópio. O lobo direito do pulmão de cada animal foi retirado e armazenado a -70°C para posterior homogeneização e quantificação de citocinas, EPO e MPO.

Para recuperação de vermes adultos de *S. venezuelensis*, a metade proximal do intestino delgado dos animais infectados foi aberta longitudinalmente, colocada sobre uma tela dentro de cálice de sedimentação contendo solução salina (0,85% NaCl), sendo os cálices incubados em banho-maria por 4h a 37°C. Após este período os vermes adultos depositados no fundo dos cálices foram contados em microscópio estereoscópio e os intestinos foram colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica para quantificação dos vermes aderidos à mucosa que foram somados ao total. A metade distal do intestino delgado foi lavada em solução fisiológica e armazenada a -70°C para posterior homogeneização e quantificação de citocinas, EPO e MPO.

O número de ovos foi quantificado após pesagem de fezes formadas coletadas no reto de cada animal, diluídas em volume conhecido de solução fisiológica contendo 10% de formalina. Foram examinadas pelo menos duas amostras de 100µL do material fecal de cada animal em microscópio óptico. A contagem de ovos foi expressa como número de ovos por grama de fezes.

O número de ovos por grama de fezes dividido pelo total de fêmeas adultas presentes no mesmo animal forneceu o valor da fecundidade destes vermes.

4.6 - Composição celular: medula óssea e infiltrado pulmonar

A obtenção de células da medula óssea foi feita como descrito por NEGRÃO-CORRÊA *et al.* (2003) através da lavagem do fêmur direito e esquerdo por injeção de 5 mL de PBS contendo heparina (50 IU/mL). A solução recuperada foi homogeneizada e centrifugada a 200 g por 7 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS contendo 3% de BSA (PBS-BSA) e alíquotas de 5 µL da suspensão celular foram utilizadas para confecção de lâminas em Cytospyn (Shandon Cytospyn III - 450 rpm por 3 min.) e coradas pela técnica May-Grunwald-Giemsa. Este procedimento foi feito 4 dias após a infecção por *S. venezuelensis*, tanto em animais não deficientes (Balb/c) quanto em animais geneticamente deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA).

Para avaliação do infiltrado celular no espaço alveolar, cada animal eutanasiado foi submetido ao procedimento de obtenção do lavado broncoalveolar (LBA). Este procedimento consistiu de traqueotomia seguida de inoculação e aspiração de 1 mL de tampão fosfato (PBS – 13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,14 mM de KH_2PO_4 e 0,43 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) contendo 0,3% de albumina bovina (BSA – Sigma, Germany). A solução foi inoculada e aspirada por 3 vezes através de uma cânula inserida na traquéia do animal. A solução contendo as células recuperadas dos alvéolos pulmonares foi transferida para um tubo mantido a 4 °C e todo o procedimento foi repetido por mais 2 vezes, sendo inoculado um total de 3 mL por animal. Toda solução recuperada de cada animal foi centrifugada (200 x g, 4°C por 7 min.) e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento contendo as células recuperadas dos alvéolos dos animais foi ressuspensionado em 100 µL de PBS contendo 3% de BSA (PBS-BSA).

O número total de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar de cada animal foi estimado através da contagem das células em câmara de

Neubauer, sendo utilizadas amostras de LBA diluídas (1:10) em solução de Turk (15 mL de ácido acético glacial, 0,2 mL de violeta genciana a 2%, 500 mL de água destilada). Para contagem diferencial de leucócitos, alíquotas de LBA contendo 5000 células suspensas em PBS-BSA foram utilizadas para confecção de lâminas em Cytospyn (Shandon Cytospyn III - 450 rpm por 3 min.) e coradas pela técnica May-Grunwald-Giemsa. Para cada lâmina, 200 células foram examinadas através de microscópio óptico e diferenciadas em mononucleares, eosinófilos e neutrófilos através de critérios morfológicos padrões para a diferenciação leucocitária. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células $\times 10^4$ /mL de lavado broncoalveolar.

A infiltração e/ou ativação de eosinófilos e neutrófilos no parênquima pulmonar e no intestino foi indiretamente estimada através da atividade enzimática destas células. Para eosinófilos, foi quantificado o nível de peroxidase de eosinófilo (EPO) nos tecidos dos animais infectados e não infectados, conforme padronização de STRATH (1985) detalhadamente descrita com modificações por SILVEIRA *et al.* (2002). Resumidamente, este procedimento consistiu da homogeneização do tecido com PBS (100 mg de tecido/ 1,9 mL de PBS), sendo o homogenato resultante centrifugado (3000 x g por 10 min.) e o sobrenadante descartado. As hemácias presentes no sedimento foram então lisadas através da adição de solução hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl a 0,2 %) e, após 30 s, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de igual volume (1,5 mL) de solução 1,6 % de cloreto de sódio contendo 5 % de glicose. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante o material foi ressuscitado em tampão fosfato contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), pH 7,4 para lise das membranas celulares. O material foi então homogeneizado e submetido a congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes, com o objetivo de romper as vesículas que contêm peroxidase. As amostras foram então centrifugadas (3000 x g por 10 min.) e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático feito em placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc.

USA). Este ensaio consistiu da adição de 75 μL de cada amostra ou diluente (não infectado) a 75 μL de solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio (O-phenylenediamina dihydrochloride, OPD – 1,5 mM, em tampão Tris-HCl – 75 mM, pH 8 suplementado com H_2O_2 – 6,6 mM). A reação foi interrompida pela adição de 50 μL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M, sendo a intensidade da cor estimada através da leitura da absorbância no leitor de ELISA em comprimento de onda de 492nm.

Para estimativa da infiltração e/ou ativação de neutrófilos nos tecidos do hospedeiro, foi estimada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino e no pulmão dos camundongos infectados e controles, conforme descrito por BAILEY, (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). De forma sucinta, o tecido (100 mg) foi homogeneizado com 1,9 mL de tampão de extração (0,1 M NaCl, 0,02 M Na_3PO_4 , 0,015 M NaEDTA em pH 4,7), centrifugado e o sedimento submetido a lise hipotônica, semelhante ao detalhado para EPO. Após centrifugação e descarte do sobrenadante o sedimento foi homogeneizado com tampão fosfato (0,05 M de Na_3PO_4 , pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) para lisar membranas celulares. Este homogenato foi então centrifugado e o sobrenadante congelado e descongelado por três vezes em nitrogênio líquido para lise de vesículas. O material resultante foi centrifugado e o sobrenadante utilizado no método colorimétrico da seguinte maneira: 25 μL da amostra foram acrescentados a placas (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 μL de solução contendo TMB (3,3'-5,5'-tetramethylbenzine diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM) seguindo-se à incubação a 37°C por 5 min. Após este período foram adicionados 100 μL de substrato H_2O_2 0,5 mM diluídos em tampão fosfato (0,05 M de Na_3PO_4 , pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) e incubados a 37°C por 5 min. A reação foi parada por adição de 100 μL de solução H_2SO_4 1 M e foi quantificada através da absorbância em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm.

Os dois tipos de peroxidase (EPO e MPO) são diferenciados nestes ensaios principalmente pelos valores de pH das soluções utilizadas dado que cada enzima possui seu pH específico de ação. Trabalhos anteriores

demonstraram que a reatividade cruzada de EPO/MPO foi menor que 1% usando esta análise (COLLINS *et al.*, 1995).

4.7 - Quantificação de citocinas

Os níveis de citocinas, IL-10, IL-4, IL-13, IL-5 e IFN- γ , presentes na mucosa intestinal ou pulmonar de camundongos infectados foram avaliados no homogenato obtido pela maceração de 100 mg de tecido em um homogeneizador de tecidos na presença de 1 mL de PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases (0,01 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina A). O homogenato resultante foi centrifugado e o sobrenadante recolhido, aliquoteado e imediatamente congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas através da técnica de ELISA.

As citocinas IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ também foram quantificadas no sobrenadante de cultura de células dos linfonodos mesentéricos obtidos de animais não infectados e com 6 dias de infecção com *S. venezuelensis* e re-estimuladas, *in vitro*, por 72 h com antígeno solúvel de L₃. Sob condições estéreis, animais eutanasiados tiveram seus linfonodos mesentéricos retirados, macerados através de tela de 70 μm com meio RPMI para se obter uma suspensão celular. Esta suspensão foi centrifugada (200 x g, 4 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min.) e as células do sedimento ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St. Louis MO, USA) contendo 15 mM de HEPES e 24 mM NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 60 mg/L de gentamicina. As células foram quantificadas e distribuídas em placas de 96 poços para cultura de células Costar (Corning, NY). Foram plaqueadas 1×10^6 células/poço, sendo cultivadas em duplicata em 200 μl de meio completo ou meio contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ of Concanavalina A (ConA, Sigma) ou ainda meio com 100 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno do parasito. As placas foram então mantidas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, com 5% de CO₂ por 72h.

Para dosagem de citocinas foram utilizados kits para ELISA de camundongo (Duoset, R&D Systems) segundo instruções do fabricante. Concentrações conhecidas de proteínas recombinantes foram usadas para gerar curva padrão para conversão de leituras de densidade óptica das amostras para pg/mL. A sensibilidade da análise para IL-4 foi de 15,62 pg/mL, para IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α foi de 31,25 pg/mL e para IL-13 foi de 62,5 pg/mL.

4.8 - Avaliação da resposta humoral

Amostras de sangue foram coletadas do plexo braquial dos camundongos anestesiados para obtenção de soro. O sangue coletado de cada animal foi estocado a 4°C por aproximadamente 4 h para maior retração do coágulo. O soro foi então centrifugado (200 g, 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior quantificação de imunoglobulinas.

A concentração de IgE total presente no soro dos animais infectados e não infectados foi estimada utilizando um kit de ELISA comercialmente disponível e de acordo com as instruções do fabricante (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Texas). Resumidamente, placas de 96 poços Nunc Maxisorp (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) foram sensibilizadas com 1 μ L de anticorpo de captura (A90-115A) diluído em 100 μ L de tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 para cada poço, permanecendo por 1h a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (tampão Tris-NaCl: Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, contendo 0,05% Tween 20, pH 8). As placas foram bloqueadas por 30 min com tampão Tris-NaCl contendo 1% de BSA e lavadas como descrito anteriormente. As amostras de soro foram diluídas (1:200) em tampão de diluição (tampão de lavagem contendo 1 % BSA). Concentração conhecida da proteína recombinante fornecida pelo fabricante também foi diluída em tampão de diluição (250 – 3,9 ng/mL) e aplicada, em duplicata, nas placas para gerar a curva padrão utilizada para transformar as leituras de absorbância das amostras em concentração de proteína. As placas contendo as amostras foram novamente incubadas a

temperatura ambiente por 1h e lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem. Imunoglobulina – E (IgE) presente nos poços foi revelada pela incubação com o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase (1:10000) por 1 h a temperatura ambiente seguido por 3 lavagens e revelação da reação através da adição do substrato (H_2O_2 0,5 M em solução de OPD 4 mM diluído em tampão citrato pH 5). As placas foram incubadas durante 20 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a reação foi interrompida pela adição de solução 2 N de H_2SO_4 (50 μ L/poço). A leitura da intensidade de cor foi realizada no leitor de microplacas com filtro de 492 nm.

As concentrações de IgG1 e IgG2a parasito-específicas foram estimadas através da sensibilização de placas de 96 poços Nunc Maxisorp com 100 μ L de antígeno solúvel de L_3 na concentração de 10 μ g/mL diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 sendo a placa incubada “overnight” a 4°C. Após a lavagem com PBS-Tween 20 (0,05%) por 3 vezes, as placas foram então bloqueadas com PBS-Tween 20 contendo 1% de albumina bovina por 1h à temperatura ambiente. Após nova lavagem como anteriormente descrito, as amostras de soros recolhidas dos animais experimentais foram diluídas (1:100) em PBS-Tween 20 contendo 0,1% de albumina bovina e incubadas por 1h à temperatura ambiente. Após incubação e lavagem com PBS-Tween 20 por 3 vezes foram adicionados 100 μ L de PBS contendo anticorpo de detecção conjugado a biotina na diluição de 1:1000. O anticorpo de detecção utilizado neste teste foi produzido em cabra, anti-IgG1 (A90-105A) e anti-IgG2a (A90-107A) de camundongo (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Texas). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 e foi adicionado o substrato (H_2O_2 0,5 M em solução de OPD 4 mM diluído em tampão citrato pH 5). Após 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz a reação foi interrompida pela adição de solução 2 N de H_2SO_4 (50 μ L/poço). A leitura da intensidade de cor foi realizada no leitor de microplacas com filtro de 492nm.

4.9 - Análise histopatológica

O pulmão foi retirado de animais não infectados 4 dias após a infecção e fixado em formalina 10% tamponada. Uma porção de cerca de 4 cm foi recolhida da região anterior do duodeno de cada animal ao 7º e 10º dia de infecção. Estas porções foram abertas longitudinalmente e lavadas em solução salina 0,85%, pH 7,2 a 37°C para retirada das fezes e fixadas em formalina tamponada. Todo o material fixado em formalina foi lavado por 3 h em água corrente 48 horas após a fixação e então colocado em álcool 70%. Posteriormente, todo o material foi desidratado em séries crescentes de álcool (70º GL a absoluto), clarificado em xilol e embebido em parafina. A seguir foram realizados cortes de 4µm de espessura, sendo os pulmões e a primeira porção do intestino corados com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson (pulmões) para observação do infiltrado inflamatório e lesões provocadas pela infecção.

4.10 - Hiperreatividade brônquica

A avaliação de alterações na pressão intratraqueal ao 4º dia após infecção foi utilizada como parâmetro indireto para avaliar a hiperreatividade brônquica em animais de todos os grupos (adaptada de SILVEIRA *et al.*, 2002 e FERREIRA *et al.*, 2007). Para isto os camundongos foram anestesiados com solução de ketamina na dose de 87,5 mg/kg (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda/Divisão Vetbrands Saúde Animal) e xilazina na dose de 12,5 mg/kg (Kensol, Laboratórios König S. A.) e sua traquéia canulada usando agulha de 22G1. Um conector de 3 vias foi ligado à agulha, ao ventilador (Harvard Apparatus Mouse Ventilator – Model 687) e a um transdutor de pressão diferencial (Differential Pressure Transducer – Modelo MP100ACE – Biopac Systems). A ventilação mecânica do animal foi feita com 10mL de ar/kg a uma frequência de 150 respirações/minuto com exalação passiva através de uma coluna de água mantida a uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 2-3 cm de água. Os camundongos foram paralisados com brometo de pancurônio (PANCURON® - CRISTÁLIA). A variação da pressão intratraqueal

após injeção de doses crescentes de metacolina (acetyl β -methylcholine chloride – SIGMA) foi usada como uma medida indireta da resistência pulmonar. Dados são expressos como porcentagem de aumento na pressão intratraqueal em comparação à linha basal.

4.11 - Contração intestinal

Camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical no 10º dia após infecção. Desprezou-se o 1º centímetro do intestino delgado, abaixo do estômago, sendo que o próximo 1 cm do duodeno foi suspenso longitudinalmente em tubo contendo solução fisiológica de Krebs (4,74 mM de KCl, 2,54 mM de CaCl₂, 18,5 mM de NaCl, 1,19 mM de NaH₂PO₄, 1,19 mM de MgSO₄ e 25 mM de NaHCO₃) a 37°C, continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Uma das extremidades do intestino foi adaptada a um transdutor isométrico de tensão (World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA). O intestino então submerso na solução de Krebs foi submetido a uma tensão de 1g. O sinal (contração) foi amplificado e transmitido para computador, através do programa de aquisição de dados WinDaq. Aguarda-se cerca de 40 minutos para que a contração intestinal se estabilize e então se aplicam doses crescentes (10⁻⁸ a 10⁻⁵ M) de carbacol. Iniciando a partir da menor dose, espera-se 5 minutos, e então se procede à troca da solução de Krebs, aguardando 10 minutos para que se estabilize novamente. Procede-se da mesma maneira para as doses posteriores. Dados são expressos como porcentagem de aumento na contração intestinal em comparação à linha basal de cada animal.

4.12 - Análise estatística

Dados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando teste t de Student (2 grupos) ou teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Diferenças de $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

5 - RESULTADOS

5.1 – Avaliação parasitológica

5.1.1 - Recuperação de larvas de *S. venezuelensis* do pulmão de camundongos

A análise dos pulmões de camundongos Balb/c no 2º dia após a infecção com *S. venezuelensis* resultou na recuperação de $24,25 \pm 9,6$ larvas/lobo pulmonar de camundongos não deficientes e $55,5 \pm 6,7$ larvas nos camundongos Δ dblGATA, animais geneticamente deficientes em eosinófilos. A diferença na recuperação de larvas do pulmão destes animais foi estatisticamente significativa ($P < 0.05$), sendo observado um aumento de cerca de 130 % no número de parasitos recuperados em camundongos Δ dblGATA nesta fase da infecção (gráfico 1).

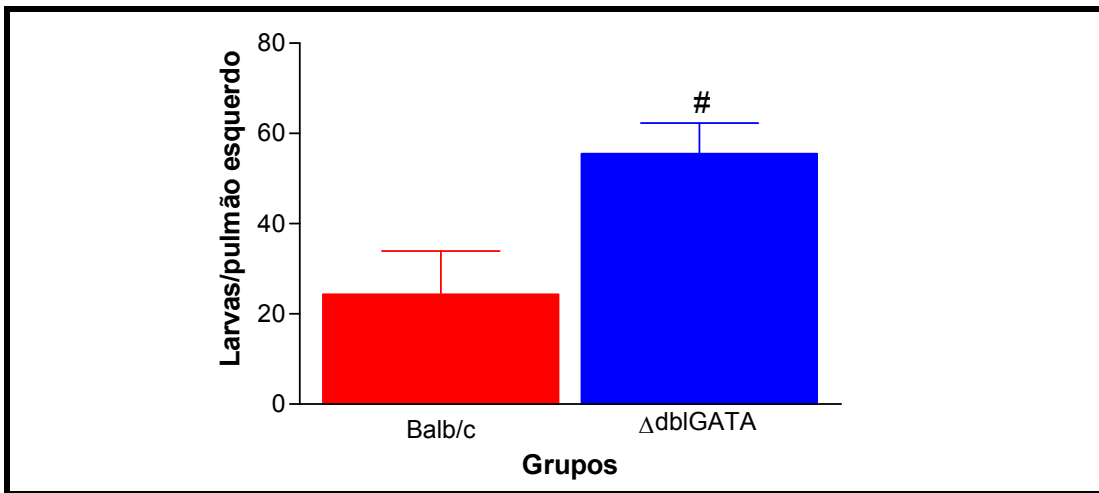


Gráfico 1 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) 2 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. # P = 0,0254 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa média \pm erro padrão, n = 5-6 animais/grupo.

5.1.2 – Recuperação de vermes adultos no intestino delgado de camundongos

A contagem de vermes adultos de *S. venezuelensis* no intestino delgado dos animais infectados revelou que o número de vermes recuperados foi estatisticamente maior em camundongos Δ dbIGATA em relação aos camundongos Balb/c durante toda a infecção (gráfico 2). Aos 7 dias pós-infecção (dpi) animais Δ dbIGATA infectados apresentavam 49 % mais vermes que os animais não deficientes (Balb/c = $203,4 \pm 23,7$ vermes/intestino vs Δ dbIGATA = $304 \pm 28,2$ vermes/intestino; $p < 0,05$). Esta diferença se acentuou aos 10 dpi, sendo encontrados 5,6 vezes mais vermes no intestino dos animais Δ dbIGATA que em Balb/c infectados. Além disso, aos 14 dpi, não foram recuperados vermes no intestino de animais Balb/c, enquanto que em camundongos Δ dbIGATA estes ainda ocorrem (48 ± 27 vermes).

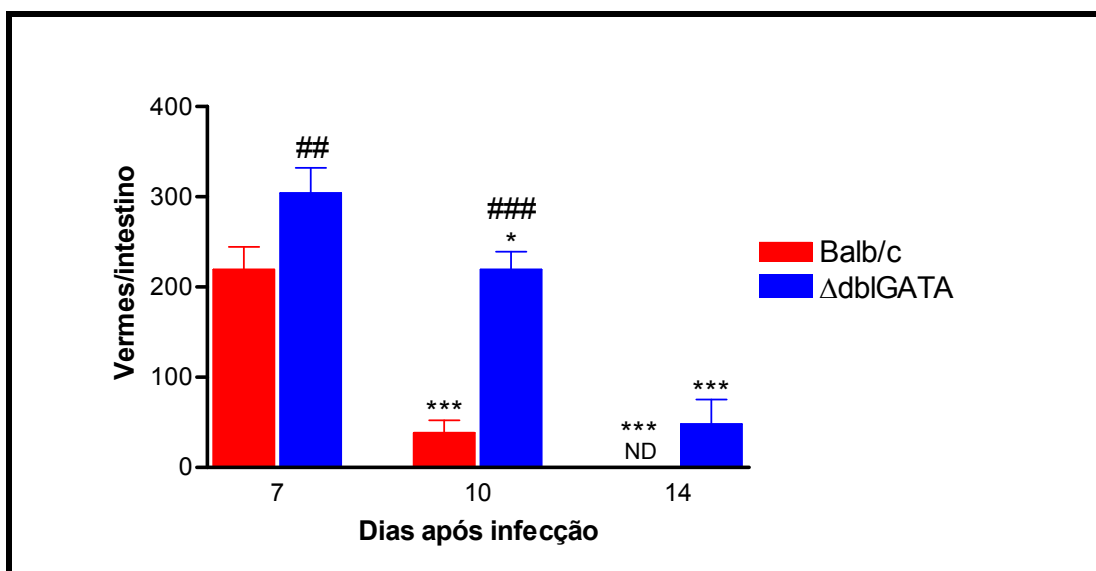


Gráfico 2 - Número de vermes adultos recuperados do intestino delgado de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L_3 de *S. venezuelensis*. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ em relação ao número obtido nos 7 dpi com os animais de mesma linhagem. ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. ND – não detectável. Cada ponto representa média \pm erro padrão, $n = 5-6$ animais/grupo.

5.1.3 – Eliminação de ovos e fecundidade das fêmeas de *S. venezuelensis*

A contagem ovos nas fezes aos 7 dias da infecção resultou no encontro de 157900 ± 36120 ovos/ g fezes em camundongos Balb/c e 142400 ± 37390 ovos / g fezes em camundongos Δ dblGATA, números estatisticamente semelhantes. Já aos 10 dias da infecção, houve uma acentuada diferença entre os grupos, sendo encontrados 9783 ± 616 ovos / g de fezes em Balb/c, enquanto que no grupo de camundongos Δ dblGATA foram encontrados 92750 ± 14430 ovos / g fezes. Somente foram encontrados ovos no 14º dia de infecção no grupo formado por animais Δ dblGATA, sendo 10350 ± 10080 ovos por grama de fezes (gráfico 3).

A fecundidade das fêmeas de *S. venezuelensis* foi avaliada através da razão do número de ovos por grama de fezes pelo número de fêmeas recuperadas do intestino do mesmo animal. Conforme mostrado no gráfico 4, não houve diferença significativa na fecundidade dos vermes recuperados nos dois grupos de camundongos aos 7 e 10 dias após a infecção. Não foi possível calcular a fecundidade do grupo formado por animais Balb/c no 14º dia de infecção visto que não havia ovos nas fezes destes camundongos neste período.

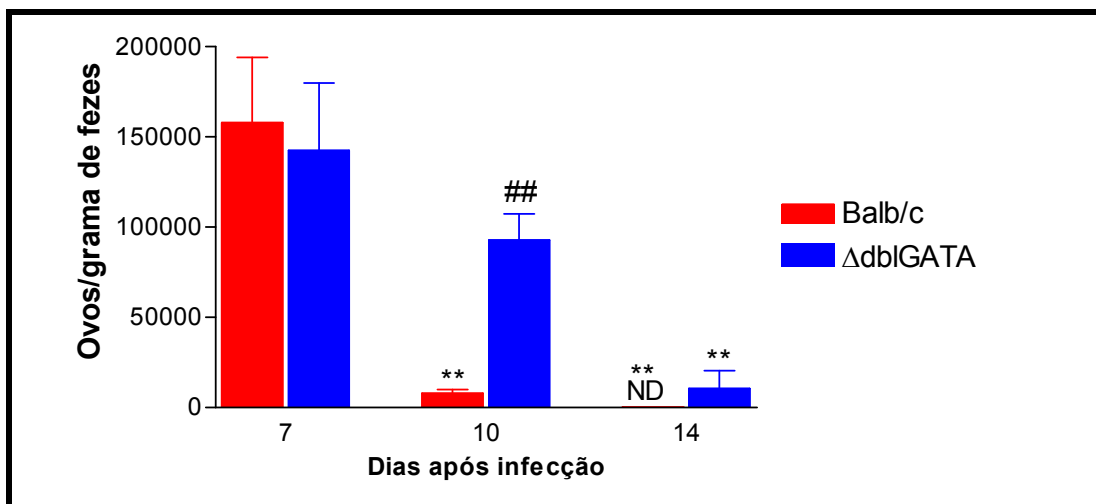


Gráfico 3 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. ** P<0,01 em relação ao número obtido nos 7 dpi com os animais de mesma linhagem. ## P<0,01 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. ND – não detectável. Cada ponto representa média \pm erro padrão, n= 5-6 animais/grupo.

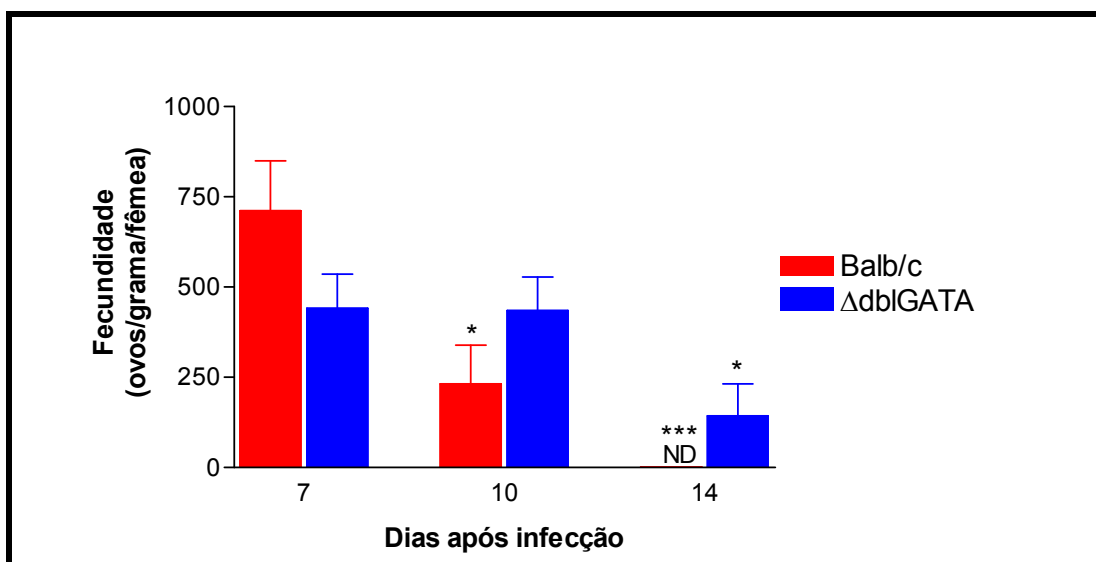


Gráfico 4 – Fecundidade (Número de ovos/ g de fezes/ fêmeas) das fêmeas de *S. venezuelensis* presentes em camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. * P<0,05; * P<0,001 em relação ao número obtido aos 7 dpi com os animais de mesma linhagem. ND – não detectável. Cada ponto representa média \pm erro padrão, n= 5-6 animais/grupo.**

5.2 - Avaliação imunológica

5.2.1 - Composição celular da medula óssea

Para comprovar a ausência de eosinófilos nos camundongos Δ dblGATA utilizados nestes experimentos, na figura 3 apresentamos amostras de células recuperadas de lavado de medula óssea femural, onde pode ser observada a presença de eosinófilos em camundongos Balb/c não deficientes e ausência destas células em material coletado de animais geneticamente deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA). Em ambos os grupos podem ser identificados mononucleares e neutrófilos nas lâminas confeccionadas a partir do lavado de medula óssea.

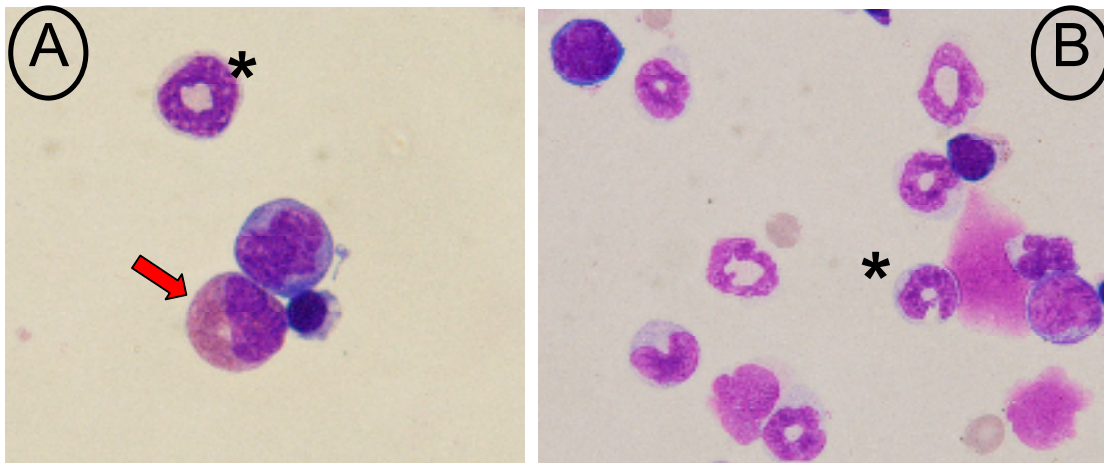


Figura 3 – Células presentes em lavado da medula óssea de camundongos Balb/c não deficientes (A) e de camundongos Δ dblGATA (B) durante a infecção por *S. venezuelensis*. A seta vermelha mostra um eosinófilo presente somente em camundongo Balb/c não deficiente e o asterisco identifica neutrófilos presentes em grande número no lavado recolhido de ambos os grupos de camundongos. Coloração May-Grunwald-Giemsa. Aumento de 100X.

5.2.2 – Avaliação do infiltrado celular pulmonar

Para a avaliação do infiltrado celular pulmonar em resposta à passagem das larvas do parasito foi realizada contagem de células recuperadas através de lavado broncoalveolar (LBA) e da quantificação de níveis de EPO como

medida indireta da presença de eosinófilos e de MPO como medida indireta da presença de neutrófilos no homogenato de tecido pulmonar.

A recuperação de células no LBA e a quantificação de níveis de EPO também foram utilizadas como forma de comprovação da ausência de eosinófilos em camundongos Δ dblGATA no decorrer da infecção por *S. venezuelensis*.

5.2.2.1 – Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar

Conforme demonstrado no gráfico 5A, no 4º dia de infecção, após a saída das larvas do parasito dos pulmões para o intestino do hospedeiro, houve um aumento significativo no número de células no lavado broncoalveolar, evidenciando a inflamação pulmonar típica deste período. O aumento ocorreu em camundongos infectados de ambos os grupos experimentais e não houve diferenças entre eles. A elevação no número total de leucócitos foi transitória retornando a níveis próximos de normais a partir de 10 dpi, em ambos os grupos experimentais.

A grande maioria dos leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar dos camundongos correspondeu a células mononucleares, sendo que também não foi verificada diferença estatística entre os dois grupos de animais estudados (gráfico 5B). Os neutrófilos encontrados no lavado broncoalveolar representaram uma pequena parcela do número total de células recolhidas e as variações entre os grupos também não foram estatisticamente significativas (gráfico 5C).

A composição celular do LBA recuperado após 4 dias de infecção, momento de maior infiltração celular encontra-se detalhada no gráfico 6. Os dados confirmam a presença de eosinófilos apenas no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos Balb/c não deficientes, como ilustrado na figura 4.

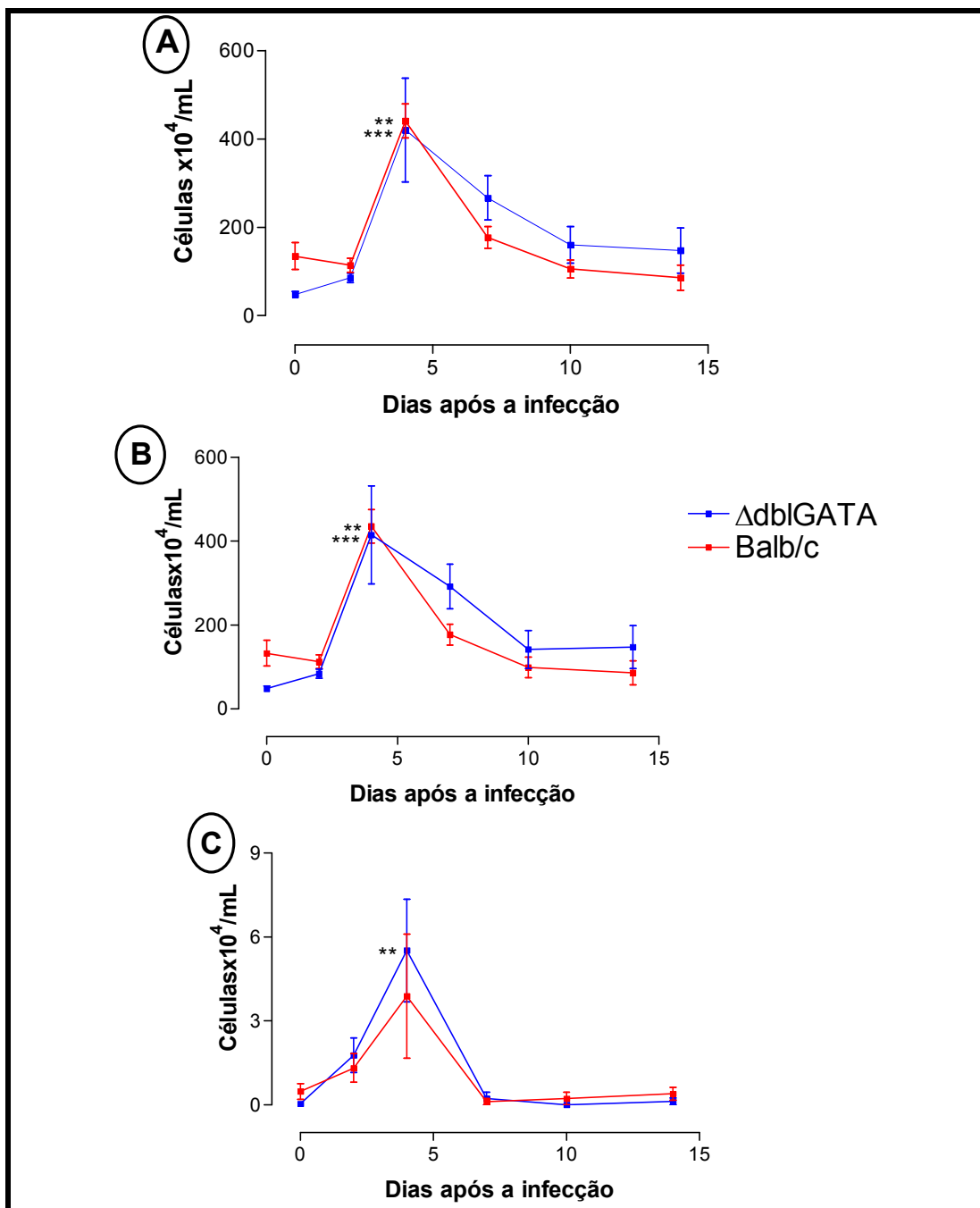


Gráfico 5 – Avaliação do número de leucócitos totais (A), células mononucleares (B) e neutrófilos (C) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos Δ dbiGATA não infectados (dia 0) e aos 2, 4, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. ** P<0,01 / * P<0,001 em relação ao número obtido em camundongos não infectados da mesma linhagem. Cada ponto representa média \pm erro padrão, n= 5-6 animais/grupo.**

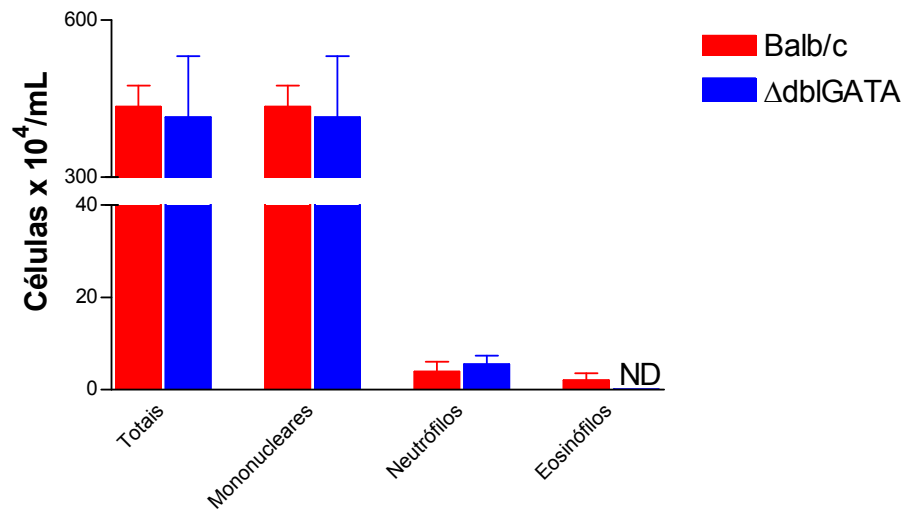


Gráfico 6 - Número de leucócitos totais, mononucleares, neutrófilos e eosinófilos no lavado broncoalveolar recuperado dos diferentes grupos experimentais aos 4 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. Cada ponto representa média ± erro padrão, n= 5-6 animais/grupo.

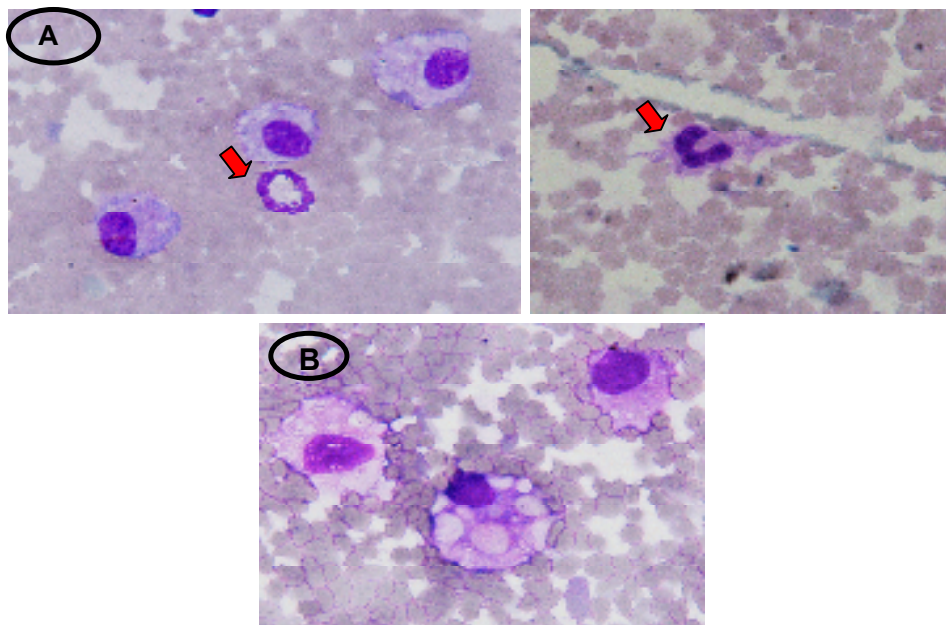


Figura 4 – Células do LBA de camundongos Balb/c não deficientes (A) evidenciando grande quantidade de hemácias, macrófagos e destacando (setas) neutrófilos e eosinófilos, à esquerda e direita, respectivamente. (B) Células do LBA de camundongos ΔdbIGATA com hemácias e macrófagos. Coloração May-Grunwald-Giemsa. Aumento de 100X.

5.2.2.2 – Eosinofilia pulmonar

A quantificação dos níveis de EPO no homogenato pulmonar foi utilizada como uma medida indireta da quantidade de eosinófilos presentes neste tecido (gráfico 7). Em animais Balb/c não deficientes ocorre um aumento estatístico nos níveis de EPO aos 2 e 4 dias após a infecção por *S. venezuelensis*, sendo que estes níveis são reduzidos após o 7º dia de infecção, quando vermes já se instalaram no intestino delgado. Os níveis de EPO nos animais Δ dbIGATA foram menores que aqueles encontrados em animais Balb/c não infectados.

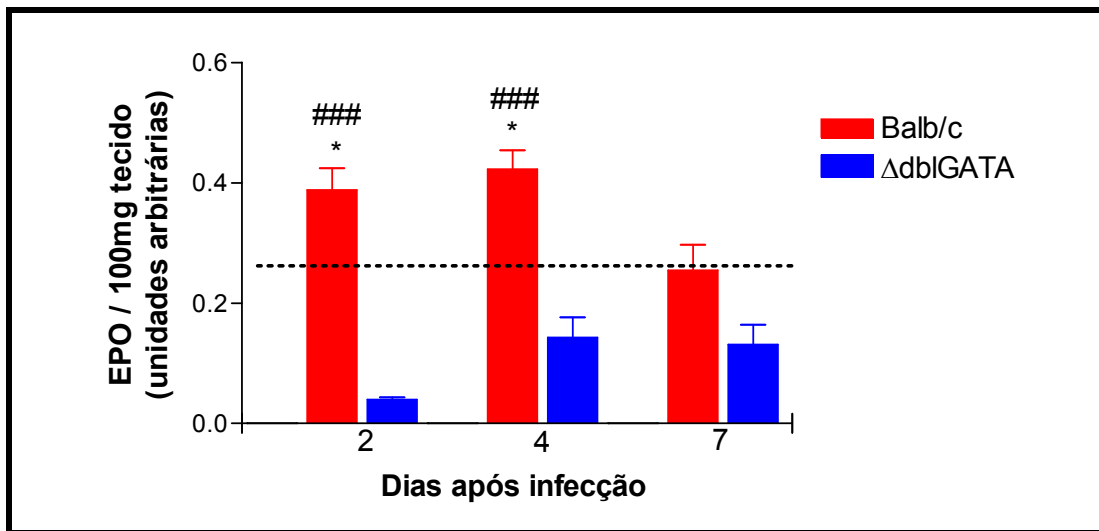


Gráfico 7 - Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato pulmonar de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de EPO em camundongos não infectados. * P<0,05 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. # P<0,05; ### P<0,001 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

5.2.2.3 – Neutrofilia pulmonar

A quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar foi utilizada como uma medida indireta da quantidade/ativação de neutrófilos presentes neste tecido (gráfico 8). Em animais não deficientes em eosinófilos (Balb/c) a atividade de MPO no homogenato pulmonar foi estatisticamente elevada aos 4 e 6 dias após a infecção em relação aos Balb/c

não infectados. Elevação dos níveis de MPO também foi verificado no homogenato pulmonar de camundongos Δ dblGATA infectados, mas o aumento ocorreu somente aos 6 dias da infecção. Por outro lado, os níveis de MPO nos animais Δ dblGATA infectados foram sempre menores que aqueles encontrados em animais Balb/c, sendo que no 4º dpi, esta diferença foi significativa ($P < 0,001$).

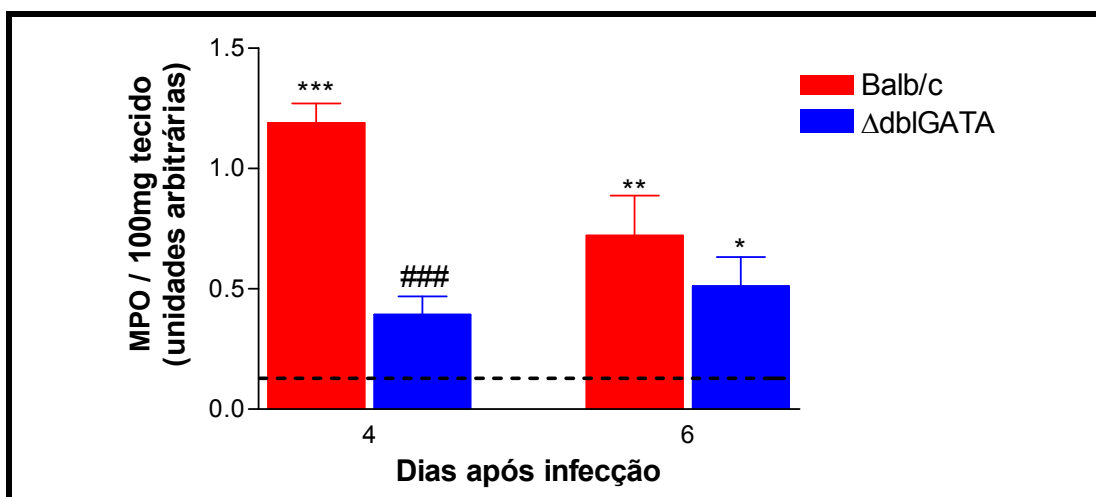


Gráfico 8 – Níveis de mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de MPO em camundongos Balb/c e Δ dblGATA não infectados. * $P < 0,05$ / ** $P < 0,01$ / $P < 0,001$ em relação a Balb/c não infectado. ### $P < 0,001$ na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

5.2.2.4 - Avaliação das alterações histopatológicas pulmonares

As figuras 5, 6 e 7 ilustram as alterações histopatológicas ocorridas no pulmão em decorrência da infecção por *S. venezuelensis*. O parênquima pulmonar dos animais não infectados (figura 5A) mostra espaços alveolares livres, sem infiltração celular e com bronquíolos e vasos intactos. Aos 4 dias após a infecção por *S. venezuelensis*, os cortes corados por hematoxilina e eosina mostram extensas áreas hemorrágicas com intenso infiltrado celular, que resulta em completa desestruturação da arquitetura alveolar em várias regiões do parênquima pulmonar dos camundongos Balb/c e Δ dblGATA

infectados (figura 5B e 5C). Visualmente, a infiltração celular e o edema verificado no parênquima pulmonar, bem como a congestão dos vasos parece mais intensa nos animais Δ dblGATA infectados (figura 5C). Em ambos as células predominantes no parênquima pulmonar foram mononucleares (figuras 6A e 6B), sendo que, nos animais Balb/c não deficientes são encontradas eventualmente células polimorfonucleares (6A e 7A).

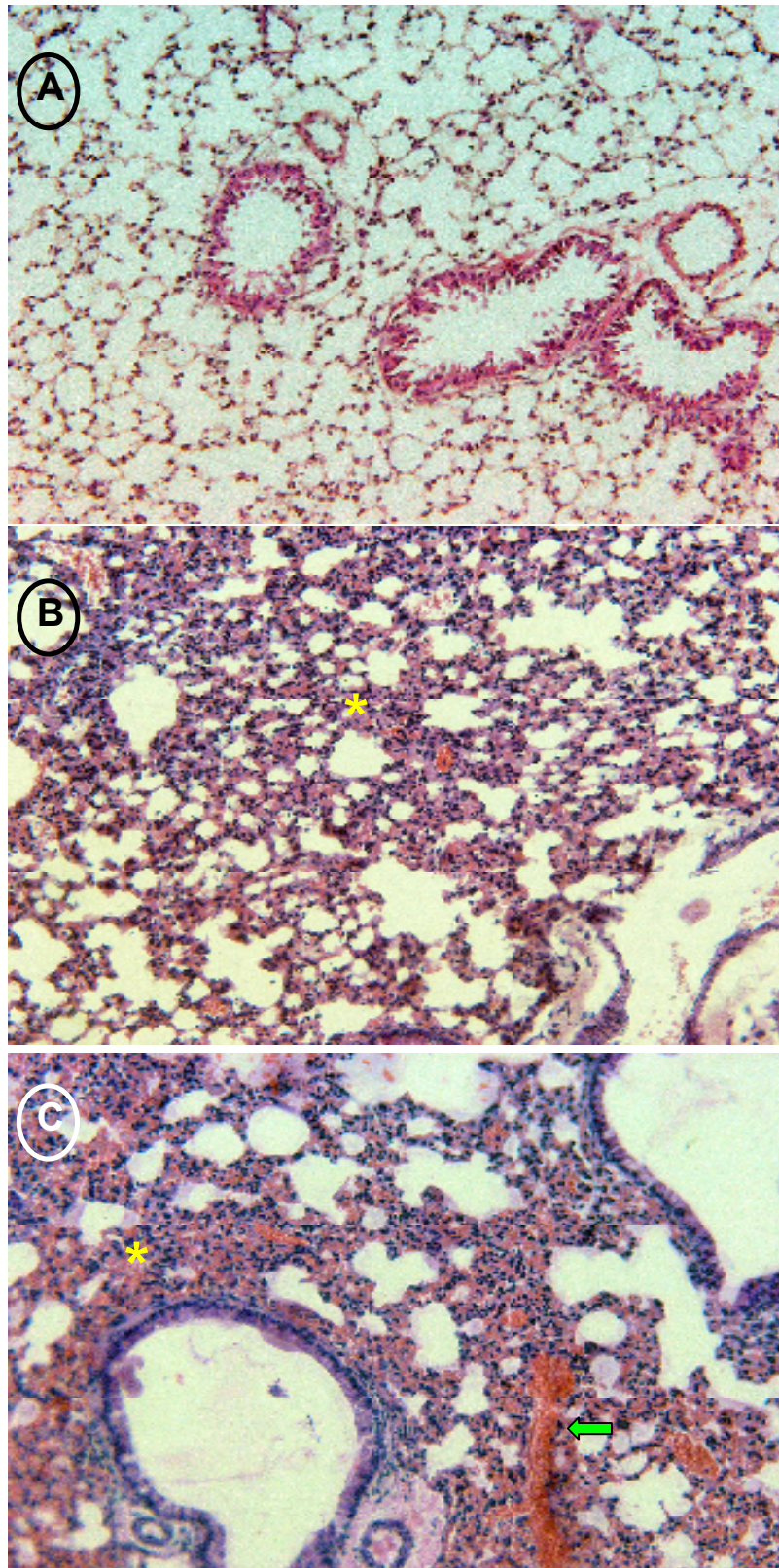


Figura 5 – Fotomicrografias de pulmões de camundongos corados por hematoxilina-eosina. **A**, Balb/c não infectado (aumento de 20x). **B**, Balb/c e **C**, Δ dblGATA 4 dias após infecção (aumento de 20x). Seta indica vaso sanguíneo congesto. Asteriscos indicam intenso infiltrado inflamatório nos espaços alveolares.

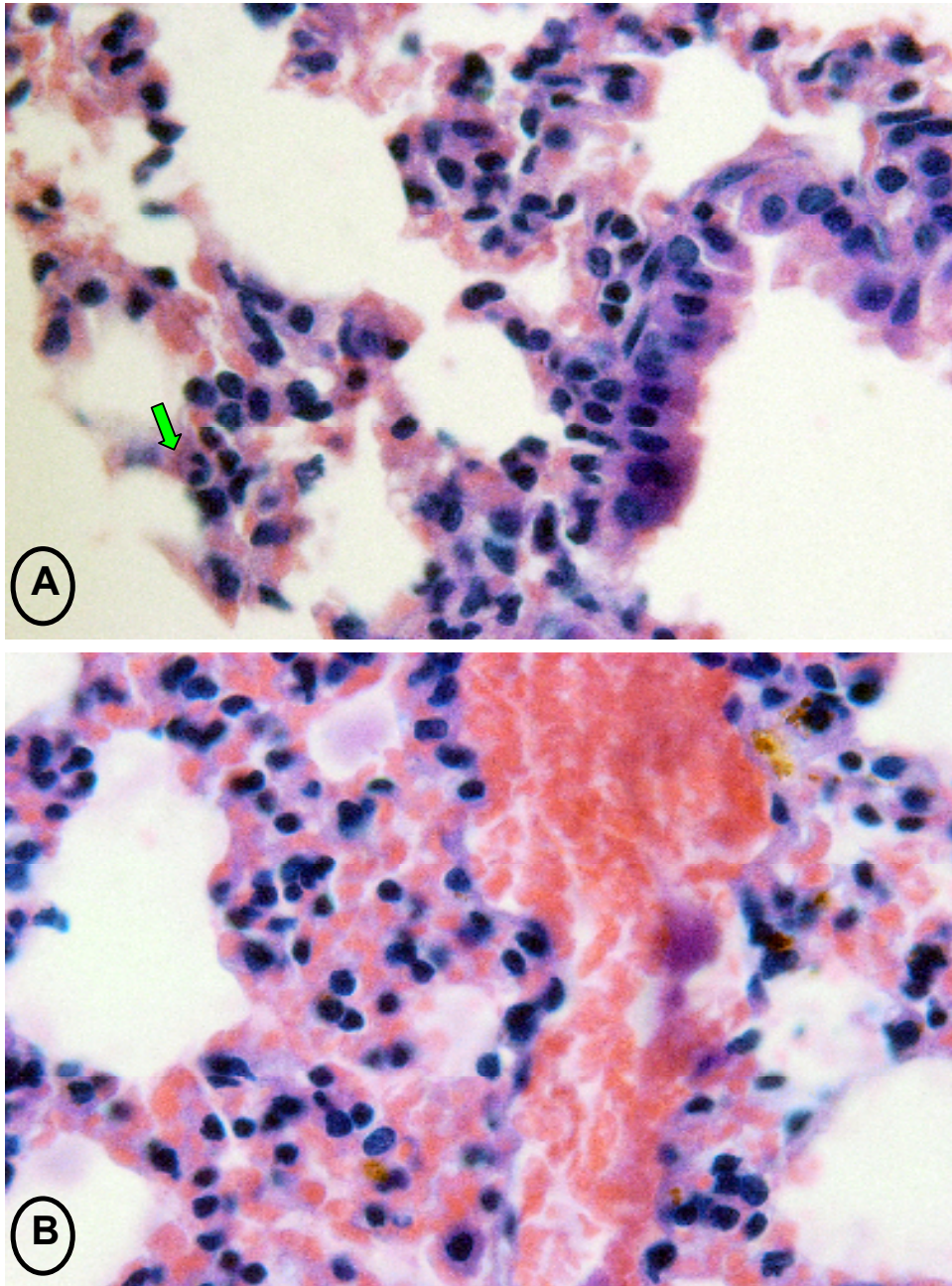


Figura 6 – Fotomicrografias de pulmões de camundongos corados por hematoxilina-eosina. **A**, Balb/c e **B**, Δ dbiGATA aos 4 dias após infecção (aumento de 100x). Seta indica presença de eosinófilo no parênquima pulmonar.

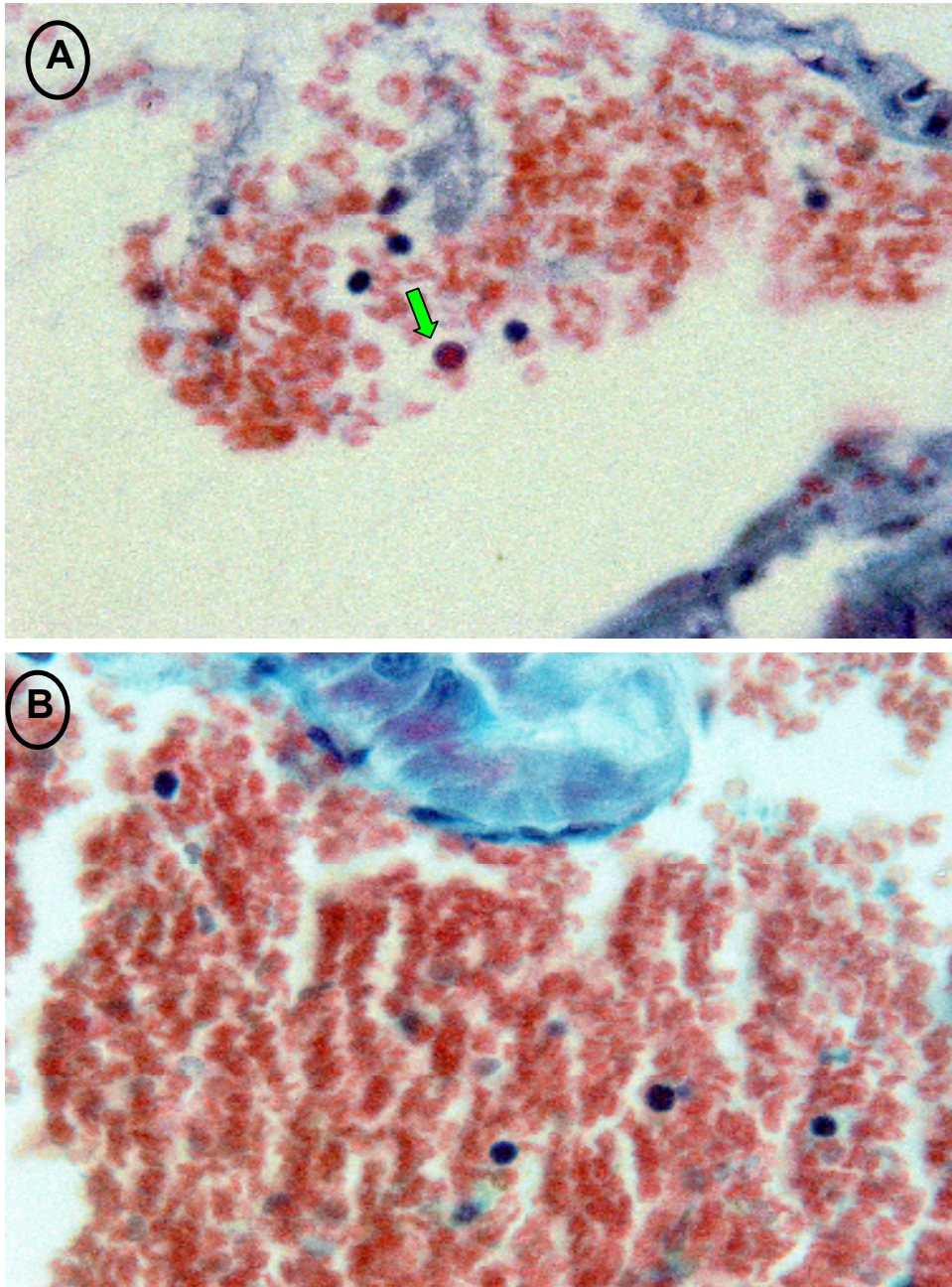


Figura 7 – Fotomicrografias de pulmões de camundongos corado por tricrômico de Masson. **A**, Balb/c e **B**, Δ dblGATA aos 4 dias após infecção (aumento de 100x). Seta indica presença de eosinófilo no sangue.

5.2.3 – Avaliação do infiltrado celular no intestino delgado

5.2.3.1 – Eosinofilia/neutrofilia intestinais

Para a avaliação do infiltrado celular no intestino delgado em resposta à infecção por *S. venezuelensis* foi realizada a quantificação de níveis de EPO como medida indireta da presença de eosinófilos (gráfico 9) e de MPO como medida indireta da presença de neutrófilos (gráfico 10) no homogenato de tecido intestinal. A quantificação dos níveis de EPO também foi utilizada como forma de comprovação da ausência de eosinófilos em camundongos Δ dbIGATA.

Em camundongos Balb/c não deficientes, a infecção por *S. venezuelensis* induziu um aumento gradativo nos níveis de EPO (gráfico 9) e de MPO (gráfico 10) na mucosa intestinal dos animais, sendo estatisticamente diferente dos animais não infectados aos 14 dias após a infecção. Os níveis de EPO foram estatisticamente menores no grupo de animais Δ dbIGATA em relação aos animais Balb/c, estando geralmente abaixo do nível encontrado em animais Balb/c não infectados (gráfico 9). Os níveis de MPO de camundongos Δ dbIGATA quantificados aos 7 e 10 dpi foram estatisticamente menores do que os níveis medidos em camundongos não deficientes nestes mesmos dias, sendo que somente no 14º dia de infecção os níveis de MPO de ambos os grupos, Balb/c e Δ dbIGATA, se tornaram semelhantes.

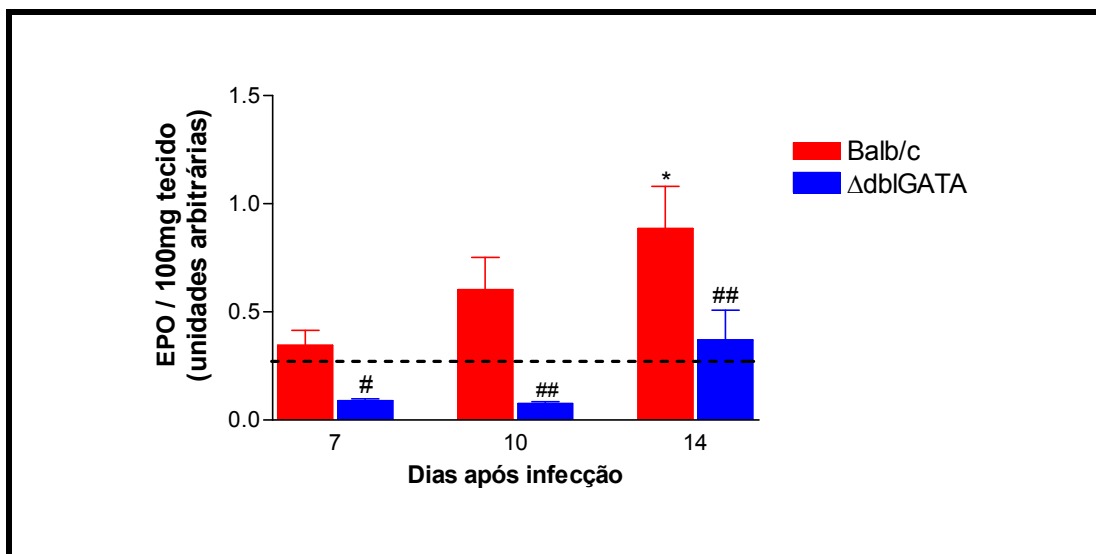


Gráfico 9 – Níveis de peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de EPO em camundongos não infectados. * P<0,05 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. # P<0,05; ## P<0,01 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

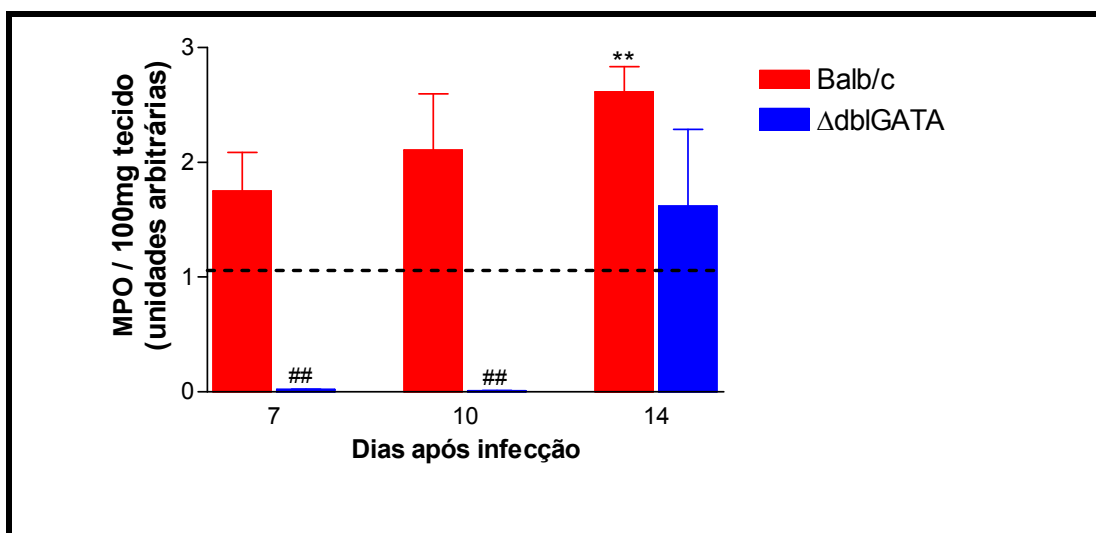


Gráfico 10 – Níveis de mieloperoxidase (MPO) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) durante a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de MPO em camundongos não infectados. ** P<0,01 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. ## P<0,01 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

5.2.3.2 – Avaliação das alterações histopatológicas intestinais

As alterações histopatológicas induzidas pela infecção por *S. venezuelensis* na mucosa do intestino delgado dos camundongos infectados são mostradas nas figuras 8, 9 e 10. Camundongos Balb/c e Δ dblGATA não infectados apresentaram vilosidades intestinais intactas e com celularidade esperada para o órgão, sem diferenças entre os dois grupos de animais (figura 8A). Aos 7 dias após a infecção pôde-se verificar vários fragmentos de vermes inseridos entre as células epiteliais e a lâmina própria da mucosa intestinal, produzindo deformação e achatamento das vilosidades intestinais, tanto em cortes histológicos de intestino de camundongos Balb/c (figura 8B) como em Δ dblGATA (figura 8C). Intenso infiltrado inflamatório foi observado no tecido conjuntivo da base das vilosidades e na lâmina própria, geralmente próximo aos vermes. Entretanto, a composição celular deste infiltrado é muito diferenciada entre camundongos Balb/c e Δ dblGATA. Em camundongos Balb/c células inflamatórias presentes na proximidade dos vermes, incluem um grande número de neutrófilos e eosinófilos (figura 9A) enquanto que na figura 9B, representativa de camundongos Δ dblGATA aos 7 dias após infecção, as células observadas no entorno do verme são em sua maioria mononucleares, especialmente linfócitos e macrófagos, não sendo encontradas polimorfonucleares.

Aos 10 dias após infecção, observa-se uma intensa proliferação de células caliciformes com aumento de produção de muco na mucosa intestinal dos animais infectados. Neste período também foi observada infiltração celular, especialmente na base das vilosidades, mas o formato das vilosidades apresenta-se mais próximo do observado em camundongos não infectados (figuras 10A e 10B). Entretanto, fragmentos de vermes foram raramente observados na mucosa de camundongos Balb/c, enquanto estes fragmentos foram um achado freqüente em camundongos Δ dblGATA aos 10 dpi (figuras 10A e 10B).

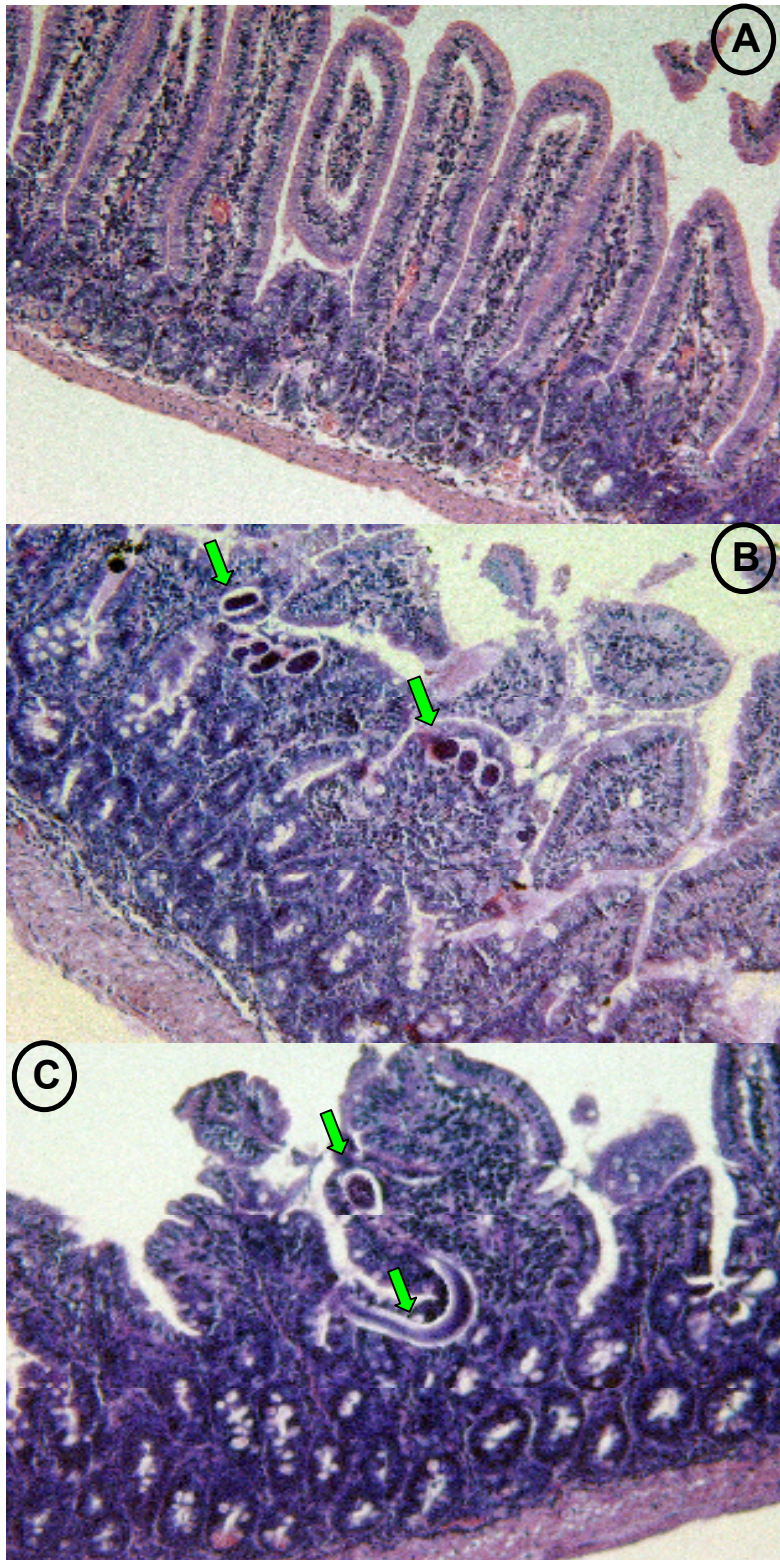


Figura 8 – Fotomicrografias do intestino de camundongos coradas por hematoxilina-eosina. **A**, não infectado (aumento 10x). **B**, Balb/c e **C**, Δ dbIGATA aos 7 dias após infecção (aumento 20x). Setas indicam fragmentos de vermes na mucosa intestinal.

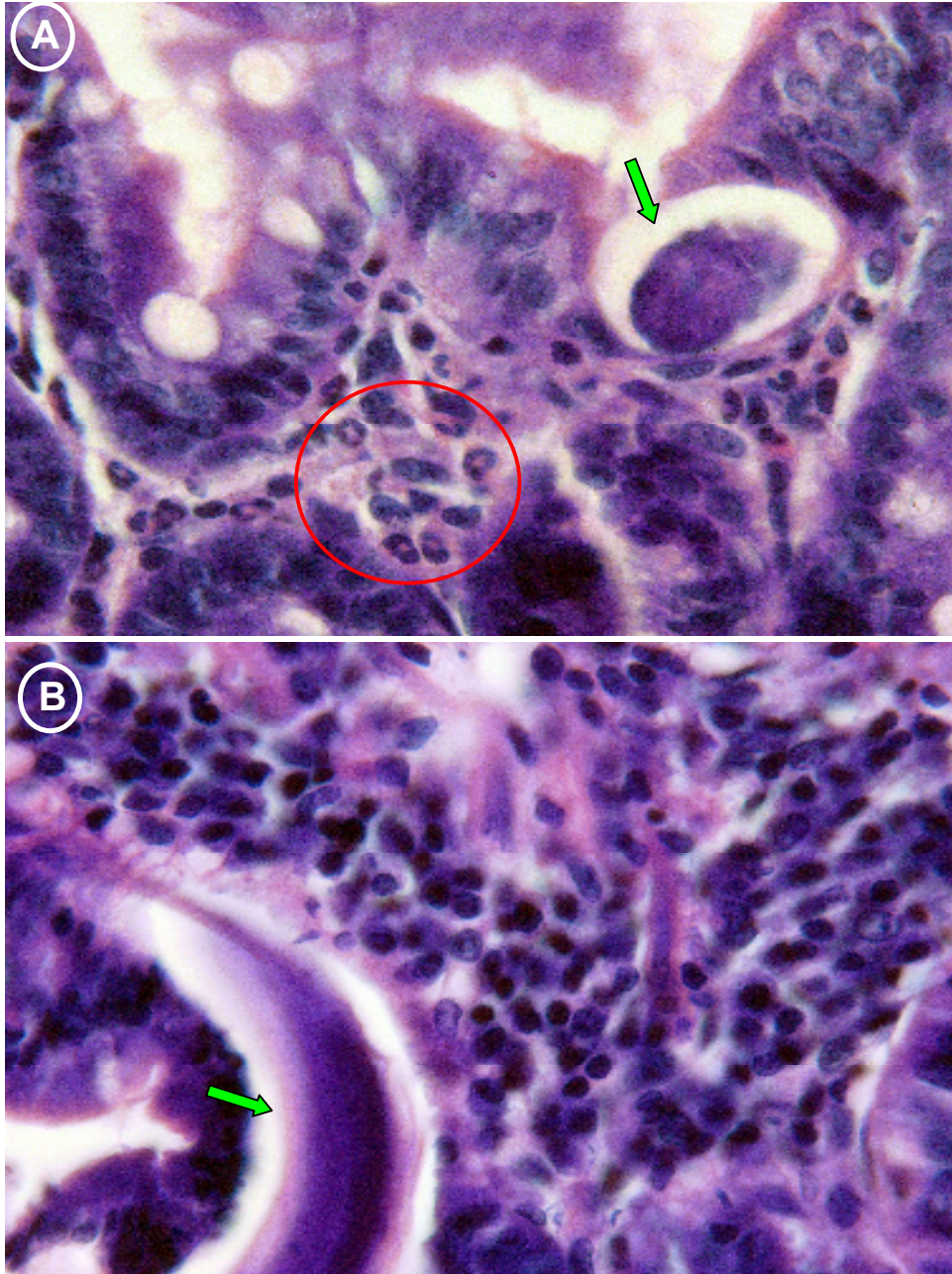


Figura 9 – Fotomicrografias de intestino delgado de camundongos coradas por hematoxilina-eosina. **A**, Balb/c e **B**, Δ dblGATA aos 7 dias após infecção (aumento 100x). Setas indicam vermes na mucosa intestinal, círculo vermelho destaca eosinófilos.

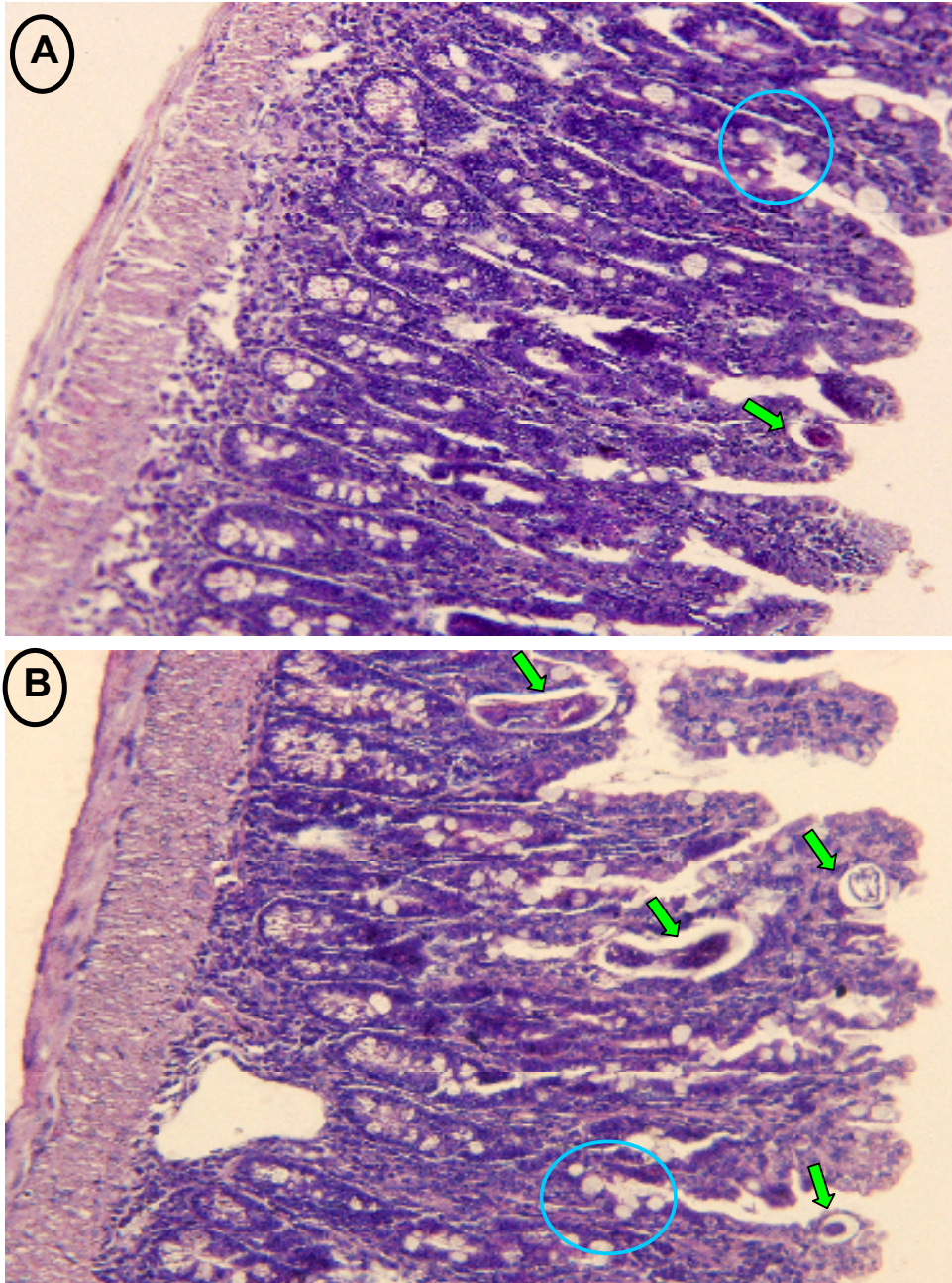


Figura 10 – Fotomicrografias de intestino delgado de camundongos coradas por hematoxilina-eosina. **A**, Balb/c e **B**, Δ dblGATA aos 10 dias após infecção (aumento 20x). Setas indicam fragmentos de vermes na mucosa intestinal. Círculos azuis indicam presença de células caliciformes.

5.2.4 – Quantificação de citocinas

5.2.4.1 – Quantificação de citocinas no homogenato intestinal

Níveis de interferon- γ (IFN- γ) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) foram quantificados durante a infecção por *S venezuelensis*. A infecção pelo parasito induziu elevação transitória de IFN- γ no parênquima intestinal de camundongos Balb/c aos 7 dpi, não estatisticamente diferente do nível normal, retornando aos níveis normais aos 10 dpi. Entretanto, em camundongos Δ dbIGATA os níveis de IFN- γ aos 7 dpi foram semelhantes aos não infectados e houve uma elevação aos 10 dpi, sendo que neste momento os níveis de IFN- γ no homogenato intestinal destes camundongos foram estatisticamente superiores que o detectado em camundongos não deficientes (gráfico 11).

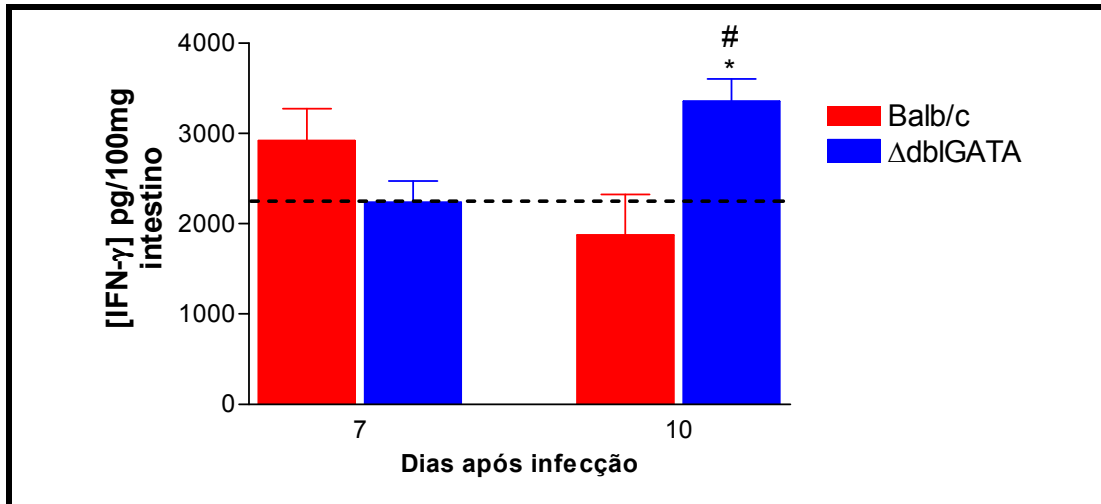


Gráfico 11 – Níveis de interferon- γ (IFN- γ) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IFN- γ em camundongos não infectados. * P<0,05 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. # P<0,05 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

A produção de IL-10 induzida pela infecção por *S. venezuelensis* em camundongos Balb/c não deficientes e camundongos Δ dblGATA não foram estatisticamente diferentes (gráfico 12).

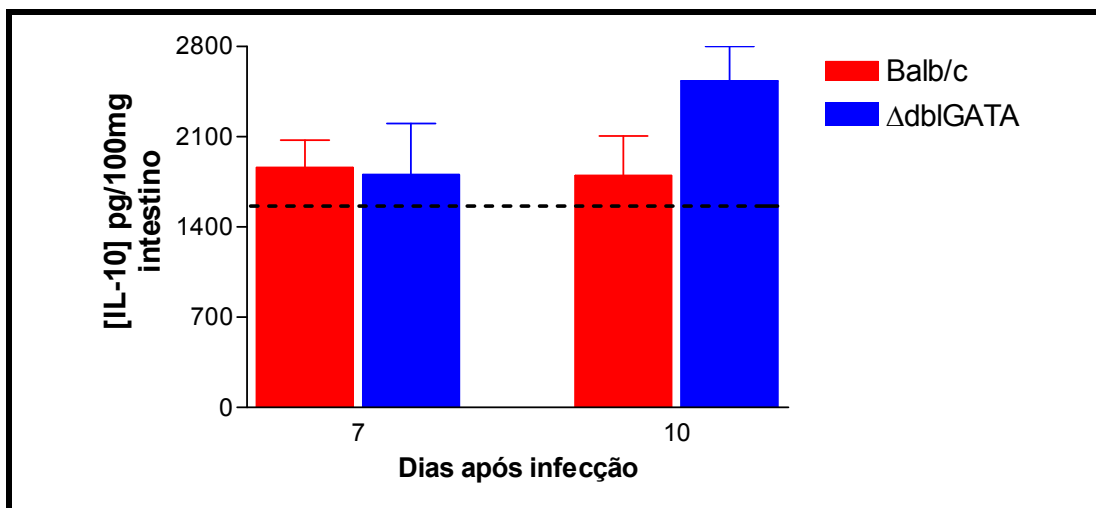


Gráfico 12 – Níveis de interleucina-10 (IL-10) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IL-10 em camundongos não infectados. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

A produção de citocinas típicas do perfil de resposta TH2, IL-4 e IL-13 (gráficos 13 e 14, respectivamente), em camundongos Balb/c não deficientes apresentaram elevação estatística aos 7 dias de infecção. Apesar de não ocorrer uma diferença estatística entre os níveis de IL-4 quantificados no homogenato intestinal de camundongos Balb/c e Δ dblGATA no 7º dia após a infecção, nos animais Δ dblGATA, a quantidade desta citocina sempre foi inferior ao Balb/c e não estatisticamente diferente do nível encontrado nos animais não infectados. Aos 10 dpi, os níveis de IL-4 permaneceram elevados nos camundongos Δ dblGATA, sendo estatisticamente diferente do observado em Balb/c neste mesmo período (gráfico 13). Perfil semelhante ao descrito para IL-4 também foi observado nos níveis de IL-13 quantificados no homogenato intestinal de camundongos Balb/c e Δ dblGATA durante a infecção por *S. venezuelensis* (gráfico 14).

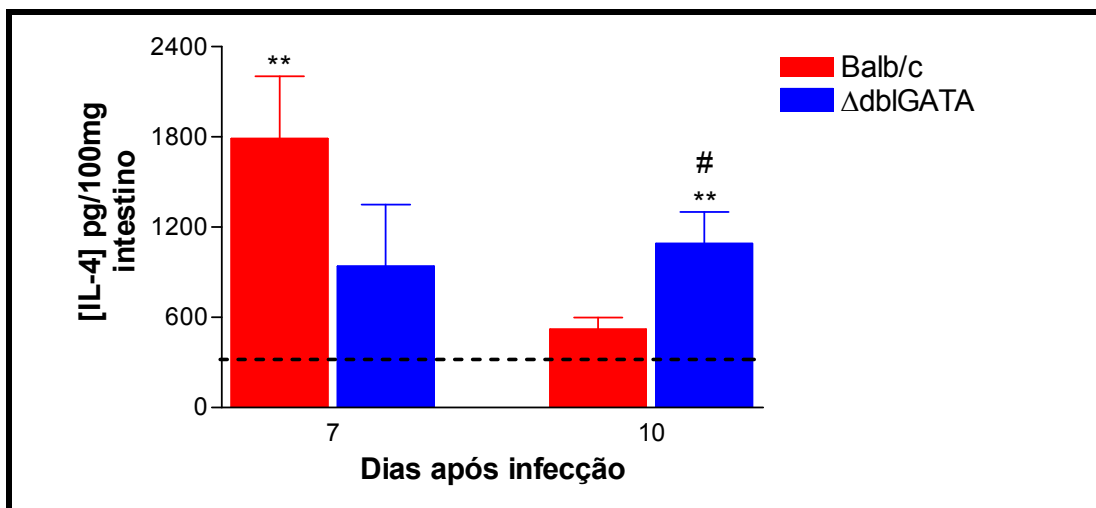


Gráfico 13 – Níveis de interleucina-4 (IL-4) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IL-4 em camundongos não infectados. ** P<0,01 em relação ao nível do animal não infectado. # P<0,05 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

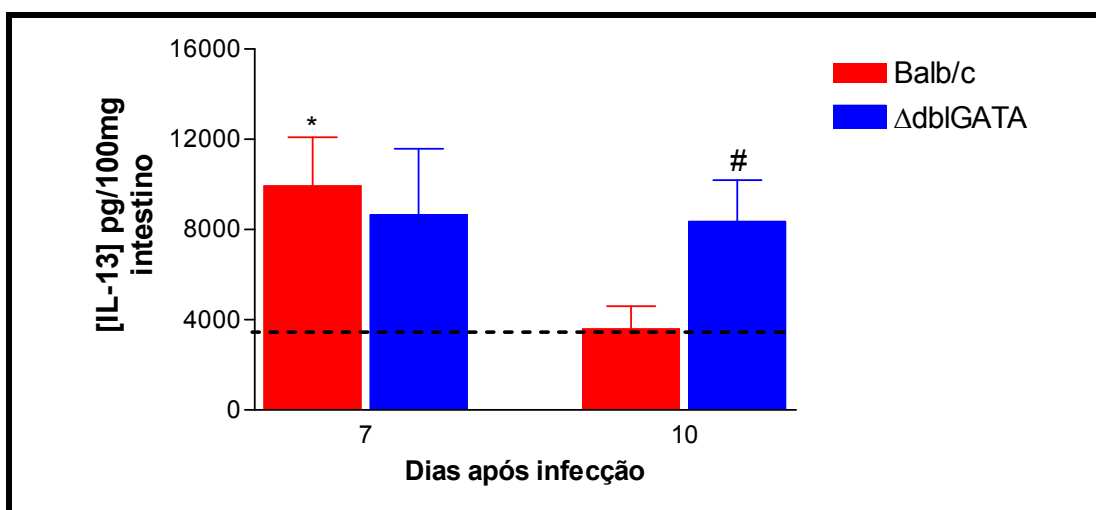


Gráfico 14 – Níveis de interleucina-13 (IL-13) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) aos 7 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IL-13 em camundongos não infectados. * P<0,05 em relação ao nível do animal não infectado. # P<0,05 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

A quantificação de IL-4 presente no homogenato intestinal de camundongos Δ dblGATA não infectados e após 6 dias de infecção foram estatisticamente semelhantes, enquanto que o nível de IL-4 no homogenato intestinal de camundongos Balb/c apresentou uma elevação significativa aos 6 dpi, sendo estatisticamente superior ao encontrado nos animais não infectados e nos camundongos Δ dblGATA neste mesmo período (gráfico 15).

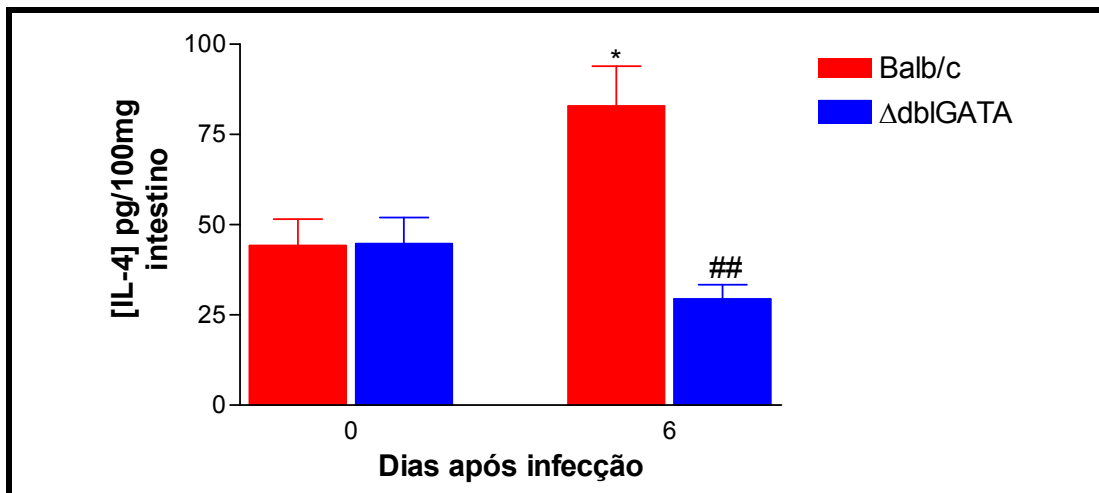


Gráfico 15 – Níveis de interleucina-4 (IL-4) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) não infectados e aos 6 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. * P<0,05 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. ## P<0,01 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

Também foram avaliados os níveis de IL-5 neste mesmo período e os dados são apresentados no gráfico 16. Em camundongos Balb/c não deficientes a infecção por *S. venezuelensis* induziu um aumento significativo na quantidade de IL-5 no homogenato intestinal aos 6 dpi, retornando a níveis próximos do não infectado após 10 dpi. De maneira interessante, o nível de IL-5 no homogenato intestinal de camundongos Δ dblGATA não infectado foi inferior ao detectado em Balb/c não deficiente e permanece muito baixo após 6 dias de infecção, sendo que neste período a diferença encontrada nos níveis de IL-5 de camundongos Balb/c e Δ dblGATA foi altamente significativa (P<

0.01). Entretanto, ao 10º dia de infecção, os níveis de IL-5 no homogenato intestinal dos camundongos Δ dbIGATA eleva-se significativamente em relação ao não infectado, e os níveis de IL-5 quantificados em ambos os grupos se tornam estatisticamente similares.

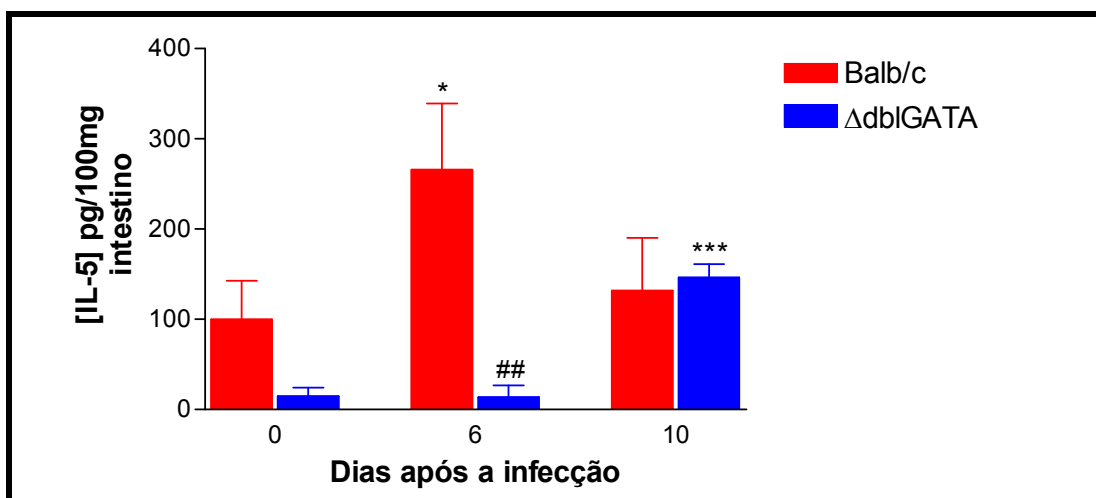


Gráfico 16 – Níveis de interleucina-5 (IL-5) no homogenato intestinal de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) não infectados (dia 0) e aos 6 e 10 dias após a infecção com 700 L₃ *S. venezuelensis*. * P<0,05; * P<0,001 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem. ## P<0,01 na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes no mesmo período. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.**

5.2.4.2 – Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico

Para verificar a produção das citocinas IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ por células do linfonodo mesentérico de camundongos 6 dias após a infecção por *S. venezuelensis*, estas células foram recuperadas e estimuladas com o mitógeno Concanavalina A (Con-A) ou com antígeno solúvel de larva (L₃) e as citocinas quantificadas no sobrenadante da cultura. As células estimuladas com Con-A produziram grandes quantidades de IL-4 e IL-5 e pouco TNF- α e IFN- γ , mostrando uma polarização para o perfil TH2. Entretanto, não houve diferença na quantidade de citocinas entre camundongos Balb/c e Δ dbIGATA (gráfico 17).

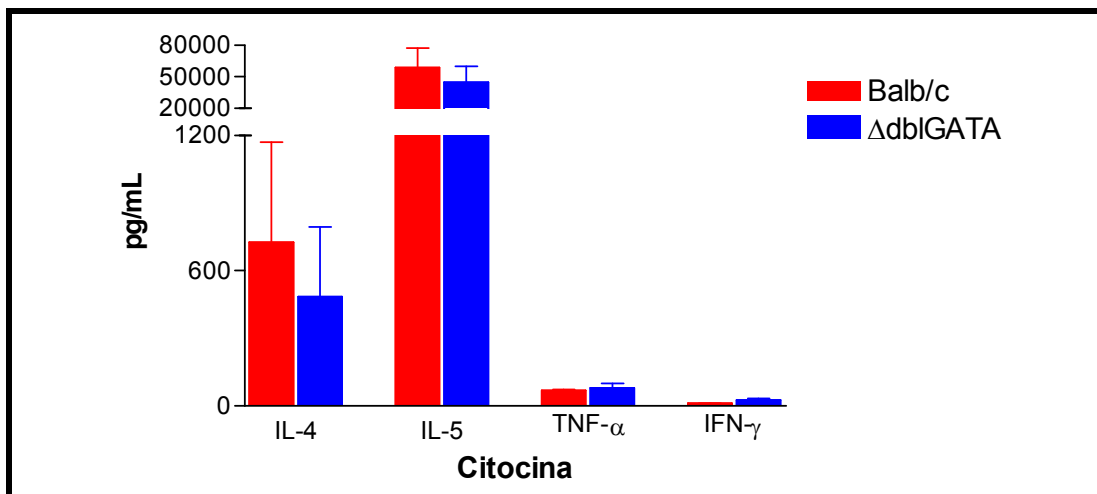


Gráfico 17 – Níveis de IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ presentes no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) infectados por 6 dias com *S. venezuelensis*. As células foram re-estimuladas com mitógeno Concanavalina A. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

Neste mesmo período, 6 dias de infecção, as células do linfonodo mesentérico dos camundongos infectados produziram baixos níveis de IL-4 e IFN- γ em resposta a estimulação com antígeno do parasito. A quantificação destas citocinas foi inferior a 30 pg/mL, que corresponde ao nível de sensibilidade do ensaio (gráfico 18). Os níveis de TNF- α produzidos em resposta a estimulação com antígeno do parasito se mostraram pouco acima do nível de detecção (30 pg/mL) e estatisticamente semelhante entre camundongos Balb/c e Δ dbIGATA. No caso de IL-5, a quantidade desta citocina no sobrenadante de cultura de células recolhidas de Δ dbIGATA infectados e re-estimulados com antígeno do parasito também foi inferior a 30 pg/mL. Entretanto, no sobrenadante de cultura de células de camundongos Balb/c infectados e re-estimulados foi quantificado cerca de 70 pg/mL de IL-5 (gráfico 18).

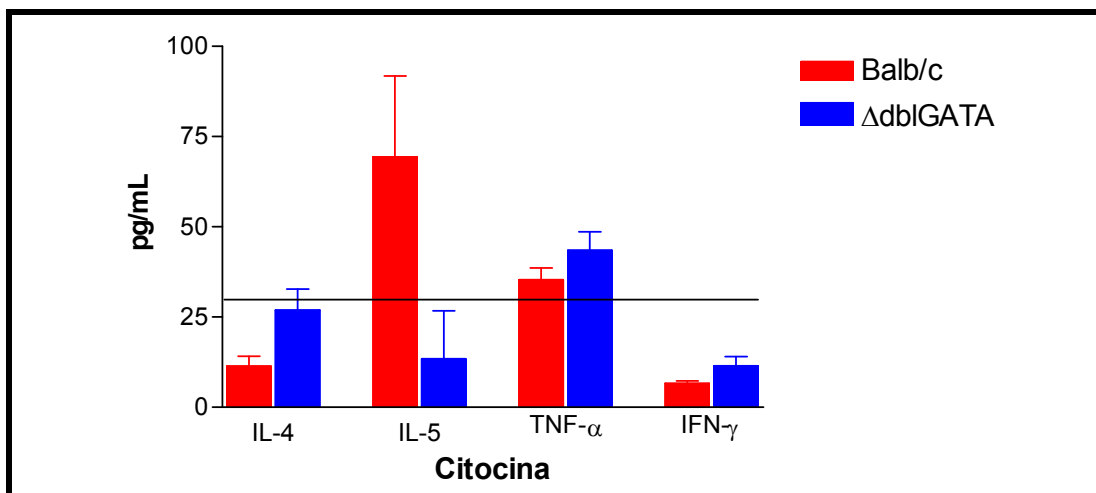


Gráfico 18 – Níveis de IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ presentes no sobrenadante de cultura de células do linfonodo mesentérico de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) infectados por 6 dias com *S. venezuelensis*. As células foram re-estimuladas com antígenos do parasito. A linha contínua indica o nível de sensibilidade do ensaio. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.

5.2.5 – Avaliação da resposta humoral

Para avaliação da resposta humoral foram verificados níveis de IgE total e IgG1 e IgG2a específicos no soro dos camundongos infectados e não infectados em diferentes dias de infecção. Não foi detectada produção de IgG2a reativa à antígenos de larvas do parasito nos camundongos Balb/c e Δ dbIGATA durante a infecção por *S. venezuelensis*. Durante a infecção primária por *S. venezuelensis* em camundongos houve uma reatividade baixa de IgG1 contra antígenos do parasito e esta não foi estatisticamente diferente entre camundongos Balb/c e Δ dbIGATA (gráfico 19).

A quantificação de IgE total no soro dos camundongos mostrou que esta imunoglobulina aumenta significativamente aos 10 e 14 dias da infecção por *S. venezuelensis*, sem, entretanto, haver diferenças significativas nos níveis de IgE total entre os grupos Balb/c e Δ dbIGATA (gráfico 20).

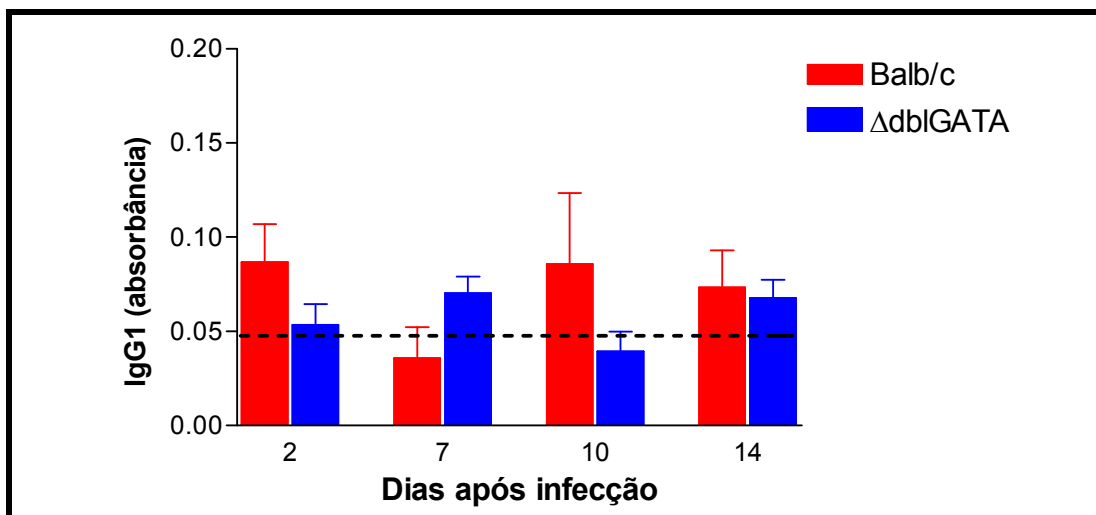


Gráfico 19 – Níveis de IgG1 parasito específico no soro de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos ($\Delta dbiGATA$) aos 2, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IgG1 em camundongos não infectados. * P<0,05; ** P<0,01; * P<0,001 em relação ao nível do animal não infectado. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.**

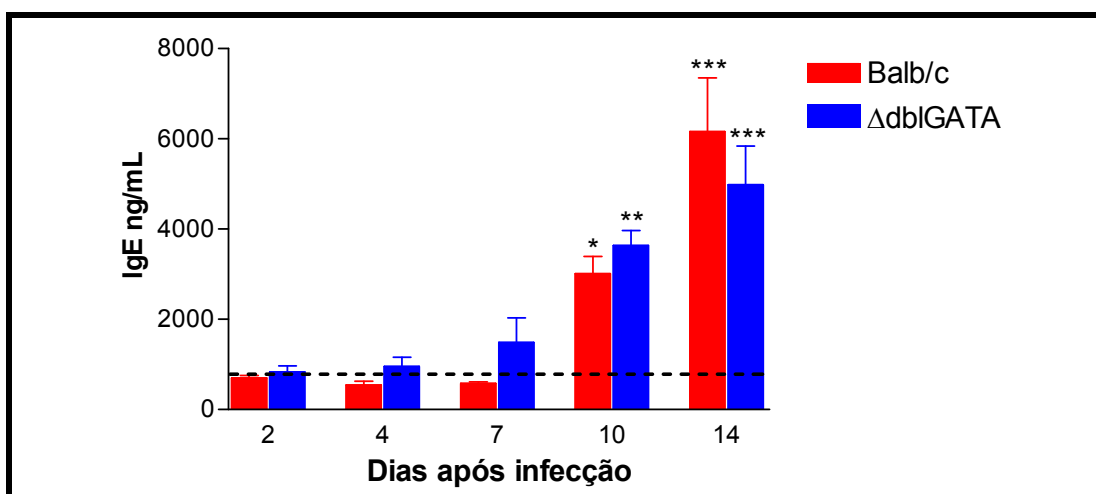


Gráfico 20 – Níveis de IgE total no soro de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos ($\Delta dbiGATA$) aos 2, 4, 7, 10 e 14 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. A linha pontilhada representa o nível de IgE em camundongos não infectados. * P<0,05; ** P<0,01; * P<0,001 em relação ao nível do animal não infectado. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo.**

5.3 – Avaliação funcional

5.3.1 – Hiperreatividade brônquica

A infecção por *S. venezuelensis* em camundongos induziu um aumento da pressão intratraqueal em resposta a administração de doses crescentes de metacolina aos 4 dpi (gráfico 20), período que coincide com o pico do processo inflamatório pulmonar (gráfico 5A). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na reatividade brônquica entre camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de Δ dblGATA (gráfico 20).

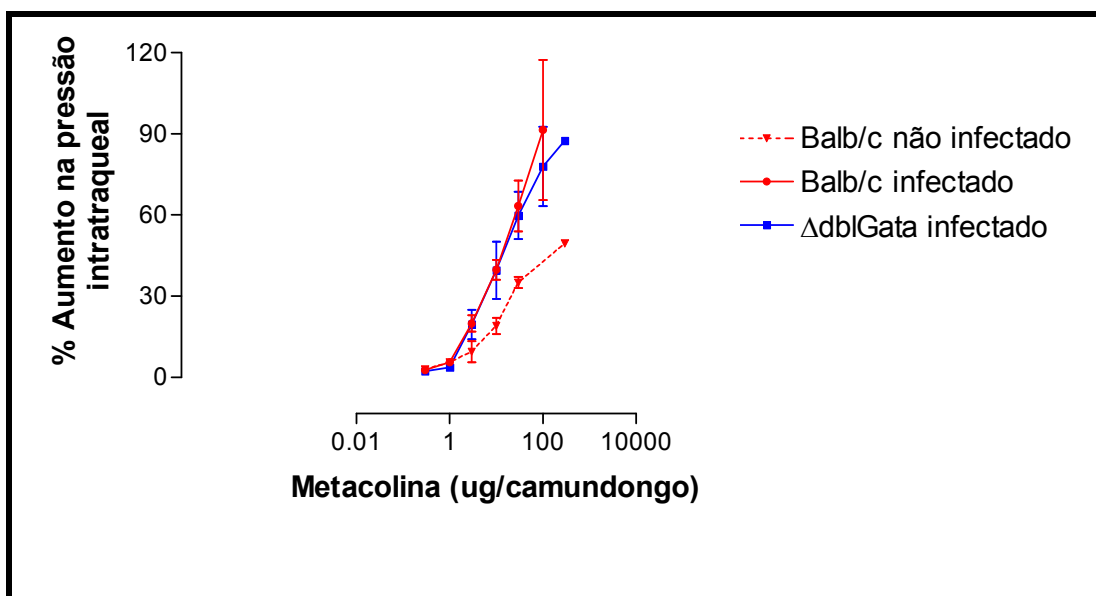


Gráfico 21 – Porcentagem de aumento na pressão intratraqueal foi utilizada como medida da reatividade brônquica em resposta a doses sucessivas de metacolina 4 dias após a infecção de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo. O experimento foi repetido 2 vezes com resultados similares.

5.3.2 – Contração intestinal

A infecção por *S. venezuelensis* também induziu um aumento significativo da contratilidade intestinal induzida por doses crescentes de carbacol. Conforme demonstrado no gráfico 21, o aumento da contratilidade

intestinal foi estatisticamente superior em camundongos infectados, aos 10 dias de infecção, em relação a resposta detectada em camundongos não infectados. Entretanto, o aumento de contratilidade intestinal em resposta a doses sucessivas de carbacol não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos de camundongos Balb/c normais e deficientes em eosinófilos.

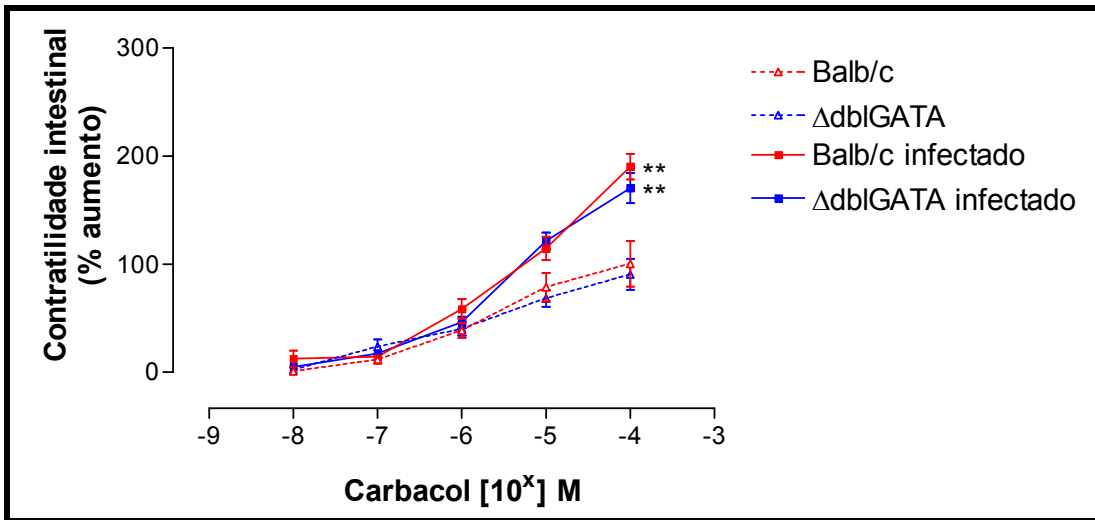


Gráfico 22 – Porcentagem de aumento na tensão em comparação à linha basal após sucessivas doses de carbacol aplicadas à porção de 1cm de intestino de camundongos Balb/c não deficientes (Balb/c) e de camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dbIGATA) não infectados e 10 dias após a infecção com 700 L₃ de *S. venezuelensis*. ** P < 0,01 em relação ao nível do animal não infectado da mesma linhagem em resposta à dose 10⁻⁴ M de carbacol. Cada ponto representa a média \pm erro padrão obtido com 5-6 animais/grupo. O experimento foi repetido 2 vezes com resultados similares.

6 - DISCUSSÃO

No presente estudo a infecção primária por *Strongyloides venezuelensis* foi comparativamente examinada em camundongos Balb/c não deficientes e camundongos Balb/c deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA) para estabelecer a participação de eosinófilos durante a infecção pelo parasito. A quantificação de EPO no homogenato pulmonar e intestinal, a análise histológica do parênquima pulmonar e mucosa intestinal, assim como a observação dos tipos celulares recuperados do lavado de medula óssea e lavado broncoalveolar confirmam que camundongos da linhagem Δ dblGATA não diferenciam eosinófilos mesmo durante a infecção por nematódeos intestinais como é o caso de *S. venezuelensis*, que são reconhecidamente fortes indutores da diferenciação deste tipo celular (TSAI *et al.*, 2002; KLION e NUTMAN, 2004).

Contrariando alguns trabalhos anteriores que demonstraram uma participação significativa de eosinófilos somente na infecção secundária por helmintos diversos (MEEUSEN e BALIC, 2000; VOEHRINGER *et al.*, 2006), nossos resultados vêm elucidar uma participação maior de eosinófilos já na infecção primária por *S. venezuelensis*. Em roedores, as larvas de *S. venezuelensis* migram da pele para os pulmões, sendo que há um pico de larvas encontradas nos pulmões 48 horas após a infecção. Desta forma, a contagem de larvas encontradas nos pulmões 2 dias após a infecção é um bom indicador da resposta protetora no estágio pré-pulmonar.

Utilizando os camundongos deficientes seletivamente na diferenciação de eosinófilos, denominados de camundongos Δ dblGATA, para infecção por *S. venezuelensis*, foi demonstrado um aumento significativo no número de larvas recuperadas nos pulmões destes camundongos em relação aos camundongos Balb/c não deficientes. Este resultado indica a participação de eosinófilos na imunidade protetora do hospedeiro durante a fase de migração sistêmica das larvas. Trabalhos anteriores realizados em camundongos transgênicos para IL-5, citocina envolvida na diferenciação final de eosinófilos bem como na migração e manutenção destas para o sítio de infecção (ROTHENBERG e HOGAN, 2006), também sugerem que o aumento de eosinófilos está associado à redução na recuperação de larvas de *S. stercoralis* (HERBERT *et al.* 2000) ou de *S. venezuelensis* (EL-MALKY *et al.*, 2003). Entretanto, a manipulação

genética de IL-5 além de interferir com eosinófilos também influencia linfócitos B1 (KOPF *et al.*, 1996) e não reduz completamente os números de eosinófilos, visto que há outros fatores que atuam na diferenciação destas células (NISHINAKAMURA *et al.*, 1996).

Desta forma, nossos resultados utilizando camundongos Δ dblGATA são a primeira evidência direta da participação de eosinófilos nos mecanismos de destruição de larvas de *Strongyloides* durante a infecção primária. De maneira interessante, KNOTT *et al.* (2007) trabalhando com camundongos Δ dblGATA infectados com outro nematódeo gastrintestinal, *Nippostrongylus brasiliensis*, não encontrou diferenças no número de larvas recuperadas dos pulmões destes animais em relação aos Balb/c não deficientes durante a infecção primária, embora esta diferença tenha se revelado durante a infecção secundária. A diferença da participação de eosinófilos no controle de larvas de *N. brasiliensis* e *S. venezuelensis* é mais uma evidência de que o mecanismo efetor envolvido na destruição de nematódeos parasitos pode variar para diferentes espécies mesmo que um ambiente predominantemente TH2 seja induzido durante estas infecções.

Na fase pulmonar da infecção, a ausência de eosinófilo não alterou significativamente o influxo celular, pois o número de leucócitos totais ou de mononucleares no lavado broncoalveolar não foi diferente entre os dois grupos. VOHRINGER *et al.*, (2006), trabalhando com estes camundongos Δ dblGATA infectados com *N. brasiliensis*, também não verificou diferenças significativas no recrutamento de células TH2 e basófilos para os pulmões, demonstrando que eosinófilos não são requeridos para que ocorra este processo. Estes resultados sugerem uma possível atuação direta do eosinófilo no mecanismo de controle das larvas de *S. venezuelensis* que já é evidente nesta fase da infecção.

Alguns trabalhos têm demonstrado eosinófilos desgranulando ao redor de larvas de helmintos (ACKERMAN *et al.*, 1990; ROTMAN *et al.*, 1997). A ativação e degranulação de eosinófilos é geralmente mediada por anticorpos específicos que opsonizam o parasito e, através de receptores para porção Fc da imunoglobulina (especialmente para IgE e IgA) expressos na superfície do

eosinófilo, ligam-se e ativam a degranulação desta célula, mecanismo denominado de citotoxicidade mediada por anticorpos – ADCC (JANEWAY, 2002). Entretanto, durante a migração das larvas de *S. venezuelensis*, utilizadas na infecção primária, ainda não observamos produção expressiva de anticorpos específicos contra o parasito. Neste modelo, verificamos baixa reatividade de IgG1 e IgE total durante a migração das larvas, assim como níveis não detectáveis de IgG2a, levando-nos a acreditar que outro mecanismo, como ativação do sistema de complemento, estaria induzindo a degranulação destes eosinófilos nas fases pulmonar e pré-pulmonar. Ativação de ambas as vias clássica e alternativa do sistema complemento com quimioatraentes e ligação de granulócitos à larva infectante tem mostrado ser importante na imunidade contra *S. stercoralis* em camundongos (VADLAMUDI *et al.*, 2006).

É possível que a especificidade de nematódeos parasitos seja em grande parte dependente do grau de ativação do complemento induzido no hospedeiro (MEEUSEN e BALIC, 2000). Em interações não naturais, como *S. venezuelensis* em camundongos, as moléculas secretadas/excretadas pelo parasito induzem uma resposta imune inata mais pronunciada, com alta produção de fatores do complemento que podem ser depositados na superfície do parasito (MEEUSEN e BALIC, 2000). No processo de ativação do complemento também são produzidos fatores intermediários, como C5a, que atraem eosinófilos e outras células inflamatórias para o sítio de infecção e aumentam a expressão de receptores do complemento na superfície destas células (JANEWAY, 2002), podendo resultar em ligações suficientes para induzir degranulação eosinofílica e morte do parasito (MEEUSEN e BALIC, 2000).

A degranulação dos eosinófilos também resulta na liberação de citocinas e quimiocinas que podem aumentar a migração de outros tipos celulares para o tecido (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Durante a infecção de *S. venezuelensis* em camundongos Δ dblGATA, o número total de mononucleares recuperados no LBA, bem como a intensidade da infiltração celular no parênquima pulmonar ou mesmo intestinal não foi significativamente alterado.

Entretanto, além da ausência de eosinófilos, a quantificação indireta de neutrófilos através dos níveis de MPO, nos tecidos pulmonar e intestinal (gráficos 8 e 10, respectivamente), bem como as análises histopatológicas, indicam que a infiltração de neutrófilos para o tecido foi significativamente retardada. No modelo de colite experimental desenvolvido em camundongos Δ dbIGATA (VIEIRA, 2008), também foi verificada uma redução significativa de migração de neutrófilos para a mucosa intestinal dos animais imunizados, sendo que o número reduzido de neutrófilos no tecido foi associado a menor produção intestinal das quimiocinas CXCL1-3/KC e CCL3/MIP1- α , com função quimioatrativa para neutrófilos, nos camundongos deficientes em eosinófilos.

GALIOTO *et al.*, (2006) mostraram que neutrófilos estão associados com destruição de larvas L₃ de *S. stercoralis* em camundongos durante infecção primária. Desta forma, o retardo na migração de neutrófilos para o sítio de infecção poderia ser um mecanismo complementar que permite maior sobrevivência de vermes em camundongos deficientes em eosinófilos devido à menor produção de quimiocinas atrativas para neutrófilos.

É importante salientar que a redução de neutrófilos nos camundongos Δ dbIGATA não se deve a qualquer problema na diferenciação destas células, pois neutrófilos diferenciados são freqüentes na medula óssea destes animais (figura 3).

MEEUSEN e BALIC (2000), após revisarem estudos de helmintos em camundongos com alterações em IL-5, concluíram que, na maioria deles, os resultados são consistentes com um papel para eosinófilos na morte de larvas infectantes, mas não de vermes adultos. Também VOEHRINGER *et al.* (2006), trabalhando com camundongos Δ dbIGATA infectados com *N. brasiliensis* não encontraram diferenças na expulsão de vermes intestinais durante infecção primária. Contrariando estes autores, nossos resultados mostram que eosinófilos têm um importante papel nas últimas fases da infecção, durante o processo de eliminação dos vermes intestinais.

Nossos dados indicam que a diferença significativa no número de vermes recuperados do intestino no 7º dia de infecção reflete a destruição/retenção que ocorreu no pulmão de camundongos Balb/c e não em

Δ dblGATA, indicando que estes parasitos foram eliminados durante a migração sistêmica das larvas e que eosinófilos não têm papel essencial durante o estabelecimento das larvas na mucosa intestinal e na maturação destes vermes.

Entretanto, no 10º dia de infecção, quando os vermes adultos já foram quase que totalmente eliminados do intestino de camundongos Balb/c não deficientes, o número de vermes recuperados no intestino de animais do grupo Δ dblGATA foi 467% maior em relação ao grupo Balb/c. Apesar disso, nossos dados também demonstram que, se eosinófilos tem participação importante no início do processo de expulsão de vermes intestinais na infecção primária, outros mecanismos compensam a ausência destas células posteriormente, visto que mesmo em animais Δ dblGATA ocorre autocura após o 14º dia de infecção.

OVINGTON *et al.* (1998), trabalhando com a infecção de *S. rattii* em camundongos C57BL/6, observou 60% mais vermes intestinais em camundongos IL-5^{-/-} em relação aos animais IL-5^{+/+}, embora a duração da infecção tenha sido similar em ambos os camundongos, deficientes e não deficientes. Trabalhando com camundongos transgênicos para IL-5, EL-MALKY *et al.*, (2003) verificaram que nesta situação os eosinófilos estão presentes em grande número e são capazes de infiltrar no epitélio intestinal e atacar *S. venezuelensis* adultos cirurgicamente transferidos para o local. Entretanto, também neste modelo experimental não foi verificada diferença no período requerido para a eliminação total destes vermes nos camundongos transgênicos e não transgênicos.

Eosinófilos e mesmo neutrófilos podem atuar diretamente no controle dos vermes durante o início do processo de eliminação de *S. venezuelensis* do intestino de camundongos, pois observamos que estes polimorfonucleares estão presentes na proximidade dos vermes e em grande número na mucosa intestinal de camundongos Balb/c não deficientes aos 7 dias da infecção pelo parasito (figura 9A). Esta possibilidade foi também sugerida por EL-MALKY *et al.* (2003) para eliminação de vermes adultos de *S. venezuelensis* em camundongos transgênicos para IL-5 e por RAINBIRD *et al.*, (1998) que

associam aumento da produção de IgA na mucosa e infiltração de eosinófilos e mastócitos intestinais ao controle de *Haemonchus contortus* no abomaso de ovinos. Entretanto, trabalhos anteriores têm demonstrado na maioria das vezes que a participação direta de eosinófilos no controle de nematódeos gastrintestinais é mais efetiva contra estágios de larvas e requerem cooperação com anticorpos e/ou sistema complemento para alcançar a máxima capacidade de eliminação do parasito (MEEUSEN e BALIC, 2000).

Eosinófilos podem também atuar no início do processo de eliminação de *Strongyloides* como fonte de citocinas do perfil TH2, que estão associadas ao desenvolvimento de proteção ao parasito. Evidências recentes indicam que isto se deve ao fato de eosinófilos serem fonte de IL-4 durante os primeiros estágios da resposta imune (DAVIES *et al.*, 2005). Além disso, ovos de *Schistosoma mansoni* e larvas de *N. brasiliensis* rapidamente recrutam eosinófilos produtores de IL-4 para o local de infecção (SABIN *et al.*, 1996; SHINKAY *et al.*, 2002). Observando os resultados obtidos na quantificação de citocinas no homogenato intestinal, verificamos atraso na produção de IL-5 e IL-4 em camundongos Δ dblGATA. Este fenômeno pode estar associado à ausência de eosinófilos, visto que estas células poderiam ser uma das fontes iniciais destas citocinas e, posteriormente, este atraso seria suplantado por outras células, como linfócitos, por exemplo. Desta forma, o retardo na eliminação do parasito pode estar associado ao retardo no estabelecimento da resposta protetora, já que nossos dados mostram menos IL-4 e IL-5 no início da resposta imune.

Células T CD4⁺ ativadas são consideradas as principais células produtoras de IL-5 induzida após infecções helmínticas (MEEUSEN e BALIC, 2000). Entretanto, nossos resultados mostram IL-5 com níveis diminuídos no homogenato intestinal de animais Δ dblGATA, no período de maior carga parasitária intestinal, apontando para uma participação mais pronunciada de eosinófilos na produção desta citocina no início da infecção. Também trabalhando com camundongos Δ dblGATA, HUMBLES *et al.*, (2004) constatou que a resposta de citocinas TH2 nestes animais é similar àquela mostrada por

camundongos Balb/c normais quando desafiados com alérgeno, condizendo com alguns resultados encontrados em nosso trabalho.

Embora eosinófilos possam modular produção de IL-13 por células T CD4⁺, possivelmente através de IL-18 (KAY, 2005), não encontramos diferenças significativas na produção de IL-13 entre os grupos avaliados neste modelo experimental.

Dentre os mecanismos de atuação de eosinófilos inclui-se ainda sua função como célula apresentadora de antígeno, modulando ativamente a resposta imune por amplificar respostas de células TH2 (SHI, 2004). Outro mecanismo pelo qual eosinófilo poderia participar da resposta imune protetora contra o parasito seria através da secreção de grânulos contendo MBP (proteína básica principal), levando à ativação de mastócitos, visto que estas células já foram associadas com a eliminação de *Strongyloides* do intestino de camundongos (NAWA *et al.*, 1985; ABE e NAWA, 1987; KHAN *et al.*, 1993). Este poderia ser o principal mecanismo que estaria expulsando os vermes mesmo na falta de eosinófilos, sendo que o atraso na eliminação da infecção deve ser reflexo da falta de ativação de mastócitos pela MBP secretada por eosinófilos. Entretanto, neste estudo não foi possível avaliar a presença de mastócitos, sendo uma hipótese a ser testada em trabalhos posteriores.

Na infecção de *S. venezuelensis* em camundongos Δ dblGATA foi observada uma eliminação de ovos nas fezes do hospedeiro significativamente maior que em camundongos Balb/c, sendo que no 10^o dpi, a contagem de ovos por grama de fezes foi cerca de 10 vezes maior no grupo Δ dblGATA em relação ao grupo Balb/c. Entretanto, a diferença no número de ovos eliminados refletiu as diferenças encontradas no número de vermes recuperados no intestino delgado dos animais de cada grupo experimental e não na fecundidade destes vermes. Este resultado indica que eosinófilos não participam do mecanismo anti-fecundidade durante a infecção de *S. venezuelensis* em camundongos e contraria os dados de alguns trabalhos que demonstraram alteração na fecundidade das fêmeas partenogênicas de *S. rattii* em camundongos tratados com anticorpo anti-granulócito (WATANABE *et al.*, 2000) e geneticamente deficientes na produção de interleucina-5 (IL-5^{-/-})

(OVINGTON *et al.*, 1998). Neste caso, a discrepância dos resultados obtidos em camundongos IL-5^{-/-} e Δ dbIGATA sobre a fecundidade dos vermes pode ser devida à importância da produção de IL-5 para proliferação de células B (KOPF *et al.*, 1996).

Alguns trabalhos sugerem que em pacientes alérgicos e em modelos de asma experimental os eosinófilos participem da determinação da hiperreatividade brônquica (SHEN *et al.*, 2003; JUSTICE *et al.*, 2003). Outros estudos têm demonstrado que mudanças na função pulmonar podem também ocorrer devido à infecção por parasitas com ciclo pulmonar, como *Strongyloides stercoralis* (WEHNER *et al.*, 1994; OCHOA *et al.*, 2003). Em nosso modelo, deficiência em eosinófilos não alterou o estabelecimento de hiperreatividade brônquica induzida pela infecção por *S. venezuelensis* em resposta a administração de metacolina.

Utilizando esta mesma linhagem de camundongos geneticamente deficientes em eosinófilos (Δ dbIGATA) e desafiados com ovalbumina, HUMBLE *et al.*, (2004) verificaram resultados semelhantes, sugerindo que eosinófilos não seriam essenciais para ocorrência da hiperreatividade brônquica induzida por alérgeno. Por outro lado, medidas da função pulmonar após desafio com OVA em camundongos C57BL/6 deficientes em eosinófilos (camundongos PHIL) mostraram que hiperreatividade brônquica em resposta a administração de metacolina foi dependente da presença de eosinófilos nestes animais (LEE *et al.*, 2004). Assim, alguns estudos têm associado eosinofilia com hiperreatividade (LEE *et al.*, 2004; HISADA *et al.*, 1999), enquanto outros não verificaram correlação entre a presença de eosinófilos e esta mudança funcional (HUMBLE *et al.*, 2004; WILDER *et al.*, 1999). Desta forma, eosinófilos têm um papel na patofisiologia da hiperreatividade de certos modelos experimentais, mas certamente outros fatores (outros tipos celulares como mastócitos e linfócitos T) devem contribuir para a modificação da função pulmonar (CARA *et al.*, 2000), fatores estes que se mostram mais importantes em nosso modelo do que propriamente o eosinófilo.

Um novo paradigma tem emergido descrevendo eosinófilos como responsivos iniciais para dano ou morte tecidual, sendo uma parte do processo

de remodelamento ou reparo e, mais importante, atuando na imunoregulação (JACOBSEN *et al.*, 2007). Desta forma, justifica-se a intensa infiltração eosinofílica pulmonar nas infecções helmínticas e doenças alérgicas. Mais ainda, se estas células mudarem de regulatórias para subsequente capacidade agressiva, é possível que, na fase final da resposta, elas voltem a agir como regulatórias para inibir a imunidade adaptativa (ROTHENBERG e HOGAN, 2006).

Proteínas catiônicas liberadas por eosinófilos têm sido consideradas na indução da contração da musculatura lisa intestinal (ZHAO *et al.*, 2003; JACOBSEN *et al.*, 2007). Além disso, eosinófilos produzem IL-1 e IL-13, quimiocinas, leucotrienos e fatores de crescimento (por exemplo, TGF- β) que têm efeito direto na musculatura lisa, induzindo recrutamento/proliferação e contração da musculatura lisa (JACOBSEN *et al.*, 2007). No entanto, em nosso modelo não encontramos diferenças na contração intestinal entre camundongos que não possuem eosinófilos e seus controles não deficientes nesta célula perante a infecção por *S. venezuelensis*. Surpreendentemente, células musculares expressam o receptor CCR3, sendo responsivas à liberação localizada de quimioatraentes de eosinófilos, como eotaxina-1 (JACOBSEN *et al.*, 2007), podendo a contratilidade intestinal estar suficientemente sendo estimulada através deste mecanismo associado à presença de IL-4 e IL-13 não eosinofílicas.

7 - CONCLUSÕES

- ✓ Eosinófilos participam da resposta imune protetora contra infecção primária por *S. venezuelensis* em camundongos Balb/c durante a fase de migração das larvas.
- ✓ Eosinófilos atuam no início do processo de eliminação de *S. venezuelensis* do intestino de camundongos infectados, porém estas células não são essenciais para que a eliminação do parasito ocorra.
- ✓ Ausência de eosinófilos alterou a infiltração de neutrófilos nos pulmões e intestino, diminuindo uma possível participação destas células na expulsão de *S. venezuelensis*.
- ✓ Ausência de eosinófilos em camundongos Δ dbIGATA foi associada a atraso na produção da maioria das citocinas estudadas.
- ✓ Ausência de eosinófilos, em nosso modelo experimental, não alterou o padrão de resposta de IgG2a, IgG1 e IgE total séricas em resposta à infecção por *S. venezuelensis*.
- ✓ A eosinofilia nos pulmões do hospedeiro não foi associada à indução de hiperreatividade brônquica observada durante a infecção por *S. venezuelensis*.
- ✓ O aumento no número de eosinófilos no intestino delgado não tem relação com o aumento da contração intestinal devido à infecção por *S. venezuelensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K. M.; SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383, p. 787-793, 1996.

ABE, T.; NAWA, Y. Reconstitution of mucosal mast cells in W/W^V mice by adoptive transfer of bone marrow-derived cultured mast cells and its effects on the protective capacity to *Strongyloides ratti*-infection. *Parasite Immunol.* v. 9, p. 31-38, 1987.

ABE, T.; NAWA, Y. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti*-infected nude mice. *Immunology*, v. 63, p.181-185, 1988.

ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K.; NAWA, Y. Induction of the expulsion of *Strongyloides ratti* and retention of *Nippostrongylus brasiliensis* in athymic nude mice by repetitive administration of recombinant interleukin-3. *Immunology*, v. 76. p. 10-14, 1992.

ABU-GHAZALEH, R.I.; FUJISAWA, T.; MESTECKY, J.; KYLE, R.A.; GLEICH, G.J. IgA induced eosinophil degranulation. *Immunol.*, v. 142, p. 2393-400, 1989.

ACKERMAN, S.J. Eosinophil degranulation: an immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *J. Immunol.*, v. 144, p. 3961-3969, 1990.

ADAMSON, M.L.. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. *Can. J. Zool.*, v. 65, p. 1478-1482, 1987.

ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. Immunology of helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 109, p. 3-10, 1996.

BAEK, B.K.; ISLAM, M.K.; KIM, B.S.; LIM, C.W.; HUR, J.; OLUOCH, A.O.; KIM, C.H.; KAKOMA, I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Vet. Parasitol.*, v. 113, p. 217-227, 2003.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*, v. 162, p. 327-334, 1988.

BANCROFT, A.J.; MCKENZIE, A.N.; GRENCIS, R.K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. *J Immunol.*, v. 160, p. 3453-3461, 1998.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J. Leukoc. Biol.*, v. 78, p. 352-358, 2005.

BEHM, C.A.; OVINGTON, K.S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitology Today*, v. 16, p. 202-209, 2000.

BEREZHNIAIA, V.G.; PROKHOROV, A.F.; SEMIASHKINA, L.R. The characteristics of the development of different geographical strains of *Strongyloides stercoralis* in a fecal culture. *Méd. Parazitol. (Mosk)*, v. 2, p. 26-8, 1991.

BRENER, Z.; CHAIA, G. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 20, p. 447-451, 1960.

BRUSASCO, V.; PELLEGRINO, R. Airways hyperresponsiveness: from molecules to bedside vited review: complexity of factors modulating airway narrowing in vivo: relevance to assessment of airways hyperresponsiveness. *J. App. Physiol.*, v. 95, p. 1305-1313, 2003.

CARA, D.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. *Histol. Histopathol.*, v.15, p. 899-920, 2000.

CHANDRAWATHANI, P.; OMAR, J.; WALLER, P.J. The control of the free-living stages of *Strongyloides papillosus* by the nematophagous fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Veterinary Parasitology*, v. 76, p. 321-325, 1998.

CHANG, C.H.; GRAHAM, G.L. Parasitism, parthenogenesis and polyploid: The life cycle of *Strongyloides papillosus*. *Journal of Parasitology*, v. 43, p.13, 1957.

CHANG, M.S. The global burden of intestinal nematode infections – Fifty years on. *Parasitol. Today*, v.13, p. 373-387, 1997.

CLIFFE, L.J.; HUMPHREYS, N.E.; LANE, T.E.; POTTEN, C.S.; BOOTH, C.; GRENCIS, R.K. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*, v. 308(5727), p. 1463-1465, 2005.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, v. 245, p. 308-310, 1989.

COLLINS, P.D.; MARLEU, S.; GRIFFITHS-JOHNSON, D.A.; JOSÉ, P.J.; WILLINS, T.J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J. Exp. Med.*, v. 182, p. 1169-1174, 1995.

CONCHA, R.; HARRINGTON, W. Jr; ROGERS, A.I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *J. Clin. Gastroenterol.*, v. 39, p. 203-211, 2005.

COOPER, E.S.; BUNDY, D.A. *Trichuris* is not trivial. *Parasitol Today*, v. 4, p. 301-6, 1988.

COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia humana. 10^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 247-256.

CROMPTON, D.W.T. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.*, v. 85, p. 397-403, 1999.

DAVIES, S.J.; SMITH, S.J.; LIM, K.C.; ZHANG, H.; PURCHIO, A.F.; MCKERROW, J.H.; WEST, D.B. In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 851-859, 2005.

DAWKINS, H.J.S. *Strongyloides ratti* infections in rodents: Value and limitations as a model of human strongyloidiasis. In "Strongyloidiasis: A major roundworm infection of man" (D.I. Grove, Ed.), 1989. pp. 287-332. Taylor & Francis, Philadelphia.

DAWKINS, H.J.S.; ROBERTSON, T.A.; PAPADIMITRIOU, J.M.; GROUVE, D.I. Light and electron microscopical studies of the location of *Strongyloides ratti* in mouse intestine. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v. 69, p. 357-370, 1983.

DE VEER, M.J.; KEMP, J.M.; MEEUSEN, N.T. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, v. 29, p.1-9, 2007.

DYER, K.D.; CZAPIGA, M.; FOSTERB, B.; FOSTER, P.S.; KANG, E.M.; LAPPAS, C.M.; MOSER, J.M.; NAUMANN, N.; PERCOPO, C.M.; SIEGEL, S.J.; SWARTZ, J.M.; RAVIN, S.T.; ROSENBERG, H.F. Eosinophils from lineage-ablated Δ dbpGATA enhancer in the promoter of GATA-1 is not essential for differentiation ex vivo. *The Journal of Immunology*, v. 179, p. 1693-1699, 2007.

DU, J.; STANKIEWICZ, M.J.; LIU, Y.; XI, Q.; SCHMITZ, J.E.; et al. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBP β isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 43481–94, 2002.

EL-MALKY, M.; MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; SHIMADA, S.; YOSHIDA, A.; AMANO, T.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol. Int.*, v. 52, p. 71-79, 2003.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D.; MALISZEWSKI, C.R.; GRENCIS, R.K. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J. Exp. Med.*, v. 179, p. 347-351, 1994.

FERREIRA, C.M.; PEREIRA, A.T.M.; SOUZA, R.S.; CASSALI, G.D.; SOUZA, D.G.; LEMOS, V.S.; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. *Microbes and infection*, v. 9, p. 813-820, 2007.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN, J.F. Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 15, p. 505-533, 1997.

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.*, v. 201, p. 139155, 2004.

FINKELMAN, F.D.; URBAN, J.F. Jr. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, p. 772-780, 2001.

FUKAO, T.; YAMADA, T.; TANABE, M.; TERAUCHI, Y.; OTA, T.; TAKAYAMA, T.; ASANO, T.; TAKEUCHI, T.; KADOWAKI, T.; HATA, J.I.J.; KOYASU, S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat. Immunol.*, v. 3, p. 295-304, 2002.

GALIOTO, A.M.; HESS, J.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; LEE J.J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval strongyloides stercoralis in mice. *Infection and immunity*, v. 74, p. 5730-8, 2006.

GUYATT, G.H. Do intestinal nematodes affect productivity in adulthood? *Parasitol. Today*, v. 16, p.153-8. 2000.

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

GROVE, D.I. Human Strongyloidiasis. *Advances in parasitology*, v. 38, p. 251-309, 1996.

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.*, v. 66, p. 4425-4430, 1998.

HARVEY, S.C.; VINEY, M.E. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics*, v. 158, p. 1527-1533, 2001.

HASEGAWA, H.; ORIDO, Y.; SATO, Y.; OTSURU, M. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*, v. 37, p. 429-434, 1988.

HERBERT, D.R.; LEE, J.J.; LEE, N.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J. Immunol.*, p. 165, v. 4544-4551, 2000.

HERNDON, F.J.; KAYES, S.G. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J. Immunol.*, v. 149, p. 3642-7, 1992.

HISADA, T.; SALMON, M.; NASUHARA, Y.; CHUNG, K.F. Cysteinyl-leukotrienes partly mediate eotaxin-induced bronchial hyperresponsiveness and eosinophilia in IL-5 transgenic mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 160, p. 571-5, 1999.

HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; KORENAGA, M.; MITA, S.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K. In vivo administration of antibody to murine IL-5 receptor inhibits eosinophilia of IL-5 transgenic mice. *Int. Immunol.*, v. 3, p.135-9, 1991.

HOKIBARA, S.; TAKAMOTO, M.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; SUGANE, K. Marked eosinophilia in interleukin-5 transgenic mice fails to prevent *Trichinella spiralis* infection. *J. Parasitol.*, v. 83, p.1186-9, 1997.

HUMBLES, A.A.; LLOYD, C.M.; MCMILLAN, S.J.; FRIEND, D.S.; XANTHOU, G.; MCKENNA, E.E.; GHIRAN, S.; GERARD, N.P.; YU, C.; ORKIN, S.H.; GERARD, C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*, v. 305(5691), p. 1776-1779, 2004.

ISHIKAWA, N.; SHI, B.B.; KHAN, A.I.; NAWA, Y. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. *Parasite Immunol.*, v. 17, p. 581-586, 1995.

JACOBSEN, E.A.; TARANOVA, A.G.; LEE, N.A.; LEE, J.J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 119, p. 1313-1320, 2007.

JANEWAY, C. A. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5ª ed. PORTO Alegre: Artmed, 2002. 824p.

JUSTICE, J.P.; BORCHERS, M.T.; CROSBY, J.R.; HINES, E.M.; SHEN, H.H.; OCHKUR, S.I.; MCGARRY, M.P.; LEE, N.A.; LEE, J.J. Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.*, v. 284, p. 169-78, 2003.

KAWANABE, M.; NOJIMA, H.; UCHIKAWA, R. Transmammary transmission of *Strongyloides ratti*. *Parasitology Research*, v. 75, p. 50-6, 1988.

KAY, A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *TRENDS in Molecular Medicine.*, v. 11, p. 148-152, 2005.

KHAN, A.I.; HORII, Y.; TIURIA, R.; SATO, Y.; NAWA, Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int. J. Parasitol.*, v. 23, p. 551-555, 1993.

KIMURA, K.; SONG, C.H.; RASTOGI, A.; DRANOFF, G.; GALLI, S.J.; LANTZ, C.S. Interleukin-3 and c-kit/stem cell factor are required for normal eosinophil responses in mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Laboratory Investigation*, v. 86, p. 987-996, 2006.

KINASHI, T.; HARADA, N.; SEVERINSON, E.; TANABE, T.; SIDERAS, P.; KONISHI, M.; AZUMA, C.; TOMINAGA, A.; BERGSTEDT-LINDQVIST, S.; TAKAHASHI, M. Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature*, v. 324, p. 70-3, 1986.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J.M.; DELANEY, K.H.; KLEMENT, G.; WEIT, J.I. An oral ivermectin regimen that eradicates Pinworms (*Syphacia* sp) in laboratory rats and mice. *Laboratory Animal Science*, v. 46, p. 286-290, 1996.

KNOTT, M.L.; MATTHAEI, K.I.; GIACOMIN, P.R.; WANG, H.; FOSTER, P.S.; DENT, L.A. Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections with defective eosinophilopoiesis. *Int. J. Parasitol.*, v. 37, p. 1367-78, 2007.

KOPF, M.; BROMBACHER, F.; HODGKIN, P.D.; RAMSAY, A.J.; MILBOURNE, E.A.; DAI, W.J.; OVINGTON, K.S.; BEHM, C.A.; KOHLLER, G.; YOUNG, I.G.; MATTHAEI, K.I. IL-5-deficiente mice have a development defect in CD5⁺B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*, v. 4, p.15-24, 1996.

KOTHARY, N.N.; MUSKIE, J.M.; MATHUR, S.C. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *Radiographics.*, v. 19, p. 1077-1081, 1999.

KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 113, p. 30–37, 2004.

LANTZ, C.S.; BOESIGER, J.; SONG, C.H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R.C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S.J. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, v. 392, p. 90-93, 1998.

LAWRENCE, C.E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? *Parasite Immunol.*, v. 25, p. 271-281, 2003.

LAWRENCE, C.E.; PATERSON, J.C.; HIGGINS, L.M.; MACDONALD, T.T.; KENNEDY, M.W.; GARSIDE, P. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 28, p. 2672-2684, 1998.

LAWRENCE, R.A.; GRAY, C.A.; OSBORNE, J.; MAIZELS, R.M. *Nippostrongylus brasiliensis*: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice. *Exp Parasitol.* v. 84, p. 65-73, 1996.

LEE, J.J.; DIMINA, D.; MACIAS, M.P.; OCHKUR, S.I.; MCGARRY, M.P.; O'NEILL, K.R.; PROTHEROE, C.; PERO, R.; NGUYEN, T.; CORMIER, S.A.; LENKIEWICZ, E.; COLBERT, D.; RINALDI, L.; ACKERMAN, S.J.; IRVIN, C.G.; LEE, N.A. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*. v. 305(5691), p. 1773-6, 2004.

LENTZE T, HOFER D, GOTTSTEIN B, GAILLARD C, BUSATO A. Prevalence and importance of endoparasites in calves raised in Swiss cow-calf farms. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, v. 106, p. 275-81, 1999.

LINK, K.; ORESTEIN, R. Bacterial complications of strongyloidiasis: *Streptococcus bovis* meningitis. *South Med J.*, v. 92, p. 728-731, 1999.

MAIZELS, R.M., BALIC, A.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; NAIR, M.; TAYLOR, M.D.; ALLEN, J.E. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol.*, v. 201, p. 89-116, 2004.

MARUYAMA, H.; EL-MALKY, M.; KUMAGAI, T.; OHTA, N. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. *Parasitology*, v. 126, p. 165-171, 2003.

MARUYAMA, H.; HATANO, H.; KUMAGAI, T.; EL-MALKY, M.; YOSHIDA, A.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: heparin-binding adhesion substances in immunologically damaged adult worms. *Exp Parasitol.*, v. 95, p. 170-175, 2000.

MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; EL-MALKY, M.; OKAMURA, S.; AOKI, M.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; SHIMADA, S.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. *Exp Parasitol.*, v. 100, p. 179-185, 2002.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. *Exp. Parasitol.*, v. 85, p. 10-15, 1997.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. *Exp. Parasitol.*, v. 89, p. 16-20, 1998.

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.*, v. 8, p. 339-342, 1998.

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

MILDER, J.E.; WALZER, P.D.; KILGORE, G.; RUTHERFORD, I.; KLEIN, M. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. *Gastroenterology*, v. 80, p. 1481-1488, 1981.

MONCOL, D.J.; GRICE, M.J. Transmammary passage of *Strongyloides papillosus* in the goat and sheep. *Proc. Helmin. Soc. Wash.*, v. 41, p. 1-4, 1974.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 145-73, 1989.

NAKAMURA, Y.; MOTOKAWA, M. Hypolipemia associated with the wasting condition of rabbits infected with *Strongyloides papillosus*. *Veterinary Parasitology.*, v. 88, p. 147-51, 2000.

NAWA, Y.; KIYOTA, M.; KORENAGA, M.; KOTANI, M. Defective protective capacity of W/W^v mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunol.*, v. 7, p. 429-38, 1985.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SILVEIRA, M.R.; CYNTHIA, M.B.; 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. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 2607-2614, 2003.

NEGRÃO-CORRÊA, 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.*, v.72, p. 1135-1142, 2004.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M.M. The mutual influence of nematode infection and allergy. *Chem. Immunol. Allergy*, v. 90, p. 14-28, 2006.

NEGRÃO-CORRÊA, 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.*, v. 36, p. 1185-95, 2006.

NEVA, F.A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. *J. Infect Dis.*, v. 153, p. 397-406, 1986.

NISHINAKAMURA, R. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / interleukin-3 / interleukin-5 functions. *Blood*, v. 88, p. 2458-2464, 1996.

NOKES, C.; GRANTHAM-MCGREGOR, S.M.; SAWYER, A.W.; COOPER, E.S.; BUNDY, D.A. Parasitic helminth infection and cognitive function in school children. *Proc. Biol. Sci.*, v. 247, p. 77-81, 1992.

OCHOA, M.D.; RAMÍREZ-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.*, v. 39, p. 524-526, 2003.

ONAH, D.N., NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J. Parasitol.*, v. 38, p. 209-236, 2000.

OVINGTON, K.S.; MCKIE, K.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G.; BEHM, C.A. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology*, v. 95, p. 488-93, 1998.

PORTO, A.F.; NEVA, F.A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO, E.M. HTLV-1 decreases TH2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol.*, v. 23, p. 503-507, 2001.

PORTO, M.A.F.; MUNIZ, A.; JÚNIOR, J.O.; CARVALHO, E.M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrogiloidíase. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, v. 35, p. 641-649, 2002.

RAINBIRD, M.A. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and IL-5. *Parasite immunology*, v. 20, p. 93-103, 1998.

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, v. 24, p. 147-174, 2006.

ROTMAN, H.L.; SCHYNYDER-CANDRIAN S.; SCOTT, P.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHM, D. IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunology*, v. 19, p. 29. 1997.

ROTMAN, H.L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R.A.; LEON, O.; GLEICH, G.J.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides*

stercoralis: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol.*, v. 82, p. 267-278, 1996.

SABIN, E.A.; KOPF, M.A.; PEARCE, E.J. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J. Exp. Med.*, v. 184, p. 1871-1878, 1996.

SATO, Y.; TOMA, H. Effects of spleen cells and serum on transfer of immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in hypothyroid (nude) mice. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, p. 63-67, 1990.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, p. 57-62, 1990.

SEN, P.; GIL, C.; ESTRELLAS, B.; MIDDLETON, J.R. Corticosteroid-induced asthma: a manifestation of limited hyperinfection syndrome due to *Strongyloides stercoralis*. *South Med J.*, v. 88, p. 923-7, 1995.

SHEN, H.H.; OCHKUR, S.I.; MCGARRY, M.P.; CROSBY, J.R.; HINES, E.M.; BORCHERS, M.T.; WANG, H.; BIEHELLE, T.L.; O'NEILL, K.R.; ANSAY, T.L.; COLBERT, D.C.; CORMIER, S.A.; JUSTICE, J.P.; LEE, N.A.; LEE, J.J. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse, *J. Immunol.*, v. 170, p. 3296-3305, 2003.

SHI, H. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.*, v. 76, p. 520-27, 2004.

SHINKAI, K.; MOHRS, M.; LOCKSLEY, R.M. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*, v. 420, p. 825-829, 2002.

SHINKA, I.K.; MOHRS, M.; LOCKSLEY, R.M. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*, v. 420, p. 825-9, 2002.

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology.*, v. 97, p. 129-38, 1988.

SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Strongyloidiasis. *Curr. Treatment. Option.*, v. 5, p. 283-289, 2003.

SILVEIRA, M.R.; NUNES, K.P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORREA, A. Jr; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun.*, v. 70, p. 6263-6272, v. 2002.

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: Strongyloidiasis: a Major Roundworm Infection of Man (D.I. Grove, ed). Pp.11-83. London: Taylor & Francis, 1989.

STEPHENSON, L.S.; LATHAM, M.C.; OTTESEN, E.A. Malnutrition and parasitic helminth infection. *Parasitology*, v. 121, p. S23-S28, 2000.

STEWART, T.B.; HALE, O.M, Losses to internal parasites in swine production. *J. Anim. Sci.*, v. 66, p. 1548-1554, 1988.

STRATH, M.; WARREN, D.J.; SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods*, v. 83, p. 209-215, 1985.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *Int. J. Parasitol.*, v. 25, p. 907-911, 1995.

TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 16, p. 418-423, 1995.

TSAI, H.C.; LEE, S.S.; LIU, Y.C.; *et al.* Clinical manifestations of strongyloidiasis in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 35, p. 29-36, 2002.

URBAN, J.F. Jr; MADDEN, K.B.; SVETIC, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P.P.; GAUSE, W.C.; KATONA, I.M.; FINKELMAN, F.D. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.*, v. 127, p. 205-220, 1992.

URBAN, J.F. Jr; MALISZEWSKI, C.R.; MADDEN, K.B.; KATONA, I.M.; FINKELMAN, F.D. IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *J. Immunol.*, v. 154, p. 4675-4684, 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-4R- α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity.*, v. 8, p. 255-264, 1998.

VADLAMUDI, R.S., CHI, D.S., KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy.* v. 4, p. 8, 2006.

VIEIRA, A.T. Papel do eosinófilo na patogênese da colite ulcerative experimental em camundongos. 2008. 91 f. (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VINEY, M.E.; LOK, J.B. *Strongyloides* spp. (23, Maio, 2007). WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, DOI/10.1895/wormbook.1.141.1, <http://www.wormbook.org>.

VINEY, M.E. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitol. Today*, v. 15, p. 231-5, 1999.

VINEY, N.N. Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 263, p. 201-208, 1996.

VOEHRINGER, D.; REESE, T.A.; HUANG, X.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R.M. Type 2 immunity is controlled by hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. 2006; DOI: 10.1084/JEM.20052448, <http://www.jem.org.br>.

VOEHRINGER, D.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R.M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*, v. 20, p. 267-277, 2004.

WATANABE, K.; NODA, K.; HAMANO, S.; KOGA, M.; KISHIHARA, K.; NOMOTO, K.; TADA, I. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitol Res.*, v. 86, p. 188-93, 2000.

WEHNER, J.H.; KIRSCH, C.M.; KAGAWA, F.T.; JENSEN, W.A.; Campagna, A.C.; M. Wilson. The prevalence and response to therapy of *Strongyloides stercoralis* in patients with asthma from endemic areas. *Chest*, v. 106, p. 762–766, 1994.

WILDER JA, COLLIE DD, WILSON BS, BICE DE, LYONS CR, LIPSCOMB MF. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v. 20, p. 1326-34, 1999.

WILLS-KARP, M. Immunologic bases of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Review of Immunology.*, v. 17, p. 255-281, 1999.

WILLS-KARP, M.; KARP, C.L. Eosinophils in asthma: remodeling a tangled tale. *Science.*, v. 305(5691), p. 1726-9, 2004.

YAMADA, M.; MATSUDA, S.; NAKASAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. *Journal of Parasitology*, v.77, p. 592-594, 1991.

YOKOTA, T.; COFFMAN, R.L.; HAGIWARA, H.; RENNICK, D.M.; TAKEBE, Y.; YOKOTA, K.; GEMMELL, L.; SHRADER, B.; YANG, G.; MEYERSON, P. Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulating factor activities: relationship to interleukin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. Nov.*, v. 84, p. 7388-92, 1987.

YU, C.; CANTOR, A.B.; YANG, H.; BROWNE, C.; WELLS, R.A.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S.H. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J. Exp. Med.*, v. 195, p. 1387-1395, 2002.

ZHAO, A.; MCDERMOTT, J.; URBAN, J.F. Jr; GAUSE, W.; MADDEN, K.B.; YEUNG, K.A.; MORRIS, S.C.; FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small

intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J. Immunol.*, v. 171, p. 948-954, 2003.

ZUANY-AMORIM, C.; HAILÉ, S.; LEDUC, D.; DUMAREY, C.; HUERRE, M.; VARGAFTIG, B.B.; PRETOLANI, M. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J. Clin. Invest.*, v. 95, p. 2644-2651, 1995.