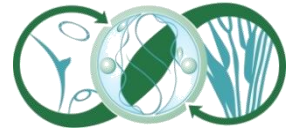




UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



**ASPECTOS PROTETORES ENVOLVIDOS NA REINFECÇÃO POR
Ascaris suum EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE EXPOSIÇÃO E DA DOSE
DA INFECÇÃO NA ASCARIDÍASE LARVAL**

Chiara Cássia Oliveira Amorim

Belo Horizonte - MG

2021

Chiara Cássia Oliveira Amorim

**ASPECTOS PROTETORES ENVOLVIDOS NA REINFECÇÃO POR
Ascaris suum EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE EXPOSIÇÃO E DA DOSE
DA INFECÇÃO NA ASCARIDÍASE LARVAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientadora: Dra. Denise Silva Nogueira

Área de concentração: Helminologia

Belo Horizonte - MG

2021

- 043 Amorim, Chiara Cássia Oliveira.
Aspectos protetores envolvidos na reinfecção por *Ascaris suum* em função do número de exposição e da dose da infecção na ascaridíase larval [manuscrito] / Chiara Cássia Oliveira Amorim. – 2021.
113 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Co-orientadora: Dra. Denise Silva Nogueira.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Ascaridíase. 3. *Ascaris suum*. 4. Infecção. 5. Imunidade Humoral. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Nogueira, Denise Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Chiara Cássia Oliveira Amorim

422/2021/01
entrada
1º/2019
2019653979

Às **quatorze horas** do dia **23 de abril do ano de 2021**, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/ffs-mxvv-nxp>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Aspectos protetores envolvidos na reinfecção por *Ascaris suum* em função do número de exposição e da dose da infecção na ascariíase larval”** área de concentração: **Helmintologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG	Aprovada
Dr. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães	NIH-USA	Aprovada
Dr. Stefan Michael Geiger	UFMG	Aprovada
Dra. Denise Silva Nogueira	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Repassadas à discente durante a arguição

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 23 de abril de 2021.

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara _____

(Orientador)

Dr. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães _____

Dr. Stefan Michael Geiger _____

Dra. Denise Silva Nogueira _____

(Coorientadora)

Chiara Cássia Oliveira Amorim

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e co-orientação da Dra. Denise Silva Nogueira.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Prof^a. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Prof^a. Dra..Daniella Castanheira Bartholomeu

Dra. Denise Silva Nogueira

Dr. Fabrício Marcus de Oliveira

MSc. Ana Clara Gazzinelli-Guimarães

MSc. Lucas Kraemer Rocha

MSc. Thais Leal Silva

Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/UFMG

Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar

Prof. Remo Castro Russo

Departamento de Patologia - ICB/UFMG

Laboratório de Protozooses

Prof. Marcelo Vidigal Caliri

Laboratório de Imunologia - Instituto de Pesquisa René Rachou/Fiocruz

Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

ORGÃO FINANCIADOR: CNPq

Aos meus pais, Maria do Carmo e Danilo

A toda minha família e amigos

"É justo que muito custe, o que muito vale" (Santa Teresa D'Ávila)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora. A Deus por guiar meus passos e direcionar meu caminho na presença diária do teu Espírito Santo que me trouxe força e sabedoria para perseverar na certeza de que os sonhos de Deus são maiores que os meus e na Tua presença é que prosperamos. A Nossa Senhora por me acolher debaixo do teu manto sagrado e me aconchegar em teu colo nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e apoio. Por dedicarem suas vidas a mim fazendo com que fosse possível a realização desse sonho. Vocês são o meu maior bem. Ao meu irmão e padrinho, pelo grande exemplo de determinação e por seu companheirismo e confiança a mim oferecidos.

A minha Tia Regina, por ser uma segunda mãe e a melhor colega de quarto, por todas as gargalhadas que demos juntas a cada noite. Ao meu primo Luis, por ser mais meu irmão que primo, por todas as histórias que vivemos juntos e por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos meus sobrinhos, por me trazerem tanta alegria e despertar em mim a vontade de sempre ser alguém melhor por eles e pra eles. Com certeza a minha vida ficou muito melhor depois da chegada deles.

A todos meus familiares, que contribuíram imensamente para que tudo isso se tornasse realidade, por serem meus maiores admiradores e por me enxergarem como a pessoa mais inteligente e dedicada da face da Terra.

Aos meus grandes amigos da Igreja Padre Eustáquio. Vocês foram de longe a melhor coisa que aconteceu em minha vida, a cada dia vocês me ensinam sobre como é sentir e viver o maior e mais verdadeiro AMOR do mundo. Obrigada por todos os sorrisos que me proporcionaram, por chorarem e se alegrarem comigo, por me escutarem em momentos de loucura e desespero, mas também em meus momentos de extrema felicidade e empolgação.

Aos meus amigos da BIO, em especial Lorena, Lunna, Debs e Soso. Obrigada por todo companheirismo e amizade durante a graduação, com certeza vocês são uma parte essencial para a realização deste trabalho. Levarei vocês comigo para o resto da minha vida. Um agradecimento especial ao meu amigo Guilherme Batista, que tenho certeza que olha por nós lá de cima. Nunca me esquecerei do seu sorriso e do seu amor pela Biologia.

Aos amigos do antigo e atual "Grupo *Ascaris*": Aninha, Dê, Fernandão, Lu, Nathy, Pedro, Fabrício e Lucas não tenho nem palavras para agradecer. Obrigada por me ensinarem a trabalhar com alegria, por mostrarem que a união é o caminho para o sucesso, pelos imensos

experimentos em bancada, por toda ajuda e contribuição para que projeto se tornasse possível. Tudo que hoje sei devo a vocês. Sempre terá uma parte de vocês em mim.

Aos demais amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) pelo agradável convívio, amizade e risadas diárias. Desconheço um ambiente de trabalho mais incrível que esse.

A Michele por toda ajuda, disponibilidade, competência, por sempre nos oferecer colo e dar conselhos em momentos de desespero. A Vanessa por toda organização, por toda vontade de nos ensinar e ajudar e por sempre me salvar no pHmetro.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara, pela oportunidade de ingressar em um laboratório extraordinário, por todos os ensinamentos e oportunidades de aprender cada dia mais e por ser, sem dúvida, um grande exemplo de pessoa e de profissional.

A minha co-orientadora, Denise Nogueira, que mais que uma co-orientadora é uma grande amiga. Obrigada por dedicar seu tempo para me ensinar tudo que sabe, por ser excelente companheira de bancada, por muitas vezes quebrar a cabeça e correr atrás das coisas comigo para que conseguíssemos realizar este trabalho, obrigada por toda disponibilidade.

A todos os colaboradores deste trabalho sem os quais não seria possível o prosseguimento do mesmo.

A minha turma de mestrado que contribuiu para que esse caminho fosse ainda mais lindo. Nada seria tão fantástico se não fosse com vocês. Em especial, agradeço minha dupla de turma, colega de laboratório e amiga da vida, Raquel, por tamanho companheirismo e carinho.

Aos professores da Pós-Graduação, por compartilharem parte do seu conhecimento.

À Sumara e Sibele que sempre são tão solícitas e dispostas a nos ajudar e auxiliar. Elas que muitas vezes durante esses dois anos me oferecem palavras e abraços de conforto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento da bolsa de estudos que permitiu que eu pudesse me dedicar ao mestrado exclusivamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia por toda excelência em formar grandes parasitologistas.

RESUMO

A ascaridíase humana é uma doença cosmopolita e negligenciada, afetando cerca de 450 milhões de pessoas, sendo assim, a geo-helminthíase mais prevalente do mundo. Em áreas endêmicas a reinfeção é recorrente devido às precárias condições de saneamento básico e ações de educação em saúde pouco eficientes. Nesse cenário, a maioria dos indivíduos adultos infectados nessas áreas são expostos múltiplas vezes ao parasito, e apresentam baixa carga parasitária. Apesar das indicações imunológicas e fisiológicas pulmonares em estudos com múltiplas exposições, outras avaliações são necessárias a fim de fornecer mais evidências sobre a biologia da interação entre *Ascaris* sp. e o hospedeiro. Nesse sentido, faz-se necessário comparar infecções únicas a diferentes abordagens de infecções múltiplas e no impacto gerado na função pulmonar em modelo murino, focando nos possíveis mecanismos que controlam a proteção contra ascaridíase larval. Assim, em busca de aliar a proteção parasitária a uma menor morbidade, o objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos da infecção por *Ascaris suum* em função do número de exposições e da dose de infecção na proteção da ascaridíase larval. Para isso, camundongos BALB/c foram divididos nos seguintes grupos experimentais: considerando o número de exposições, uma exposição - PI; duas exposições - RI (2X) e três exposições - RI (3X), e considerando as doses de infecção, 25 ovos - RI (25); 250 ovos - RI (250) e 2.500 ovos - RI (3X), seguido de infecção desafio com 2.500 ovos. Como principais resultados obtidos podemos destacar uma redução da carga parasitária dos grupos reinfectedos quando comparados aos primoinfectados, sendo o RI (3X) com maior proteção. Em compensação o grupo RI (250) apresentou uma redução da carga parasitária próxima a do RI (3X), porém, esta foi aliada a uma inflamação mais discreta, menores danos teciduais e parâmetros fisiológicos semelhantes a do NI. Sendo assim, entre os grupos reinfectedos foi o que apresentou melhor prognóstico. Além disso, foi observado maiores níveis de IgG total e SIgA específicos nos grupos reinfectedos e que a proteção ocorre de forma dependente do número de exposição e da dose de infecção, indicando uma importante participação da resposta humoral frente a redução e controle da carga parasitária nos pulmões desses animais.

Palavras-chave: Ascaridíase larval, *Ascaris suum*, reinfeção, resposta humoral.

ABSTRACT

Human ascariasis is a neglected and cosmopolitan disease, affecting about 450 million people, making it the most prevalent geohelminthiasis in the world. In endemic areas, reinfection is recurrent due to the precarious conditions of basic sanitation and health education. In this scenario, the majority of adult individuals infected in these areas are exposed to the parasite multiple times, and have a low parasitic load. Despite the pulmonary immunological and physiological indications in studies with multiple exposures, further evaluations are necessary in order to provide more evidence on the biology of the interaction between *Ascaris* sp. and the host, therefore, it is necessary to compare single infections to different approaches to multiple infections and the impact on lung function in a murine model, focusing on the possible mechanisms that control protection against larval ascariasis. Thus, in order to combine parasitic protection with lower morbidity, the objective of the present study was to evaluate the impacts of *Ascaris suum* infection as a function of the number of exposures and the dose of infection in the protection of larval ascariasis. For this, BALB/c mice were divided into the following experimental groups: considering the number of exposures, one exposure - PI; two exposures - RI (2X) and three exposures - RI (3X), and considering the doses of infection, 25 eggs - RI (25); 250 eggs - RI (250) and 2,500 eggs - RI (3X), followed by challenge infection with 2,500 eggs. As main results obtained, we can highlight a reduction in the parasitic load of the reinfected groups when compared to the primoinfected ones, with the IR (3X) with greater protection. In compensation, the group and RI (250) showed a reduction in parasitic load close to that of RI (3X), however, this was combined with more mild inflammation, less tissue damage and physiological parameters similar to that of NI. Thus, among the reinfected groups, it was the one with the best prognosis. In addition, it was observed higher levels of total IgG and specific SIgA in the reinfected groups and that protection occurs depending on the number of exposure and the dose of infection, suggesting an important participation of the humoral response to the reduction and control of the parasitic load in the lungs of these animals.

Keywords: Larval ascariasis, *Ascaris suum*, reinfection, humoral response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias dos estágios de desenvolvimento de <i>Ascaris</i> spp....	20
Figura 2: Ciclo biológico do parasito <i>Ascaris</i> spp.....	22
Figura 3: Ciclo biológico do parasito <i>Ascaris</i> sp. no modelo animal.....	23
Figura 4: Grupos Experimentais.....	37
Figura 5: Delineamentos Experimentais..	38
Figura 6: Sistema de pontuação histopatológica para pulmões de camundongos.....	43
Figura 7: Carga parasitária dos camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> oito dias após a infecção desafio.....	50
Figura 8: Contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina e proteína total no BAL dos camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao <i>A. suum</i> no oitavo dia após a infecção desafio....	52
Figura 9: Níveis da atividade de EPO, MPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.....	54
Figura 10: Quantificação das citocinas IL-5, IL-13 e IL-4 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.....	55
Figura 11: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	56
Figura 12: Quantificação das citocinas IL-10, IL-17A e IL-2 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio....	57
Figura 13: Níveis séricos de IgG total específico para antígeno bruto de verme adulto de <i>A.suum</i> , níveis das subclasses de IgG e níveis de SIgA no lavado broncoalveolar em camundongos BALB/c. com diferentes números de exposições ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	59

Figura 14: Análise de correlação entre produção de anticorpos e carga parasitária em camundongos BALB/c. com diferentes números de exposições ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.	60
Figura 15: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio	61
Figura 16: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio....	63
Figura 17: Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.....	64
Figura 18: Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de infecção ao <i>A. suum</i> oito dias após a infecção desafio.	67
Figura 19: Contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina e proteína total no BAL dos camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> no oitavo dia após a infecção desafio....	70
Figura 20: Níveis da atividade de EPO, MPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.....	72
Figura 21: Quantificação das citocinas IL-5, IL-13 e IL-4 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.	73
Figura 22: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio.	74
Figura 23: Quantificação das citocinas IL-10, IL-17A e IL-2 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	75
Figura 24: Níveis séricos de IgG total específico para antígeno bruto de verme adulto de <i>A. suum</i> , níveis de subclasses de IgG e avaliação da produção de SIgA no lavado broncoalveolar em camundongos BALB/c. com diferentes carga de exposição a <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	76

Figura 25: Análise de correlação entre produção de anticorpos e carga parasitária em camundongos BALB/c/. com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	78
Figura 26: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	79
Figura 27: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	81
Figura 28: Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com <i>A. suum</i> , no oitavo dia após a infecção desafio..	82

.

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
BAL	Lavado broncoalveolar
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongos de pelagem albina
BCA	<i>"Bicinchoninic acid"</i> (Ácido bicinconínico)
BSA	Albumina bovina sérica
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DALYs	<i>"Disability-adjusted life years"</i> (Anos de vida perdidos por incapacidade)
EDTA	<i>"Ethylenediamine tetraacetic acid"</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima
EPO	Peroxidase de eosinófilos
GBD	<i>"Global burden disease"</i> (Doença de carga global)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Ig	Imunoglobulina
ILC2	Células linfoides inatas tipo 2
L3	Larva de terceiro estágio infectante de <i>A. suum</i>
L4	Larva de quarto estágio de <i>A.suum</i>
MAA	Macrófagos alternativamente ativados
MPO	Mieloperoxidase de neutrófilos
NAG	N-acetilglicosaminidase
NI	Grupo de animais não infectados
NK	Células <i>"natural killer"</i>

NOD	Receptores intracelular de oligomerização de ligação a nucleotídeos
OD	Densidade óptica
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde - " <i>World Health Organization</i> "
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	<i>"o-phenylenediamine dihydrochloride"</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	<i>"Phosphate buffered saline"</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PI	Grupo de animais primoinfectados
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RI (2X)	Grupo de animais reinfectedados com uma exposição (2.500 ovos) e uma infecção desafio (2.500 ovos)
RI (3X)	Grupo de animais reinfectedados com duas exposições (2.500 ovos) e uma infecção desafio (2.500 ovos)
RI (250)	Grupo de animais reinfectedados com duas exposições (250 ovos) e uma infecção desafio (2.500 ovos)
RI (25)	Grupo de animais reinfectedados com duas exposições (25 ovos) e uma infecção desafio (2.500 ovos)
TA	Temperatura ambiente
TMB	<i>"3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine"</i> (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina)
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A Ascariíase.....	18
1.1.1 O Agente etiológico.....	18
1.1.2 Biologia e ciclo evolutivo.....	19
1.1.3 Epidemiologia.....	24
1.1.4 Manifestações clínicas e fisiopatologia	25
1.1.5 Diagnóstico e tratamento	28
1.1.6 Resposta imune.....	28
1.1.7 Reinfecções por <i>Ascaris</i>	30
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Material biológico	36
4.1.1 <i>Ascaris suum</i>	36
4.1.2 Camundongos	36
4.2 Delineamento experimental e infecção experimental.....	37
4.2.1 Delineamento experimental.....	37
4.2.2 Infecção Experimental.....	38
4.2.3 Procedimento de anestesia, coleta de sangue e eutanásia.....	39
4.3 Caracterização do perfil parasitológico	39

4.3.1 Obtenção, processamento e quantificação parasitária no lavado broncoalveolar ...	39
4.3.2 Quantificação da carga parasitária tecidual e total	40
4.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares	41
4.5 Avaliação dos aspectos histopatológicos pulmonares	42
4.6 Caracterização dos aspectos imunológicos e inflamatórios	43
4.6.1 Dosagem de citocinas teciduais	43
4.6.2 Quantificação de atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos	44
4.6.3 Contagem diferencial de células, dosagem de hemoglobina e de proteínas total no BAL	45
4.6.4 Detecção da produção de IgG sérico, total específico e subclasses, e produção de SIgA no BAL.....	46
4.7 Análise estatística dos dados	47
CAPÍTULO 01	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Efeito protetor dos diferentes números de exposições	49
5.2 Avaliação dos aspectos imunológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes números de exposições	50
5.3 Avaliação histopatológica e dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes números de exposições	60
CAPÍTULO 02	65
6. RESULTADOS	66
6.1 Efeito protetor das diferentes doses de infecção	66
6.2 Avaliação dos aspectos imunológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes doses de infecção	68
6.3 Avaliação histopatológica e dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes doses de infecção	78
7. DISCUSSÃO	83
8. CONCLUSÃO	93

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
10. ANEXO.....	113
10.1 Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG	113

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Ascaridíase

1.1.1 O Agente etiológico

As helmintíases são infecções parasitárias causadas por representantes dos filos Nematoda e Platyhelminthes. Dentro do filo Nematoda encontram-se os geo-helmintos, que são parasitos que desenvolvem parte importante do seu ciclo no solo e também são os agentes etiológicos das doenças parasitárias intestinais mais comuns dos países em desenvolvimento, como ascaridíase, a tricuriase e ancilostomíase (Lustigman et al., 2012).

A ascaridíase humana tem como agente etiológico o helminto *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). Esse parasito pertence ao Filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e gênero *Ascaris*.

Em meados da década de 50 nematódeos desse gênero tornaram-se motivo de preocupação e discussão científica, pela possibilidade de *Ascaris suum* e *A. lumbricoides* serem a mesma espécie e de ocorrer transmissão cruzada entre homens e suínos (Leles et al., 2012; Betson et al., 2014). O helminto *A. suum* (Goeze, 1782) foi descrito como agente causador da ascaridíase em suínos e essa infecção é responsável por ocasionar grande impacto no setor pecuário (Hale & Stewart, 1979, Hale et al., 1985, Roepstorff, A. et al., 2011) principalmente devido a perdas econômicas geradas por causa dos efeitos clínicos, da redução do crescimento e da conversão alimentar da suinocultura, do custo para controlar a infecção por meio da utilização de antihelmínticos e da condenação de órgãos, por exemplo, o fígado (Thamsborg et al., 2013).

Essa associação entre a espécie do parasito e o hospedeiro é proveniente de estudos de infecções experimentais (Takata, 1951; Galvin, 1968) e de observações epidemiológicas (Anderson et. al, 1993; Anderson & Jaenike, 1997). Esse desacordo na literatura ocorre, pois alguns autores questionam a real existência de duas espécies distintas já que todos os estágios de desenvolvimento destes parasitos são morfologicamente e biologicamente indistinguíveis (Anderson, 2001; Leles et al., 2012; Liu et al., 2012), exceto por uma pequena diferença no formato dos dentículos dos vermes adultos (Sprent, 1952; Barbosa, 2015). Outros autores defendem a existência de uma única espécie com base em estudos moleculares, paleoparasitológicos, na história de contato próximo entre humanos e porcos selvagens

(iniciado há aproximadamente dez mil anos) e também em análise comparativa do genoma mitocondrial (Leles et al., 2012; Liu et al., 2012).

Segundo Leles e colaboradores (2012) as pequenas diferenças observadas nos exemplares provenientes de humanos e suínos seriam reflexo de pequenas modificações adaptativas no genótipo e fenótipo destas populações. Além de que, a discussão que considera essas espécies sinônimas se fortaleceu a partir de inúmeras evidências do caráter antroponótico de *A. suum* (Takata, 1951; Anderson, 1993; Nejsun et al., 2005; Arizono et al., 2010; Nejsun et al., 2012), e do potencial zoonótico confirmado de *A. lumbricoides* (Galvin, 1968), inclusive, a partir dessas observações é possível sugerir que os porcos podem até mesmo atuar como um potencial reservatório da infecção para humanos.

O estudo dessa controvérsia é de grande relevância, pois sua importância não reflete apenas na classificação taxonômica, mas também, nas implicações diretas das ações profiláticas e de vigilância epidemiológica da ascaridíase. Uma vez que dados na literatura, experimentais e moleculares, demonstram que ambas as espécies podem ser patogênicas tanto para humanos quanto para suínos, já que a transmissão cruzada experimental entre humanos e suínos já foi evidenciada (Takata 1951; Barbosa 2015, Avery et al., 2018; Sadaow et al., 2018; Monteiro et al., 2019). Inclusive, alguns estudos epidemiológicos têm sugerido a ocorrência de transmissão cruzada natural (Nejsun et al., 2012; Betson et al., 2014; Miller et al., 2015; Barbosa, 2015), fazendo com que também haja um desacordo na comunidade científica sobre a proporção da população humana infectada com *A.suum* ou *A.lumbricoides* (Leles et al., 2012).

Assim, diante dessa discussão e da dificuldade de estudar *A. lumbricoides* em humanos, muitos estudos experimentais visualizaram a possibilidade de utilizar a infecção por *A. suum* em camundongos como modelo para compreender diferentes aspectos da ascaridíase, como a interação parasito hospedeiro, o padrão de resposta imunológica, patogenia e outros.

1.1.2 Biologia e ciclo evolutivo

Para melhor conhecer o agente etiológico de determinada doença é extremamente necessário que se compreenda a biologia e o ciclo do parasito. Dessa maneira, quanto às formas evolutivas, os representantes do gênero *Ascaris* apresentam em seu ciclo de vida três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e verme adulto (**Figura 1**). Possuem ciclo monoxênico, ou seja, se desenvolve em apenas um hospedeiro, com período de incubação dos ovos no ambiente. A transmissão do parasito ocorre por via fecal-oral, já que ovos embrionados, contendo a forma

infectante do parasito necessitam ser ingeridos pelos hospedeiros susceptíveis (humanos e suínos) para iniciar a infecção.

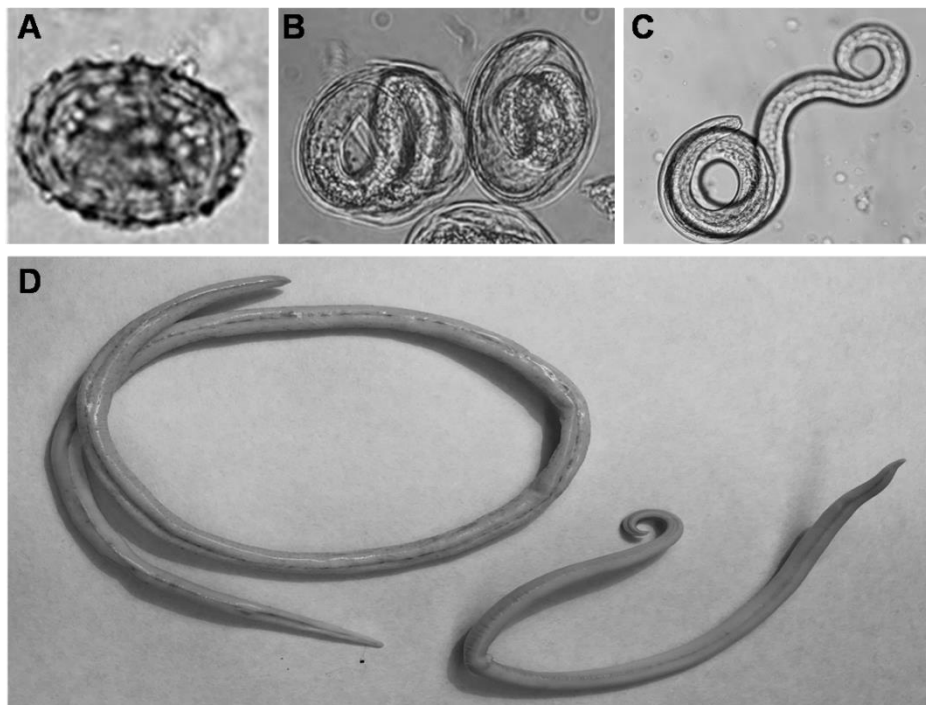


Figura 1: Fotografias dos estágios de desenvolvimento de *Ascaris spp.*. A) ovo fértil não embrionado com membrana mamilonada (visualização microscópica - aumento de 40X), B) ovo larvado decorticado (visualização microscópica - aumento de 40X); C) larva L3/L4 retirada dos pulmões (visualização microscópica - aumento de 40X) e D) Verme adulto fêmea (espécime mais robusto) à esquerda, e macho (espécime com a extremidade posterior recurvada ventralmente) à direita.

Os vermes adultos são longos e cilíndricos, de coloração branca, dióicos, cujas formas adultas habitam o intestino delgado principalmente jejuno e íleo, causando a ascaridíase (Dold & Holland, 2011a). Possuem uma camada exterior quitinosa consistindo a cutícula e a boca, que possui três lábios e se abre na extremidade anterior. Apresentam dimorfismo sexual, que se evidencia nos machos por meio da extremidade posterior recurvada na direção ventral e nas fêmeas por meio do comprimento, geralmente sendo maiores (20 a 49 cm de comprimento por 3 a 6 mm de diâmetro) que os machos (15 a 30 cm de comprimento por 2 a 4 mm de diâmetro). Contudo, essas proporções podem variar em decorrência do estado nutricional do hospedeiro e da carga parasitária devido à competição intraespecífica (Walker et al., 2010). No intestino delgado, ao atingir a maturidade sexual, aproximadamente 60 dias após a infecção, machos e fêmeas se reproduzem sexuadamente e as fêmeas fecundadas passam a liberar ovos, em média

200.000 por dia, que irão chegar ao meio ambiente através das fezes do hospedeiro. Na ausência de machos as fêmeas liberam ovos inférteis (Kennedy, 1998; Holland, Behnke, Dold, 2013).

Os ovos apresentam forma oval com 45 a 75 μm de diâmetro, de coloração castanha devido aos pigmentos biliares contidos nas fezes e cápsula espessa composta por três membranas: *membrana mamilonada*, camada mais externa, grossa, de superfície irregular e formada por mucopolissacarídeos; *membrana intermediária*, quitinosa e transparente; e a *membrana vitelina*, camada mais interna, delgada, formada predominantemente por lipídios que confere uma impermeabilidade à água, garantindo aos ovos a capacidade de resistir às condições adversas do meio ambiente. Em algumas situações a membrana mamilonada pode ser perdida, sendo os mesmos denominados, então, ovos decorticados. Esses ovos, quando férteis e já presentes nas fezes, com duas a três semanas no solo, em condições adequadas de temperatura (25-30 °C), umidade (70%) e na presença de oxigênio, desenvolverá a larva de terceiro estágio (L3) infectante em seu interior (Dold & Holland, 2011b; Holland, Behnke, Dold, 2013).

No ambiente, os ovos permanecem viáveis por longos períodos, contaminando o solo, água e alimentos. E, ao serem ingeridos por hospedeiros suscetíveis, as L3 irão eclodir no intestino grosso do mesmo. Em seguida, as L3 penetram ativamente na mucosa intestinal, encontram vasos sanguíneos e são carregadas inicialmente para o fígado através da circulação porta e posteriormente para o coração e pulmões (Murrell et al., 1997). Nos pulmões, as larvas saem da circulação, penetram no parênquima pulmonar, migram pelo tecido e atingem os espaços alveolares (Ciclo de Looss). Em passagem pelos alvéolos pulmonares, as larvas sofrem muda para L4 estimuladas pela alta concentração de oxigênio e ascendem a árvore brônquica chegando até a faringe, onde provocam efeito expectorante no hospedeiro e então as larvas podem ser expelidas ou deglutidas (Dold & Holland, 2011b). Se deglutidas, as larvas atingem o lúmen do intestino delgado, e atingem a maturidade sexual em torno do 24º dia, tornando-se vermes adultos, machos e fêmeas, podendo sobreviver por 1 a 2 anos no intestino delgado do hospedeiro (Bailey & Warner, 2010; Dold & Holland, 2011a; Holland, Behnke, Dold, 2013).

De acordo com o ciclo, a ascaridíase pode ser dividida em duas fases distintas caracterizadas por aspectos biológicos específicos do agente etiológico. A fase inicial, denominada de ascaridíase larval ou aguda, que é causada pela migração hepato-traqueal das formas larvais do parasito. E a fase crônica que é caracterizada por manifestações intestinais causadas pelos vermes adultos. (**Figura 2**).

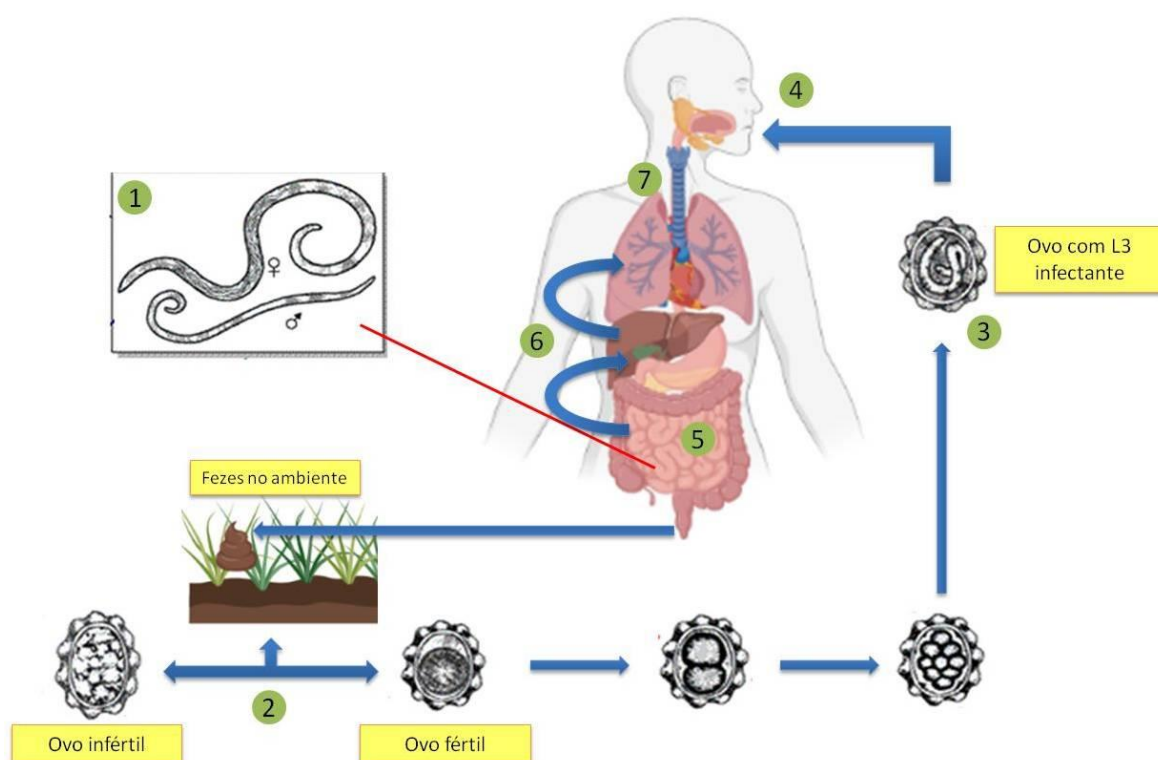


Figura 2: Ciclo biológico do parasito *Ascaris sp.* (1) Vermes adultos estabelecidos no intestino delgado em que na presença de macho e fêmea ocorre a cópula e posterior oviposição dos ovos. (2 e 3) Os ovos são eliminados nas fezes e no ambiente sofrem maturação. (4) Ovos infectantes contendo a larva L3 são ingeridos em alimentos e água contaminados. (5) Larvas eclodem no intestino e atravessam a mucosa intestinal. (6) As larvas são carreadas pela circulação sanguínea ao fígado e posteriormente aos pulmões. (7) Nos pulmões, as larvas migram pelo parênquima pulmonar, rompem alvéolos, sofrem muda para L4 e, posteriormente, ascendem a árvore brônquica. Quando deglutidas, as larvas retornam ao sistema gastrointestinal e atingem maturidade sexual no intestino delgado.

Fonte: Adaptado de Centro de controle e prevenção de doenças (CDC, 2012). <https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>

Para muitos estudos de infecções experimentais, o modelo murino tem sido a proposta mais utilizada, contudo, esses roedores conseguem mimetizar apenas a fase aguda do ciclo com o estabelecimento dos estádios larvais, pois o parasito não consegue completar o seu ciclo devido às limitações de tamanho se comparado a proporção do estágio adulto do nematódeo com a extensão total do intestino do camundongo (Slotved et al., 1998; Gazzinelli-Guimarães et al., 2013) (**Figura 3**). Assim, em camundongos verificou-se que após a ingestão de ovos infectantes pelo hospedeiro, as larvas L3 eclodem no lúmen do intestino delgado e penetram na mucosa intestinal na altura do ceco, chegam a circulação sanguínea e são carreadas ao fígado por meio do sistema vascular portal. A migração pelo fígado atinge o pico do terceiro ao quinto dia após a infecção. Posteriormente, as larvas ganham a circulação novamente e são

passivamente carreadas aos pulmões, onde podem ser encontradas a partir do sexto dia de infecção, atingindo o pico no oitavo. Com 10 a 12 dias se encontra larvas no intestino delgado e passado esse período as larvas são expelidas pelo roedor (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). As alterações morfológicas, por exemplo o tamanho, das larvas L3 recuperadas no tecido pulmonar e das larvas L4 encontradas nas vias aéreas irá variar de acordo com o estágio em que a larva estará, sendo as L4 normalmente maiores que as L3.



Figura 3: Ciclo biológico do parasito *Ascaris* sp. no modelo animal

Fonte: Holland, 2013

É importante ressaltar a relevância do modelo murino, pois por meio deste está sendo possível estudar alguns aspectos do estágio inicial da infecção e da migração larval no hospedeiro, nos quais seria irrealizável eticamente com humanos. Entre as contribuições que o modelo permite realizar estão a avaliação de alterações fisiopatológicas sob diferentes cargas e sob múltiplas exposições (Lewis et al., 2009, Nogueira et al., 2016), análise das alterações de origem genética (Lewis et al., 2006, Dold et al., 2010, Deslyper et al., 2016, Deslyper et al., 2019), avaliação da interferência da idade do hospedeiro no curso da infecção e o reconhecimento do pico de infectividade de ovos em cultura (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013), teste e desenvolvimento de vacinas (Gazzinelli-Guimarães et al., 2018; De Castro et al., 2021), melhor compreensão a respeito de comorbidades e coinfeções em associação com *Ascaris* (Lescano et al., 2012; Gazzinelli-Guimarães et al., 2017; Oliveira et al., 2019), entre outros.

1.1.3 Epidemiologia

A ascaridíase humana representa um problema de saúde pública e possui grande impacto socioeconômico. Dentro do panorama da saúde pública, é considerada a infecção intestinal por helmintos mais prevalente dentre as doenças tropicais negligenciadas. Dados atuais estimam que haja em todo o mundo aproximadamente 450 milhões de pessoas infectadas com parasitos do gênero *Ascaris* (GBD, 2017). Ao comparar este dado com estimativas anteriores (Pullan et al., 2014; Vos et al., 2015) foi notável uma significativa redução da prevalência, sugerindo que os esforços da Organização Mundial de Saúde (OMS) na década passada quanto ao controle da infecção e da prevalência por meio de tratamento em massa está obtendo resultado promissores. Sendo que a meta dos programas de quimioterapia preventiva era atingir uma cobertura mínima de 75% dos grupos mais afetados (crianças em idade pré-escolar e escolar, mulheres grávidas e em idade reprodutiva e adultos em áreas com maiores riscos de exposição) até 2020 (Freeman et al., 2019; Nery et al., 2019, Else et al., 2020, WHO, 2020). Porém, um ponto a ser ressaltado nesse panorama é que as taxas de transmissão de *Ascaris*, mesmo após o tratamento indicado, são elevadas devido, principalmente, às precárias condições sanitárias (Jia et al., 2012), sendo esta então uma preocupação recorrente e atual.

Mesmo diante do cenário positivo é necessário mencionar que as taxas de mortalidade e morbidade são suficientes para gerar implicações negativas. Para avaliar o impacto socioeconômico causado por doenças, a OMS usa o índice DALYs (disability-adjusted life year - anos de vida perdidos por incapacidades), o qual leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma incapacidade devido à morbidade causada pela doença (WHO, 2013). Segundo este cálculo, em 2017 (GBD, 2017) a estimativa global de perda na população causada pela ascaridíase foi de 860.000 anos de vida ajustados por incapacidade. Alguns dados demonstram também que os anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) associados aos geo-helmintos estão diminuindo decorrer da última década; no entanto, essa redução ocorreu principalmente nos países de renda média alta, com a carga da doença se concentrando mais nos países de baixa e média renda (Stolk et al., 2016).

Apesar das infecções por *Ascaris* spp. serem mundialmente disseminadas e da existência de registros de ascaridíase em regiões economicamente desenvolvidas (WHO, 1987; De Silva et al., 1997; Bendall et al., 2011; Umetsu et al., 2014; Miller et al., 2015), as altas taxas de prevalências e intensidades de infecção estão comumente associadas à fatores socioeconômicos, por exemplo, deficiência nas práticas de higiene, pobreza aguda e precárias

condições sanitárias, e , à regiões tropicais tais como: África subsaariana, Ásia e Américas Latina, em que ambos fatores se coincidem (WHO 1987; De Silva et al., 1997; Campos et al., 2002; Fortes et al., 2004; Shapiro et al., 2005; Brooker et al., 2006; Ellis et al., 2007; Walker et al., 2011; Lustigman et al., 2012; Chammartin et al., 2014, Jourdan et al., 2018; Nery et al., 2019).

Dentre os fatores de risco associados à transmissão da ascaridíase, pode-se destacar a idade do hospedeiro, as condições ambientais e a infraestrutura sanitária. Em relação à idade do hospedeiro, a infecção pode acontecer em qualquer faixa etária, porém, as crianças são as mais susceptíveis já que o pico de prevalência e de intensidade da doença ocorre entre seis a dez anos de idade (Manrtin et al., 1983) Além disso, a intensidade de infecção observada em adultos são frequentemente mais leve que as encontradas nas crianças, isso pode ocorrer devido a uma redução da exposição mediada pelo comportamento do hospedeiro ou pelo desenvolvimento de imunidade adquirida com a exposição crônica ao parasito (Croll et al., 1981, Else et al., 2020).

No que se refere às condições ambientais, o risco de transmissão da ascaridíase se relaciona positivamente com a precipitação anual (alta umidade acelera o desenvolvimento dos ovos), com as características do solo, tais como: aridez, acidez (pH: 5,35 - 5,65) e a com temperaturas mais elevadas (em regiões com temperaturas mais altas - 20°C a 35°C - o embrionamento leva menor tempo quando comparado a locais com temperatura mais baixas) (Brooker et al., 2004; Pullan, 2012; Brooker, 2012; Chammartin et al., 2013; Chammartin et al., 2014; Senecal et al., 2020). Quanto as ações de saneamento básico, se eficazes, se associam com um risco reduzido de transmissão de helmintíases em geral (Zielgelbauer et al., 2012), uma vez que, a transmissão ocorre por ingestão ou contato com os estágios infecciosos presentes no solo contaminado com fezes de um hospedeiro infectado. O esforço para reduzir a contaminação fecal do ambiente deve ajudar a reduzir o risco de exposição ao parasito e as melhorias na água, saneamento e higiene são vistas como essenciais para o controle sustentável e de longo prazo das geo-helmintíases (Nery et al., 2019). Por exemplo, em Salvador (BA, Brasil) a execução de um programa de sanitização reduziu em 42% a prevalência de *A. lumbricoides* em crianças em idade escolar (Barreto et al., 2010).

1.1.4 Manifestações clínicas e fisiopatologia

Embora a ascaridíase humana seja uma infecção crônica e na maioria dos casos não letal, é considerado um problema de saúde pública mundial, devido às complicações clínicas observadas em indivíduos com alta carga parasitária, que caracterizam a forma grave da doença, que afeta anualmente cerca de 8 - 15% dos infectados. Essa forma está associada a um quadro de distensão abdominal, de náuseas, diarreias e pode ser fatal devido a um quadro de obstrução intestinal pelos vermes adultos (Chan, 1997).

Os vermes adultos podem também se estabelecer em outros locais podendo causar, por exemplo, apendicite, colecistite, pancreatite e ascaridíase gástrica. Neste contexto, é descrito na literatura médica casos de hematêmise (Ahmad et al., 2015), pneumonite eosinofílica (Herrera & Meneses, 2005), obstrução intestinal aguda ou subaguda (Louw, 1966; De Silva et al., 1997; Mwenda & Ilkul, 2013), apendicite (Louw, 1966), abscesso hepático (Chauhan et al., 2015), ascaridíase pancreática (Louw, 1966; Galzerano et al., 2010; Azhar et al., 2015) e biliar (Louw, 1966; Morano & Morano, 1988; Lum, 2012; Asif et al., 2014; Umetsu et al., 2014; Azhar et al., 2015; Khuroo et al., 2015).

A fase crônica ocorre após estabelecimento dos parasitos no intestino e, as complicações crônicas desta fase se relacionam principalmente com anemia e desnutrição. Ahmed e colaboradores (2012) realizaram um estudo longitudinal avaliando os impactos da infecção por geo-helminthos e identificaram a presença de cargas moderada a alta de ascaridíase como um dos principais aspectos preditores de anemia e raquitismo na população de escolares aborígenes residentes na Malásia E, três meses após tratamento com anti-helmíntico, os níveis de hemoglobina das crianças que tinham cargas moderada a alta de ascaridíase tiveram um aumento significativo, quando comparados aos aumentos verificados nas crianças não infectadas ou com baixas cargas. Além disso, os dados existentes a respeito da quantificação e frequência de complicações da ascaridíase são limitados, entretanto, em 2017, o número estimado de mortes no mundo atribuível à doença foi de aproximadamente 3.200 (GBD, 2020; Else et al., 2020).

Dessa forma, a patologia da doença está positivamente relacionada à carga parasitária (De Silva et al., 1997; Jourdan et al., 2018). As infecções intensas são associadas a complicações severas, pois, a morbidade e a mortalidade aumentam em função da carga da doença. Outro fator que impacta a morbidade é o poliparasitismo comum nas regiões endêmicas, pois, evidências sugerem que maiores cargas parasitárias ocorrem em hospedeiros portadores de infecções com múltiplos helmintos (Brooker et al., 2000).

Contudo, a maioria das pessoas infectadas com cargas leves a moderadas não desenvolve sintomatologia ou esta, quando presente, é inespecífica com sintomas tais como:

dor ou desconforto abdominal, náusea, anorexia e diarreia (De Silva et al., 1997). Sendo que, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS, são consideradas infecções leves aquelas que a carga parasitária encontrada for menor que 1.000 ovos por grama de fezes, infecções moderadas quando a carga encontrada for entre 1.001 e 9.999 ovos por grama de fezes e intensa quando ultrapassar 10.000 ovos por grama de fezes (WHO, 1987, Else et al., 2020). Em infecções moderadas, a ascaridíase está correlacionada com déficit nutricional, retardo do crescimento e déficit cognitivo, especialmente em crianças e adolescentes (Crompton, 2001). E, como as crianças portadoras de infecções crônicas ou intensas podem apresentar desnutrição com consequente déficit cognitivo (De Silva et al., 1997; Capello, 2004). A OMS preconiza tratamento em massa direcionado a todas as crianças em idade escolar, residentes em áreas endêmicas com risco de transmissão (>50% - tratamento duas vezes ao ano; ≥ 20 e <50% - tratamento uma vez ao ano) com o intuito de controlar a morbidade das geo-helmintíases, reduzindo a intensidade e prevalência das infecções (WHO 2008a, 2008b; Hall et al 2009, Jourdan et.al, 2018).

Já durante a fase larval, foco desse trabalho, complicações agudas são pouco conhecidas, e, geralmente, associadas a infecções com alta carga parasitária. A migração das larvas pelas vias aéreas do hospedeiro, ou Ciclo de Looss, é uma fase crucial para o ciclo de vida do parasito, mas ainda pouco estudada, o que se sabe é que, assim como na maioria das infecções por geo-helminthos, a migração pulmonar das larvas de *Ascaris* spp. induz uma intensa resposta inflamatória eosinofílica no local da migração, produzindo uma gama de manifestações clínicas, como asma, dispneia, broncoespasmos, tosse, febre e dor subesternal, conhecida com/o síndrome de Loeffler (Chitkara & Krishna, 2006, Hirakawa et al., 2009; Hoenigl et al., 2010) ou reação de hipersensibilidade 1 aos estágios larvais (Jourdan et al., 2018). Essa resposta pode levar a graves distúrbios respiratórios nos indivíduos infectados (Beaver, 1975; Spillman, 1975; Pawlowski et al., 1982). Contudo, a falta de um diagnóstico específico para a ascaridíase larval, a limitação de estudos envolvendo experimentação humana e, por muitos anos, a falta de um modelo experimental padronizado, fez da ascaridíase larval uma grande incógnita para a parasitologia.

1.1.5 Diagnóstico e tratamento

Em termos de diagnóstico, a ascaridíase é comprovada somente pela presença de ovos nas fezes do hospedeiro, após o período pré-patente (tempo entre a infecção e o início da eliminação de ovos) (Galvin, 1968) e o método de diagnóstico recomendado pela OMS é o Kato-Katz, que permite a quantificação de ovos de geo-helminthos nas fezes humanas (WHO, 2002). Esses métodos de demonstração de ovos nas fezes apresentam simplicidade e baixo custo (Chaves et al., 1979), contudo, a eficácia dos mesmos é comprometida pela redução da intensidade da infecção (Knopp et al., 2008) ou pela presença de infecções nas quais os parasitos não alcançaram maturidade sexual ou são todos do mesmo sexo.

Visto a importância da morbidade causada pela migração das larvas no período pré-patente, torna-se clara a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e que sejam capazes de detectar a infecção ainda na fase inicial. Estudos sorológicos e moleculares têm sido realizados e podem resultar em uma alternativa de diagnóstico mais sensível, específico e eficaz para detectar a fase inicial da infecção, e para isso antígenos de extrato bruto e secretados/excretados ou proteínas purificadas de larvas e vermes adultos têm sido estudados para desenvolvimento de ensaios sorológicos (Kennedy et al., 1987; Lind et al., 1993; Cabrera-Barroso et al., 2014; Gálvez et al., 2014; González-Miguel et al., 2014).

Em relação ao tratamento, a OMS lista cinco drogas essenciais para o tratamento da ascaridíase (*albendazol* – dose única de 500 mg; *levamisol* – 2,5 mg / kg, *mebendazol* – dose única de 500 mg, *pirantel* – dose única de 10 mg / kg e *ivermectina* – 50 a 200 µg / kg) (WHO, 1999). Avaliação da eficácia do tratamento com albendazol e mebendazol contra helmintíases (Albonico et al., 2004) demonstrou que ambos compostos apresentaram excelente resultado contra *A. lumbricoides*. em termos de cura e redução da taxa de eliminação de ovos.

1.1.6 Resposta imune

O sucesso provável de muitos helmintos como *Ascaris* em infectar seus hospedeiros pode ser devido à capacidade que esses parasitos possuem de estabelecer infecções crônicas permitidas possivelmente pela modulação ativa da resposta imune do hospedeiro. Ou seja, uma resposta considerada ideal à infecção por helmintos é aquela que busca controlar o parasito a níveis toleráveis em equilíbrio com a homeostase imunológica do hospedeiro sem grandes danos aos tecidos (Maizels, 2003; Nutman, 2015).

De maneira geral, na ascaridíase larval há a indução de uma intensa resposta inflamatória inata, principalmente, devido a moléculas do parasito, como glicanos e lipídios, que servem como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos e processados por células apresentadoras de antígenos (APCs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) como receptores toll-like (TLR), lectinas do tipo C e receptores intracelulares de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD) (Mulcahy et al., 2005; Perrigoue et al., 2008; Schwartz et al., 2018; Weatherhead et al., 2020). A sinalização intracelular resultante dessa ativação promove a liberação de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 e IL-17 (Pineda & Ramos 2012; Maizels, Hewitson, Smith, 2012; Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016), bem como quimiocinas que ajudam a propagar a resposta imune do hospedeiro. Por sua vez, essas citocinas e quimiocinas ativam e recrutam células inflamatórias inatas, incluindo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos, células *natural killer* (NK) e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) para os pulmões (Bonne-Anneé et al., 2011; Craig et al., 2014).

Inicialmente, por meio das ILC2 e, posteriormente, através da expansão clonal de células TCD4 polifuncionais específicas ao antígeno há um aumento da indução de citocinas de perfil tipo 2, desencadeando ainda mais a resposta. Diante disso, pode-se dizer que a migração larval pelos pulmões, fase aguda, promove uma resposta inflamatória local de perfil tipo 2 que quando associada à patologia pulmonar pode desencadear um quadro clínico chamado de hiper-responsividade persistente das vias aéreas que se assemelha a uma forma de doença alérgica (Weatherhead et al., 2018; Else et al., 2020).

Além disso, em camundongos, no sétimo e oitavo dia pós-infecção, pico da migração larval nos pulmões, também é observado uma elevada produção de IL-6, que se pode estar relacionada à infiltração de neutrófilos proeminente. E então, quando as larvas terminam sua passagem pelos pulmões e continuam a sua migração rumo ao intestino delgado, ocorre uma substituição do infiltrado neutrofílico por, principalmente, macrófagos alternativamente ativados (MAA) e eosinófilos (Allen et al., 2011; Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Gazzinelli-Guimarães & Nutman, 2018). Essa substituição no infiltrado promove papel fundamental no remodelamento do tecido e prevenção à futuras reinfecções.

Uma vez de volta ao intestino delgado, as larvas amadurecem em vermes adultos, ocasionando a ascaridíase intestinal, fase crônica, em que há a estimulação constante do sistema imunológico devido à permanência do helminto na luz do intestinal. Essa última é a fase mais estudada quanto aos aspectos da resposta imunológica, principalmente em humanos, sendo caracterizada por uma significativa eosinofilia periférica e tecidual, baixa proliferação

linfocitária, um conjunto de mecanismos protetores da mucosa, como a secreção de muco e o aumento da contratilidade do músculo liso intestinal; significativa modulação da resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) (Cooper et al., 2000; Geiger et al., 2002; Paterson et al., 2002; Bradley; Jackson, 2004; Jackson et al., 2004; Dawson et al., 2005; Oshiro et al., 2006; Dold & Holland, 2011a; Reina et al., 2011, Masure et al., 2013), e, a longo prazo, uma diminuição da resposta específica de helmintos (Paterson et al., 2002; Midttun et al., 2018).

A imunorregulação feita por helmintos e os mecanismos pelos quais conseguem suprimir a imunidade do hospedeiro estão sendo amplamente estudadas. Normalmente, esses parasitos induzem um padrão de resposta imunológica tipo 2 e, consequentemente, inibem principalmente a resposta do tipo 1, uma vez que tendem a suprimir a produção de IFN- γ (Urban et al., 1996; Maizels, 2003; Finkelman et al., 2004; Carvalho et al., 2009) . Ademais, já foi observado que esses parasitos conseguem induzir células T reguladoras, direcionando para um aumento de produção de citocinas como IL-10 (Figueiredo et al., 2010; Ortiz et al., 2011)

Além disso, é importante mencionar que, diferindo da maioria das infecções helmínticas crônicas, que são caracterizadas por uma polarização da resposta imune mediada por células Th2 e regulatórias (Nutman, 2015; Gazzinelli-Guimarães & Nutman, 2018; Weatherhead et al., 2020), na fase aguda da ascaridíase a resposta inflamatória mista apresenta um papel crucial na resistência do hospedeiro infectado (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016).

1.1.7 Reinfecções por *Ascaris*

Diante de algumas lacunas a respeito da compreensão de como os aspectos da fase aguda da ascaridíase poderiam influenciar no desenvolvimento da resposta imune e a indução da resistência e suscetibilidade à infecção, se faz relevante buscar entender esses aspectos imunobiológicos tanto na infecção primária quanto na reinfecção. Pois, isso permitirá entender o tipo de resposta imune inicial necessária para o controle da infecção e, consequentemente, para a proteção. Além de que, a caracterização cada vez mais aprofundada da relação parasito-hospedeiro contribuirá para o conhecimento básico necessário, por exemplo, para o desenvolvimento de estratégias imunoproláticas que sejam mais eficazes para interromper o ciclo de transmissão do parasito antes que se estabeleça cronicamente.

Tal preocupação é fundamental já que é um grande desafio o desenvolvimento de estratégias que controlem a transmissão do parasito. Jia e colaboradores (2012) sugerem que uma forma de se fazer isso seria o controle integrado, que consiste na quimioterapia preventiva

somada a ações educação em saúde e a melhora da infraestrutura sanitária, uma vez que mesmo com a existência e administração de drogas sabidamente eficazes (Keizer & Utzinger, 2008; Jia et al., 2012; Moser et al., 2017), a presença constante e onipresente de ovos potencialmente infectantes no ambiente oportuniza a reinfecção mesmo pouco tempo após o tratamento (Jia et al., 2012).

Apesar da importância epidemiológica da ascaridíase larval, o conhecimento obtido a respeito dessa fase do ciclo é baseado em modelos experimentais, posto que há limitações para o diagnóstico precoce em humanos durante a infecção pulmonar. Diante disso, a utilização de um modelo animal tem se mostrado eficiente para a melhor compreender os mecanismos imunobiológicos e fisiopatológicos após a reinfecção. Alguns trabalhos demonstram a utilização tanto de porcos (Urban et al., 1988; Eriksen et al., 1992; Nejsum et al., 2009) quanto de camundongos como modelo experimental para entender os efeitos da múltipla exposição (Nogueira et al., 2016). Entre as evidências encontradas após a múltipla exposição estão: redução do número de larvas (Urban et al., 1988; Eriksen et al., 1992; Nejsum et al., 2009, Nogueira et al., 2016), redução do número de manchas leitosas no fígado (lesão hepática) causadas pela migração do parasito (Nejsum et al., 2009), mecanismo de proteção dependente da dose da infecção (Eriksen et al., 1992).

No estudo desenvolvido por Nogueira e colaboradores (2016) foi demonstrado que, camundongos submetidos a múltiplas exposições ao parasito *A. suum* desenvolvem uma intensa inflamação tecidual, com predominância de eosinófilos, que foi associada a importante uma redução da carga parasitária durante a migração pulmonar, conferindo proteção parcial ao hospedeiro, porém, com algum prejuízo da função pulmonar.

Nesse mesmo estudo, foi evidenciado que reinfecções ao parasito geram lesões repetidas, provocando assim uma inflamação tecidual crônica. Tal achado foi correlacionado ao padrão de resposta imune misto Th2/Th17, que desempenharia um papel duplo, atuando tanto na indução da resposta imune específica contra o parasito, quanto no reparo das lesões teciduais e indução do espessamento de septos e fibrose pulmonar (Nogueira et al., 2016), podendo assim prejudicar o funcionamento do órgão. Contudo, foi demonstrado por Oliveira e colaboradores (2019) que o quadro de fibrose pulmonar por si só não é suficiente para alterar a migração das larvas (Oliveira et al., 2019). E mesmo diante desse cenário inflamatório, os animais reinfetados possuem um prognóstico funcional pulmonar significativamente melhor que os animais primoinfectados, indicando que as lesões agudas causadas pela migração larval e maior carga parasitária representam maior prejuízo à função pulmonar do que as lesões relacionadas à inflamação intensa após múltiplas exposições.

É fato que os estudos sobre os mecanismos de proteção decorrentes dos processos imunológicos estão contribuindo para o entendimento do curso da infecção. E mesmo que as vias responsáveis pelo controle da carga parasitária ainda não sejam totalmente compreendidas, há trabalhos que demonstram que infecções prolongadas por helmintos induzem a produção de anticorpos específicos ao parasito, com predomínio de IgG1 e IgA (McCoy et al., 2008). Portanto, a resposta imune humoral desempenha um papel importante na proteção contra *Ascaris*, como foi evidenciado em animais que quando desafiados após a transferência passiva de soro imune ou IgG apresentaram controle da carga parasitária (Khoury et al., 1977; Gazzinelli-Guimarães et al., 2018).

Diante do exposto, é explícito que os aspectos da proteção na ascaridíase larval após múltiplas exposições ao parasito necessitam ser elucidados, sobretudo no que diz respeito aos mecanismos associados à resposta imune do hospedeiro. Portanto, este trabalho visou esclarecer as implicações da reinfecção com diferentes números de exposições ou com diferentes doses de infecção. Sugerindo que após repetidas exposições a baixas doses haja uma redução da carga parasitária com menor disfunção pulmonar, considerando que a proteção ocorre de forma dependente do número de exposições ao parasito e/ou das doses da infecção.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre as geo-helminthíases, a ascaridíase é a mais frequente no mundo, afetando aproximadamente 450 milhões de pessoas. Trata-se de uma doença com grande relevância epidemiológica, causando impactos consideráveis à saúde pública nas áreas endêmicas (Hotez & Kamath, 2009; Hotez, 2010; Pullan et al., 2014, GBD, 2017). Apesar de a infecção ocorrer em todas as faixas etárias, as crianças de comunidades carentes em idade escolar são as mais suscetíveis, levando ao comprometimento do seu desempenho escolar.

Levando em consideração fatores como a precariedade do sistema de saneamento básico e ineficiência nas ações de educação em saúde nas áreas endêmicas, a manutenção das geo-helminthíases nessas regiões se faz presente, resultando em elevadas taxas de reinfecção após tratamento específico (Jia et al., 2012), uma vez que as estratégias para intervenções profiláticas contra a ascaridíase humana são deficitárias. Somado a esse fator, o diagnóstico parasitológico padrão para a ascaridíase é limitado, uma vez que se baseia apenas na detecção de ovos do parasito nas fezes (Lutz, 1919; Hoffman et al., 1934; Ritchie, 1948), consequentemente, interferindo no tratamento dos doentes e propiciando manutenção do ciclo do parasito no ambiente.

Diante desse cenário, a maioria dos indivíduos infectados em áreas de alta endemicidade são expostos múltiplas vezes ao parasito, e apresentam baixa carga parasitária, sugerindo que o hospedeiro é capaz de montar uma resposta protetora contra a infecção, como demonstrado em modelo experimental (Nogueira et al., 2016). Além disso, acredita-se que uma intensa resposta inflamatória sistêmica, das vias aéreas e dos pulmões é desencadeada para controlar a migração larval. Porém, essa mesma resposta inflamatória intensa pode estar associada com a patogênese pulmonar da ascaridíase larval e ser responsável pelo comprometimento do funcionamento respiratório.

Apesar das indicações imunológicas e fisiológicas pulmonares em estudos com múltiplas exposições, outras avaliações são necessárias a fim de fornecer mais evidências sobre a biologia da interação entre o *Ascaris* e o hospedeiro, com foco principal na elucidação dos mecanismos imunológicos e vias de proteção que são desencadeados para controlar a carga parasitária e lesões teciduais na ascaridíase larval. Dentro dessa perspectiva, para várias infecções por trematódeos, acredita-se que a exposição ao verme, em condições naturais, ocorra uma infecção com baixas doses repetidas gerando uma imunidade adquirida ou concomitante (Crombie & Anderson, 1985).

Nessa perspectiva, faz-se necessário comparar diferentes abordagens de infecções múltiplas, bem como, o impacto gerado na função pulmonar, focando nos possíveis mecanismos envolvidos na proteção contra ascaridíase larval. Nesse trabalho esperamos que essa proteção nos animais reinfectedados por *A. suum* ocorra de forma dependente ao número de exposições ao parasito e das doses de infecção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os impactos da infecção por *Ascaris suum* em camundongos BALB/c em função do número de exposições e das doses de infecção durante a fase pulmonar da ascaridíase larval.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil parasitológico durante a fase pulmonar em camundongos reinfectedados com diferentes números de exposições e com diferentes doses de infecção.
 - ✓ Quantificação parasitária no tecido pulmonar e nas vias aéreas.
- Caracterizar os aspectos imunológicos envolvidos na reinfecção por *Ascaris suum* em camundongos com diferentes números de exposições e com diferentes doses de infecção.
 - ✓ Quantificação de células inflamatórias e composição das populações leucocitárias no BAL;
 - ✓ Níveis de proteínas totais e de hemoglobina no BAL;
 - ✓ Atividade tecidual de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos;
 - ✓ Níveis de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17;
 - ✓ Níveis de SIgA no BAL e de IgG total e subclasses no soro.
- Identificar as alterações patológicas, bem como descrever os aspectos histológicos do pulmão dos camundongos reinfectedados com diferentes números de exposições e com diferentes doses de infecção.
 - ✓ Análise semiquantitativa - *score* de inflamação
- Avaliar os parâmetros fisiológicos pulmonares dos camundongos reinfectedados com diferentes números de exposições e com diferentes doses de infecção.
 - ✓ Impactos na capacidade respiratória - resistência e complacência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 *Ascaris suum*

Os vermes adultos de *A. suum* foram recuperados de carcaças intestinais de suínos obtidos em um abatedouro localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os parasitos, assim que removidos do intestino, foram acondicionados em solução salina para serem encaminhados ao laboratório. A identificação e sexagem dos vermes foram realizadas por meio de caracterização morfológica. Em seguida, no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) da Universidade Federal de Minas Gerais, os vermes adultos fêmeas tiveram seus úteros dissecados para obtenção dos ovos, esses então foram isolados por meio da maceração mecânica do órgão e o produto resultante foi filtrado em telas de nylon 100µm para purificação.

O embrionamento dos ovos foi induzido de acordo com metodologia descrita por Boes e colaboradores (1998), com algumas modificações. Suspensões contendo em média 25 ovos/µL serão acondicionadas em garrafas de cultura contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ a 0,2 M) e mantidas a 26 °C em incubadora tipo BOD (SP 50 RDE 35 Super) com agitação manual para oxigenação três vezes por semana. Os ovos nas culturas atingiram o pico de infectividade com aproximadamente 100 dias, e somente os larvados foram contabilizados para as infecções experimentais dos camundongos.

4.1.2 Camundongos

Foram utilizados 90 camundongos BALB/c fêmeas adultas, com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Durante todo o período experimental esses animais foram mantidos sob condições de luminosidade controlada (ciclo claro-escuro de 12 horas) no Biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos. Os animais receberam ração comercial para roedores e água à vontade.

Todas as atividades de pesquisas envolvendo modelo animais foram conduzidas de acordo com princípios éticos de boas práticas na experimentação com animais, sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo nº. 221/2020

4.2 Delineamento experimental e infecção experimental

4.2.1 Delineamento experimental

Para as análises necessárias, os camundongos foram divididos em seis diferentes grupos, a saber: **Não infectado (NI)**, que receberam apenas água filtrada em todos os tempos de infecção; **Primoinfectado (PI)** que receberam duas doses de água filtrada e uma dose contendo 2.500 ovos de *A. suum* no último tempo de infecção; **Reinfectado (2X)** que receberam uma dose de água filtrada no primeiro tempo de infecção e duas doses contendo 2.500 ovos no segundo e último tempo de infecção; **Reinfectado (3X)** que receberam três doses de 2.500 ovos de *A. suum* em todos os tempos de infecção; **Reinfectado (250)** que receberam duas doses contendo 250 ovos de *A. suum* nos dois primeiros tempos de infecção e uma dose desafio contendo 2.500 ovos no último tempo; **Reinfectado (25)** que receberam duas doses contendo 25 ovos de *A. suum* e uma dose desafio contendo 2.500 ovos. Os nomes dos grupos foram abreviados como NI, PI, RI (2X), RI (3X), RI (250), RI (25), respectivamente (**Figura 4**).

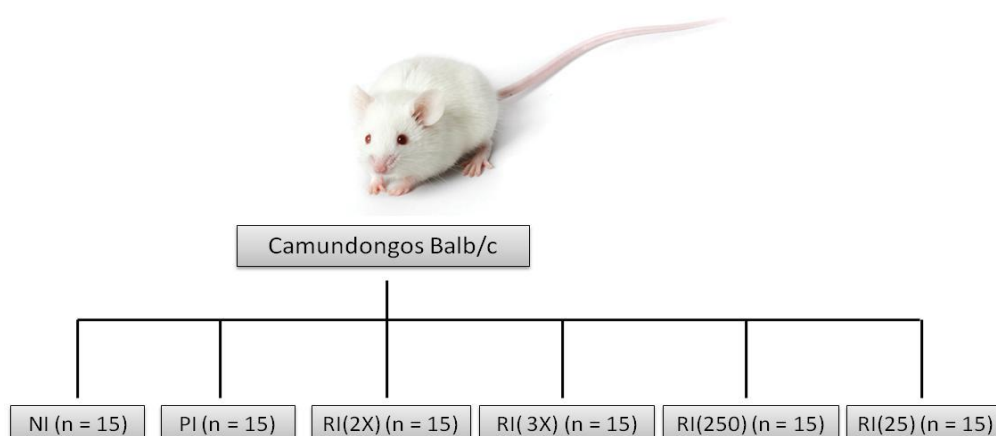


Figura 4: Grupos Experimentais.

E, a fim de elucidar as questões levantadas nesse estudo, avaliação do impacto do número de exposições na proteção (**Figura 5A**) e avaliação do impacto de diferentes doses de infecção na proteção (**Figura 5B**), foi traçado os seguintes delineamentos:

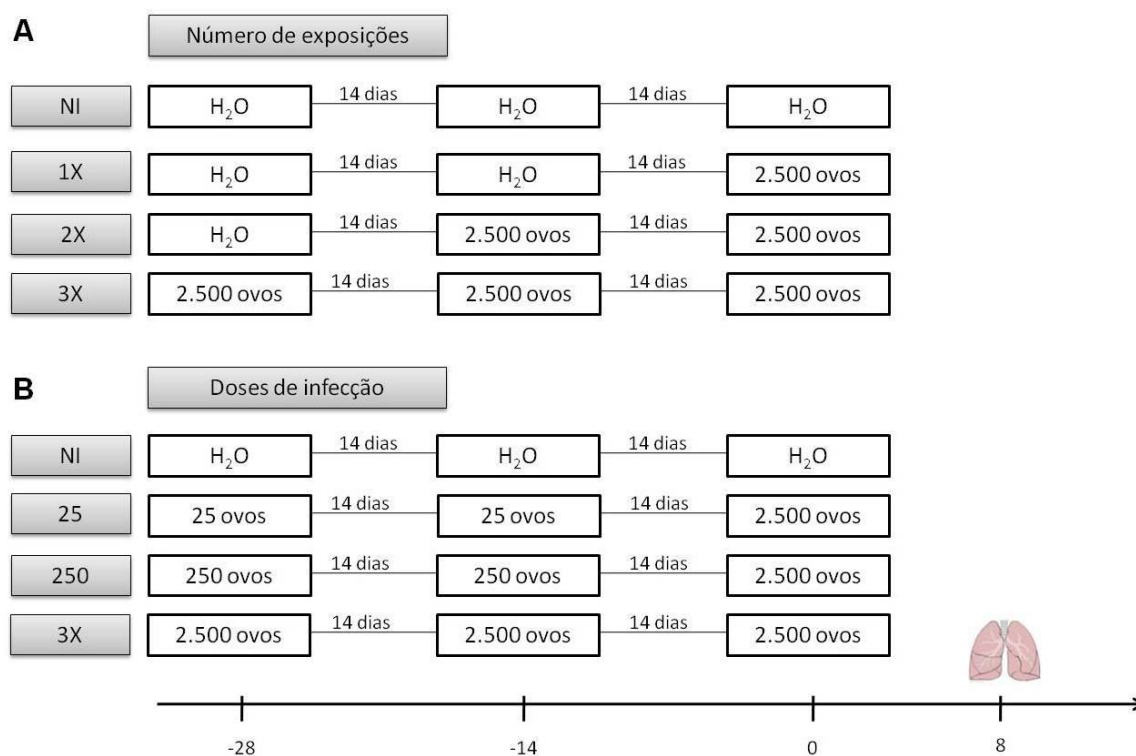


Figura 5: Delineamentos Experimentais.

4.2.2 Infecção Experimental

O preparo dos ovos para a realização das infecções foi realizado segundo Gazzinelli e colaboradores (2013). Resumidamente, uma amostra da cultura de ovos, que está em solução de H₂SO₄ 0,2 M, foi coletada da e submetida a uma centrifugação a 800g por dez minutos, em temperatura ambiente (TA). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5% e incubado por 120 minutos em estufa de CO₂ (Water – Jacketed Incubator) a 37 °C. Após a incubação, o hipoclorito foi removido da solução após centrifugação a 800g por 10 minutos em TA, sendo descartado o sobrenadante. Em sequência, foi adicionada água filtrada ao sedimento de ovos e nova etapa de centrifugação a 800g por 10 minutos em TA foi realizada. O processo de lavagem foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em 10 mL de água filtrada e três alíquotas de 10 µL foram recolhidas da suspensão e usadas para a contagem dos ovos larvados. O valor obtido foi

utilizado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por μL e determinar a diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 0,2 mL, 250 ovos em 0,2 mL e 25 ovos em 0,2 mL.

Após o preparo dos ovos, a infecção foi realizada por via intragástrica de acordo com protocolo descrito por Lewis e colaboradores (2006), em que, com o auxílio de uma agulha de gavage foram inoculados, aproximadamente, 100 μL de uma suspensão contendo os ovos, de acordo com o grupo que estava sendo infectado, seguidas por 100 μL de água para remover os ovos remanescentes na seringa e agulha. Aos animais do grupo controle foram administrados 200 μL de água filtrada.

4.2.3 Procedimento de anestesia, coleta de sangue e eutanásia

No oitavo dia pós-infecção desafio, os camundongos de cada grupo foram eutanasiados por dose de anestésico (ketamina 120 mg/kg e xilazina 45 mg/kg) via intraperitoneal somada a coleta de sangue, sendo que metade desses animais foram destinados para avaliação da carga parasitária total nos pulmões e avaliação da carga e células do lavado broncoalveolar (BAL). A outra metade de cada grupo foi destinada para avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares, e posteriormente, coleta dos pulmões para avaliação histopatológica, dosagem de citocinas e avaliação da atividade celular tecidual.

Para a avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares, o protocolo de anestesia foi diferenciado a fim de manter a respiração espontânea durante a espirometria forçada (8,5 mg/kg de xilazina e 130 mg/kg de ketamina). Após o procedimento de espirometria forçada, com os animais ainda eutanasiados, foi realizada a eutanásia por hipovolemia.

A coleta de sangue foi realizada apenas no dia da eutanásia, sendo coletado em média 500 μL na veia cava de cada camundongo utilizando uma seringa descartável de 1 mL. O sangue foi centrifugado e os soros foram coletados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises.

4.3 Caracterização do perfil parasitológico

4.3.1 Obtenção, processamento e quantificação parasitária no lavado broncoalveolar

Após a eutanásia, a obtenção do lavado das vias aéreas foi realizada segundo Nogueira e colaboradores (2016). Brevemente, foi realizada a dissecação na parte superior da traqueia

para introdução de um cateter (Safety Catheter 18 G x 1¼”, Terumo Medical Corp.) acoplado a uma seringa contendo 1 mL de solução tamponada com fosfato (PBS - phosphate buffered saline) filtrado a 4 °C. Foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1 mL de PBS. Imediatamente, após sua retirada, o BAL foi colocado em um filtro celular de 40 µm de diâmetro (BD Biosciences) para remoção das larvas presentes e recolhido em um tubo, previamente identificado e submetido à centrifugação a 600g por 10 minutos a 4 °C.

O sobrenadante então foi coletado, separado em alíquotas e congelado a -80 °C e o sedimento utilizado para contagem celular.

As larvas provenientes das vias aéreas, retidas no filtro celular, foram recuperadas por meio da lavagem dos filtros com 10 mL de PBS seguido de centrifugação a 800g por 10 minutos em TA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso com 10 mL de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenado para posterior contagem em microscópio óptico. Essa contagem se refere ao resultado de número de larvas recuperadas nas vias aéreas.

4.3.2 Quantificação da carga parasitária tecidual e total

Após a obtenção do BAL, os pulmões foram coletados e transferidos para placas de Petri para serem picotados com tesouras cirúrgicas. Feito isso, os tecidos picotados foram transferidos para aparatos de Baermann-Moraes modificado, então, foi adicionado PBS até que a solução alcançasse os tecidos no tamis do aparato. As amostras foram incubadas por 4 horas a 37 °C. As larvas presentes nos tecidos migraram devido ao termotropismo e hidrotropismo, saindo o tecido e caindo na água do aparato e sedimentaram no fundo do cálice. Os sedimentos foram coletados com o auxílio de pipetas Pasteur de plástico e transferidos para tubos cônicos de 15 mL que foram centrifugados a 800g por 10 minutos em TA. Os sobrenadantes foram reduzidos a aproximadamente 2 mL e acrescentados 10 mL de solução tamponada de formaldeído a 4%.

No momento da contagem, os tubos contendo as larvas foram centrifugados novamente e os sobrenadantes reduzidos para 2 mL. A contagem do número de larvas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (Olympus CX31), sendo todo o volume de cada amostra analisado por meio da varredura dos campos nas lâminas. Essa contagem se refere ao resultado de número de larvas recuperadas no parênquima pulmonar

Para a determinação da carga parasitária total dos grupos experimentais foi realizada a somatória do número de larvas recuperadas das vias aéreas ao número de larvas recuperadas no tecido pulmonar.

4.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares

No oitavo dia pós-infecção desafio, foi realizada a avaliação da função pulmonar por espirometria forçada. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de ketamina e xilazina (8,5 mg/kg de xilazina e 130 mg/kg de ketamina) de tal maneira que conseguissem manter a respiração espontânea sob anestesia. Após o processo de anestesia, os camundongos foram traqueostomizados e feita a inserção de um cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 ml de espaço morto) no órgão. Então, os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador mecânico controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System[®], Buxco Research Systems[®], Wilmington, North Carolina USA).

Este aparelho laboratorial, especificamente projetado para uso em camundongos, tem apenas um volume de cânula (espaço de morte) de 0,8 mL e fornece semi-automaticamente três manobras diferentes: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência respiratória média de 160 inspirações/minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração. Para determinar a capacidade residual funcional (FRC), a ventilação é interrompida ao final da expiração com um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a consequente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC (lei de Boyle).

Durante a respiração mecânica diferentes tipos de parâmetros são possíveis de ser medidos. Nos quais, neste trabalho, na função RC, foram detectados a Resistência Pulmonar (Rl), que é a resistência do trato respiratório ao movimento do fluxo de ar durante a inspiração e expiração normais, onde $Rl = [(Pressão\ Atmosférica - Pressão\ Alveolar) / V]$, e a Complacência Pulmonar Dinâmica (Cdyn) que avalia as propriedades elásticas do tecido pulmonar, mensurando a capacidade do pulmão de se esticar e expandir.

Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

Após a realização da avaliação da função pulmonar, os animais foram eutanasiados por hipovolemia e os pulmões coletados para posteriores análises histopatológicas, dosagem de citocinas e avaliação indireta da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no tecido.

4.5 Avaliação dos aspectos histopatológicos pulmonares

Para a análise histopatológica pulmonar, o pulmão esquerdo foi coletado no oitavo dia pós-infecção e fixado em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth, Brasil) em PBS por 72 horas. Posteriormente, os tecidos foram processados e confeccionadas as lâminas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para visualização dos danos teciduais, considerando a intensidade da inflamação e hemorragia.

Para análise semiquantitativa, as lâminas foram examinadas sob um microscópio óptico de campo de luz acoplado a uma câmera de captura de imagem de sistema digital (Motic 2.0). Para análise do grau de inflamação das vias aéreas, inflamação peribrônquica, perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia nos pulmões, foi feita análise semiquantitativa seguindo metodologia descrita previamente por Gazzinelli-Guimarães e colaboradores, (2018), cujo método baseia-se no score de 6 graus de diferenciação para inflamação das vias aéreas sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave). Para o score de inflamação peribrônquica e perivascular, também foram utilizados 6 graus de diferenciação sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1 alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2 alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5 todos os vasos estão completamente inflamados (grave). Do mesmo modo, o score para inflamação do parênquima pulmonar foi baseado em 6 graus sendo: grau 0 igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1 de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2 de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3 de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4 de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5 mais de 70% do parênquima afetado. Já para o score das áreas hemorrágicas do tecido pulmonar foi

baseado em 4 graus sendo: grau 0 ausência de hemorragia (ausente); grau 1 presença de pequenas zonas hemorrágicas (discreta); grau 2 presença de áreas hemorrágicas significativas (moderada); grau 3 presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa).

Score 1: Inflamação das vias aéreas 0 = Ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas - AUSENTE 1 = Pequeno número de células inflamatórias em torno de algumas vias aéreas - DISCRETA 2 = Algumas vias aéreas apresentam inflamação significativa - MODERADA 3 = Maioria das vias aéreas apresentam alguma inflamação - ACENTUADA 4 = Maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas - INTENSA 5 = Todas as vias aéreas estão completamente inflamadas - GRAVE Score 1: Inflamação vascular 0 = Ausência de células inflamatórias em torno dos vasos - AUSENTE 1 = Pequeno número de células inflamatórias em torno de alguns vasos - DISCRETA 2 = Alguns vasos apresentam inflamação significativa - MODERADA 3 = Maioria dos vasos apresentam alguma inflamação - ACENTUADA 4 = Maioria dos vasos estão significativamente inflamadas - INTENSA 5 = Todos os vasos estão completamente inflamadas - GRAVE Score 1: Inflamação do parênquima (com ampliação de 10X) 0 = <1% afetado 1 = 1-9% afetado 2 = 10-29% afetado 3 = 30-49% afetado 4 = 50-69% afetado 5 = >70% afetado
--

Figura 6: Sistema de pontuação histopatológica para pulmões de camundongos.

Fonte: Traduzido de Oliveira et al.,2019

4.6 Caracterização dos aspectos imunológicos e inflamatórios

4.6.1 Dosagem de citocinas teciduais

Para avaliar o perfil de citocinas no tecido pulmonar foi coletado o pulmão direito (quadrilobado). Posteriormente, a 100 mg de tecido pulmonar foi homogeneizado em 1 mL de PBS (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO₄) suplementado com inibidores de protease (0,1 mM

de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio , 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinin A) e 0,05% de Tween 20. Os homogenatos foram centrifugados a 8.000g, por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C, e posteriormente utilizados para realizar a dosagem das citocinas.

A determinação de produção das citocinas IL-5, IL-13, IFN- γ e TNF- α foi feita utilizando kit de ELISA (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Já a determinação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF - α e IFN- γ foi feita utilizando o kit CBA (BD Biosciences, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.6.2 Quantificação de atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos

Para avaliar a atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no tecido foi realizada pela determinação dos níveis das peroxidases provenientes destas células imunes (Peroxidase eosinofílica - EPO e Mieloperoxidase de neutrófilos - MPO) e por meio de N-acetilglicosaminidase tecidual (NAG). A quantificação da atividade celular foi determinada a partir dos homogenatos do tecido pulmonar e medidos de acordo com um método descrito por Strath (1985) e modificado por Silveira (2002). Após a homogeneização dos tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA), o homogenato tecidual foi centrifugado a 1.500g por 10 minutos a 4 °C e o sedimento resultante foi então utilizado para determinar a atividade de das células em questão.

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 μ L de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e depois congelado e descongelado três vezes utilizando nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado a 1.500g por 10 minutos a 4 °C, 10 e o sobrenadante foi coletado, diluído 1:2 e distribuído numa microplaca de 96 poços (75 μ L / poço) (Corning, EUA). Em seguida foi adicionado 75 μ L de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM H₂O₂ em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0). Após uma incubação de aproximadamente 30 minutos em TA, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (2 M H₂SO₄) e a absorbância foi lida a 492 nm.

Para o ensaio MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200 μ L de solução tampão 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 0,015 M Na₂EDTA, pH 4,7) seguido de centrifugação (1500g, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado, e em seguida foi adicionado ao sedimento 800 μ L de solução tampão 2 (0,05 M NaPO₄, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%). A

mistura foi homogeneizada e depois congelada e descongelada três vezes utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (1500g, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25 µL da solução foram distribuídos em cada poço de microplacas de 96 poços (Corning, EUA) seguido pela adição de 25 µL de substrato TMB (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina + dimetilsulfóxido 1,6 mM) e 100 µL de 0,5M H₂O₂. Após incubação de cinco minutos em TA, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico (2M H₂SO₄). A densidade óptica (OD) absorbância foi determinada pelo leitor VersaMax ELISA (MolecularDevices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

Para ensaio de atividade da N-acetilglicosaminidase tecidual (NAG), 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-Dglicosaminidina (Sigma) diluídos em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.1 M, pH 4.5) na concentração final de 2.24 mM, foram adicionados em 100 µL de sobrenadante das amostras processadas e separadas para o ensaio em placa de 96 poços, por 10 minutos a 37° C. Ao final desta etapa, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0.2 M (pH 10.6) para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor VersaMax ELISA (MolecularDevices, EUA) a 405 nm.

4.6.3 Contagem diferencial de células, dosagem de hemoglobina e de proteínas total no BAL

Para a contagem diferencial de células, o sedimento resultante da centrifugação do BAL foi suspenso com 100 µL de PBS 1x. Uma alíquota (10 uL de amostra somada a 90 uL de corante Turk) foi removida para obtenção da contagem global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5x10⁴ células/mL. Após o ajuste de volume, cada amostra foi centrifugada a 135g por cinco minutos a 4 °C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). Lâminas obtidas após citocentrífugação foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e usadas para a contagem diferencial de leucócitos. Em cada lâmina foram contadas 400 células e assim o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado.

A concentração de hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico usando-se o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm contra solução de Drabkin, modificada (Bioclin Quibasa, Brasil). O padrão de hemoglobina (Bioclin Quibasa, Brasil) foi usado para preparação de uma

curva padrão na qual foram interpolados os valores de densidade óptica (OD) das amostras para se determinar a concentração das mesmas (Guabiraba et al., 2013). Os resultados foram expressos por μg de hemoglobina por mL de BAL.

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicíntrico usando kit comercial (Pierce, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de OD das amostras foram interpolados para se determinar a concentração de proteínas nas mesmas. Os resultados foram expressos por μg de proteína total por mL de BAL.

4.6.4 Detecção da produção de IgG sérico, total específico e subclasses, e produção de SIgA no BAL

Inicialmente, para quantificar IgG produzido foi necessário realizar a produção de antígeno bruto de verme adulto que foi obtido por meio da maceração mecânica do parasito em solução salina PBS utilizando um macerador de tecidos (Tissue Grinder, Fisher Scientific, EUA). Em seguida o produto bruto, mantido sob resfriamento em gelo, foi ultrassonicado a 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre cada ciclo, totalizando cinco ciclos. Em seguida, o produto bruto solúvel foi purificado por meio da centrifugação a 800g durante 10 minutos a TA. O sedimento foi descartado e os sobrenadantes armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. A quantidade de proteínas nas preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce, EUA) conforme as instruções do fabricante.

Posteriormente, os ensaios de ELISA foram realizados utilizando o soro dos animais dos diferentes grupos. Placas de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 100 μL de antígeno bruto de verme adulto na concentração de 10 μg por poço e deixadas overnight a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então foi feito o bloqueio da placa com 250 μL de PBS acrescido de 3% de BSA durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por, e em seguida adicionado 100 μL dos soros dos animais dos grupos experimentais diluídos 1:1.000 em PBS com BSA 3% foram adicionados aos poços e incubados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. As placas, no dia seguinte, foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100 μL do anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase diluído 1:2.000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem, e então foi adicionado 100 μL por

poço da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, OPD 0,05% e H_2O_2 0,1%. As placas foram incubadas a 37 °C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora e a reação foi interrompida pela adição de 50 μL de H_2SO_4 2M. A densidade óptica foi lida em leitor de VersaMax ELISA (MolecularDevices, EUA) ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Na ELISA padrão para as subclasses de IgG, o protocolo realizado foi o mesmo descrito acima, utilizando os respectivos anticorpos secundários anti-IgG1 mouse, anti-IgG2a mouse, anti-IgG2b mouse e anti-IgG3 mouse todos na diluição 1:1.000 diluídos em PBS-BSA 3%. Os soros dos animais foram diluídos 1:500 para IgG1 e IgG3 e 1:100 para IgG2a e IgG2b. Já para a determinação de SIgA, a amostra de BAL foi utilizada sem diluição e o anticorpo secundário na diluição de 1:500 em PBS-BSA 3%.

4.7 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Inc, EUA). Primeiramente, foi realizado o teste de ROUT para detectar a presença de possíveis outliers nas amostras. Em seguida, foi verificada a distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Por fim, para determinar as diferenças significativas entre as médias dos grupos foram realizados os testes ANOVA seguido do pós teste de comparação múltipla de Bonferroni (para dados com distribuição paramétrica) e o teste Kruskal–Wallis seguido do pós teste de comparação múltipla de Dunn (para dados com distribuição não paramétrica). A análise de correlação entre a produção de anticorpos e a carga parasitária foi realizada pelo teste de Spearman.

As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

CAPÍTULO 01:

Efeito do número de exposições com alta carga na ascaridíase larval

5. RESULTADOS

5.1 Efeito protetor dos diferentes números de exposições

Para análise da proteção em função do número de exposições, os camundongos foram infectados com 2.500 ovos de *A. suum*, e o número de larvas recuperadas nos pulmões e nas vias aéreas no oitavo dia após o desafio foi comparado entre os grupos PI, o RI (2X) e RI (3X) (**Figura 7**). A análise dos resultados indicou que os animais dos grupos reinfectedos, tanto do grupo 2X, quanto do grupo 3X apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparados ao grupo primoinfectado (PI). Mais detalhadamente, ao analisar a carga parasitária total (somatória das cargas parasitária no tecido pulmonar e no BAL), o grupo RI (3X) apresentou uma proteção total de 99,2 % ($p<0,001$), seguido de 95,6% para o grupo RI (2X) ($p<0,05$) quando comparados ao grupo PI (**Figura 7A**). De modo semelhante, a análise do número de larvas recuperadas no tecido pulmonar revelou que o grupo RI (3X) apresentou uma redução da carga parasitária quando comparado com os animais PI, atingindo 98,8 % ($p<0,001$) de proteção, seguido de 94% ($p<0,05$) de proteção para os animais do grupo RI (2X) (**Figura 7B**). Quanto ao do número de larvas recuperadas nas vias aéreas, também foi observado uma relevante redução no grupo RI (3X), atingindo 100% ($p<0,001$) de proteção e de 97,6% ($p<0,05$) de proteção no grupo RI (2X) (**Figura 7C**).

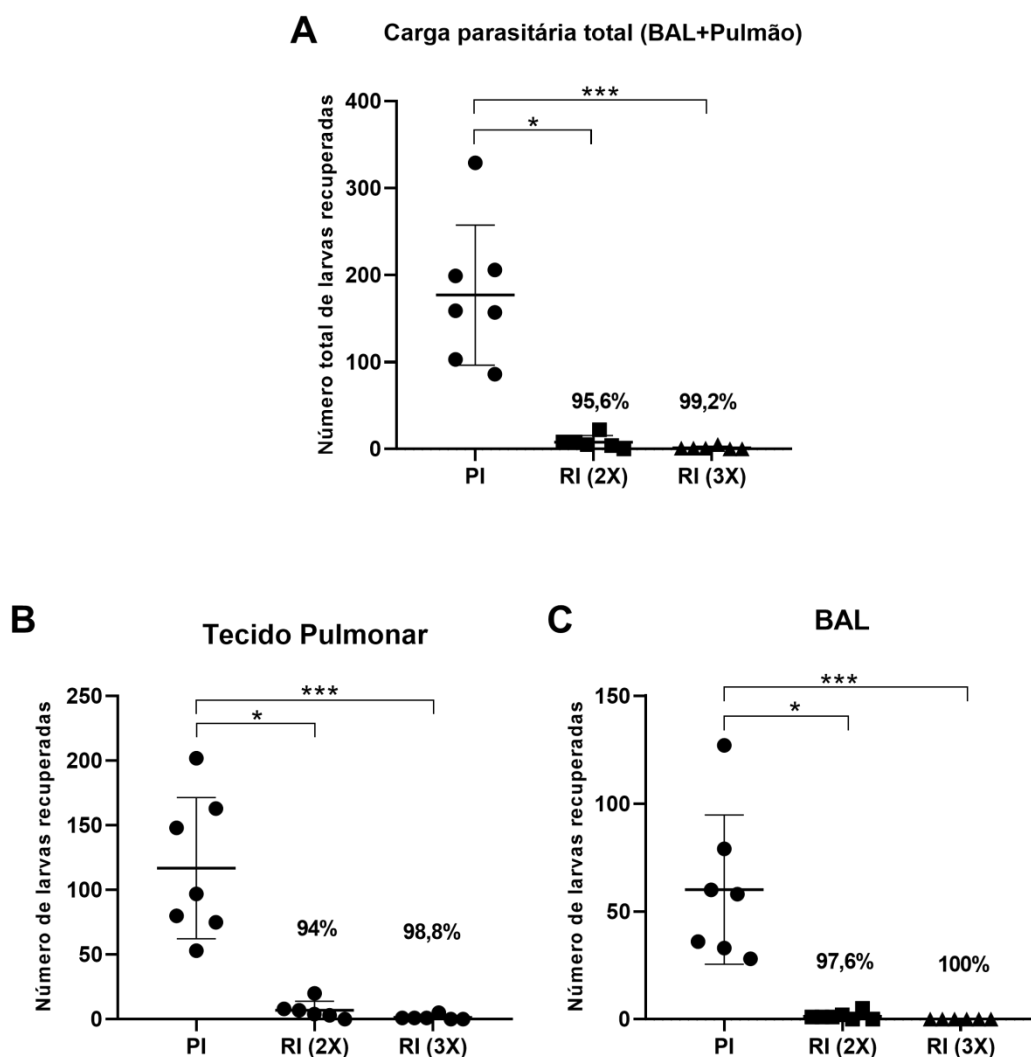


Figura 7: Carga parasitária dos camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum* oito dias após a infecção desafio. (A) Número total da de larvas recuperadas dos pulmões (BAL+Parênquima). (B) Número de larvas recuperadas do parênquima pulmonar dos animais. (C) Número de larvas recuperadas das vias aéreas dos animais. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelo símbolo *. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. O percentual apresentado no gráfico indica a taxa de redução da carga parasitária em relação ao grupo primoinfectado.

5.2 Avaliação dos aspectos imunológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes números de exposições

Após a avaliação da carga parasitária no pulmão dos animais dos diferentes grupos, foi realizada a análise do perfil leucocitário, dos níveis de hemoglobina e de proteína total no BAL,

a análise da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, e a dosagem de citocinas teciduais. A realização de todas essas metodologias foi feita a fim de caracterizar o perfil inflamatório durante as reinfecções com diferentes números de exposições.

Analisando o perfil do recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas dos camundongos após as pré exposições e a infecção desafio, foi verificado, a partir da contagem de celularidade, um aumento do número total de leucócitos e de seus subtipos, em consequência do aumento do número de exposições (**Figura 8**). Notou-se também que houve um aumento significativo de cada um dos subtipos celulares nos camundongos dos grupos reinfectedos RI (2X) e RI (3X) quando comparados ao grupo NI (**Figura 8**). Tais achados não foram verificados no grupo PI.

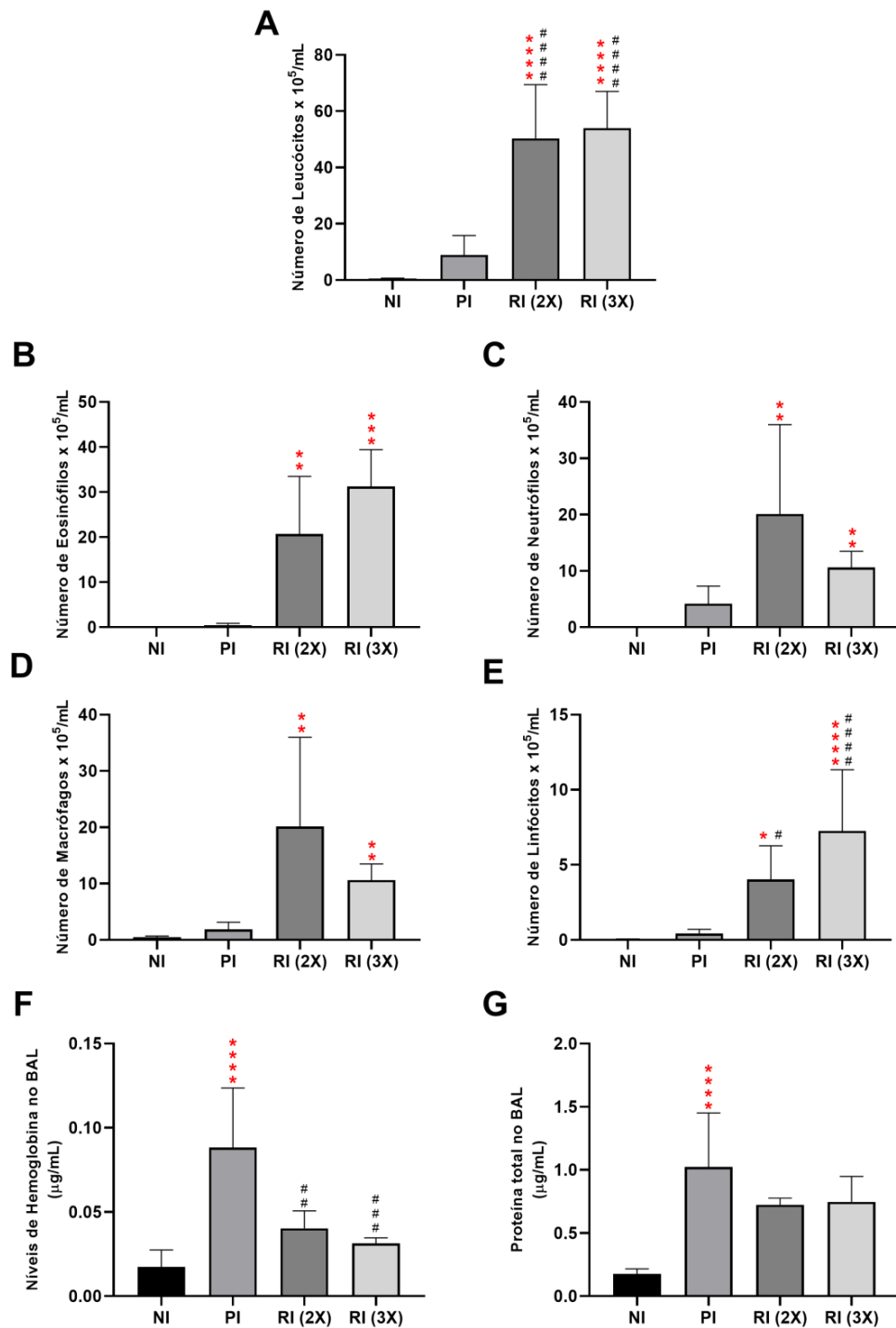


Figura 8: Contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina e proteína total no BAL dos camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao *A. suum* no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Leucócitos totais (B) Eosinófilos (C) Neutrófilos (D) Macrófagos (E) Linfócitos (F) Níveis de hemoglobina (G) Níveis totais de proteína. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A, E e F) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B, C, D e G). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*) e (#). Onde, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001,

***p<0,0001 são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, #####p<0,0001 são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

Detalhadamente, quanto aos leucócitos totais, os grupos RI (2X) e RI (3X) apresentaram um aumento significativo no número de células quando comparado aos grupos NI (p<0,0001) e PI (p<0,0001) (**Figura 8A**). Quanto à análise diferencial dos leucócitos, mostrou que os eosinófilos apresentaram um aumento significativo dos grupos reinfectedos os grupos RI (2X) e RI (3X) quando comparados ao NI (p<0,01 e p<0,001, respectivamente) (**Figura 8B**). De maneira semelhante, foi observado um aumento significativo no número de neutrófilos (**Figura 8C**) e macrófagos (**Figura 8D**) nos animais RI(2X) (p<0,01 e p<0,01, respectivamente) e RI (3X) (p<0,01 e p<0,01, respectivamente) em comparação ao grupo NI.. Quanto ao número de linfócitos, foi verificado um aumento nos grupos reinfectedos RI (2X) e RI (3X) quando comparados aos grupos NI (p<0,05 e p<0,0001, respectivamente) e PI (p<0,05 e p<0,0001, respectivamente) (**Figura 8E**).

Em contrapartida, ainda com enfoque na inflamação das vias aéreas, foi verificada a presença de hemorragia nos animais de todos os grupos infectados, contudo ela é significativamente maior no grupo PI quando comparado ao grupo NI (p<0,0001), RI (2X) (p<0,01) e RI (3X) (p<0,001) (**Figura 8F**). A maior hemorragia nos animais do grupo PI pode ser associada à maior migração de larvas do parênquima para as vias aéreas, uma vez que durante a migração, as larvas rompem capilares pulmonares causando extravasamento de sangue. Ao analisar os níveis de proteína total, foi observado que há uma maior exsudação nos animais PI (p<0,0001) quando comparado aos animais não infectados (**Figura 8G**), o que também pode estar relacionado à maior migração e a hemorragia das vias aéreas.

Buscando caracterizar o perfil da inflamação do tecido pulmonar, foi realizada, primeiramente, a avaliação indireta da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no tecido pulmonar pela quantificação da peroxidase de eosinófilos (EPO), da mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e de N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente (**Figura 9**). Assim, foi evidenciado um aumento significativo da atividade de EPO nos grupos reinfectedos (p<0,0001) quando comparado aos grupos NI e PI, contudo, com aumento mais acentuado no grupo RI 2X quando comparado ao grupo RI 3X (p<0,001) (**Figura 9A**). Também foi evidenciado um aumento da atividade de neutrófilos nos animais dos grupos RI (2X) (p<0,0001) e RI (3X) (p<0,01) quando comparado ao grupo NI. Esse aumento também foi significativo quando comparado o grupo RI (2X) (p<0,01) ao grupo PI (**Figura 9B**). Da mesma forma, foi verificada uma maior atividade de NAG nos grupos RI (2X) e RI (3X) em

comparação aos grupos NI ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente) e PI ($p<0,01$ e $p<0,01$, respectivamente) (**Figura 9C**).

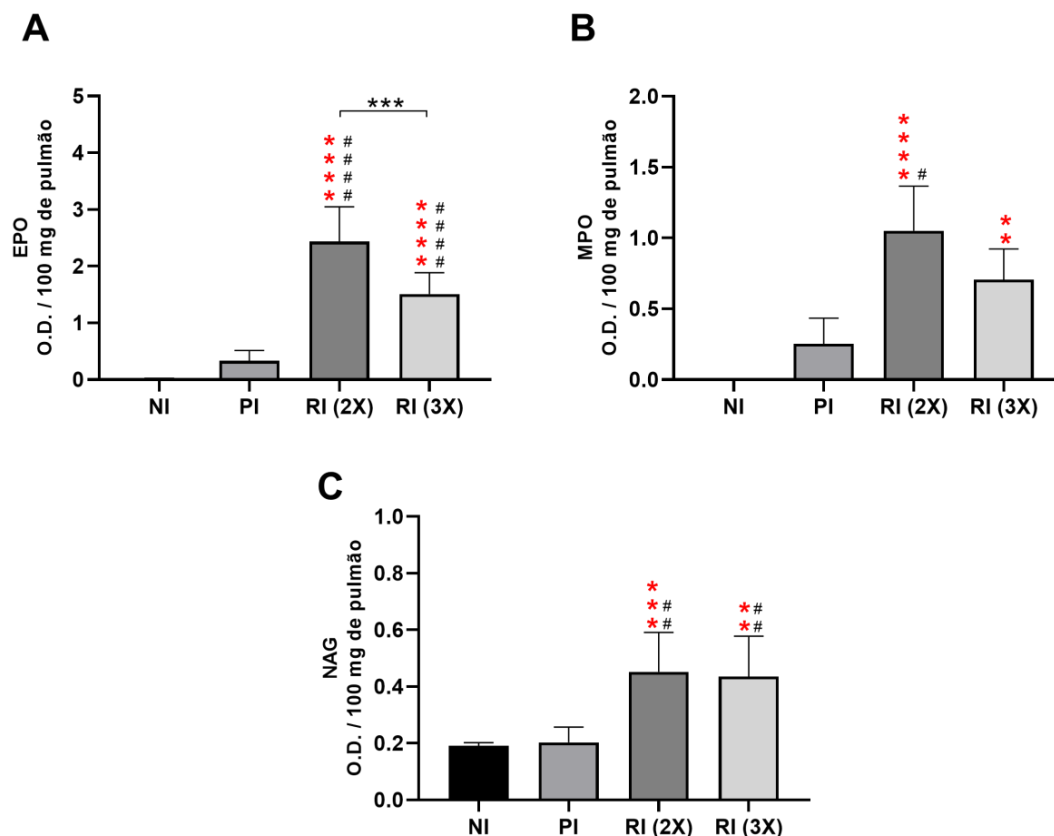


Figura 9: Níveis da atividade de EPO, MPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis da atividade de EPO. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de NAG. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A e C) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfetados, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, ##### $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

A caracterização do perfil de resposta imune tecidual foi realizada por meio da quantificação das citocinas presentes no pulmão com camundongos (**Figura 10**). Quanto a citocinas de perfil Th2, foi evidenciado o aumento nos níveis da citocina IL-5 em ambos os grupos reinfetados, RI (2X) ($p<0,01$) e RI (3X) ($p<0,01$), quando comparados ao grupo NI,

além disso, a citocina também foi aumentada nos animais do grupo RI (3X) em relação ao grupo PI ($p < 0,05$) (**Figura 10A**). No caso da citocina IL-13 também foi quantificada uma maior produção nos grupos reinfetados RI (2X) ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$) e RI (3X) ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$) em comparação aos grupos NI e PI, respectivamente (**Figura 10B**). Quanto a citocina IL-4, foi verificado um aumento no grupo RI (2X) quando comparado aos demais grupos, $p < 0,01$ para o grupo NI e $p < 0,05$ para os grupos PI e RI (3X) (**Figura 10C**).

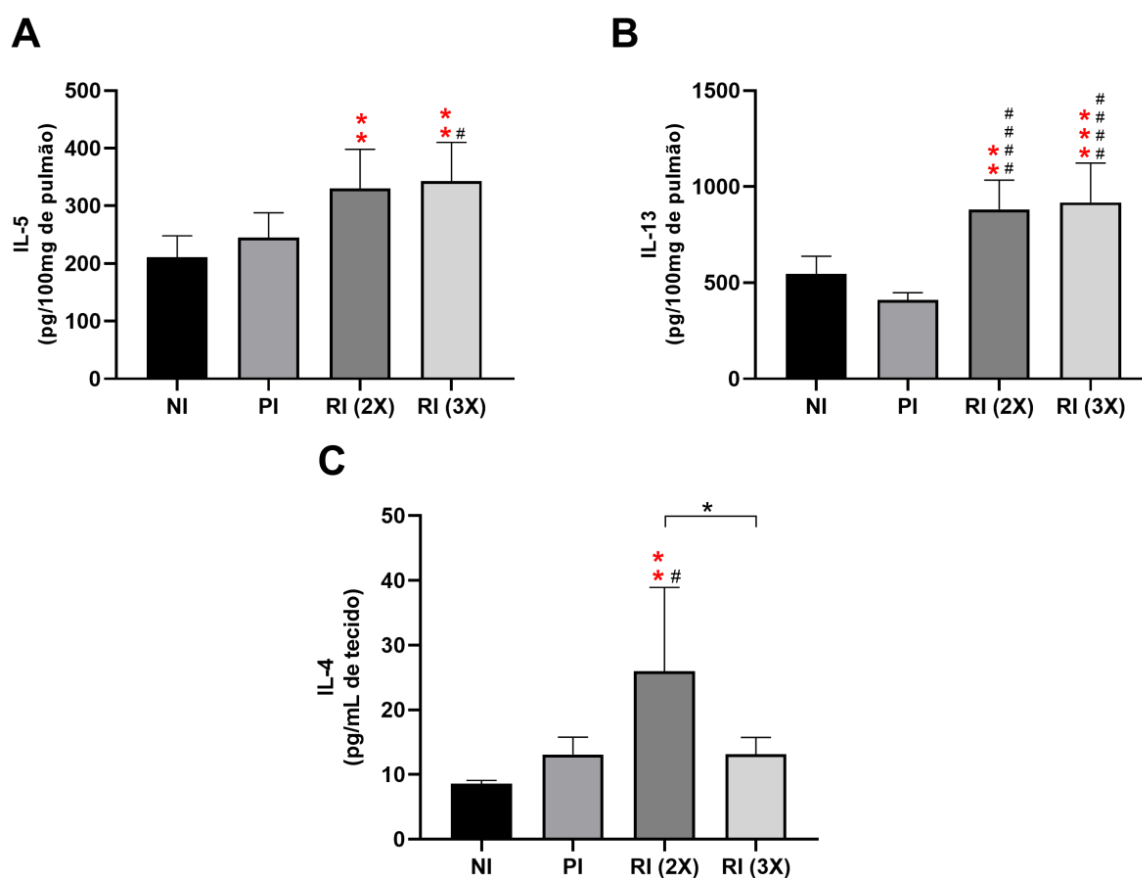


Figura 10: Quantificação das citocinas IL-5, IL-13 e IL-4 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IL-5 quantificados por ELISA. B) Níveis de IL-13 quantificados por ELISA. C) Níveis de IL-4 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A, B e C). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e#) e (#). Onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfetados, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

Do mesmo modo, foram avaliadas as citocinas de perfil pró-inflamatório no tecido pulmonar. Primeiramente, notamos o aumento dos níveis IFN- γ nos grupo RI (2X) ($p<0,001$) e RI (3X) ($p<0,01$) quando comparados ao grupo PI (**Figura 11A**). Quanto a citocina TNF- α foi verificado um aumento nos grupos reinfetados, RI (2X) ($p<0,05$ e $p<0,001$) e RI (3X) ($p<0,001$ e $p<0,0001$), em comparação aos grupos NI e PI, respectivamente (**Figura 11B**). A respeito da citocina IL-6 é visualizado um aumento nos níveis dosados no grupo PI ($p<0,01$) comparado ao grupo NI e do grupo RI (3X) ($p<0,05$) em relação ao grupo PI (**Figura 11C**).

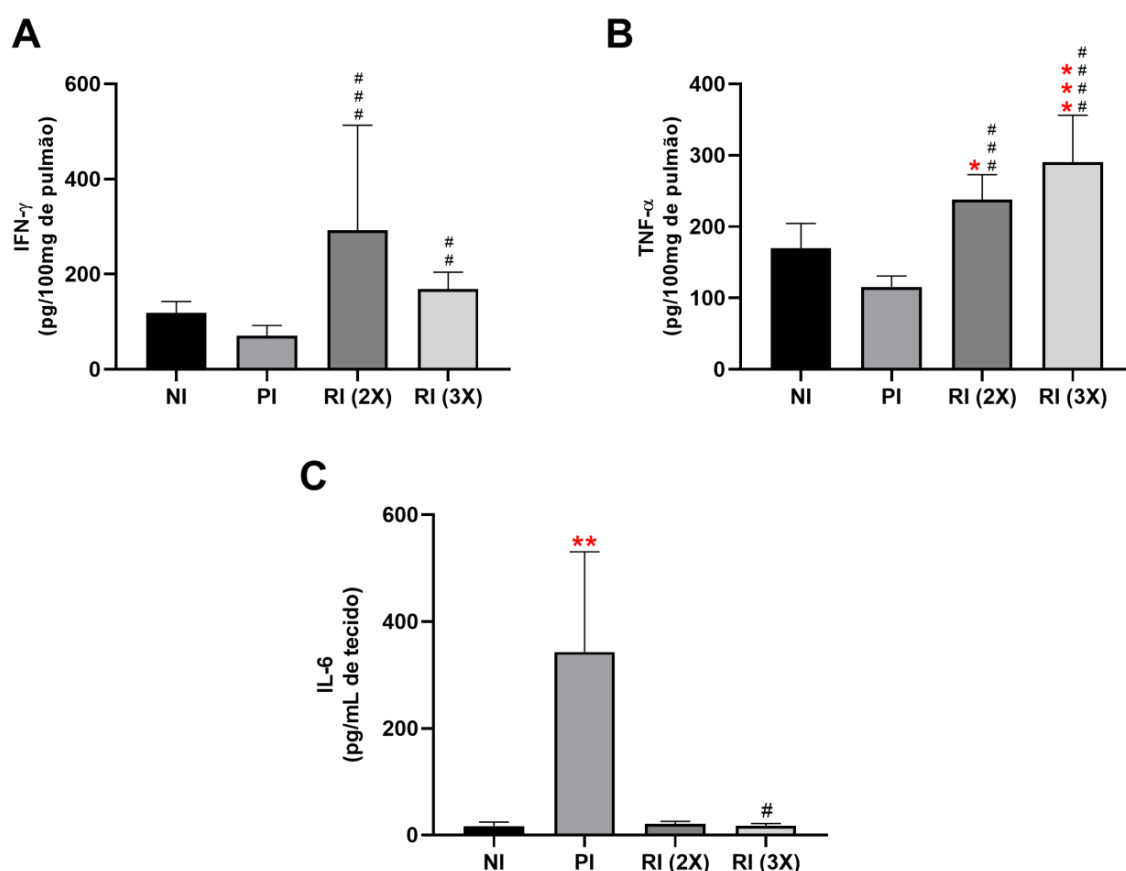


Figura 11: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IFN- γ quantificados por ELISA. B) Níveis de TNF- α quantificados por ELISA. C) Níveis de IL-6 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (B) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (A e C). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*) e (#). Onde * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, #### $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

As citocinas IL-10, IL-17 e IL-2 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (**Figura 12**)

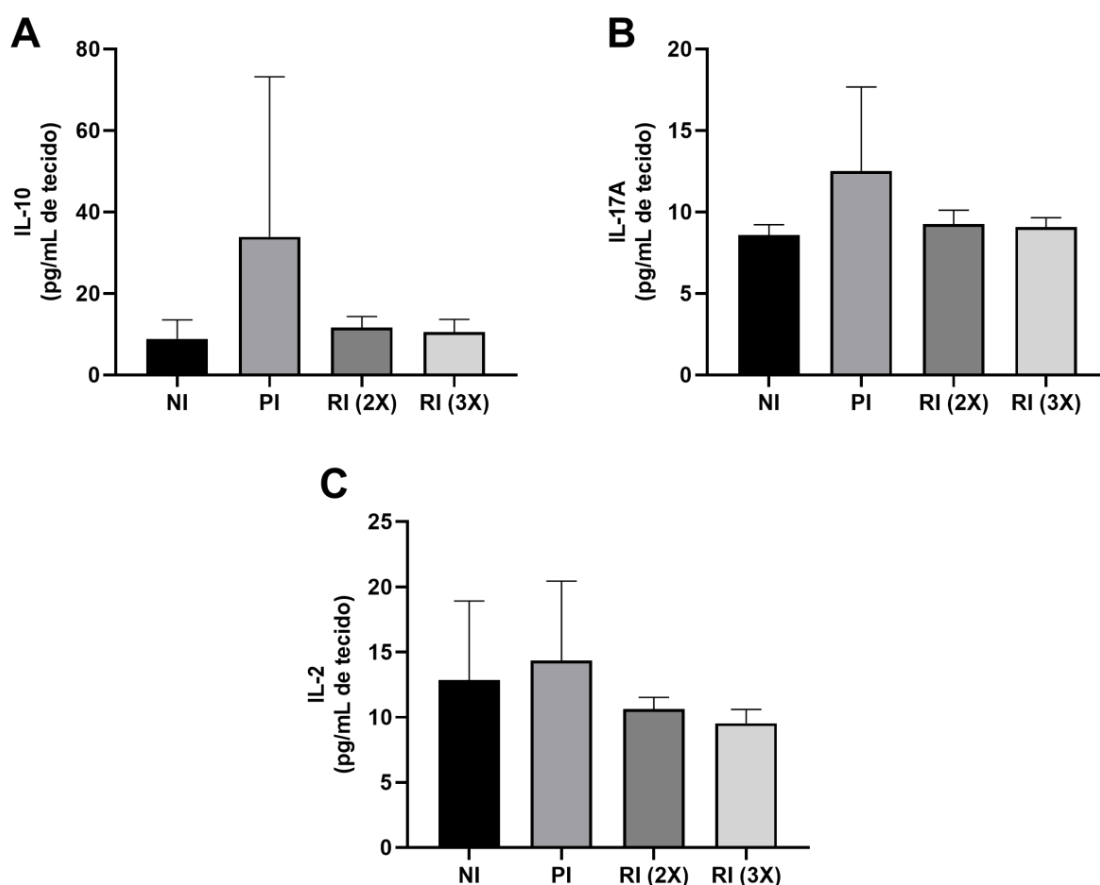


Figura 12: Quantificação das citocinas IL-10, IL-17A e IL-2 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IL-10 quantificados por CBA. B) Níveis de IL-17A quantificados por CBA. C) Níveis de IL-2 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (C) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (A e B). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão.

Por fim, com a finalidade de entender como se estabelece a relação entre os diferentes números de exposições ao *A. suum* e a geração de uma memória imunológica nos camundongos, foi realizada a dosagem e avaliação dos níveis séricos de IgG total específico para o antígeno bruto de verme adulto do parasito, assim como, a dosagem das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 presente nos soros dos animais (**Figura 13**). Essa análise demonstrou que houve um crescimento evidente e significativo na produção de IgG antígeno-específico nos grupos

reinfectados quando comparados aos grupos NI e PI ($p < 0,0001$) (**Figura 13A**). Quanto as subclasses foi observado um aumento significativo na produção de IgG1 nos grupos reinfectados quando comparado ao grupo NI ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) e também maiores níveis dessa subclasse no grupo RI (3X) quando comparado ao grupo PI ($p < 0,01$) (**Figura 13B**). No caso de IgG2a foi verificado um aumento da produção nos grupos reinfectados, RI (2X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$), quando comparados aos grupos NI e PI, respectivamente (**Figura 13C**). Também foi observado um aumento dos níveis de IgG2b nos grupos RI (2X) ($p < 0,001$ e $p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) em comparação aos grupos NI e PI, respectivamente (**Figura 13D**). A respeito da subclasse IgG3 foi encontrado um padrão semelhante ao observado nos resultados de avaliação dos de IgG total, em que, há um aumento significativos dos níveis de produção de IgG3 nos grupos reinfectados quando comparados aos grupos NI e PI ($p < 0,0001$), sendo que entre os grupos reinfectados, o grupo RI (3X) foi o que apresentou maiores níveis ($p < 0,05$) (**Figura 13E**).

Também foram quantificados os níveis de produção de SIgA no lavado broncoalveolar dos animais e foi observado um crescimento significativo nos grupos reinfectados, RI (2X) ($p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo NI. Esse aumento também é evidente no grupo RI (3X) em comparação com o grupo PI ($p < 0,01$) (**Figura 13F**).

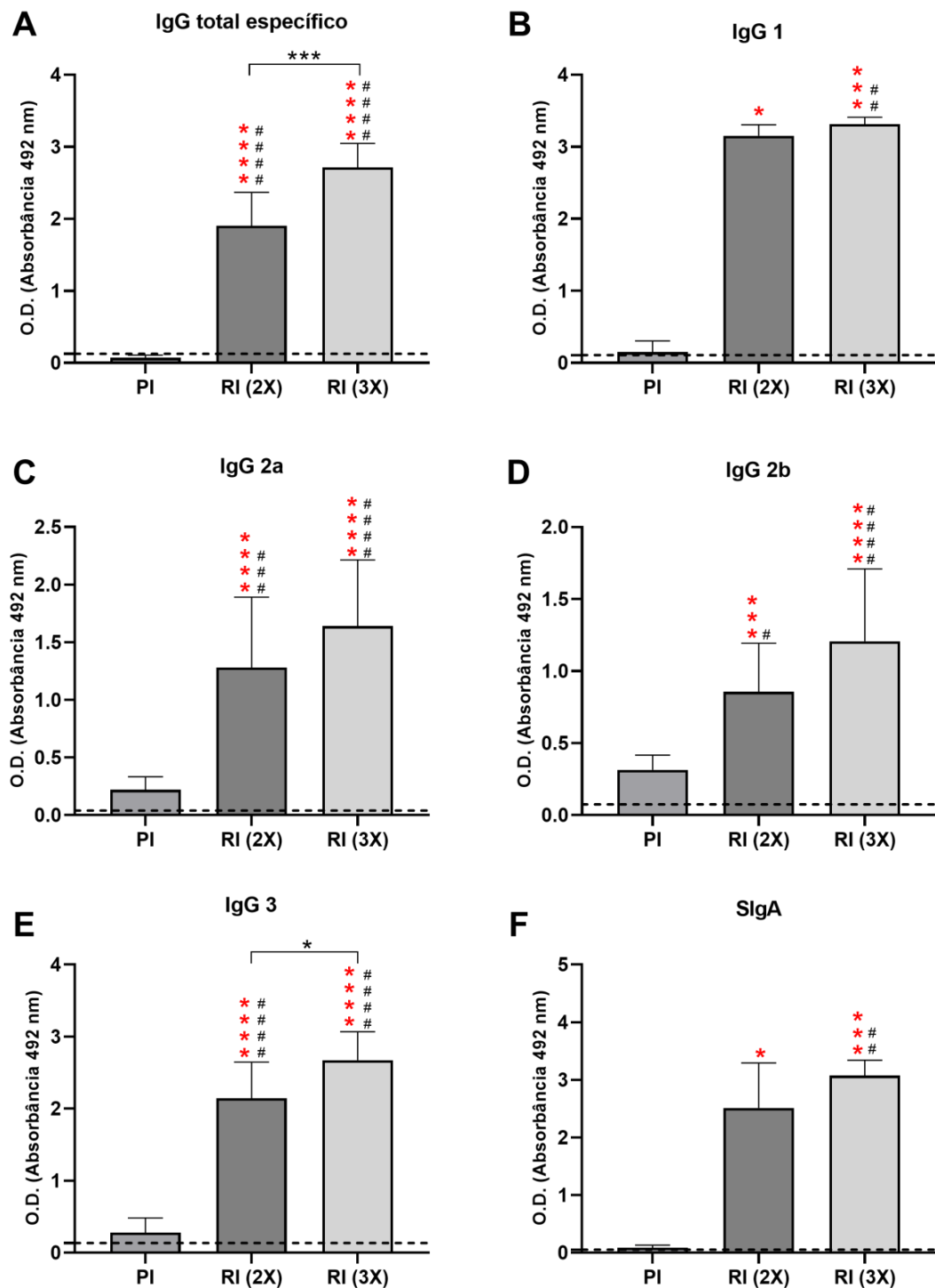


Figura 13: Níveis séricos de IgG total específico para antígeno bruto de verme adulto de *A.suum*, níveis das subclasses de IgG e níveis de SIgA no lavado broncoalveolar em camundongos BALB/c. com diferentes números de exposições ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Absorbância de IgG total específico (B) Absorbância de IgG1 específico (C) Absorbância de IgG2a específico (D) Absorbância de IgG2b específico (E) Absorbância de IgG3 específico (F) Absorbância de SIgA específico no BAL. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizado os testes One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A, C, D e E) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de

comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B e F). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfetados, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI. O grupo não infectado está representado pela linha pontilhada.

Além disso, foi verificado se há correlação da produção de IgG total específico e de SIgA (**Figura 14**) em função da carga parasitária. Nessa análise, foi possível constatar uma forte correlação entre os níveis de IgG total (**Figura 14A**) e de SIgA (**Figura 14B**) e a diminuição da carga parasitária. Ou seja, quanto maior foram os níveis anticorpos, tanto IgG total quando SIgA, menor foi o número de larvas recuperadas dos pulmões no oitavo dia pós-infecção desafio.

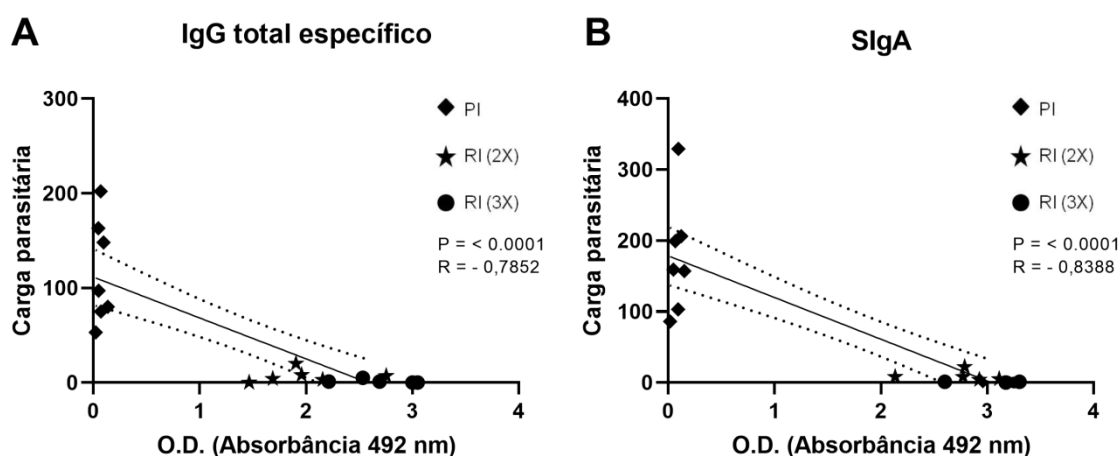


Figura 14: Análise de correlação entre produção de anticorpos e carga parasitária em camundongos BALB/c. com diferentes números de exposições ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Correlação da produção de IgG total específico com a carga parasitária. (B) Correlação da produção de SIgA com a carga parasitária. Para analisar a correlação entre as duas variáveis foi utilizado o teste de Spearman .

5.3 Avaliação histopatológica e dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes números de exposições

A fim de caracterizar as possíveis alterações do tecido pulmonar em decorrência dos diferentes números de exposição ao parasito, foi realizada uma avaliação histopatológica

semiquantitativa (**Figura 15**). Foi possível constatar um aumento da inflamação nas vias aéreas (**Figura 15A**), perivascular (**Figura 15B**) e no parênquima (**Figura 15C**) nos grupos RI (2X) ($p<0,001$, $p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente) e RI (3X) ($p<0,01$, $p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) quando comparado com o grupo NI.

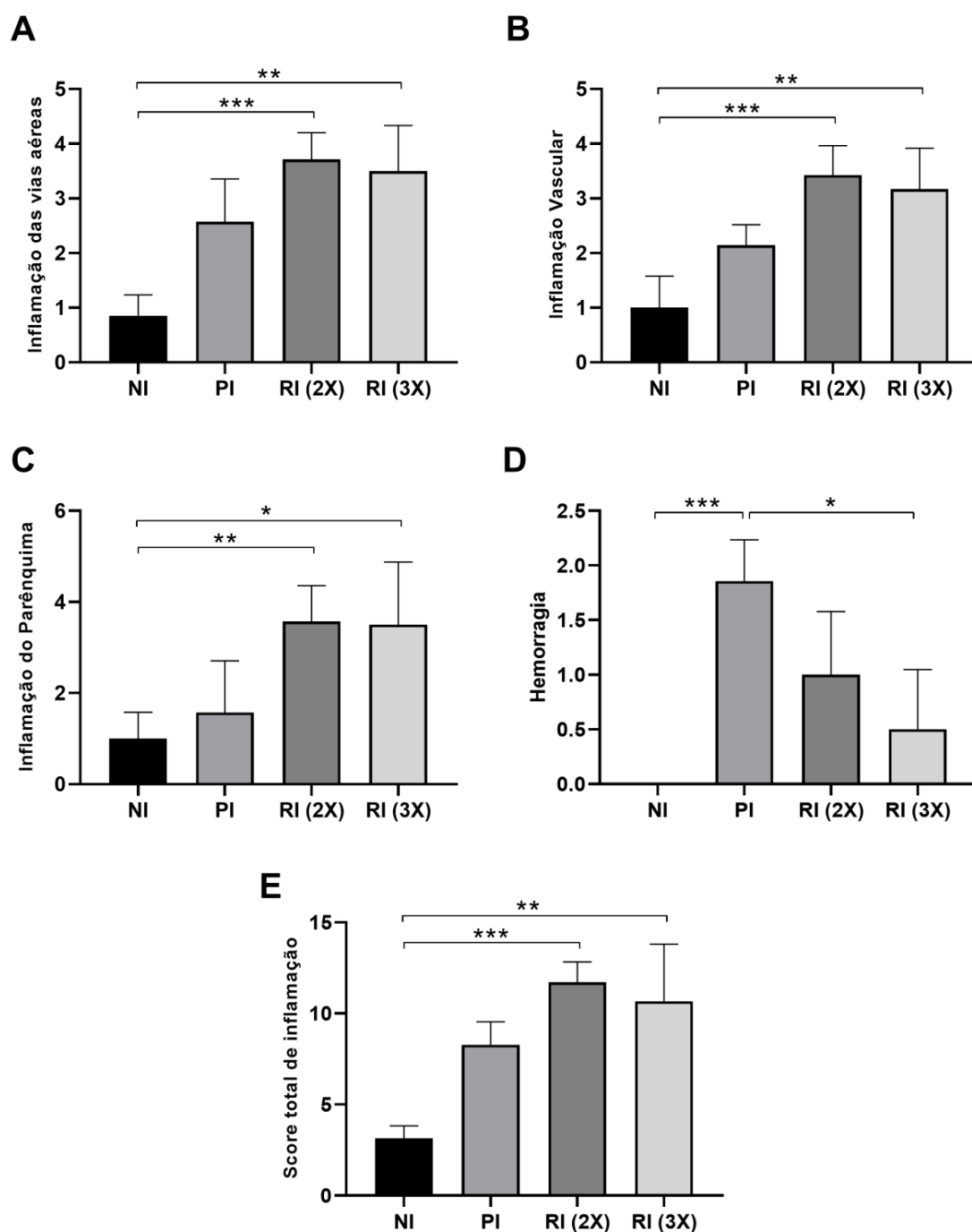


Figura 15: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D)

Hemorragia. E) *Score* total de inflamação. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelo símbolo *. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Ainda por meio da avaliação semiquantitativa, foi possível confirmar a presença de hemorragia mais intensa no grupo PI, sendo significativamente maior quando comparada aos grupos NI ($p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,05$) (**Figura 15D**), corroborando com o resultado de hemoglobina nas vias aéreas. Por fim, ao avaliar o *score* total de inflamação ficou evidente que os grupos reinfectedos apresentam uma maior inflamação pulmonar (**Figura 15E**).

Através da prancha histológica foi possível visualizar as alterações encontradas microscopicamente no parênquima pulmonar (**Figura 16**). Ao comparar os grupos infectados ao grupo NI foi observado presença de evidentes áreas hemorrágicas no grupo PI (**Figura 16B**) e considerável espessamento dos septos interalveolares, assim como, o aumento do infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas e dos vasos sanguíneos nos grupos reinfectedos RI (2X) e RI (3X) (**Figura 16C e 16D**).

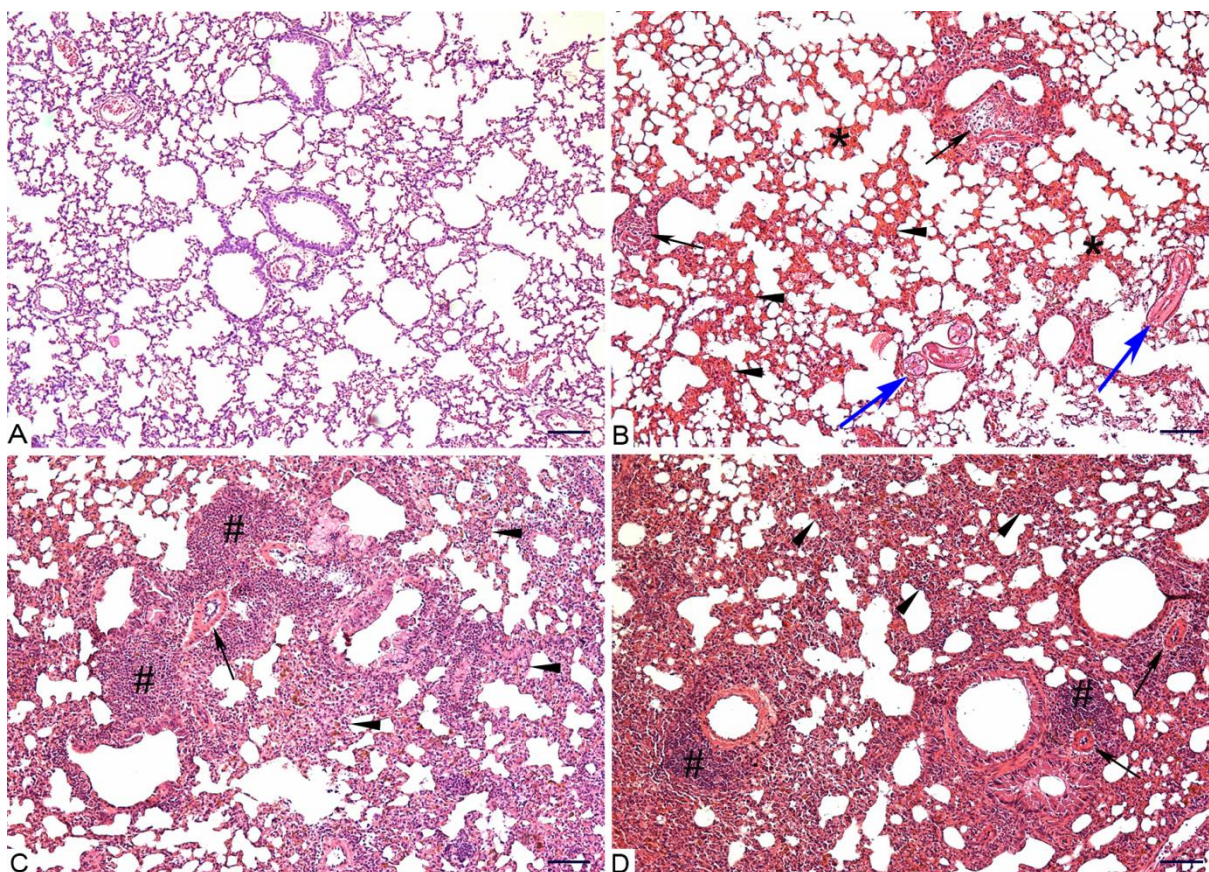


Figura 16: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c com diferentes números de exposição ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Grupo NI: imagem panorâmica do parênquima pulmonar com aspecto habitual; B) Grupo PI: imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando leve espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (seta azul), presença de exuberantes zonas de hemorrágicas (*); C) Grupo RI (2X): imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando grande espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), presença massiva de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores e vasos sanguíneos (#); D) Grupo RI (3X): imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando grande espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), presença massiva de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores e vasos sanguíneos (#). Barra = 100µm. Coloração hematoxilina & Eosina.

Após verificar a redução da carga parasitária e maior inflamação pulmonar nos grupos reinfetados, foi realizada a avaliação de parâmetros fisiológicos pulmonares, pela técnica de espirometria forçada no oitavo dia pós-infecção (**Figura 17**). Por meio dessa avaliação, quanto à complacência pulmonar, foi verificado que não houve uma diferença significativa entre os grupos infectados PI, RI (2X) e RI (3X), contudo, houve uma diminuição significativa da complacência dos grupos PI ($p < 0,01$) e RI (2X) ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo NI (**Figura 17A**). Com relação à resistência, também não foi vista uma diferença significativa entre

os grupos infectados PI, RI (2X) e RI (3X), mas foi observado um aumento significativo da resistência dos grupos PI ($p<0,01$) em comparação ao grupo NI (**Figura 17B**).

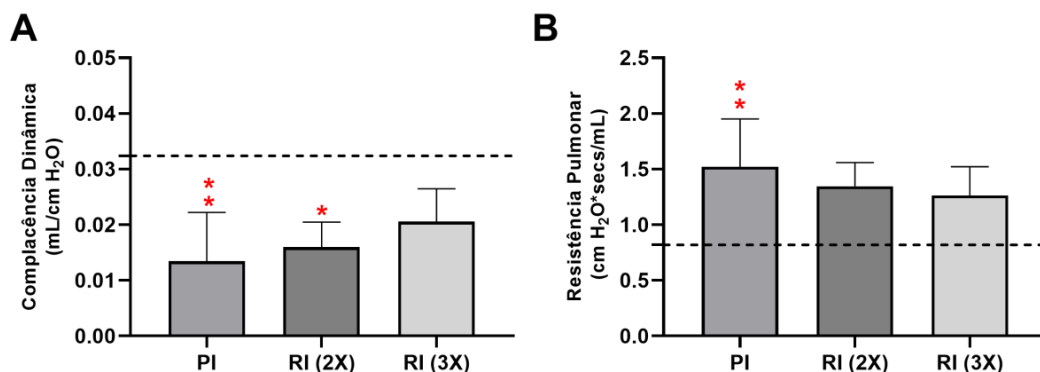


Figura 17: Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos BALB/c com diferentes números de exposições ao *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Complacência Dinâmica Forçada e (B) Resistência Pulmonar. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelo símbolo *. Onde, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI. O grupo não infectado está representado pela linha pontilhada.

Em última análise, os nossos dados sugerem que mesmo não havendo uma diferença significativa entre os grupos infectados é observada uma tendência a recuperação da capacidade elástica do pulmão nos animais RI (3X), possivelmente devido a uma menor migração das larvas no tecido contribuindo para tal, e também uma tendência à redução da resistência nos animais reinfectados.

CAPÍTULO 02:

Efeito das diferentes doses de infecção na ascaridíase larval

6. RESULTADOS

6.1 Efeito protetor das diferentes doses de infecção

Tendo em vista que o número de exposições influenciou no controle da carga parasitária, nos parâmetros imunológicos e fisiopatológicos pulmonares, neste capítulo foi avaliado se a reinfecção com diferentes doses de infecção gerariam alterações nos mesmos parâmetros. Primeiramente, analisamos a recuperação de larvas de *A. suum* no parênquima pulmonar e nas vias aéreas dos camundongos submetidos a diferentes doses de infecção, oito dias após a infecção desafio. De uma forma geral, a análise dos resultados evidenciou que houve uma redução significativa e dependente da dose de infecção nos camundongos dos grupos reinfectedos comparados ao grupo primoinfectado (**Figura 18**).

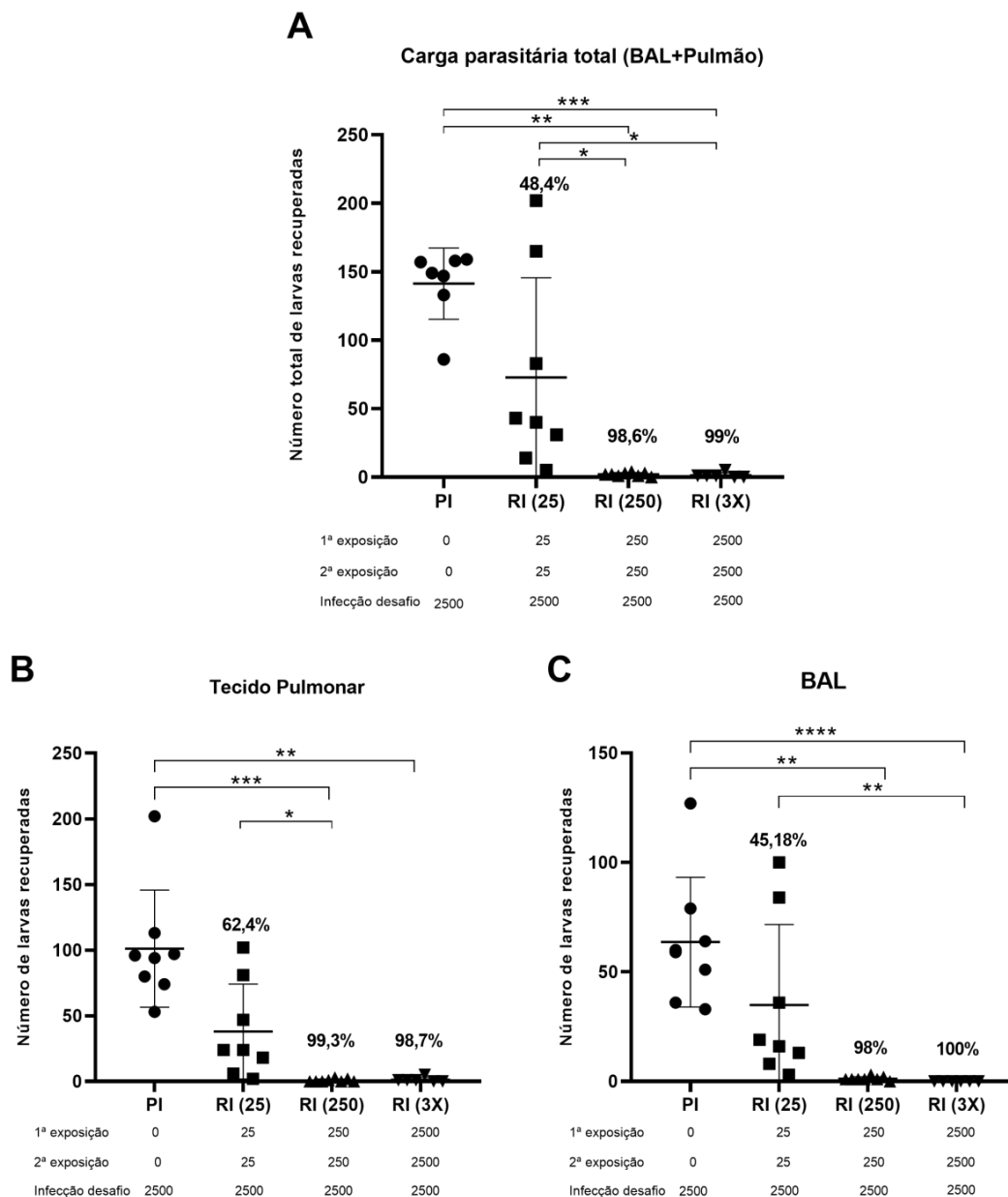


Figura 18: Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de infecção ao *A. suum* oito dias após a infecção desafio. (A) Número total da de larvas recuperadas dos pulmões (BAL+Parênquima). (B) Número de larvas recuperadas do parênquima pulmonar dos animais. (C) Número de larvas recuperadas nas vias aéreas dos animais. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelo símbolo *. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. O percentual apresentado no gráfico indica a taxa de redução da carga parasitária em relação ao grupo primoinfectado

Mais detalhadamente, ao analisar a carga parasitária total, que foi determinada pela soma das larvas recuperadas no tecido pulmonar e nas vias aéreas, foi possível observar uma

redução da carga parasitária nos grupos reinfectedados, contudo foi apenas nos grupos RI (250) e RI (3X) que essa redução foi significativa ao ser comparada com o grupo PI. Sendo assim, o grupo RI (3X) apresentou uma proteção total de 99% ($p < 0,001$), seguido de 98,6% ($p < 0,01$) no grupo RI (250) (**Figura 18A**).

Quando analisado separadamente a quantificação de larvas recuperadas no tecido pulmonar e no BAL é possível observar um padrão semelhante. Nos dados referentes à recuperação de larvas no tecido pulmonar foi visto uma maior taxa de redução dos grupos RI (250) e RI (3X) quando comparado com os animais do grupo PI, atingindo 99,3% ($p < 0,001$) e 98,7 % ($p < 0,01$) de redução, respectivamente (**Figura 18B**). Quanto a carga parasitária nas vias aéreas foi demonstrado uma relevante redução no número total de larvas nos animais RI (3X), atingindo 100% ($p < 0,0001$) de redução, seguido de 98% ($p < 0,01$) de proteção para o grupo RI (250) quando comparados ao grupo PI (**Figura 18C**).

Embora o grupo RI (25) não tenha apresentado redução significativa da carga parasitária em comparação ao grupo PI, ainda assim foi observado um percentual de redução equivalente a 48,4 % na carga total, 62,4% no parênquima e 45,18% nas vias aéreas. A partir desses dados é observado que quanto maior a dose maior a proteção.

6.2 Avaliação dos aspectos imunológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes doses de infecção

Assim como demonstrado no capítulo anterior, após a avaliação e quantificação da carga parasitária, foram analisados o perfil leucocitário, os níveis de hemoglobina e de proteína total das vias aéreas, a atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos e a dosagem de citocinas teciduais.

Primeiramente, a respeito do recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas (**Figura 19**). Com relação a presença de leucócitos totais foi observado um aumento gradual da celularidade, sendo que o grupo RI (3X) ($p < 0,0001$) apresentou um aumento significativo quanto ao número de células quando comparado aos demais grupos (**Figura 19A**). Quanto aos subtipos celulares foi observado um aumento significativo de eosinófilos nos grupos RI (250) ($p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo NI, esse aumento também foi relevante quando comparado o grupo RI (3X) ($p < 0,01$) ao grupo PI (**Figura 19B**). A respeito dos neutrófilos houve um aumento significativo no número de células nos grupos RI (250) ($p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,01$) quando comparado com os animais do grupo NI (**Figura 19C**). No caso dos macrófagos foi observado um aumento significativo nos grupos RI (25) ($p < 0,05$) e RI

(3X) ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo NI (**Figura 19D**). Em relação ao número de linfócitos observamos um aumento gradual desse subtipo celular, sendo mais presente e significativos nos grupos RI (250) ($p < 0,01$ e $p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) quando comparado aos grupos NI e PI, respectivamente (**Figura 19E**). Também houve um aumento significativo desse tipo celular no grupo RI (3X) ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo RI (25).

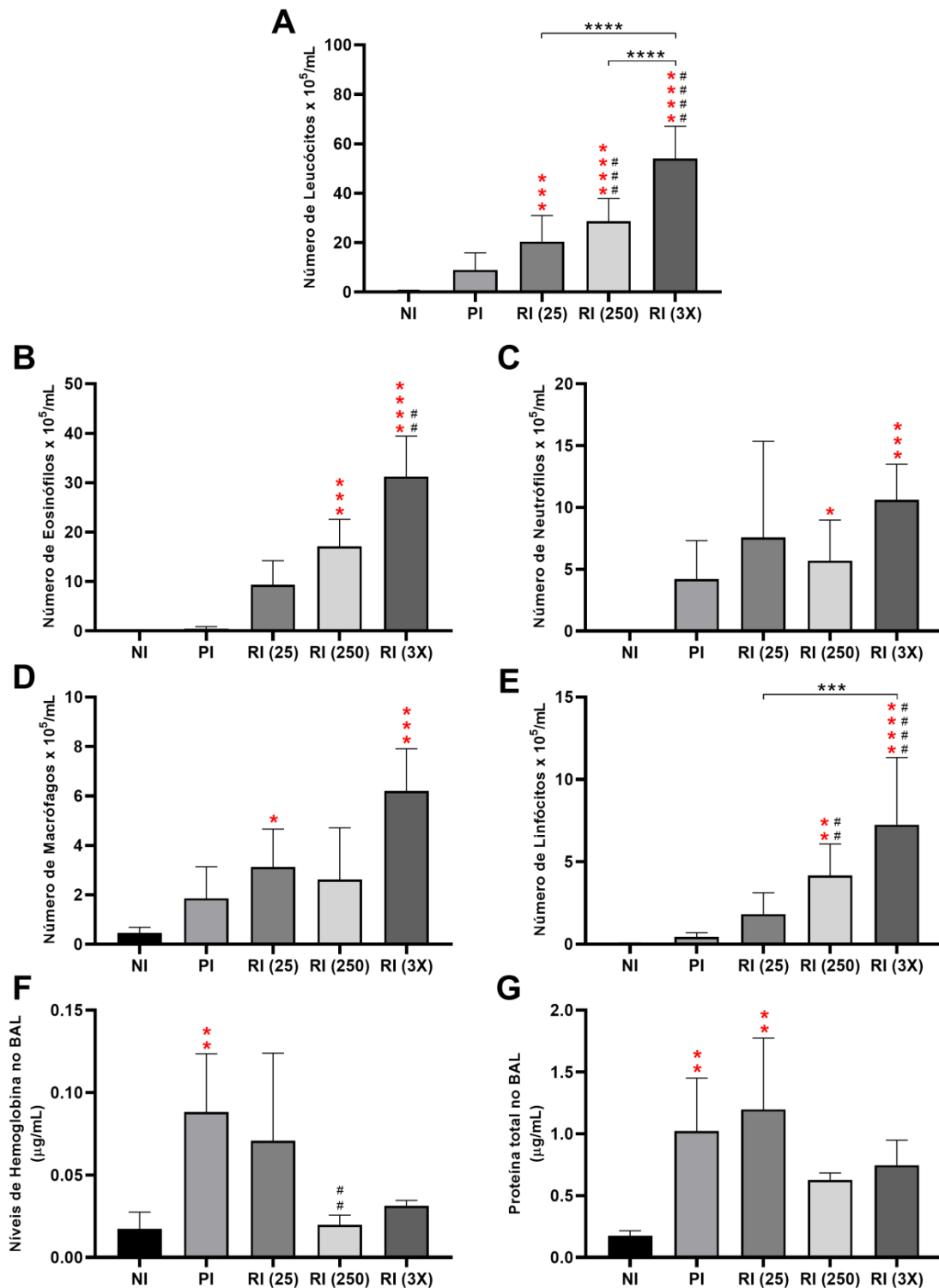


Figura 19: Contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina e proteína total no BAL dos camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum* no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Leucócitos totais, (B) Eosinófilos, (C) Neutrófilos, (D) Macrófagos, (E) Linfócitos, (F) Níveis de hemoglobina e (G) Níveis totais de proteína. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A e E) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B,

C, D, F e G). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfectedos, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

Ao analisar os níveis de hemoglobina e de proteínas nas vias aéreas dos diferentes grupos, foi observada uma hemorragia mais intensa no grupo PI comparado aos grupos NI ($p < 0,01$) e RI (250) ($p < 0,01$), contudo, não foram observadas diferenças em relação aos grupos RI (25) e RI (3X) (**Figura 19F**). Quanto aos níveis de proteína total foi observado um aumento do grupo PI ($p < 0,01$) e RI (250) ($p < 0,01$) comparado ao grupo NI (**Figura 19G**).

A fim de aprofundar o conhecimento a respeito da inflamação pulmonar nos camundongos reinfectedos com diferentes doses, foi realizada a quantificação da atividade de células no tecido pulmonar (**Figura 20**). Com isso, observamos um aumento da atividade de eosinófilos em todos os grupos reinfectedos - RI (25) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$), RI (250) ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$) em comparação aos grupos NI e PI, respectivamente. Porém a atividade de EPO em camundongos do grupo RI (25) foi significativamente maior quando comparado aos grupos reinfectedos RI (250) ($p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,0001$) (**Figura 20A**). Quanto a atividade de MPO foi detectado uma maior atividade entres os grupos reinfectedos - RI (25) ($p < 0,0001$) RI (250) ($p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo NI. Apenas o grupo RI (25) ($p < 0,05$) apresentou aumento significativo em comparação ao PI (**Figura 20B**). Já em relação da atividade de macrófagos, esta foi aumentada nos grupos RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,01$) quando comparados aos grupos NI e PI (**Figura 20C**).

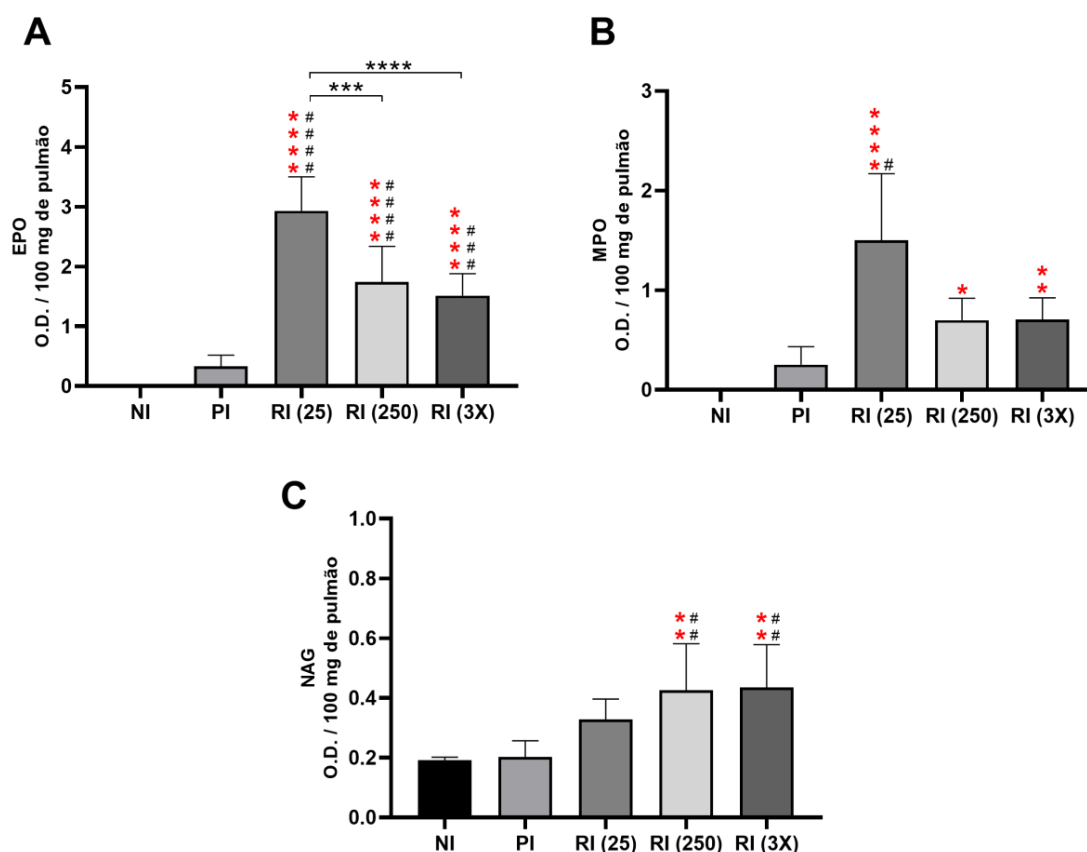


Figura 20: Níveis da atividade de EPO, MPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis da atividade de EPO. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de NAG. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A e C) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e#) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfetados, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

Dando continuidade as investigações a respeito do perfil de inflamação, também foi realizada a quantificação de citocinas teciduais (**Figura 21**). Avaliando o perfil de citocinas Th2 foi observado um aumento de IL-5 no grupo RI (250) ($p < 0,05$) e do grupo RI (3X) ($p < 0,01$) comparado ao grupo NI (**Figura 21A**). Ao analisar a citocina IL-13, foi verificado um aumento nos grupos reinfetados ao comparar os grupos RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,001$) com o grupo NI, RI (25) ($p < 0,05$), RI (250) (0,0001) e RI (3X) ($p < 0,0001$) com o grupo PI. Também foi observado uma maior produção dessa citocina do grupo RI (3X) ($p < 0,01$) quando

comparado ao grupo RI (25) (**Figura 21B**). E por fim, foi observado um aumento da citocina IL-4 no grupo RI (25) em comparação aos demais, NI ($p<0,0001$), PI ($p<0,001$), RI (250) ($p<0,001$) e RI (3X) ($p<0,001$) (**Figura 21C**).

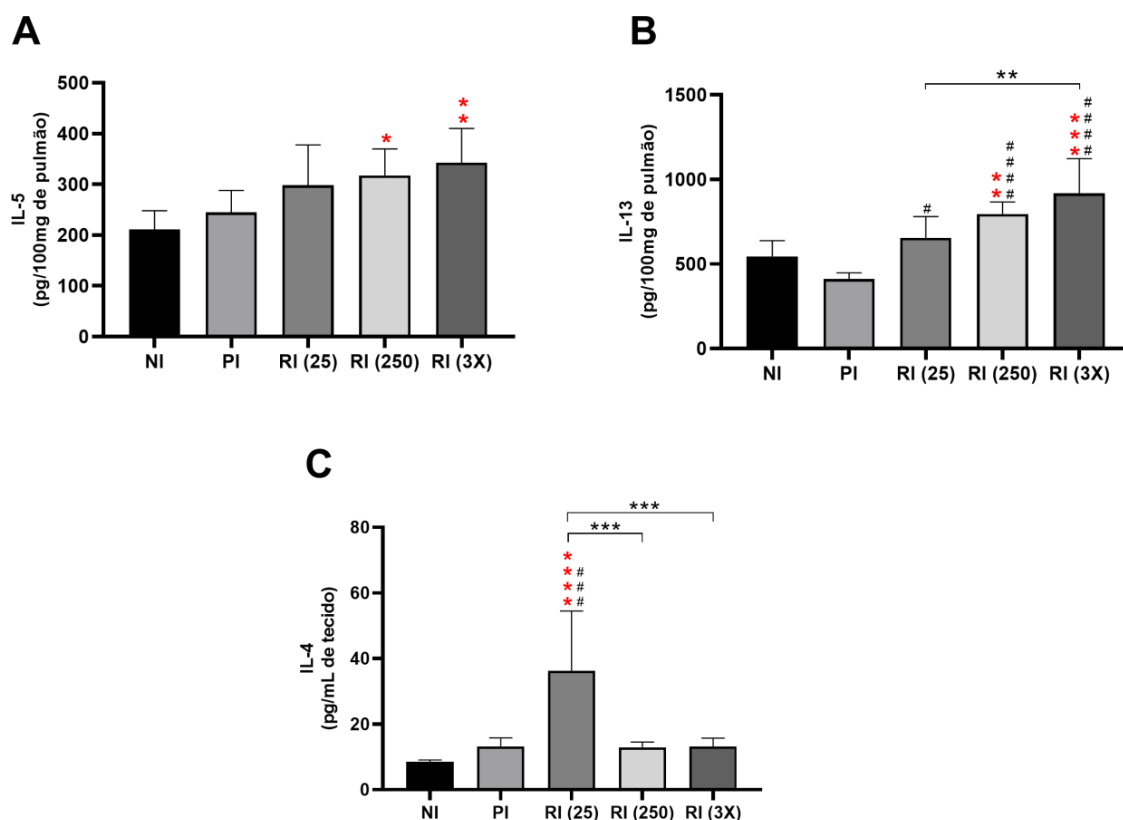


Figura 21: Quantificação das citocinas IL-5, IL-13 e IL-4 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IL-5 quantificados por ELISA. B) Níveis de IL-13 quantificados por ELISA. C) Níveis de IL-4 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A, B e C). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfetados, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, #### $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

Ao analisar as citocinas de perfil pró-inflamatório no tecido pulmonar foi verificado um aumento dos níveis de IFN- γ nos grupos RI (250) ($p<0,001$ e $p<0,01$) e RI (3X) ($p<0,001$ e $p<0,01$) comparado ao grupo PI e RI (25), respectivamente (**Figura 22A**). Quanto a citocina TNF- α foi observado um perfil semelhante ao visto com IFN- α . Em que foi verificado uma

maior quantificação dos níveis nos grupos RI (250) ($p<0,05$, $p<0,001$ e $p<0,05$) e RI (3X) ($p<0,001$, $p<0,0001$ e $p<0,001$) quando comparado aos grupos NI, PI e RI (25), respectivamente (**Figura 22B**). A respeito da citocina IL-6 é observado um aumento do grupo PI ($p<0,001$) e RI (25) ($p<0,05$) comparado ao NI e também uma diminuição significativa do grupo RI (3X) ($p<0,01$) comparado ao grupo PI (**Figura 22C**).

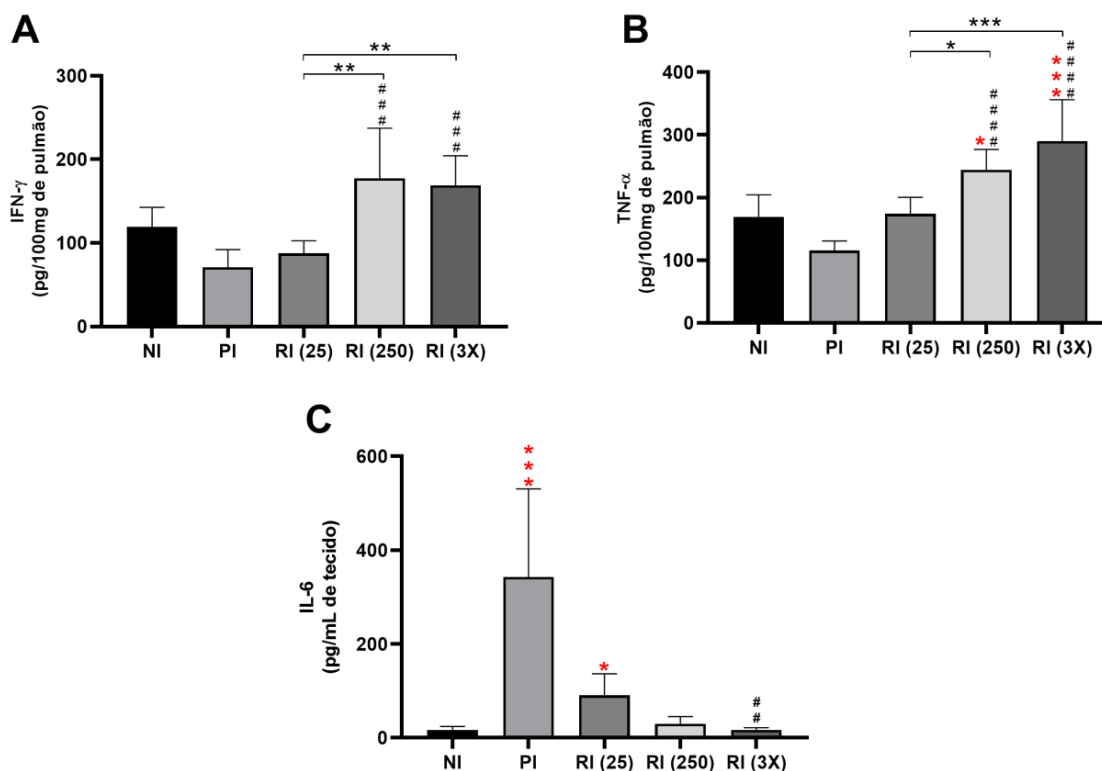


Figura 22: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IFN- γ quantificados por ELISA. B) Níveis de TNF- α quantificados por ELISA. C) Níveis de IL-6 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A e B) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (C). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfectados, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, #### $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI.

As citocinas IL-10, IL-17 e IL-2 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (**Figura 23**).

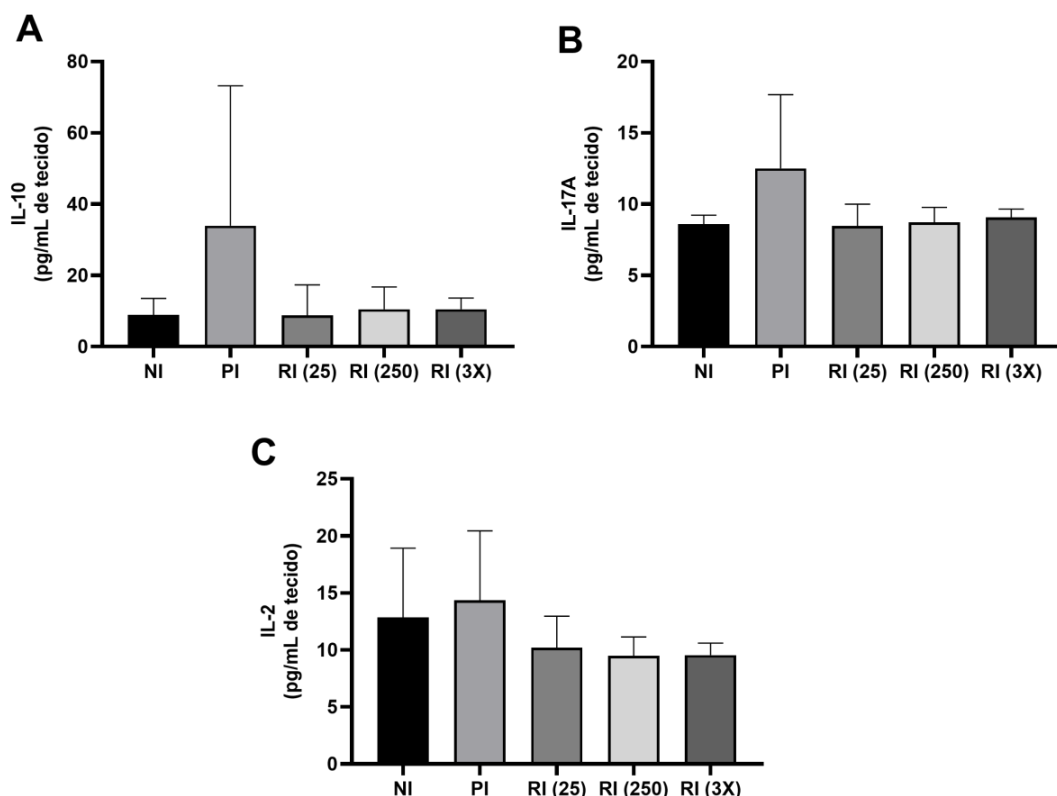


Figura 23: Quantificação das citocinas IL-10, IL-17A e IL-2 no tecido pulmonar de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Níveis de IL-10 quantificados por CBA. B) Níveis de IL-17A quantificados por CBA. C) Níveis de IL-2 quantificados por CBA. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (B e C) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (A). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão.

Com o intuito de avaliar se o estabelecimento da produção de anticorpos específicos é dose-dependente, foi quantificado os níveis séricos de IgG total específico e das subclasses após as infecções com diferentes doses de infecção (**Figura 24**). Em relação aos dados encontrados, foi observado um crescimento na produção de IgG total específico para antígeno bruto de verme adulto do parasito nos grupos RI (25), RI (250) e RI (3X) quando comparados aos grupos NI ($p < 0,0001$) e PI ($p < 0,0001$). Foi verificado também que entre os grupos reinfetados, os grupos RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,05$) apresentaram níveis mais elevados do que o RI (25) (**Figura 24A**).

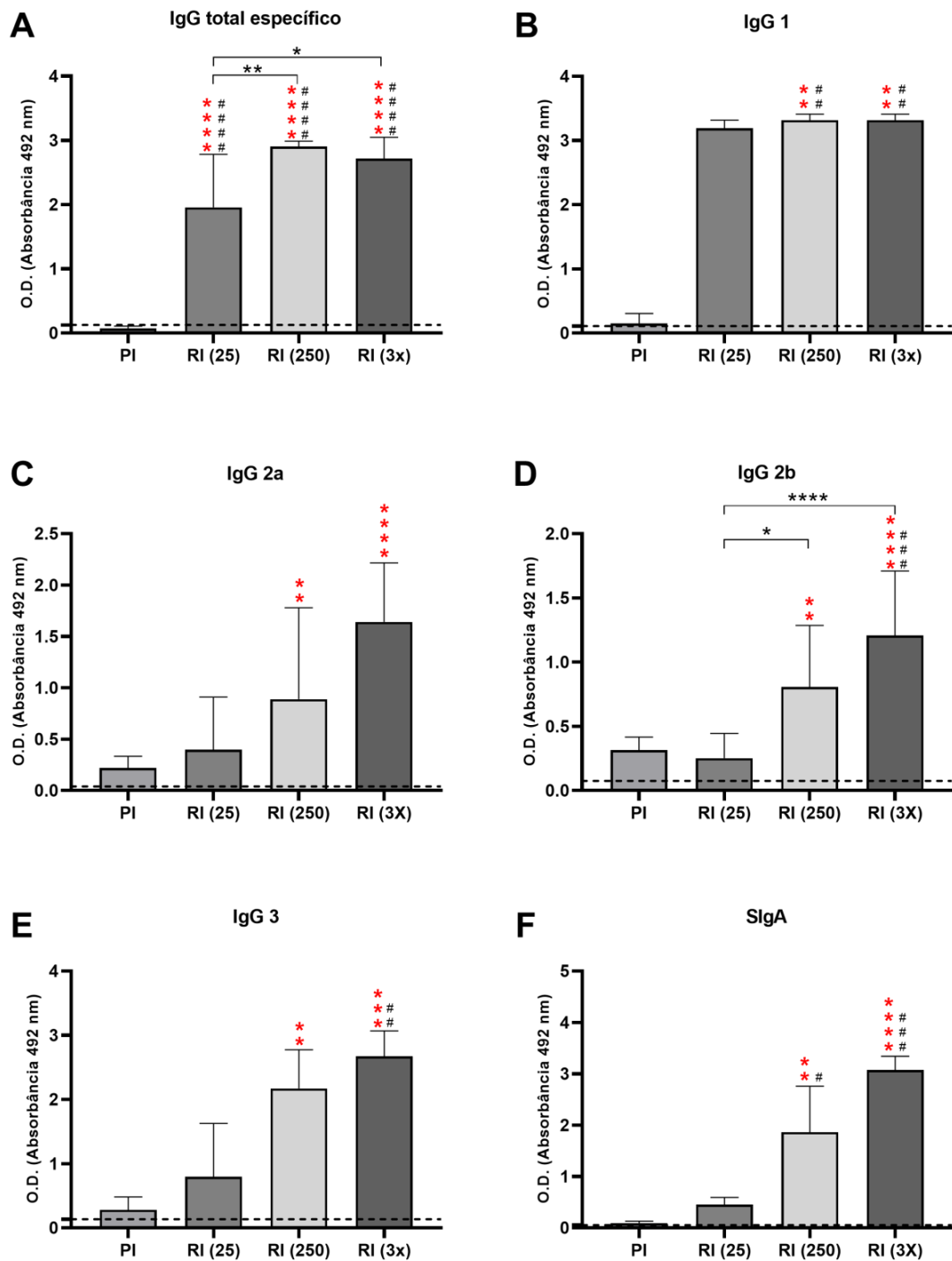


Figura 24: Níveis séricos de IgG total específico para antígeno bruto de verme adulto de *A. suum*, níveis de subclasses de IgG e avaliação da produção de SIgA no lavado broncoalveolar em camundongos BALB/c. com diferentes carga de exposição a *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Absorbância de IgG total específico. (B) Absorbância de IgG1 específico (C) Absorbância de IgG2a específico (D) Absorbância de IgG2b específico (E) Absorbância de IgG3 específico (F) Absorbância de SIgA específico no BAL. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni para os dados que apresentaram uma distribuição normal (A e D) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B, C, E e F). Os

resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*e*) e (#). Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças entre os grupos reinfectedos, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo PI. O grupo não infectado está representado pela linha pontilhada.

Quanto as subclasses foi observado um aumento significativo na produção de IgG1 nos grupos reinfectedos RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,01$) quando comparado aos grupos NI e PI (**Figura 24B**). No caso de IgG2a foi verificado um aumento nos grupos reinfectedos, RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,0001$), apenas quando comparados aos grupos NI (**Figura 24C**). Quanto aos níveis de IgG2b foi observado um aumento nos grupos RI (250) ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) em comparação aos grupo NI e RI (25). Também foi encontrado um aumento significativo no grupo RI (3X) ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo PI (**Figura 24D**). Em relação a subclasse IgG3 foi visualizado um aumento significativo ao comparar os grupos RI (250) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,001$) com os animais do grupo NI e o grupo RI (3X) ($p < 0,01$) com o grupo PI (**Figura 24E**).

Também foram quantificados os níveis de SIgA no lavado broncoalveolar dos animais. Foi observado um aumento significativo nos grupos RI (250) ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$) quando comparados ao grupo NI e ao o grupo PI, respectivamente (**Figura 24F**).

Além disso, foi verificado se há correlação da produção de IgG total específico e de SIgA (**Figura 25**) em função da carga parasitária. E assim como no capítulo anterior, foi observado que houve uma correlação negativa significativa entre os níveis de IgG total específico (**Figura 25A**) e de SIgA (**Figura 25B**) e a diminuição da carga parasitária. Ou seja, quanto maior foram os níveis anticorpos, tanto IgG total quando SIgA, menor foi o número de larvas recuperadas dos pulmões no oitavo dia pós-infecção desafio.

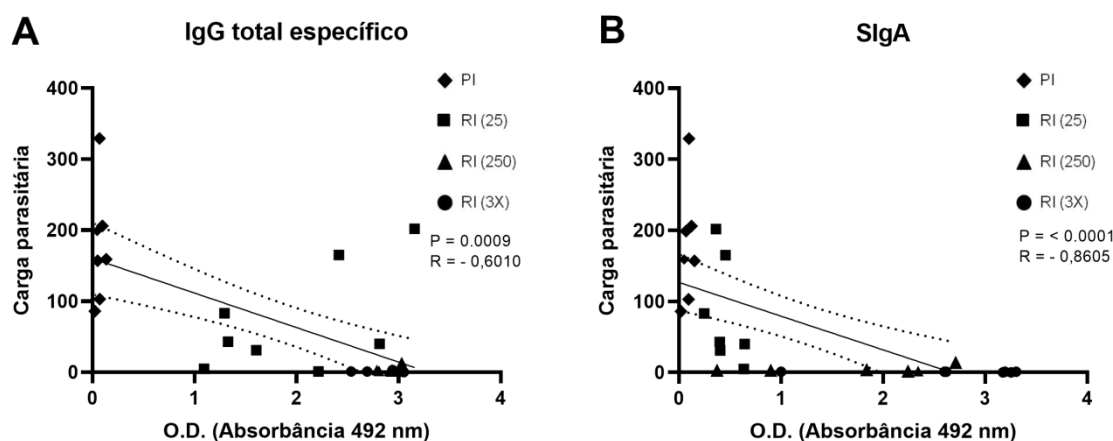


Figura 25: Análise de correlação entre produção de anticorpos e carga parasitária em camundongos BALB/c. com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Correlação da produção de IgG total específico com a carga parasitária. (B) Correlação da produção de SIgA com a carga parasitária. Para analisar a correlação entre as duas variáveis foi utilizado o teste de Spearman .

6.3 Avaliação histopatológica e dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos submetidos a diferentes doses de infecção

Para avaliar as consequências das infecções repetidas e inflamação no tecido pulmonar, foi realizada a análise histopatológica semiquantitativa (**Figura 26**). Inicialmente foi observado uma presença maior de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas dos grupos reinfetados RI (25) ($p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo NI (**Figura 26A**). Tal observado se repetiu quando analisada a inflamação perivascular, em que foi verificada uma maior inflamação nos grupos RI (25) ($p < 0,01$) e RI (3X) ($p < 0,01$) em comparação ao grupo NI (**Figura 26B**). A respeito da análise semiquantitativa do parênquima foi encontrado um aumento da inflamação acompanhando as cargas das exposições, sendo os grupos RI (250) ($p < 0,05$) e RI (3X) ($p < 0,01$) os que apresentaram crescimento significativo comparado ao NI (**Figura 26C**). Por meio dessas análises também foi possível confirmar a presença de hemorragia no parênquima pulmonar, que foi mais intensa no grupo PI ($p < 0,01$) e RI (25) ($p < 0,01$) quando comparada aos grupos NI (**Figura 26D**). Por fim, ao analisar o score total de inflamação foi constatado que os grupos RI (25) ($p < 0,001$) e RI (3X) ($p < 0,001$) apresentam uma maior inflamação em comparação ao grupo NI (**Figura 26E**).

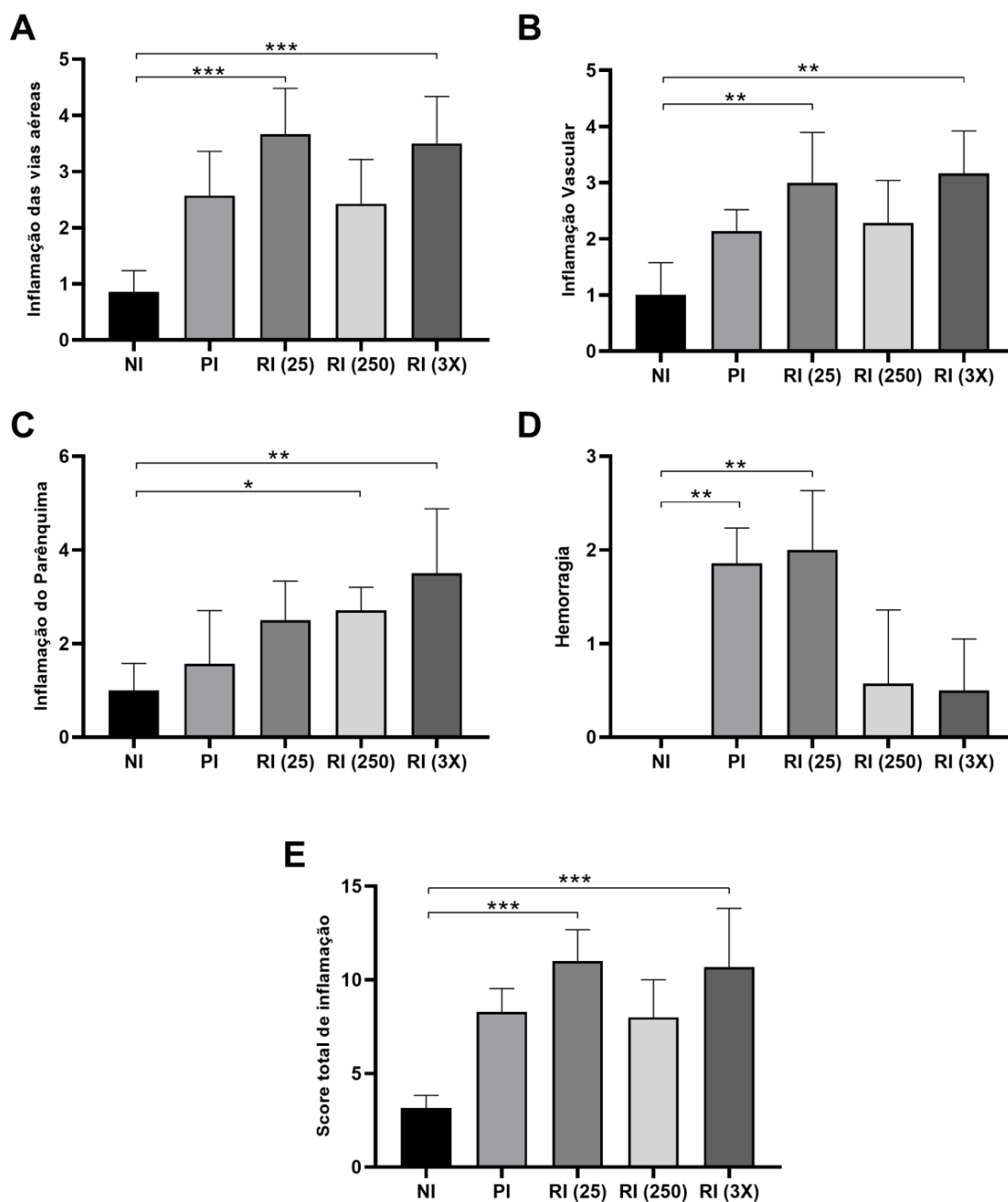


Figura 26: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) Score total de inflamação. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelo símbolo *. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Através da prancha histológica foi possível visualizar as alterações encontradas microscopicamente no parênquima pulmonar dos animais que receberam diferentes doses de

infecção (**Figura 27**). Ao comparar os grupos infectados ao grupo NI foi observado a presença de exuberantes zonas hemorrágicas no grupo PI e RI (25) (**Figura 27B e 27C**) e considerável espessamento dos septos interalveolares, assim como, o aumento do infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas e dos vasos sanguíneos no grupo reinfestado RI (3X) (**Figura 27E**). Já o grupo RI (250) (**Figura 27D**) comparado aos grupos reinfestados RI (25) e RI (3X) apresentou infiltrado inflamatório mais discreto e leve espessamento dos septos.

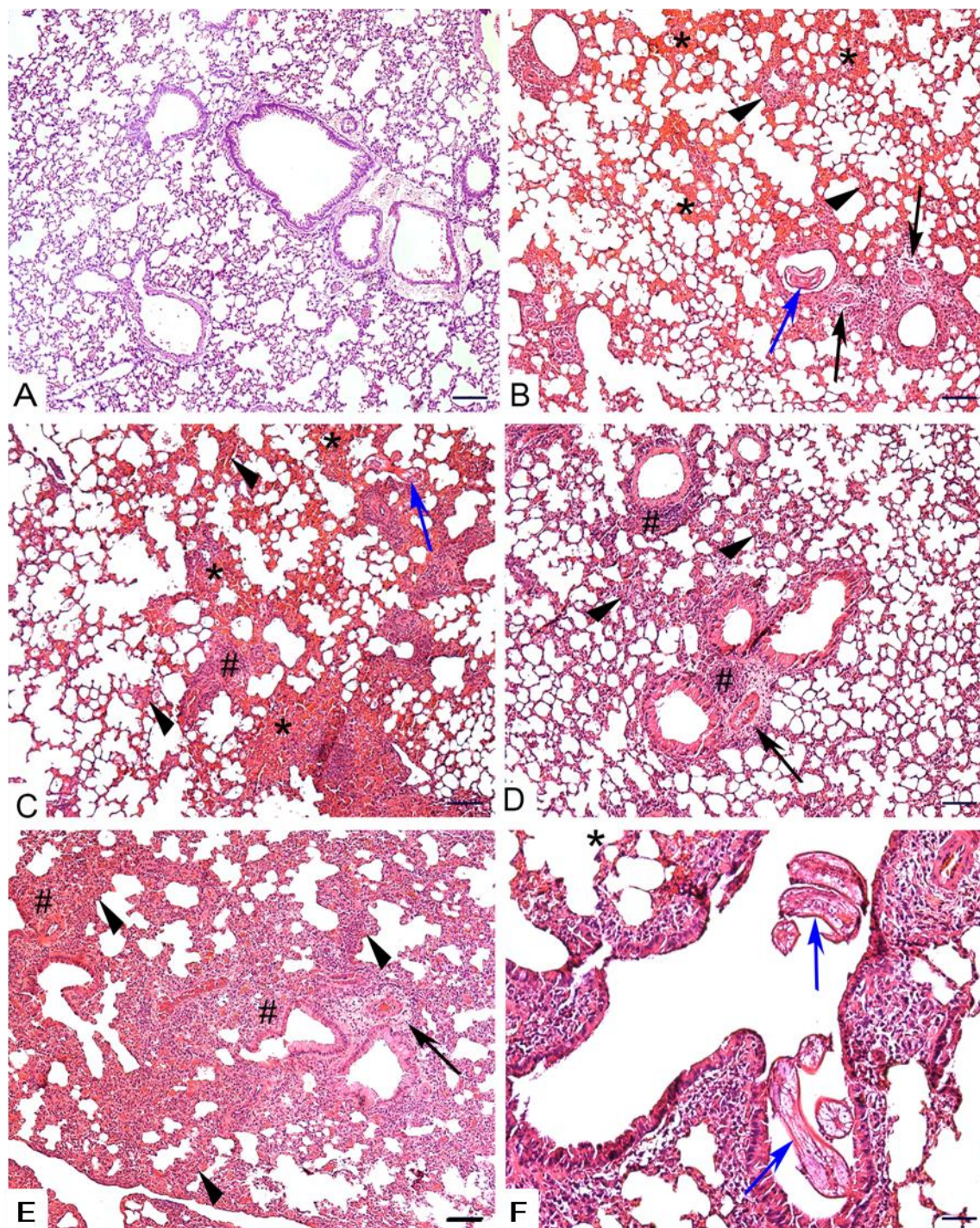


Figura 27: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. A) Grupo NI: imagem panorâmica do parênquima pulmonar com aspecto habitual; B) Grupo PI: imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando leve espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (seta azul), presença de exuberantes zonas hemorrágicas (*); C) Grupo RI (25): imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando espessamento dos septos interalveolares de leve a moderado (cabeças de seta), presença de infiltrado inflamatório em torno dos vasos sanguíneos (#), larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (seta azul), presença de exuberantes de zonas hemorrágicas (*); D) Grupo RI (250): imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando leve espessamento dos septos interalveolares (cabeças de seta),

edema perivascular (seta), presença de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores e vasos sanguíneos (#); E) Grupo RI (3X): imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando grande espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), presença exuberante de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores e vasos sanguíneos (#); F) Grupo RI (25): imagem em maior aumento exibindo detalhes da larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (seta azul), no lúmen de um brônquio, barra = 50µm. Barra = 100µm. Coloração hematoxilina & Eosina.

O impacto das reinfecções com diferentes doses na função pulmonar foi avaliado no oitavo dia pós-infecção desafio (**Figura 28**).

Dentro dos parâmetros pulmonares avaliados foi possível observar uma diminuição na complacência dos grupos PI ($p<0,001$) e RI (25) ($p<0,01$) quando comparado ao grupo NI (**Figura 28A**). E quanto a resistência houve um aumento significativo no grupo PI ($p<0,01$) em relação ao grupo NI (**Figura 28B**).

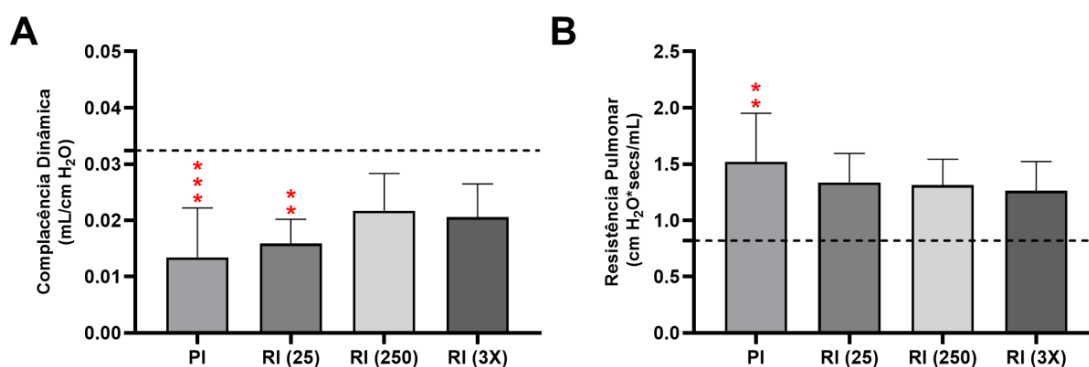


Figura 28: Avaliação dos parâmetros fisiológicos pulmonares de camundongos BALB/c com diferentes doses de infecção com *A. suum*, no oitavo dia após a infecção desafio. (A) Complacência Dinâmica Forçada e (B) Resistência Pulmonar. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os dados que apresentaram distribuição normal (A) e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para os dados que não apresentaram distribuição normal (B). Os resultados estão apresentados nos gráficos com a média e o desvio padrão e as diferenças significativas entre os grupos estão representadas pelos símbolos (*) e (#). Onde, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ são indicados para representar as diferenças em comparação ao grupo NI. O grupo não infectado está representado pela linha pontilhada.

7. DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 450 milhões de pessoas estão infectadas por *Ascaris* spp. no mundo (GBD, 2017) e pelo menos mais da metade da população está sob risco de infecção (WHO, 2013). A ascaridíase humana é uma doença cosmopolita e negligenciada, estando entre as mais prevalentes do mundo, principalmente em lugares carentes, colocando as crianças como um relevante grupo de risco (Manrtin et al., 1983). Além disso, as limitações das estratégias para intervenções profiláticas, tais como: ações de educação em saúde ineficientes e saneamento básico precário, contribuem para o cenário atual da ascaridíase humana, resultando em elevadas taxas de reinfecção mesmo após tratamento específico (Jia et al., 2012).

Diante desse cenário, ao longo dos anos, se fez cada vez mais necessário estudos experimentais em modelos animais, uma vez que trabalhos sobre a infecção experimental em humanos são limitados devido a dificuldade de elaborar estudos éticos e adequados sobre a migração larval. O que vinha impedido a pesquisa nesta fase do ciclo de vida e, conseqüentemente, a importância do conhecimento deste para a saúde pública (Stephenson & Holland, 1987; Dold & Holland, 2011a).

É certo que alguns trabalhos com infecções experimentais em suínos (Stephenson et al., 1980; Hale et al., 1985; Eriksen et al., 1992; Boes et al., 1998b; Nejsun et al., 2009;) ajudaram a compreender melhor o curso da infecção, assim como, a resposta do hospedeiro ao parasito. Contudo, apesar do fato dos suínos serem hospedeiros naturais e conseguirem completar o ciclo, a execução e manutenção de experimentos nestes animais é mais difícil e cara, se comparada a modelos, como em camundongos.

A partir disso, trabalhos como de Massara e colaboradores (1990), Enobe e colaboradores (2006), Lewis e colaboradores (2006 e 2007), Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013) e de Nogueira e colaboradores (2016) foram desenvolvidos e trouxeram contribuições a respeito da infecção experimental em camundongos, abrindo portas para novas perguntas e perspectivas.

Os estudos de Enobe e colaboradores (2006) e Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013), por exemplo, contribuíram para descrição e caracterização dos diferentes aspectos imunobiológicos da ascaridíase larval em infecções únicas, como o padrão de migração das larvas e da resposta imune da fase inicial do ciclo correspondente a migração hepato-traqueal. Para tal, Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013), utilizaram camundongos da linhagem BALB/c proporcionando uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro.

Já o estudo de Nogueira e colaboradores (2016) buscou compreender os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos da ascaridíase larval em camundongos comparando únicas e múltiplas infecções com enfoque nos possíveis mecanismos responsáveis pela redução da carga parasitária. Visto que, diversos trabalhos anteriores demonstraram que a exposição prévia a helmintos pode induzir a proteção contra a reinfecção a *A. suum* (McCraw, 1975; Eriksen et al., 1992; Nejsun et al., 2009), *Strongyloides ratti* (Dawkins & Grove, 1982), *Neodiplostom seoulensis* (Yu et al, 1995), *Strongyloides venezuelensis* (Schilter et al, 2010), entre outros helmintos. Assim, a partir dos resultados de Nogueira e colaboradores (2016) esses achados para a infecção por *Ascaris* sp. foram reforçados, fornecendo fortes evidências de que múltiplas exposições são capazes de induzir uma proteção relevante durante a migração larval.

Sem dúvida, compreender a maneira como a resposta está sendo desencadeada frente à infecção é crucial para o desenvolvimento de novas terapias. E os modelos laboratoriais de infecção por helmintos têm sido uma ferramenta valiosa na compreensão das respostas imunológicas fundamentais à infecção (Glover et al., 2019).

Diante disso, o modelo murino foi utilizado nesse trabalho para avaliar os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos da influência de diferentes números de exposições e de diferentes doses de infecção, enfocando no efeito protetor e nos possíveis mecanismos acionados para controlar a carga parasitária durante a ascaridíase larval na fase pulmonar.

Nesse aspecto, é importante mencionar que a maioria dos estudos em roedores que investigam a resposta imune à infecção por helmintos realiza uma única infecção com alta dose. Apesar de esses trabalhos serem centrais para definir paradigmas de resistências e suscetibilidade à infecção, eles divergem da forma como ocorre a infecção natural do ser humano, ou seja, repetidamente com baixas doses. E estudos com infecções repetidas por nematóides com baixa dosagem em roedores são raros (Ovington, 1986; Brailsford & Behnke, 1992; Glover et al., 2019).

Sendo assim, esse estudo buscou se aproximar do cenário real e natural da ascaridíase humana, assim como de outras helmintíases, em que a maioria dos indivíduos infectados em áreas de alta endemicidade estão em constante exposição ao parasito e consequentemente apresentando uma baixa carga parasitária ao longo de sua vida (Croll et al., 1981; Dawkins et al., 1982; Holland et al., 1989; Barbosa et al., 2006; Schilter et al., 2010; Glover et al., 2019; Colombo & Grecis, 2020). Essa poderia ser uma possível explicação para os dados de McSharry e colaboradores (1999) a respeito de crianças susceptíveis e imunes a *A. lumbricoides*, sugerindo que aquelas que são imunes apresentam tal comportamento por já terem entrado em contato com o parasito e desencadeado uma resposta imunológica de memória

(McSharry et al., 1999). Ademais, como já relatado por Crombie e Anderson (1985) e Srisawangwong e colaboradores (2011), em condições naturais, é possível que a infecção ocorra com baixas doses repetidas gerando uma imunidade adquirida ou concomitante, o que também pôde ser inferido com os resultados deste trabalho.

Glover e colaboradores (2019) em seu trabalho com *Trichuris muris* demonstrou que por meio de infecções repetidas com baixas doses, também chamada de infecções por "gotejamento", houve uma aquisição lenta da imunidade e desenvolvimento da resistência ao longo do tempo associada a mecanismos efetores de expulsão dos vermes aumentados, como produção elevada de IL-13, hiperplasia de células caliciformes, produção de Muc5ac e aumento da renovação das células epiteliais. Nesse mesmo estudo, ao avaliar camundongos que haviam sido infectados por "gotejamento" em um curto espaço de tempo (3 infecções de baixa dose) foi observado que esses animais não apresentaram resistência a um desafio de baixa dose administrado 10 semanas depois, sugerindo que o número de eventos de infecções com baixa dose é a chave para gerar resistência e não simplesmente o desenvolvimento lento de imunidade protetora (Glover et al., 2019).

Dentro da perspectiva da ecologia parasitária isso é interessante, pois assim há um equilíbrio entre uma resposta eficaz do hospedeiro ao parasito controlando aspectos imunopatológicos potencialmente prejudiciais (Graham et al., 2005). E, da mesma forma, a presença do parasito, que promove uma resposta imune, deve acontecer de tal maneira que possibilite sua própria sobrevivência. Diante disso, é altamente provável que as respostas imunes antiparasitárias tenham evoluído para limitar a carga parasitária e promover o reparo de feridas, em vez de causar a expulsão rápida e total do parasito (Colombo & Grencis, 2020). E em infecções únicas com altas doses o que acontece é uma exacerbação da resposta imunológica com tendência para a rápida expulsão do parasito que muitas vezes é associada a geração de prejuízos ao hospedeiro.

Em um primeiro momento, quando analisada a influência do número de exposições ao *A. suum*, assim como, de diferentes doses de infecção na proteção da ascaridíase larval, foi possível observar que quanto maior o número de exposição ao parasito e maior a dose de infecção mais significativa foi a redução da carga parasitária. Embora, os mecanismos de proteção desenvolvidos pelo hospedeiro para o controle da migração larval ainda não estejam totalmente elucidados, trabalhos com infecções únicas demonstraram que os pulmões são um importante sítio inflamatório na ascaridíase larval primária (Lewis et al., 2007; Gazzinelli-Guimarães et al., 2013) e que a resposta imune pulmonar apresenta um papel crucial para prevenir a reinfecção (Nogueira et al., 2016).

Devido às limitações do modelo, não foi possível aferir se também ocorre a redução ou eliminação no estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado e comparar com o curso natural da fase crônica nas infecções humanas. Entretanto, um trabalho recente com *T. muris* demonstrou que a imunidade induzida pela infecção por "gotejamento" reduziu significativamente o número de vermes, porém essa imunidade não foi capaz de eliminar completamente a infecção, pois houve a persistência de uma baixa carga parasitária intestinal (Glover et al., 2019).

Em nosso trabalho observamos um aumento significativo de leucócitos totais nos grupos reinfetados, e esse aumento foi visto tanto nas células da imunidade inata como nas células da imunidade adaptativa, como já evidenciado também por Nogueira e colaboradores (2016) que após múltiplas exposições ao parasito houve aumento da celularidade nas vias aéreas corroborando com os dados analisados em questão.

Sabe-se que a resposta celular inata possui um papel essencial no reconhecimento, indução de resposta e eliminação das larvas de helmintos durante a fase aguda da infecção (Rotman et al., 1996; De'Broski et al., 2000; Galioto et al., 2006; Perrigoue et al., 2008; Bonne-Anné et al., 2011; Craig et al., 2014; Schwartz et al., 2018). Contudo, a discussão a respeito do tipo de imunidade predominante e o seu percurso é válida, pois bem se sabe que a imunidade inata não é apenas importante como primeira linha de defesa, mas também é responsável por influenciar a natureza da resposta adaptativa (Palucka et al., 1999), criando ambientes com citocinas específicas que possuem a capacidade de conduzir a proliferação e diferenciação das células T auxiliares efectoras. A partir dos resultados desse trabalho, é possível observar que aos grupos que apresentaram maior redução da carga parasitária, RI (250) e RI (3X), também foram os que apresentaram aumento significativo nos números de linfócitos denotando uma participação da resposta adaptativa, que não só é essencial para conduzir o tipo de resposta que será definida frente a uma infecção, mas também, para a proliferação de células B e, consequente, produção de anticorpos e memória imunológica.

Inclusive, Glover e colaboradores (2019) demonstraram que a depleção de células TCD4⁺ em animais resistentes a partir das exposições com infecções repetidas por *T. muris* acarretou a reversão dessa resistência ao parasito, confirmando a importância da imunidade adaptativa protetora após essa abordagem de infecção por gotejamento.

Outros trabalhos também relatam que para a expulsão de geo-helmintos as células TCD4⁺ são essenciais. Isso pode ser inferido a partir de estudos com camundongos nus atímicos que sustentaram infecções com altas doses de longo prazo em comparação com camundongos selvagens que expulsaram os parasitos prontamente (Jacobson & Reed, 1974; Yoichi, 1991). E

como já mencionado, a depleção das células TCD4⁺ é suficiente para induzir à suscetibilidade à infecção de camundongos de outra forma resistentes (Koyama et al., 1995; Hashimoto et al., 2009). Além disso, a transferência passiva de células TCD4⁺ para camundongos deficientes em células T e B foi suficiente para conferir proteção contra infecção por *T. muris* (Betts et al., 2000).

Décadas atrás a participação de anticorpos na proteção contra helmintos foi discutível, contudo ao longo dos anos, diversos trabalhos contribuíram para o melhor entendimento e reconhecimento da resposta humoral frente a infecções helmínticas (Crandall & Crandall, 1971; Lynch, 1992; Amiri et al., 1994; Allen & Maizels, 1996; Kringel et al., 2015; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2018, De Castro et al., 2021). Uma vez que foi descrito que as células Th2 e as células T foliculares nos centros germinativos coordenam a resposta humoral na inflamação do tipo 2, promovendo uma resposta de células B específicas de helmintos e estimulando a mudança da classe de células B para IgE, IgG1 e IgG4 de alta afinidade em humanos (Schwartz et al., 2018) e que essas são as moléculas efetoras da resposta adaptativa bem como são característica central da imunidade Th2 (Allen et al., 2014). Semelhante aos dados observados em estudos anteriores do nosso grupo (Oliveira, 2017; Nogueira, 2018; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2018; De Castro et al., 2021), o presente estudo demonstrou que a participação da resposta humoral é crucial para o controle da carga parasitária durante a fase pulmonar da ascaridíase larval e que essa proteção é dependente do número de exposição e da dose da infecção.

Diante disso, foi demonstrado que os níveis de IgG específico e SIgA aumentam na medida em que o hospedeiro é exposto ao parasito, ou seja, existe uma resposta de memória crescente, após múltiplas exposições. Tal achado corrobora com alguns trabalhos, como o de Khoury e colaboradores (1977), de McCoy e colaboradores (2008) e de Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2018), em que já foi demonstrado que as infecções prolongadas por helmintos são capazes de induzir a geração de anticorpos específicos, com predomínio de IgG1 e IgA, e que as infecções primárias recentes geram anticorpos IgG e IgE poliativos (McCoy et al., 2008), e que por meio da transferência passiva de IgG de soro de animais imunizados é possível observar a contribuição da resposta humoral para o controle da carga parasitária em animais desafiados após a transferência (Khoury et al., 1977; Gazzinelli-Guimarães et al., 2018). Achados semelhantes também foram encontrados em porcos, em que foi observado que a aquisição gradual de resistência à reinfecção foi associada a um aumento nos títulos de anticorpos específicos no soro, principalmente de IgG e IgA (Lind et al., 1993).

O aumento no número de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos foi corroborado pela dosagem da atividade dessas células no tecido pulmonar. Quanto aos eosinófilos, Masure e

colaboradores (2013) demonstrou que o controle da carga parasitária pode ser desempenhado por eosinófilos que defendem a mucosa intestinal contra as larvas de *A. suum*. Parece que essas células também são importantes no pulmão, tal achado foi evidenciado pelo trabalho de Nogueira (2018) que mostrou que a resposta imune pulmonar possui um papel crucial também na reinfecção, reduzindo o número de larvas migratórias de maneira consistente, ao mesmo tempo que foi verificado o aumento do número de eosinófilos circulantes e da atividade dos eosinófilos no tecido pulmonar, sugerindo um importante papel dessas células no controle da infecção por *A. suum*. Além disso, a presença significativa de eosinófilos pode estar relacionada ao remodelamento do tecido já que a migração larval ocasiona uma extensa lesão mecânica, assim como, a ausência dessas células impactou negativamente no controle da carga parasitária (Nogueira, 2018).

Essa ação efetora e necessária de eosinófilos durante a infecção por helmintos vem sendo amplamente abordada em alguns estudos (Padigel et. al, 2007; Cadman et. al, 2010; Bonne-Anneé et. al, 2011; Weatherhead et. al, 2020) seja por meio da morte direta dos parasitos ou atuando como APCs promovendo o direcionamento da diferenciação de células T para células imunes do tipo 2, embora essa última função permaneça controversa. De certo, já foi descrito que a presença de larvas de helmintos nos pulmões desencadeia rápida ativação eosinofílica e recrutamento por meio da liberação de eotaxinas quimioatraentes, bem como a produção da citocina IL-5 (Rotman et al., 1996; De'Broski et al., 2000; Culley et. al, 2002; Galioto et al., 2006). De fato, durante a ascaridíase larval foi observado, tanto em modelo de infecção simples (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013), como no presente estudo, o aumento da citocina IL-5 no tecido pulmonar que, provavelmente, está relacionada com a maior número e atividade de eosinófilos em camundongos reinfetados, já que a IL-5 aumenta a diferenciação, maturação e sobrevivência de eosinófilos derivados de precursores da medula óssea (Roboz & Rafii, 1999; Lalani et al., 1999). Curiosamente, IL-5 também é descrita como um indutor potente de diferenciação de célula B, secreção de anticorpos e troca de isótipos (Takatsu et al., 2009), logo, uma resposta protetora Th2 desencadeada pela imunização pode ser secundária a uma resposta humoral específica de IgG induzida por IL-5 (Gazzinelli-Guimarães et al., 2018).

Além disso, alguns trabalhos demonstraram que a citotoxicidade eosinofílica às larvas de helmintos ocorre por meio de mecanismos dependentes da peroxidase eosinofílica (EPO). Esses achados já foram descritos por Galioto e colaboradores (2006) a respeito do parasito *S. stercoralis*, em que observaram que a sobrevivência larval foi inversamente correlacionada com o número de eosinófilos, o nível de IL-5 e o nível de peroxidase de eosinófilos encontrados no microambiente larval. Ademais, os trabalhos de Cadman e colaboradores (2010) e O'Connel e

colaboradores (2011) viram que isso ocorre particularmente durante a infecção secundária e também por meio da indução da liberação de histamina dos mastócitos. Em resumo, os nossos dados corroboram com os de Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2019) e Nogueira (2018), em que demonstram que a resposta imune eosinofílica restringe o desenvolvimento larval e reduz a carga do parasito nos pulmões, particularmente em hospedeiros com pré-sensibilização ao alérgeno ou na exposição secundária a helmintos.

A atuação dos neutrófilos como células efectoras importantes para limitar a sobrevivência e disseminação do parasito em modelos murinos de infecções helmínticas é descrita na literatura, servindo como primeira linha de defesa do hospedeiro (Chen et al., 2012; Bonne-Année et al., 2013; Sutherland et al., 2014; Egholm et al., 2019). Inclusive, segundo Sutherland e colaboradores (2014), essas células atuam durante a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* nos pulmões, em que, com a chegada das larvas no pulmão há aumento do infiltrado de neutrófilos, provavelmente, como um mecanismo rápido para conter a disseminação da infecção. Contudo, é importante ressaltar que o controle mediado por essas células ocorre às custas de maior dano tecidual, por isso sua ativação deve ser controlada (Chen et al., 2012; Sutherland et al., 2014; Allen et al., 2015; Heeb et al., 2018).

Há evidências crescentes de que a sinalização de IL-4R por IL-4 e IL-13 pode inibir as funções efectoras dos neutrófilos (Heeb et al., 2018; Egholm et al., 2019). Tal evidência foi demonstrada experimentalmente, em que camundongos deficientes em IL-4R α infectados com *N. brasiliensis* apresentaram aumento da infiltração de neutrófilos pulmonares e maiores lesões teciduais (Sutherland et al., 2014). Em nossos dados, de forma geral, foram observados tanto o aumento dos neutrófilos nas vias aéreas quanto aumento dos grânulos citotóxicos (mieloperoxidase) nos animais reinfetados, sendo que essa maior atividade tecidual neutrofílica já foi demonstrada em outro trabalho de múltiplas exposições (Nogueira et al., 2016). Porém, curiosamente, dentre os grupos reinfetados, o grupo RI (25) apresentou, concomitantemente, aumento da atividade de neutrófilos e de IL-4. Podendo sugerir que o aumento de IL-4 pode ser devido a tentativa de auxiliar no controle da ativação dessas células e prevenir maiores danos teciduais, visto que essa citocina exerce efeito inibitório sobre os neutrófilos.

Contudo, a associação dos neutrófilos com a resposta do tipo 2 e o perfil de citocinas expresso tem sido cada vez mais sendo estudadas, contribuindo para achados surpreendentes. A ideia de que os neutrófilos, assim como os macrófagos, possuem subconjuntos distintos foi apresentada por Tsuda e colaboradores (2004). Em contribuição, Ma e colaboradores (2016) mostraram que o fenótipo local dos neutrófilos muda ao longo do tempo após o infarto do

miocárdio em camundongos e que os neutrófilos N1 pró-inflamatórios predominaram no primeiro dia, enquanto os neutrófilos N2 anti-inflamatórios prevaleceram nos dias 5 e 7 após a lesão. Além disso, foi que o reparo tecidual e a fibrose fazem parte da remodelação que ocorre após o infarto do miocárdio (Ma et al., 2016), e que IL-4 e IL-13 são os principais impulsionadores desses processos (Gieseck et al., 2018). Portanto, é possível que o ambiente de reparo de tecido emergente com meio de citocinas do tipo 2 mude o perfil dos neutrófilos de um fenótipo N1 pró-inflamatório para um N2 anti-inflamatório, podendo até contribuir para a resolução da inflamação.

Ademais, recentemente, Chen e colaboradores (2014) descreveram que durante a infecção por *N. brasiliensis* no pulmão, os neutrófilos adotaram um perfil de fenótipo N2 demonstrado pela regulação positiva de IL-13 e IL-33. Esses neutrófilos foram induzidos durante a infecção primária e auxiliaram os macrófagos durante a infecção secundária, mediando o dano e eliminação do parasito (Chen et al., 2014).

Outra hipótese para esse aumento da atividade de neutrófilos nos animais que foram expostos mais de uma vez seria que, juntamente aos macrófagos, essas células podem se infiltrar rapidamente nos locais de lesão tecidual, sendo, inicialmente, benéficas na remoção de agentes infecciosos, limpeza de detritos celulares e expressão de fatores que promovem a cicatrização de lesões (Martin & Leibovich, 2005; Chen et al., 2012).

Por falar da ação conjunta de neutrófilos e macrófagos, há estudos mostrando que nenhum dos dois tipos celulares por si só foram capazes de matar as larvas de nematóides de forma eficiente, mas quando em conjunto colaboram para imobilização e morte dos parasitos (Al-Qaoud et al., 2000 ; Morimoto et al., 2004; Anthony et al., 2006; Egholm et al., 2019). E mesmo que os neutrófilos tenham uma vida útil curta, eles são responsáveis por iniciar respostas imunológicas que persistirão após a sua morte. Entre essas ações está o *priming* de macrófagos, em que para se tornarem alternativamente ativados durante a infecção inicial é necessário a presença de neutrófilos (Chen et al., 2014; Egholm et al., 2019)

Em nosso trabalho, o aumento do número e atividade dos macrófagos foi evidenciado nas vias aéreas e no tecido pulmonar, respectivamente, principalmente nos animais reinfectados. Embora os mecanismos que promovem a imunidade protetora durante a fase aguda da ascaridíase não sejam totalmente elucidados, é possível que um dos meios pela qual ocorra seja por interferência da imunidade inata por meio de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que resultam no estabelecimento de um ambiente inflamatório robusto do tipo 2 rico em macrófagos alternativamente ativados (MAA) e dominado por eosinófilos, podendo ser uma possível explicação para o aumento da atividade celular desse subtipo (Weatherhead et. al,

2020). Apesar de os macrófagos muitas vezes serem descritos como células efetoras em infecções bacterianas e protozoárias por meio da produção de óxido nítrico, sua participação em infecções por helmintos é bem documentada. Além disso, é visto que sua interação com as citocinas presentes em um microambiente Th2, tais como IL-4 e IL-13 induz a diferenciação da população MAA, importantes no processo de cicatrização tecidual, podendo estabelecer um papel predominantemente regulador em infecções helmínticas (Nutman, 2015).

Os macrófagos alternativamente ativados contribuem para as alterações funcionais em tecidos infiltrados com larvas de helmintos, mediando tanto a reparação quanto a inflamação tecidual. Foi descrito que sua ativação é amplificada e ocorre mais rapidamente após a reinfecção por helmintos, onde podem desempenhar um papel duplo no controle da migração larval no tecido e na prevenção ou resolução da inflamação e danos associados (Coakley & Harris, 2020), podendo esta ser uma das explicações para o aumento da atividade celular tecidual encontrada nos animais reinfetados em nosso trabalho.

De fato, nossos dados mostraram um aumento da citocina IL-4 e IL-13 no tecido pulmonar dos camundongos reinfetados, sugerindo que pode estar havendo modulação de macrófagos e neutrófilos para atuação no reparo tecidual. Por outro lado, notamos também que a citocina IFN- γ encontra-se aumentada nos grupos reinfetados, o que indica a existência de uma resposta mista, assim como foi observado em outros estudos com *Ascaris* (Islam et al., 2005; Gazzinelli-Guimarães et. al, 2013; Nogueira et. al, 2016).

O aumento da inflamação em camundongos reinfetados ficou ainda mais evidente quando foram avaliadas as alterações histopatológicas do tecido pulmonar. Assim como já observado em outros trabalhos do grupo, os camundongos que foram submetidos a apenas a uma exposição (PI) apresentaram níveis mais elevados de hemoglobina e proteínas no BAL (Nogueira et. al, 2016; Oliveira, 2017; Gazzinelli-Guimarães et. al, 2018). Foi sugerido que isso ocorre durante a primoinfecção devido ao maior número de larvas de *Ascaris* migrando através dos pulmões e das vias aéreas, e, conseqüentemente, isso causa maior destruição dos vasos sanguíneos, resultando em danos nos tecidos, exsudação e extravasamento sangue e de proteínas nas vias aéreas, caracterizando a lesão aguda da ascaridíase larval. Assim, de forma geral, *Ascaris* spp. podem causar patologia pulmonar como resultado da migração larval diretamente ou indiretamente, por meio da ativação da resposta imune mista.

Como conseqüência do dano tecidual, houve um comprometimento fisiológico pulmonar, principalmente no grupo primoinfectado. O mesmo foi verificado anteriormente por Nogueira e colaboradores (2016), o que indica que as lesões ocasionadas pela migração larval,

durante a infecção primária, provocam disfunção pulmonar mais acentuada, quando comparada às lesões acumuladas ao longo de múltiplas exposições.

Os dados obtidos por Nogueira e colaboradores (2016) indicaram um aumento da resistência pulmonar em camundongos após múltiplas infecções quando comparados aos primoinfectados, diferentemente do que foi observado em nosso trabalho, em que houve um aumento da resistência apenas em primoinfectados. Contudo, em ambos os trabalhos, foi observado uma redução da complacência dinâmica em camundongos primoinfectados. Já nos trabalhos de Oliveira (2017) e Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2018) foi observada uma diminuição da complacência e aumento da resistência nos animais primoinfectados, corroborando com os dados desse trabalho. Essas alterações, portanto, podem ser explicadas pelas alterações histológicas do órgão decorrentes da infecção e inflamação.

Diante de todos os aspectos discutidos e ao refletir sobre as perguntas chaves deste trabalho, sugerimos que os camundongos expostos múltiplas vezes a doses moderadas - grupo RI (250) - se aproximaram mais de situações ideais, uma vez que, num panorama geral, almeja-se uma redução da carga parasitária aliada a um menor comprometimento fisiológico pulmonar. E este grupo foi o que apresentou menor lesão e uma porcentagem significativa de proteção, próxima a do grupo reinfestado com altas doses - RI (3X).

Esse resultado nos oferece boas perspectivas, em que a exposição menores doses de infecção já seriam suficientes para controlar a migração de larvas pelo pulmão sem causar grandes danos teciduais.

8. CONCLUSÃO

Os crescentes estudos a respeito da ascaridíase experimental estão possibilitando maior entendimento a cerca da interação parasito-hospedeiro. Em contribuição a isso, o nosso grupo, utilizando modelo murino, vem obtendo resultados importantes que auxiliam no preenchimento de certas lacunas. Entre eles estão a avaliação do tempo de infectividade dos ovos, cinética do pico da migração larval nos órgãos, descrição de alguns aspectos da resposta imune primária, e também após múltiplas exposições, além de abordar a importância da participação da inflamação pulmonar no curso e controle da infecção.

A partir de perguntas geradas de trabalhos anteriores, houve se uma necessidade de estudos que aproximassem ainda mais às condições naturais de áreas endêmicas, sendo esse, o norte deste trabalho: a busca por aprimorar o modelo experimental de tal forma que mimetizasse um cenário real, com diferentes números de exposição e diferentes doses de infecção. E por meio dos resultados obtidos foi possível verificar que o impacto causado pela migração larval no pulmão depende da quantidade de vezes que se é exposto ao parasito bem como a dose dessa exposição, e isso está intimamente relacionado com a proteção na ascaridíase larval.

Os mecanismos dessa proteção podem ocorrer por meio de um maior recrutamento de células, aumento da inflamação tecidual com uma tendência ao remodelamento e aumento do título de anticorpos. Visto que, o impacto do reconhecimento dos helmintos na resposta imune pulmonar envolve uma orquestração sofisticada e ativação das células imunes inatas e adaptativas do hospedeiro.

Diante de maiores quantidades e/ou maiores doses de infecção há uma maior contribuição para uma resposta imunológica exacerbada direcionada ao controle larval e reparo tecidual. Tais achados são bastante relevantes já que muito ainda permanece desconhecido a respeito das consequências da doença pulmonar como resultado da infecção por helmintos.

Sendo assim, dentre todos os grupos avaliados neste trabalho, o grupo RI (250) foi o que mais se adequou às nossas expectativas e questionamentos. Ou seja, foi um modelo que conseguiu simular melhor um cenário real em condições naturais, em que o hospedeiro não está exposto a elevadas doses, e que apresentou uma situação mais ideal com redução da carga parasitária aliada a uma menor morbidade e menor lesão tecidual. Além disso, os resultados deste estudo fornecem embasamento para o desenvolvimento de vacinas, demonstrando que pré exposições são suficientes para a geração de uma resposta imunológica significativamente protetora, reduzindo a morbidade, sobretudo durante a fase pulmonar da ascaridíase.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M. M., Malik, P. K., Hassan, S., & Dwivedi, S. Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. **J Health Res Rev.** v. 2, p. 37-38, 2015.

Ahmed, A., Al-Mekhlafi, H. M., Azam, M. N., Ithoi, I., Al-Adhroey, A. H., Abdulsalam, A. M., & Surin, J. Soil-transmitted helminthiasis: a critical but neglected factor influencing school participation of Aboriginal children in rural Malaysia. **Parasitology**, v. 139, n. 6, p. 802-808, 2012.

Albonico, M., Engels, D., & Savioli, L. Monitoring drug efficacy and early detection of drug resistance in human soil-transmitted nematodes: a pressing public health agenda for helminth control. **Int J Parasitol.** v. 34, p. 1205-1210, 2004.

Allen, J. E., & Maizels, R. M. Immunology of human helminth infection. **International archives of allergy and immunology**, v. 109, n. 1, p. 3-10, 1996.

Allen, J. E., & Maizels, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375-388, 2011.

Allen, J. E., & Sutherland, T. E. Host protective roles of type 2 immunity: parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 329-340, 2014.

Allen, J. E., Sutherland, T. E., & Rückerl, D. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. **Current opinion in immunology**, v. 34, p. 99-106, 2015.

Al-Qaoud, K. M., Pearlman, E., Hartung, T., Klukowski, J., Fleischer, B., & Hoerauf, A. A new mechanism for IL-5-dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. **International immunology**, v. 12, n. 6, p. 899-908, 2000.

Amiri, P., Haak-Frendscho, M., Robbins, K., McKerrow, J. H., Stewart, T., & Jardieu, P. . Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni*-infected normal and interferon gamma knockout mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 43-51, 1994.

Anderson, T. J. C., Romero-Abal, M. E., & Jaenike, J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitol.** v. 107, p. 319-334, 1993.

Anderson, T. J. C., & Jaenike, J. Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. **Parasitol.** v. 115, p. 325-342, 1997.

Anderson, T. J. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **TRENDS Parasitol.** v. 17, n. 4, p. 183-188, 2001.

Anthony, R. M., Urban, J. F., Alem, F., Hamed, H. A., Roza, C. T., Boucher, J. L., ... & Gause, W. C. Memory TH 2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 955-960, 2006.

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

Asif, M., Rashid, K., Siddiqui, A., & Shah, S. S. H. Biliary ascariasis - Atypical infestation of *Ascaris lumbricoides*. **Int J Surg Pakistan.** v. 19, n 3, p. 123-124, 2014.

Avery, R. H., Wall, L. A., Verhoeve, V. I., Gipson, K. S., & Malone, J. B.. Molecular confirmation of *Ascaris suum*: further investigation into the zoonotic origin of infection in an 8-year-old boy with Loeffler syndrome. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 11, p. 638-640, 2018.

Azhar, M., Sheikh, A. S. F., Khan, A., Mustafa, S., Shah, I. A., & Hameed, B. Case report: Hepatobiliary ascariasis complicated by pancreatitis. **J Ayub Med Coll Abbottabad.** v. 27, n. 2, p. 479-481, 2015.

Bailey, J. K., & Warner, P. Respiratory arrest from *Ascaris lumbricoides*. **Pediatrics.** v. 126, n. 3, p. 712-715, 2010.

Barbosa, C. S., Favre, T. C., Wanderley, T. N., Callou, A. C., & Pieri, O. S.. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 55-62, 2006.

Barbosa F.S. Potencial zoonótico da ascaridiose humana e suína: aspectos moleculares, morfológicos, genéticos e filogenéticos das espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*. (Tese em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 101 p. 2015.

Barreto, M. L., Genser, B., Strina, A., Teixeira, M. G., Assis, A. M. O., Rego, R. F., ... & Cairncross, S. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ Health Perspect.** v. 118, n. 11, p. 1637-1642, 2010.

Beaver, P C. Biology of soil-transmitted helminths: the massive infection. **Health Lab Sci**12: 116-125, 1975.

Bendall, R. P., Barlow, M., Betson, M., Stothard, J. R., & Nejsun, P. Zoonotic Ascariasis, United Kingdom. **Emerging Infect Dis.** v. 17, n. 10, p. 1964-1966, 2011.

Betts, C. J., Deschoolmeester, M. L., & Else, K. J. *Trichuris muris*: CD4⁺ T cell-mediated protection in reconstituted SCID mice. **Parasitology**, v. 121, n. 6, p. 631-637, 2000.

Betson, M., Nejsum, P., Bendall, R. P., Deb, R. M., & Stothard, J. R. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **J Infect Dis**. 210(6): 932-941, 2014.

Boes, J., Eriksen, L., & Nansen, P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. **Veterinary parasitology**, 75.2-3: 181-190. 1998.

Boes, J., Medley, G. F., Eriksen, L., Roepstorff, A., & Nansen, P. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. **Parasitology**, v. 117, n. 6, p. 589-596, 1998b.

Bonne-Année, S., Hess, J. A., & Abraham, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic research**, v. 51, n. 2, p. 205-214, 2011.

Bonne-Année, S., Kerepesi, L. A., Hess, J. A., O'Connell, A. E., Lok, J. B., Nolan, T. J., & Abraham, D. Human and mouse macrophages collaborate with neutrophils to kill larval *Strongyloides stercoralis*. **Infection and immunity**, v. 81, n. 9, p. 3346-3355, 2013.

Bradley, J E; Jackson, J A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunol**. v. 26, p. 429-441, 2004.

Brailsford, T. J., & Behnke, J. M. The dynamics of trickle infections with *Ancylostoma ceylanicum* in inbred hamsters. **Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 247-253, 1992.

Brooker, S., Miguel, E. A., Moulin, S., Louba, A. I., Bundy, D. A., & Kremer, M. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. **East AfrMed J**. v. 77, p. 157-161, 2000.

Brooker, S., Kabatereine, N. B., Tukahebwa, E. M., & Kazibwe, F. Spatial analysis of the distribution of intestinal nematode infections in Uganda. **Epidemiol Infect**. v. 132, n. 6, p. 1065-1071, 2004

Brooker, S., Alexander, N., Geiger, S., Moyeed, R. A., Stander, J., Fleming, F., ... & Bethony, J. Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. **Int J Parasitol**. v. 36, p. 1143-1151, 2006.

Brooker, S. J., Pullan, R. L., Gitonga, C. W., Ashton, R. A., Kolaczinski, J. H., Kabatereine, N. B., & Snow, R. W. Plasmodium-helminth coinfection and its sources of heterogeneity across East Africa. **J Infect Dis.** v. 205, n. 5, p. 841-52, 2012.

Cabrera Barroso, J. L., Jiménez Artigas, J. C., Nuñez, L., Pocaterra, L., Rojas, E., & Hernán, A. Evaluación inmunológica de extractos de *Ascaris lumbricoides* para las inmunoglobulinas IgA en el suero de individuos infectados. **Gen.** v. 68, n. 2, p. 48-52, 2014

Cadman, E. T., & Lawrence, R. A. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? **Parasite immunology**, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2010.

Campos, M. R., Valencia, L. I. O., Fortes, B. D. P. M. D., Braga, R. C. C., & Medronho, R. D. A. Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Rev Saúde Públ.** v. 36, n. 1, p. 69-74, 2002.

Cappello, M. Global Health Impact of Soil-Transmitted Nematodes. **Pediat Infect Dis J.** 23(7): 663-664, 2004.

Carvalho, L., Sun, J., Kane, C., Marshall, F., Krawczyk, C., & Pearce, E. J. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 28-34, 2009.

Chammartin, F., Scholte, R. G., Malone, J. B., Bavia, M. E., Nieto, P., Utzinger, J., & Vounatsou, P. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. **Parasit Vectors.** v. 25, n. 6, p. 152, 2013.

Chammartin, F., Guimarães, L. H., Scholte, R. G., Bavia, M. E., Utzinger, J., & Vounatsou, P. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasites Vect.** v. 7, p. 440, 2014.

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

Chauhan, V., Thakur, S., & Rana, B. Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. **Indian J Med Microbiol.** v. 33, p. 427-429, 2015.

Chaves, A., Alcantara, O. S. D., Carvalho, O. D. S., & Santos, J. S. D. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-katz e Faust modificado. **Rev Saúde Públ.** v. 13, p. 348-352, 1979.

Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Roza, C., Bowdridge, S., Millman, A., ... & Gause, W. C. An essential role for TH 2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. **Nature medicine**, v. 18, n. 2, p. 260-266, 2012.

Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J. F., Chen, E., Patel, N., ... & Gause, W. C. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. **Nature immunology**, v. 15, n. 10, p. 938-946, 2014.

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

Coakley, G., & Harris, N. L. Interactions between macrophages and helminths. **Parasite immunology**, v. 42, n. 7, p. e12717, 2020.

Colombo, S. A., & Grencis, R. K. Immunity to Soil-Transmitted Helminths: Evidence From the Field and Laboratory Models. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

Cooper, P. J., Chico, M. E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M. W., ... & Nutman, T. B. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 182, n. 4, p. 1207-1213, 2000.

Craig, J. M., & Scott, A. L.. Helminths in the lungs. **Parasite immunology**, v. 36, n. 9, p. 463-474, 2014.

Crandall, C. A., & Crandall, R. B. *Ascaris suum*: immunoglobulin responses in mice. **Experimental parasitology**, v. 30, n. 3, p. 426-437, 1971.

Croll, N. A., & Ghadirian, E. Wormy persons: contributions to the nature and patterns of overdispersion with *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Trichuris trichiura*. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 33, n. 3, p. 241-248, 1981.

Crombie, J.A., Anderson, R.M. Population dynamics of *Schistosoma mansoni* in mice repeatedly exposed to infection. **Nature** 315, 491–493, 1985.

Crompton, D W. *Ascaris* and ascariasis. **Adv Parasitol**.48:285-375, 2001.

Culley, F. J., Brown, A., Girod, N., Pritchard, D. I., & Williams, T. J.. Innate and cognate mechanisms of pulmonary eosinophilia in helminth infection. **European journal of immunology**, v. 32, n. 5, p. 1376-1385, 2002.

Dawkins, H. J. S., & Grove, D. I. Immunisation of mice against *Strongyloides ratti*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 66, n. 3, p. 327-333, 1982.

Dawson, H. D., Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A., ... & Lunney, J. K. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 2, p. 1116-1128, 2005.

De'Broski, R. H., 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. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 8, p. 4544-4551, 2000.

De Castro, J. C., de Almeida, L. V., Cardoso, M. S., Oliveira, F. M. S., Nogueira, D. S., Reis-Cunha, J. L., ... & Fujiwara, R. T. Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 394-401, 2021.

De Silva, N. R., Guyatt, H. L., & Bundy, D. A. P. Worm burden in intestinal obstruction caused by *Ascaris lumbricoides*. **Tropical Medicine & International Health**, v. 2, n. 2, p. 189-190, 1997

De Silva, N. R., Brooker, S., Hotez, P. J., Montresor, A., Engels, D., & Savioli, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol.** v. 19, n. 12, p. 547-551, 2003.

Deslyper, G., Colgan, T. J., Cooper, A. J., Holland, C. V., & Carolan, J. C. . A proteomic investigation of hepatic resistance to *Ascaris* in a murine model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004837, 2016.

Deslyper, G., Holland, C. V., Colgan, T. J., & Carolan, J. C. The liver proteome in a mouse model for *Ascaris suum* resistance and susceptibility: evidence for an altered innate immune response. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2019.

Dold, C., Cassidy, J. P., Stafford, P., Behnke, J. M., & Holland, C. V. Genetic influence on the kinetics and associated pathology of the early stage (intestinal-hepatic) migration of *Ascaris suum* in mice. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 173, 2010.

Dold, C; Holland, C V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes and Infection**. v. 13, n. 7, p. 632-637, 2011a.

Dold, C; Holland, C V. Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. **Microbes Infect.** v. 13, n. 7, p. 624-631, 2011b.

Ellis, M. K., Raso, G., Li, Y. S., Rong, Z., Chen, H. G., & McManus, D. P. Familial aggregation of human susceptibility to co- and multiple helminth infections in a population from the Poyang Lake region, China. **Int J Parasitol.** v. 37, p. 1153-1161, 2007.

Else, K. J., Keiser, J., Holland, C. V., Grencis, R. K., Sattelle, D. B., Fujiwara, R. T., ... & Cooper, P. J. Whipworm and roundworm infections. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1-23, 2020.

Enobe, C. S., Araujo, C. A., Perini, A., Martins, M. A., Macedo, M. S., & Macedo-Soares, M. F. Early stages of *Ascaris suum* induce airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. **Parasite immunology**, v. 28, n. 9, p. 453-461, 2006.

Eriksen, L., Nansen, P., Roepstorff, A., Lind, P., & Nilsson, O. Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. **Parasitology research**, v. 78, n. 3, p. 241-246, 1992.

Evengard, B. Schistosomiasis. Immunological, serological and clinical aspects. **Scand J Infect Dis Suppl**; 63:1-72, 1989.

Figueiredo, C. A., Barreto, M. L., Rodrigues, L. C., Cooper, P. J., Silva, N. B., Amorim, L. D., & Alcantara-Neves, N. M. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. **Infection and immunity**, v. 78, n. 7, p. 3160-3167, 2010.

Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Morris, S. C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K. B., ... & Urban Jr, J. F. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 139-155, 2004.

Fortes, B. D. P. M. D., Ortiz Valencia, L. I., Ribeiro, S. D. V., & Medronho, R. D. A.. Modelagem geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Cad. Saúde Pública**. v. 20, n. 3, p. 727-734, 2004.

Freeman, M. C., Akogun, O., Belizario Jr, V., Brooker, S. J., Gyorkos, T. W., Imtiaz, R., ... & Utzinger, J. Challenges and opportunities for control and elimination of soil-transmitted helminth infection beyond 2020. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007201, 2019.

Gálvez, R., Alvarado, E., Casana, W., Quiroz, J., Ríos, M., & Jara, C.. An ELISA test with *Ascaris suum* pseudocoelomic fluid antigens for pulmonary experimental ascariasis diagnosis. **Rebiolest**. v. 2, n. 2, p. e34, 2014.

Galvin, T. J. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. **The Journal of parasitology**, p. 1085-1091, 1968.

Galzerano, A., Sabatini, E., & Duri, D. *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. 2010.

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, n. 10, p. 5730-5738, 2006.

Gazzinelli-Guimarães, P. H., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Silva, F. N., Mati, V. L. T., de Carvalho Dhom-Lemos, L., Barbosa, F. S., ... & Bueno, L. L. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris sp.* infection in mice. **Int J Parasit.** v. 43, p. 697-706, 2013.

Gazzinelli-Guimarães, P. H., de Freitas, L. F. D., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Coelho, F., Barbosa, F. S., Nogueira, D., ... & Fujiwara, R. T.. Concomitant helminth infection downmodulates the Vaccinia virus-specific immune response and potentiates virus-associated pathology. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 1, p. 1-10, 2017.

Gazzinelli-Guimarães, A. C., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Nogueira, D. S., Oliveira, F. M. S., Barbosa, F. S., Amorim, C. C. O., ... & Fujiwara, R. T. IgG induced by vaccination with *Ascaris suum* extracts is protective against infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2535, 2018.

Gazzinelli-Guimaraes, Pedro H.; Nutman, Thomas B. Helminth parasites and immune regulation. **F1000Research**, v. 7, 2018.

Gazzinelli-Guimaraes, P. H., de Queiroz Prado, R., Ricciardi, A., Bonne-Année, S., Sciurba, J., Karmele, E. P., ... & Nutman, T. B. Allergen presensitization drives an eosinophil-dependent arrest in lung-specific helminth development. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3686-3701, 2019.

GBD 2017. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet** **392**, 1789–1858, 2018.

GBD 2017. DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet** **392**, 1859–1922, 2018.

Global Health Data Exchange. GBD results tool. *GHDx* <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>, 2020.

Geiger, S. M., Massara, C. L., Bethony, J., Soboslay, P. T., Carvalho, O. S., & Corrêa-Oliveira, R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunol.** v. 24, p. 499-509, 2002.

Gieseck III, R. L., Wilson, M. S., & Wynn, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 62, 2018.

Glover, M., Colombo, S. A., Thornton, D. J., & Grencis, R. K. Trickle infection and immunity to *Trichuris muris*. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 11, p. e1007926, 2019.

González-Miguel, J., Morchón, R., Gussoni, S., Bossetti, E., Hormaeche, M., Kramer, L. H., & Simón, F. Immunoproteomic approach for identification of *Ascaris suum* proteins recognized by pigs with porcine ascariasis. **Vet. Parasitol.** v. 203, n. 3-4, p. 343-348, 2014.

Graham, A. L., Allen, J. E., & Read, A. F. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 36, p. 373-397, 2005.

Guabiraba, R., Russo, R. C., Coelho, A. M., Lopes, G. A., Gomes, A. K., Andrade, S. P., ... & Teixeira, M. M. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. **Inflammation Research**, v. 62, n. 8, p. 811-821, 2013.

Hale, O. M., & Stewart, T. B. Influence of an experimental infection of *Trichuris suis* on performance of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 1000-1005, 1979.

Hale, O. M., Stewart, T. B., & Marti, O. G. Influence of an experimental infection of *Ascaris suum* on performance of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 1, p. 220-225, 1985.

Hall, A., Horton, S., & de Silva, N. The costs and cost-effectiveness of mass treatment for intestinal nematode worm infections using different treatment thresholds. **PLoS Negl Trop Dis**. 3(3): e402, 2009.

Hashimoto, K., Uchikawa, R., Tegoshi, T., Takeda, K., Yamada, M., & Arizono, N. Depleted intestinal goblet cells and severe pathological changes in SCID mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 457-465, 2009.

Heeb, L. E., Egholm, C., Impellizzeri, D., Ridder, F., & Boyman, O. Regulation of neutrophils in type 2 immune responses. **Current opinion in immunology**, v. 54, p. 115-122, 2018.

Herrera, I A; Meneses, L T. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. **Cuadernos Del Hospital de Clinicas**. v. 50, n. 2, 69-73, 2005.

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

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

Hoffman, W A; Pons, J A, Janer, J L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico J Publ Hlth**; 9:283-98, 1934.

Holland, C. V., Asaolu, S. O., Crompton, D. W., Stoddart, R. C., Macdonald, R., & Torimiro, S. E. The epidemiology of *Ascaris lumbricoides* and other soil-transmitted helminths in primary school children from Ile-Ife, Nigeria. **Parasitology**, v. 99, p. 275-285, 1989.

Holland, C V; Behke, J M; Dold, C. Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. *In: Ascaris the neglected parasite*. Ed. Elsevier. Amsterdam. c. 5, p. 107-125, 2013.

Hotez, P J. The Giant Anteater in the Room: Brazil's Neglected Tropical Diseases Problem. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, n. 1, p. e177, 2008.

Hotez, P. J; Kamath A. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 3: 412, 2009.

Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M. G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., ... & Carabin, H. (2014). The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 7, p. e2865, 2010.

Islam, M. K., Miyoshi, T., & Tsuji, N.. Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1023-1030, 2005.

Jackson, J. A., Turner, J. D., Rentoul, L., Faulkner, H., Behnke, J. M., Hoyle, M., ... & Bradley, J. E. T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. **The Journal of infectious diseases**, 2004, 190.10: 1804-1811.

Jacobson, R. H., & Reed, N. D. The immune response of congenitally athymic (nude) mice to the intestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 147, n. 3, p. 667-670, 1974.

Jia, T. W., Melville, S., Utzinger, J., King, C. H., & Zhou, X. N. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. 6(5):e1621, 2012.

Jourdan, P. M., Lamberton, P. H., Fenwick, A., & Addiss, D. G. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252-265, 2018.

Keiser, J.; Utzinger, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 299, n. 16, p. 1937-1948, 2008.

Kennedy, M. W., Qureshi, F., Haswell-Elkins, M. R. D. B., & Elkins, D. B. Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. **Clin Exp Immunol**. v. 67, p. 20-30, 1987.

Kennedy, M W. Ascariasis. *In: Encyclopedia of Immunology*. p. 226765, 1998.

Khoury, P. B., Stromberg, B. E., & Soulsby, E. J. Immune mechanisms to *Ascaris suum* in inbred guinea-pigs. I. Passive transfer of immunity by cells or serum. **Immunology**, v. 32, n. 4, p. 405, 1977.

Khuroo, M. S., Khuroo, N. S., & Khuroo, M. S. Biliary ascariasis in the etiology of recurrent pyogenic cholangitis in an endemic area. **Int J Hepatobiliary Pancreat Dis**. 5: 22-29, 2015.

Knopp, S., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Steinmann, P., Stothard, J. R., Rollinson, D., ... & Utzinger, J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, p e331, 2008

Koyama, K., Tamauchi, H., & Ito, Y. The role of CD4+ and CD8+ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. **Parasite immunology**, v. 17, n. 3, p. 161-165, 1995.

Kringel, H., Thamsborg, S. M., Petersen, H. H., Göring, H. H. H., Skallerup, P., & Nejsum, P. Serum antibody responses in pigs trickle-infected with *Ascaris* and *Trichuris*: Heritabilities and associations with parasitological findings. **Veterinary parasitology**, v. 211, n. 3-4, p. 306-311, 2015.

Lalani, T., Simmons, R. K., & Ahmed, A. R. Biology of IL-5 in health and disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 82, n. 4, p. 317-333, 1999.

Leles, D., Gardner, S. L., Reinhard, K., Iñiguez, A., & Araujo, A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasite Vec**. v. 5, n. 42, 2012.

Lescano, S. A. Z., Nakhle, M. C., Ribeiro, M. C. S., & Chieffi, P.P. IgG antibody responses in mice coinfectd with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 145-152, 2012.

Lewis, R., Behnke, J. M., Stafford, P., & Holland, C. V. The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. **Parasitology**, 132.2: 289-300, 2006

Lewis, R., Behnke, J. M., Cassidy, J. P., Stafford, P., Murray, N., & Holland, C. V. The migration of *Ascaris suum* larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/Ca mice. **Parasitology**, v. 134, n. 9, 2007.

Lewis, R., Behnke, J. M., Stafford, P., & Holland, C. V.. Dose-dependent impact of larval *Ascaris suum* on host body weight in the mouse model. **Journal of helminthology**, v. 83, n. 1, p. 1-5, 2009.

Lind, P., Eriksen, L., Nansen, P., Nilsson, O., & Roepstorff, A.. Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. II: Specific IgA,

IgG, and IgM antibodies determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitol Res.** v. 79, p. 240-244, 1993.

Liu, G. H., Wu, C. Y., Song, H. Q., Wei, S. J., Xu, M. J., Lin, R. Q., ... & Zhu, X. Q. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. **Gene.** v. 492, p. 110-116, 2012.

Lynch, N. R.. Influence of socio-economic level on helminthic infection and allergic reactivity in tropical countries. **Allergy and immunity to helminths: common mechanisms or divergent pathways.**, p. 51-62, 1992.

Louw, J H. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. **Brit J Surg.** v. 53, n. 6, p. 510-522, 1966.

Lum, L C. Biliary ascariasis from a rural setting: A case study. **Med& Health.** v. 7, n. 2, p. 102-106, 2012.

Lustigman, S., Prichard, R. K., Gazzinelli, A., Grant, W. N., Boatin, B. A., McCarthy, J. S., & Basáñez, M. G.. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1582, 2012.

Lutz, A O. *Schistosomum mansoni* e a Schistomatose, segundo observações feitas no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**;11:121-55, 1919.

Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R. P., Cannon, P. L., Flynn, E. R., Jung, M., ... & Lindsey, M. L. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. **Cardiovascular research**, v. 110, n. 1, p. 51-61, 2016.

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

Maizels, RM; Hewitson, JP; Smith, K. A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. **Curr. Opin. Immunol.** v. 24, p. 459-466, 2012.

Massara, C. L., Costa, H. M. D. A., & Carvalho, O. D. S. Contribuição para o estudo do *Ascaris lumbricoides* em laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 43-47, 1990.

Masure, D., Vlamincx, J., Wang, T., Chiers, K., Van den Broeck, W., Vercruysse, J., & Geldhof, P. A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 3, p. e2138, 2013.

Masure, D., Wang, T., Vlamincx, J., Claerhout, S., Chiers, K., Van den Broeck, W., ... & Geldhof, P. The intestinal expulsion of the roundworm *Ascaris suum* is associated with eosinophils, intra-epithelial T cells and decreased intestinal transit time. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2588, 2013.

Martin, J., Keymer, A., Isherwood, R. J., & Wainwright, S. M. The prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in Moslem children from northern Bangladesh. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 77, n. 5, p. 702-706, 1983.

Martin, P., & Leibovich, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

McCoy, K. D., Stoel, M., Stettler, R., Merky, P., Fink, K., Senn, B. M., ... & Harris, N. L. Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 4, p. 362-373, 2008

McCraw, B. M.. The development of *Ascaris suum* in calves. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 39, n. 3, p. 354, 1975.

McSharry, C., Xia, Y., Holland, C. V., & Kennedy, M. W. Natural Immunity to *Ascaris lumbricoides* Associated with Immunoglobulin E Antibody to ABA-1 Allergen and Inflammation Indicators in Children. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 484-489, 1999.

Midttun, H. L., Acevedo, N., Skallerup, P., Almeida, S., Skovgaard, K., Andresen, L., ... & Williams, A. R. *Ascaris suum* infection downregulates inflammatory pathways in the pig intestine in vivo and in human dendritic cells in vitro. **The Journal of infectious diseases**, v. 217, n. 2, p. 310-319, 2018.

Miller, L. A., Colby, K., Manning, S. E., Hoenig, D., McEvoy, E., Montgomery, S., ... & Sears, S. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013. **Emerging Infec Dis.** v. 21, n. 2, p. 332-334, 2015.

Moller, M., Gravenor, M. B., Roberts, S. E., Sun, D., Gao, P., & Hopkin, J. M. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms. **Human Molecular Genetics**. v. 16, n. 15, p. 1828-36, 2007.

Monteiro, K. J., Calegar, D. A., Santos, J. P., Bacelar, P. A., Coronato-Nunes, B., Reis, E. R. C., ... & Jaeger, L. H. Genetic diversity of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0218867, 2019.

Morano, Jacod; Morano, Jfblt. Ascaridiose vesicular. **RECCS**. p. 12-13, 1988.

Morimoto, M., Morimoto, M., Whitmire, J., Xiao, S., Anthony, R. M., Mirakami, H., ... & Gause, W. C. Peripheral CD4 T cells rapidly accumulate at the host: parasite interface during an inflammatory Th2 memory response. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2424-2430, 2004.

Moser, W., Schindler, C., & Keiser, J. Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis. **Bmj**, v. 358, 2017.

Mulcahy, G., O'Neill, S., Fanning, J., McCarthy, E., & Sekiya, M. Tissue migration by parasitic helminths—an immunoevasive strategy?. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 6, p. 273-277, 2005

Murrell, K. D., Eriksen, L., Nansen, P., Slotved, H. C., & Rasmussen, T. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **The Journal of parasitology**, 1997, 255-260.

Mwenda, A S; Ilkul, J H. Obstructive ileal ascariasis. **New Engl J Med**. v. 368, n. 10, p. 943, 2013.

Nejsum, P., Parker, E. D., Frydenberg, J., Roepstorff, A., Boes, J., Haque, R., ... & Sørensen, U. B. S. Ascariasis is a zoonosis in denmark. **J ClinMicrobiol**. Mar;43(3):1142-8, 2005.

Nejsum, P., Thamsborg, S. M., Petersen, H. H., Kringel, H., Fredholm, M., & Roepstorff, A. Population dynamics of *Ascaris suum* in trickle-infected pigs. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 1048-1053, 2009.

Nejsum, P., Betson, M., Bendall, R. P., Thamsborg, S. M., & Stothard, J. R. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. **J Helminthol**. v. 86, p. 148-155, 2012.

Nery, S. V., Pickering, A. J., Abate, E., Asmare, A., Barrett, L., Benjamin-Chung, J., ... & Ercumen, A. The role of water, sanitation and hygiene interventions in reducing soil-transmitted helminths: interpreting the evidence and identifying next steps. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 273, 2019.

Nogueira, D. S., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Barbosa, F. S., Resende, N. M., Silva, C. C., de Oliveira, L. M., ... & Caliari, M. V. Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed TH2/TH17 immune 1 response in mice. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 10, n. 1, p. e0004382, 2016.

Nogueira, D.S. Mecanismos de proteção mediados pela resposta imune na ascaridiose larval após exposição primária e múltiplas exposições ao parasito (*Tese em parasitologia*). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 135p. 2018

Nutman, T. B. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. **Parasite immunology**, v. 37, n. 6, p. 304-313, 2015.

O'Connell, A. E., Hess, J. A., Santiago, G. A., Nolan, T. J., Lok, J. B., Lee, J. J., & Abraham, D. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and immunity**, v. 79, n. 7, p. 2770-2778, 2011.

Oliveira, L.M. O papel de SIgA na resposta imune de mucosa contra ascaridose larval (*Tese em parasitologia*). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 125p. 2017

Oliveira, F. M. S., da Paixão Matias, P. H., Kraemer, L., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Santos, F. V., Amorim, C. C. O., ... & Bueno, L. L.. Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, 2019.

Ortiz, M. R., Schreiber, F., Benitez, S., Broncano, N., Chico, M. E., Vaca, M., ... & Cooper, P. J. Effects of chronic ascariasis and trichuriasis on cytokine production and gene expression in human blood: a cross-sectional study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1157, 2011.

Oshiro, T. M., Enobe, C. S., Araújo, C. A., Macedo, M. S., & Macedo-Soares, M. F. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. **Immunol Cell Biol.** v. 84, p.138-144, 2006.

Ovington, K. S. Trickle infections of *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 72, n. 6, p. 851-853, 1986.

Padigel, U. M., Hess, J. A., Lee, J. J., Lok, J. B., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 12, p. 1844-1851, 2007.

Palucka, K., & Banchereau, J. Linking innate and adaptive immunity. **Nature medicine**, v. 5, n. 8, p. 868-870, 1999.

Paterson, J. C., Garside, P., Kennedy, M. W., & Lawrence, C. E. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. **Infec Immun.** v. 70, n. 11, p. 6058-6067, 2002.

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

Perrigoue, J. G., Marshall, F. A., & Artis, D. On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1757-1764, 2008.

Pineda, M R B; Ramos, J D A. *Ascaris suum* infective eggs up regulate IL-4, 5 and 10 in BALB/c mice. **Philippine Sci Let.** v. 5, n. 2, p. 139-149, 2012.

Pullan, R L; Brooker, S J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors.** v. 5, n. 81, 2012.

Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R., & Brooker, S. J. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**. v. 7, n 37, 2014.

Ritchie, L S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bull US Army Med Dept**; 8:326, 1948.

Roboz, G. J.; Rafii, S. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. **Current opinion in hematology**, v. 6, n. 3, p. 164, 1999.

Roepstorff, A., Mejer, H., Nejsun, P., & Thamsborg, S. M. Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 72-81, 2011.

Rotman, H. L., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Gleich, G. J., Nolan, T. J., ... & Abraham, D. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. **Experimental parasitology**, v. 82, n. 3, p. 267-278, 1996.

Saboyá, M., Catalá, L., Ault, S., & Nicholls, R. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. Pan American Health Organization: Washington D.C. 2011.

Sadaow, L., Sanpool, O., Phosuk, I., Rodpai, R., Thanchomnang, T., Wijit, A., ... & Intapan, P. M. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **Parasitology research**, v. 117, n. 8, p. 2427-2436, 2018.

Schilter, H. C., Pereira, A. T. M., Eschenazi, P. D., Fernandes, A., Shim, D., Sousa, A. L. S., ... & Negrão-Corrêa, D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite immunology**, v. 32, n. 3, p. 184-192, 2010.

Schwartz, C., Hams, E., & Fallon, P. G. Helminth modulation of lung inflammation. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 5, p. 388-403, 2018.

Senecal, J., Nordin, A., & Vinnerås, B. Fate of *Ascaris* at various pH, temperature and moisture levels. **Journal of Water and Health**, v. 18, n. 3, p. 375-382, 2020.

Shapiro, A. E., Tukahebwa, E. M., Kasten, J., Clarke, S. E., Magnussen, P., Olsen, A., ... & Brooker, S. Epidemiology of helminth infections and their relationship with clinical malaria in southwest Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 99, p. 18-24, 2005.

Silveira, M. R., Nunes, K. P., Cara, D. C., Souza, D. G., Corrêa, A., Teixeira, M. M., & Negrão-Corrêa, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway

eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6263-6272, 2002.

Slotved, H. C., Eriksen, L., Murrell, K. D., & Nansen, P. Early *Ascaris suum* migration in mice as a model for pigs. **The Journal of parasitology**, 1998, 16-18.

Spillmann, R K. Pulmonary ascariasis in tropical communities. **Am J Trop Med Hyg** 24: 791-800, 1975.

Sprent, J. F. A. On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I. distribution of larvae in tissues. **J Infect Dis.** v. 90, p. 165-176, 1952.

Srisawangwong, T., Sithithaworn, P., Sukkasaem, P., Jintakanon, D., Tesana, S., Sithithaworn, J., ... & Fried, B. Concomitant and protective immunity in mice exposed to repeated infections with *Echinostoma malayanum*. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 4, p. 740-744, 2011.

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. **Journal of immunological methods**, v. 83, n. 2, p. 209-215, 1985.

Stephenson, L. S., Pond, W. G., Nesheim, M. C., Krook, L. P., & Crompton, D. W. T. *Ascaris suum*: nutrient absorption, growth, and intestinal pathology in young pigs experimentally infected with 15-day-old larvae. **Experimental Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 15-25, 1980.

Stephenson, L. S., & Holland, C. **The impact of helminth infections on human nutrition: schistosomes and soil-transmitted helminths**. Taylor and Francis Ltd, 1987.

Stolk, W. A., Kulik, M. C., le Rutte, E. A., Jacobson, J., Richardus, J. H., de Vlas, S. J., & Houweling, T. A. et al. Between-country inequalities in the neglected tropical disease burden in 1990 and 2010, with projections for 2020. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004560, 2016.

Sutherland, T. E., Logan, N., Rückerl, D., Humbles, A. A., Allan, S. M., Papayannopoulos, V., ... & Allen, J. E. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. **Nature immunology**, v. 15, n. 12, p. 1116-1125, 2014.

Takata, I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 23, n. 4, p. 49-59, 1951.

Takatsu, K., Kouro, T., & Nagai, Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. **Advances in immunology**, v. 101, p. 191-236, 2009.

Thamsborg, S. M., Nejsum, P., & Mejer, H. Impact of *Ascaris suum* in livestock. In: **Chapter 14 - Impact of *Ascaris suum* in Livestock**. C. Holland (Ed.) *Ascaris: the neglected parasite*. Elsevier, 2013. p. 363-381

Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., & Suzuki, F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 215-226, 2004.

Umetsu, S., Sogo, T., Iwasawa, K., Kondo, T., Tsunoda, T., Oikawa-Kawamoto, M., ... & Fujisawa, T. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. **World J Gastroenterol**. v. 20, n. 38, p. 14058-14062, 2014.

Urban Jr, J. F., Alizadeh, H., & Romanowski, R. D.. *Ascaris suum*: development of intestinal immunity to infective second-stage larvae in swine. **Experimental parasitology**, v. 66, n. 1, p. 66-77, 1988.

Urban Jr, J. F., Fayer, R., Sullivan, C., Goldhill, J., Shea-Donohue, T., Madden, K., ... & Finkelman, F. D. Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 54, n. 1-4, p. 337-344, 1996.

Vos, T., Barber, R. M., Bell, B., Bertozzi-Villa, A., Biryukov, S., Bolliger, I., ... & Duan, L. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743-800, 2015.

Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Brown, A., ... & Boufous, S. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, 2016.

Walker, M; Hall, A; Basáñez, M G. Trickle or clumped infection process? A stochastic model for the infection process of the parasitic roundworm of humans, *Ascaris lumbricoides*. **International journal for parasitology**. v. 40, n. 12, p. 1381-1388, 2010.

Walker, M., Hall, A., & Basáñez, M. G.. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: New epidemiological insights. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5, n. 4, p. e1047, 2011.

Weatherhead, J. E., Porter, P., Coffey, A., Haydel, D., Versteeg, L., Zhan, B., ... & Beaumier, C. M. *Ascaris* larval infection and lung invasion directly induce severe allergic airway disease in mice. **Infection and immunity**, v. 86, n. 12, 2018.

Weatherhead, J. E., Gazzinelli-Guimaraes, P., Knight, J. M., Fujiwara, R., Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., & Corry, D. B.. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

World Health Organization. World health report series. Prevention and control of intestinal parasitic infections. Geneva: World Health Organization, 1987.

World Health Organization. Report of the WHO Informal Consultation on Monitoring of Drug Efficacy in the Control of Schistosomiasis and Intestinal Nematodes, Geneva, 8-10 July 1998. World Health Organization, 1999.

World Health Organization. World health report. Annex Table 2: deaths by cause, sex, and mortality stratum in WHO regions and annex Table 3: burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions. Geneva: World Health Organization; p. 186-193, 2002.

World Health Organization. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Geneva: World Health Organization, 2008a.

World Health Organization. Soil-transmitted helminthiasis: progress report on number of children treated with anthelmintic drugs. *Wkly Epidemiol Rec*. 83: 866-871, 2008b.

World Health Organization. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2011. Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE, 2013.

World Health Organization. 2030 targets for soil-transmitted helminthiasis control programmes, 2020.

Yoichi, I. The absence of resistance in congenitally athymic nude mice toward infection with the intestinal nematode, *Trichuris muris*: resistance restored by lymphoid cell transfer. **International journal for parasitology**, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1991.

Yu, J. R., Hong, S. T., Chai, J. Y., & Lee, S. H.. The effect of reinfection with *Neodiplostomum seoulensis* on the histopathology and activities of brush border membrane bound enzymes in the rat small intestine. **The Korean journal of parasitology**, v. 33, n. 1, p. 37-43, 1995.

Ziegelbauer, K., Speich, B., Mäusezahl, D., Bos, R., Keiser, J., & Utzinger, J. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**. v. 9, n. 1, p. e1001162, 2012.

10. ANEXO

10.1 Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da influência da carga parasitária no processo de reinfecção por *Ascaris suum* e implicações na proteção da Ascaridíase larval", protocolo do CEUA: 221/2020 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/12/2020.]

Vigência da Autorização	07/12/2020 a 06/12/2025
Finalidade	Pesquisa