

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

Eleuza Rodrigues Machado



Estudo dos fatores determinantes do grau de infectividade de
linhagens de *Strongyloides venezuelensis* e análise de antígenos
heterólogos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eleuza Rodrigues Machado
Marlene Tiduko Ueta
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do título de Doutor em Parasitologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Tiduko Ueta
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	UNICAMP
	M18e
V	EX
TOMBO BCI	53396
PROC.	124103
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/09/03
Nº CPD	

CM00182186-3

BIB ID 287798

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA- UNICAMP**

M18e**Machado, Eleuza Rodrigues**

Estudos dos fatores determinantes do grau de infectividade em linhagens de *Strongyloides venezuelensis* e análise de antígenos heterólogos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana/

Eleuza Rodrigues Machado. - -

Campinas, SP. [s.n.], 2003.

Orientadora: Marlene Tiduko Ueta

Co-Orientadora: Lúcia Helena Faccioli

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Eosinofilia. 2. Imunoglobulinas. 3. Leucotrienos.

I. Ueta, Marlene Tiduko. II. Faccioli, Lúcia Helena.

III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

IV. Título.

Campinas, 31 de janeiro de 2003

Banca Examinadora:Profa. Dra. **Marlene Tiduko Ueta** (Orientadora) Marlene Tiduko UetaProf. Dr. **José Roberto Mineo** José Roberto MineoProfa. Dra. **Julia Maria Costa-Cruz** Julia Maria Costa-CruzProfa. Dra. **Selma Giorgio** Selma GiorgioProfa. Dra. **Ana Maria Aparecida Guaraldo** Ana Maria Aparecida GuaraldoProf. Dr. **José Clóvis Prado Júnior** José Clóvis Prado JúniorProfa. Dra. **Eliana Maria Zanotti-Magalhães** Eliana Maria Zanotti-Magalhães

2003.01.31

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao seu Filho Salvador, que estiveram presentes em todos os momentos de minha vida. A Eles entrego todos os momentos de indecisões, tristezas e desânimos. E com Eles compartilho todas as minhas Vitórias.

"Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro?
O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra.
O sol não te molestará de dia nem a lua de noite.
O Senhor te guardará de todo o mal: ele guardará a tua alma.
O Senhor guardará a tua entrada e a tua saída, desde agora e para sempre".

Salmos (121:1;2;7;6;8)

Dedico esse estudo...

Àqueles que partiram e deixaram um imenso vazio em meu coração, meu pai Joaquim, meu "meio" irmão Ivânio, meu amigo Hilário e minha sobrinha Talita (in memorian), pela confiança e pelo carinho, minha especial gratidão e saudade. Amigos, olhem o meu sonho aqui se concretizando!. A vocês esse grande dia. Com amor de sua filha, irmã, amiga e tia.

"...Tudo morre grande ou pequeno, fraco ou forte, tudo morre. Primeiro cumprimos a nossa missão. Experimentamos o sol e a lua, o vento e a chuva. Aprendemos a dançar e a rir... A primavera se transforma em verão... E também o verão se transforma em outono. É o momento em que as folhas mudam de casa. Algumas pessoas chamam a isso de morrer. São mudanças naturais como a estação da morte. É o grande mistério... Pelo sol e pela lua, pelos tempos felizes que passamos juntos, pelas cores no outono, pelas estações... Há uma coisa que é mais forte do que a morte é a vida. Dura eternamente e somos todos uma parte da vida..."

(A história de uma folha – uma fábula para todas as idades – Leo Buscaglia).

Àquelas pessoas que me fizeram e fazem sentir como é bom estar viva. Com seus exemplos, elas me ensinaram que amar, lutar e sofrer é, acima de tudo, crescer como filha, irmã, cunhada, tia e bióloga.

A minha mãe M^a José, e meus irmãos (as), Sebastião, Cleuza, Cleumar, Valdemar, Neuza, M^a Elvira, Ceição e Cris.

"Eu tenho tanto para te falar, mas com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por vocês. Nunca se esqueçam..."

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos Adolfo, Dulce, M^a das Dores, Anívia, M^a Alice, Ana Angélica, Elaine, José Euripedes, Denis, M^a Tereza e Priscilla. A vocês, o que o vento não levou, de Mário Quintana:

"No fim tu hás de ver que as coisas mais leves são as únicas que o vento não conseguiu levar: um estribilho antigo, um carinho no momento preciso, o folhear de um livro, o cheiro que tinha um dia o próprio vento". Vocês tornam minha vida mais leve!.

À Prof^a. Dr^a. Marlene Tiduko Ueta, orientadora, que me acolheu e abriu as portas para que eu pudesse desenvolver um trabalho sonhado e no qual eu acreditava, o qual possibilitou meu crescimento como pesquisadora e profissional. Muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli, Co-Orientadora. É difícil expressar em palavras o tamanho da GRATIDÃO que sinto pela Prof^a. Lúcia. Todo o trabalho de cuidadosa supervisão e orientação à esta tese já valeriam um imenso MUITO OBRIGADA! De fato ela contribuiu para o meu crescimento e desenvolvimento como profissional e cientista.

Mas ela foi além disso... Ofereceu-me um exemplo de pessoa, de profissional, de caráter, sendo continente em todos os momentos deste percurso...e existiram muitas pedras e espinhos no meio do caminho...e ela me ensinou, me ajudou a percorrer da melhor maneira possível...pôde, assim, contribuir também com o meu crescimento e desenvolvimento emocional e pessoal.

Minha eterna gratidão...

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

Tive o privilégio de sempre poder contar com muitas pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho, mas de modo especial quero agradecer

À CAPES, pela bolsa de doutorado, e a FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos componentes de Comissão Julgadora de minha tese: Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa-Cruz; Prof. Dr. José Roberto Mineo; Prof. Dr. José Clóvis Prado Júnior; e Prof^ª. Dr^ª. Selma Giorgio pela revisão crítica deste trabalho.

Aos docentes do Dep. de Parasitologia (UNICAMP), que muito contribuíram na minha formação acadêmica.

À Dr^ª. Maria Cristina Roque-Barreira (FMRP-USP), pelas portas sempre abertas de seu laboratório no desenvolvimento de partes de meu trabalho e discussões de alguns resultados. E à Pós-Graduanda Elaine V. Lourenço, pela paciência e competência no auxílio na execução de alguns experimentos.

À Dr^ª. Julia M^a Costa-Cruz - Lab. Parasitologia (UFU-MG), pelas portas sempre abertas de seu laboratório no desenvolvimento de partes de minha pesquisa e discussões de alguns resultados e a M^a do Rosário pelo auxílio na realização de alguns experimentos.

À Dr^ª. Eliane Candiani Arantes Braga - Lab. de Fisico-Química (USP-RP), pela disponibilidade, sugestões e auxílio na preparação dos géis.

À Dr^ª. Elaine Ap. Del Bel - Lab. de Fisiologia (USP-RP), pela receptividade em seu laboratório e permissão do uso do cryo-micrótomo.

Ao prof. Auro Nomizo, pela atenção e carinho nesses anos.

Aos colegas de Pós-Graduação e do Departamento Edna, Leila, Simone, Davi, Fernanda, Raquel, Luís Gustavo, M^a Helena e Débora pelos agradáveis momentos durante os cursos. E a Valdelice pela amizade, carinho e atenção dispensado durante esses anos.

À Erika pelo apoio técnico durante os meus últimos experimentos e, acima de tudo, pelo carinho, atenção e amizade dispensado.

À secretária Margareth Rovariz, pela dedicação, competência e amor à Pós-Graduação em Parasitologia (UNICAMP). Pelo carinho e atenção dispensada durante todos esses anos.

Aos funcionários do Dep. de Parasitologia (UNICAMP), em especial, ao Ivo, Sr. Geraldo pela amizade e ao João pela amizade e incondicional ajuda no preparo das culturas de *S. venezuelensis* e infecção dos camundongos.

Aos colegas do Lab. de Imunologia Daniela, Camila, Alexandra, Lúcia de Paula, Fabiani, Anderson, Beto, Rosane e Jorge, pela tolerância que tiveram comigo durante estes anos.

À Adriana, pela receptividade, atenção e apoio dispensado aos meus primeiros dias de Ribeirão Preto e principalmente pelos inúmeros exemplos de virtudes espirituais.

À Fernanda, pela amizade, carinho e imenso auxílio na realização de alguns experimentos.

Ao Alexandre e Walter, pelas palavras amigas, atenção nos momentos de angústia e pelos papers oferecidos.

Ao Prof. José Clóvis Prado Jr, Prof^a. Ana Amélia e técnica Miriam - Lab. de Parasitologia (FCFRP-USP), pela receptividade, atenção dispensada e auxílio na execução dos meus primeiros experimentos.

Às técnicas Ana Cristina M. Polizello e Ana Elisa C. S. Azzolini - Lab. de Bioquímica (USP-RP), pela disponibilidade e auxílio nas preparações dos tampões de ELISA.

Às secretárias Regina Amélia A. A. Albuquerque, Vânia Cláudia de Albuquerque e Vânia Tavares - Dep. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (USP-RP), pela disponibilidade e serviços prestados.

À secretária Milene - Serviços de Revisão Bibliográficas - Biblioteca Central (USP-RP), pela atenção e revisão das referências bibliográficas.

À Toninha e à Tida, pelo auxílio na limpeza dos materiais usados em alguns experimentos.

Aos funcionários do Biotério Central (USP-RP) e Biotério da FCF-RB (USP), pelo fornecimento e manutenção dos animais.

Muito Obrigada!

"Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas".

Charles Chaplin

Sumário

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 . INTRODUÇÃO.....	01
1 . 1 . Biologia e Epidemiologia.....	01
1 . 2 . Aspectos clínicos na estrogiloidíase.....	04
1 . 3 . Diagnóstico da estrogiloidíase.....	12
2 . JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO I.....	17
Capa.....	18
Resumo.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	25
Discussão.....	39
Referências.....	42
CAPÍTULO II.....	47
Capa.....	48
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	56
Discussão.....	68
Referências.....	73

CAPÍTULO III.....	78
Capa.....	79
Resumo.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	83
Resultados.....	87
Discussão.....	98
Referências.....	101
 CAPÍTULO IV.....	 107
Capa.....	108
Resumo.....	109
Introdução.....	110
Material e Métodos.....	111
Resultados.....	115
Discussão.....	123
Referências.....	127
 3. CONCLUSÕES GERAIS.....	 131
 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 134

ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASB	Albumina do soro bovino
BSA	Soro albumina bovina
CC	Quimiocina, quimioatraente para monócitos, linfócitos T CD ₄ de memória e eosinófilos
CXC	Quimiocina, quimioatraente para neutrófilos, eosinófilos e linfócitos
C3a	Fragmento 3 do complemento
C5a	Fragmento 5 do Complemento
D.O.	Densidade Óptica
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent assay"(Ensaio Imunoenzimático)
E. P. M	Erro padrão da média
FLAP	Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase
H ₂ O ₂	Água oxigenada
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetranoico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon- γ
Igs	Imunoglobulinas: A, D, E, G, G ₁ , G ₄ , M.
s. c.	Injeção subcutânea
Interleucina-	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-12
L-	Linhagem
LTs	Leucotrienos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
MK-886	Inibidor da síntese de leucotrienos
MRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OPD	"Ortophenylene Diamine" (orto-fenil-diamina)
PAF	Fator Ativador de Plaqueta
PBS	Salina tamponada com fosfato

SCF	Fator Estimulador de Células
SNC	Sistema Nervoso Central
PGs	Prostaglandinas
PGA	Prostaglandina A
PGD	Prostaglandina D
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F α
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PMN	Polimorfonucleares
TH _{1,2}	Linfócito auxiliar do tipo 1,2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TA	Temperatura ambiente

RESUMO

Neste estudo mostramos que camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *Strongyloides venezuelensis* induzem aumento de leucócitos totais, eosinófilos (EO) e células mononucleares (MO) no sangue, na cavidade peritoneal (LCP) e espaço broncoalveolar (LBA) de formas semelhantes. Ambas linhagens estimularam síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂ da resposta imune, com maior tendência para TH₂. L-2 foi mais infectante que L-49, induzindo precocemente maior síntese de IL-4, IL-5 e IFN γ e anticorpos. Houve correlação positiva entre indução de maior síntese de IL-4 e de IgG e maior expulsão do parasita pela L-2. Não houve correlação entre indução de maior síntese de IL-5 e maior proliferação e recrutamento de EO e MO. O tempo e a temperatura de manutenção das culturas influenciaram na infectividade do parasita. Com menor tempo de permanência das larvas nas culturas estas induziram resposta imune inata mais intensa no sangue e no LCP, com eliminação mais rápida dos parasitas. Larvas obtidas a temperatura mais alta induziram eosinofilia mais intensa e precoce no LCP, e sob temperatura mais baixa, a eosinofilia foi menor e tardia. Larvas mantidas por menor tempo nas culturas estimularam resposta imune celular capaz de expulsar mais rapidamente as fêmeas parasitas, e as mantidas por maior tempo e sob temperaturas mais altas induziram maior síntese de anticorpos e de IL-4 e IL-10. Larvas mantidas por menor tempo nas culturas induziram maior síntese de IL-12, e as de maior tempo, maior produção de IFN- γ . O tempo e/ou temperatura não influenciaram a síntese de IL-5. Observamos que leucotrienos participam do aumento de leucócitos totais, EO e MO no sangue, no LCP e LBA na strongiloidíase. A IL-5 também participa no aumento de leucócitos nesses compartimentos. IL-12 e IFN- γ protegem o parasita contra as defesas do hospedeiro. Verificamos que as oito linhagens de *S. venezuelensis* apresentaram antigenicidade semelhante, detectada por imunofluorescência indireta, ELISA e "Immunoblot". O anticorpo IgG anti-*S. stercoralis* reconheceu a fração antigênica de peso molecular aparente de 45 kDa. Assim, antígenos destas linhagens podem ser usados no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

Palavras chave: *Strongyloides venezuelensis*, strongiloidíase, leucócitos totais, eosinofilia, células mononucleares, citocinas, anticorpos, leucotrienos, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

In this study, we have shown that, in mice, L-2 and L-49 strains of *S. venezuelensis* induced an increase in the total number of leukocytes, eosinophils (EO) and mononuclear cells in blood, peritoneal cavity (LCP) and in the bronchoalveolar space (LBA), in a similar manner. Both strains stimulated synthesis of TH₁ or TH₂ type immune response cytokines, with a greater tendency to TH₂. L-2 strain was more infective than L-49, inducing earlier synthesis of IL-4, IL-5 and IFN- γ , and antibodies. In L-2, there was a direct correlation between greater production of IL-4 and IgG and expulsion of parasites, but no correlation to greater synthesis of IL-5 or proliferation and recruitment of EO and MO. Time and temperature had influence on parasite infectivity. Larvae that remained in the cultures for shorter periods of time had their infectivity affected, inducing a more intense innate immune response in blood and LCP, with rapid elimination of the parasites. Parasites kept in higher temperatures rapidly induced higher eosinophil levels in LCP, while for low temperatures, eosinophils appeared later and in lower numbers. When larvae were cultured for shorter periods of time, they stimulated a cellular immune response capable of quickly expelling female parasites, while those submitted to shorter periods and high temperatures induced a higher synthesis of antibodies, IL-4 and IL-10. Larvae kept in culture for short periods induced greater synthesis of IL-12, while longer periods lead to greater IFN- γ production. Neither time nor temperature affected IL-5 synthesis. It was observed that, in strongyloidiasis, leukotrienes participate on the increase of total leukocyte numbers, EO, and MO in blood, LCP and LBA. IL-5 is also involved in the increase of leukocyte numbers in these compartments. Both IL-12 and IFN- γ protect the parasite against host defense. It was also verified, through indirect immunofluorescence, ELISA, and Immunoblot, that eight strains of *S. venezuelensis* presented similar antigenicity. The antibody anti-*S. stercoralis* IgG was able to recognize the antigenic fraction with apparent molecular weight of 45 kDa. Therefore, antigens to these strains may be used for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

Key words: *S. venezuelensis*, strongyloidiasis, leukocytes, eosinophils, mononuclear cells, cytokines, antibody, leukotrienes, immunodiagnosis, mice.

INTRODUÇÃO

As estrongiloidíases são parasitoses intestinais causadas por nematódeos do gênero *Strongyloides*, que ocorrem no homem, em mamíferos domésticos e silvestres, aves, répteis e anfíbios. Esses parasitas têm desenvolvido uma relação de sucesso em dois ecossistemas: o meio terrestre e o corpo do hospedeiro, facultativamente independente entre eles (GENTA, 1986; GROVE, 1996).

Strongyloides stercoralis foi descoberto, em 1876, por Normand, na cidade de Toulon – França, ao examinar fezes diarréicas de soldados procedentes da Cochinchina, atual Vietnã. As formas do parasita foram descritas por Bavay, em 1876, como *Anguillula stercoralis*, para os parasitas encontrados nas fezes, e como *Anguillula intestinalis* para os obtidos de necropsias. Em 1911, Leuckart demonstrou ser *A. stercoralis* e *A. intestinalis* pertencentes à mesma espécie heterogenética, uma sendo a forma parasita partenogenética e a outra de geração de vida livre bissexuada. A espécie passou a ser denominada *S. stercoralis* (GENTA, 1986).

Strongyloides sp pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditoidea. A família Strongyloididae é composta somente pelo gênero *Strongyloides* (LEVINE, 1979), e apresenta 54 espécies. O homem se infecta por duas espécies e uma sub-espécie, *S. stercoralis*, *S. fülleborni* e *S. fülleborni kellyi*. A primeira tem distribuição mundial, a segunda é encontrada na África e nas Filipinas, e a terceira apenas na Ilha de Papua Nova Guiné (BARNISH & ASHFORD, 1989; PIRES & DREYER, 1993). As demais espécies infectam animais, e sua importância para o homem está relacionada a perdas econômicas devidas ao alto parasitismo que pode ocorrer nos gados ovino, bovino, suíno, ou por serem empregadas como modelos experimentais para estudos da relação entre parasita e hospedeiro, como *S. ratti* (Sandground, 1925), *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) e *S. papillosus* (Wedl, 1856).

1.1 - Biologia e Epidemiologia

As larvas filarióides (L₃) de *S. stercoralis* são as formas infectantes. Elas estão presentes no solo ou alimentos e, ao penetrarem na pele do indivíduo, caem na corrente sangüínea ou linfática, chegam ao coração direito, atingem o pulmão,

atravessam os capilares e chegam aos alvéolos. Nos pulmões, sofrem duas mudas (L₃-L₄ e L₄-L₅) e dos alvéolos, sobem pela traquéia, alcançam a faringe, onde a maioria é deglutida e, no intestino delgado, amadurecem em fêmeas partenogenéticas parasitas (GENTA, 1986, GROVE, 1996).

As fêmeas parasitas, em infecções assintomáticas no intestino, ficam entre ou mergulhadas nas criptas da mucosa intestinal ou no terço superior do jejuno. Nas formas graves de infecção são encontradas do piloro ao intestino grosso, no interior das criptas da mucosa e nas secreções do lume intestinal. Nas formas disseminadas, são observadas em praticamente todos os órgãos, como pulmão, fígado, coração, tireóide, adrenais, paratireóides, pâncreas, linfonodos, rins, próstata, vesícula biliar, glândulas mamárias, vagina, sistema nervoso central, articulações, etc. (CACERES et al., 1988; BHATT et al., 1990; DELAROCQUE et al., 1994; DIONISIO et al., 2000; BUIKHUISEN et al., 2002).

As fêmeas fazem ovoposição na mucosa do intestino delgado, porém, em condições ectópicas, os ovos são postos nos locais onde as fêmeas se encontram. Dos ovos larvados saem as larvas rabditóides (L₁), que migram para a luz intestinal, podendo ou não sofrer muda para a forma rabditóide (L₂), que saem para o meio exterior com as fezes. Nas infecções disseminadas, larvas (rabditóides/filarióides) são encontradas na bile, escarro, urina, líquido duodenal e líquido pleural. Essas larvas, na luz intestinal, podem seguir três caminhos para o seu desenvolvimento: o ciclo direto, o ciclo indireto e a auto-infecção (FERREIRA, 1991; PIRES & DREYER, 1993; GROVE, 1996, COSTA-CRUZ, 2000).

No ciclo direto, as larvas rabditóides L₁ e L₂ chegam ao exterior juntamente com as fezes e transformam-se diretamente em larvas filarióides infectantes, que penetram na pele do hospedeiro e, através da corrente sangüínea ou linfática, chegam ao pulmões, de onde migram pelas vias aéreas, são deglutidas e alcançam o intestino, completando o ciclo biológico. No intestino, os vermes adultos, que são as fêmeas partenogenéticas, eliminam ovos que eclodem na luz intestinal, originando as larvas rabditóides, que são eliminadas nas fezes ou re-infectam o próprio hospedeiro (GROVE, 1996). No ciclo indireto, as larvas rabditóides chegam ao exterior juntamente com as fezes e, em condições ambientais adequadas para seu desenvolvimento, originam fêmeas e machos de vida livre. Das fêmeas fecundadas, saem os ovos com as larvas rabditóides, que podem transformar-se

novamente em machos ou fêmeas de vida livre, mantendo o ciclo indireto no meio ambiente, ou originar larvas filarióides infectantes (L₃), que infectam o hospedeiro (GROVE, 1996). Muitos estudos utilizando *S. planiceps*, *S. ransomi*, *S. papillosus*, *S. stercoralis* e *S. ratti* sugerem que o desenvolvimento de adultos de vida livre ou larva filarióide é influenciado consideravelmente pelas condições ambientais, como temperatura, quantidade de alimento e pH do meio (ARIZONO, 1976a; ARIZONO, 1976b; YAMADA et al., 1991, COSTA-CRUZ, 2000).

Na auto-infecção do hospedeiro, as larvas rabditóides que ainda estão na luz intestinal transformam-se em larvas filarióides infectantes (L₃), que penetram na mucosa intestinal, caem na corrente sangüínea ou linfática, seguindo o mesmo trajeto relatado no início desta descrição. A auto-infecção do hospedeiro é responsável pela cronificação da doença (FERREIRA, 1991).

A auto-infecção externa ocorre na região perianal do hospedeiro. As larvas rabditóides transformam-se em larvas filarióides e aí penetram, alcançam a corrente sangüínea ou a linfática, e completam o ciclo. Esse modo de infecção ocorre quando o hospedeiro tem supressão da imunidade celular, de grande importância na defesa do hospedeiro contra esse parasita (GENTA, 1984; NEVA, 1986; PIRES & DREYER, 1993; GROVE, 1996).

A estrogiloidíase humana é uma doença parasitária cosmopolita, que ocupa o quinto lugar de prevalência dentre as helmintíases, com uma estimativa de mais de 50 milhões de pessoas infectadas. *S. stercoralis* apresenta-se amplamente disseminado nos trópicos e subtrópicos, onde as condições ambientais favoráveis (solo arenoso, poroso, rico em matéria orgânica, úmido, com ausência de luz direta e temperatura variando de 25°C a 30°C), a alta concentração populacional de baixo poder econômico e cultural, a deficiência de educação sanitária e a falta de saneamento básico facilitam seu desenvolvimento e a manutenção no meio ambiente (SHIWAKU et al., 1988; CELEDON et al., 1994; AL SAMMAN et al., 1999).

Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham na zona rural, enquanto nos países tropicais a doença acomete principalmente crianças, devido ao seu contato freqüente com solos contaminados (BOUREE et al., 1981; PIRES & DREYER, 1993). Nos países europeus (GENTA, 1989; LIU & WELLER, 1993), descrevem-se casos de estrogiloidíase autóctone em Nottingham (norte da Inglaterra), França, Espanha, Grécia e na antiga Iugoslávia. Os dados dos países do

leste europeu e da Ásia ainda são escassos (GENTA, 1989), não permitindo conclusões a respeito da prevalência da estrogiloidíase nesses locais.

A estrogiloidíase é altamente endêmica na África subsariana, havendo relatos de prevalência de 26% no Congo e de até 46% na República Centro-Africana. Na Nigéria, a prevalência de *S. stercoralis* varia entre 0,2% a 11,7% (GENTA, 1989; FERREIRA, 1991).

Nos países da América do Norte, a estrogiloidíase é de alta endemicidade no México (GENTA, 1989; FERREIRA, 1991) e no sudeste dos Estados Unidos (FERREIRA, 1991; LIU & WELLER, 1993; SIMPSON et al., 1993). Em Nova Iorque, há vários estudos mostrando elevação da prevalência nos últimos anos (GENTA, 1989), provavelmente devido às fortes correntes migratórias de países da A. Latina.

Na América Central, a Costa Rica apresenta índices variando entre 1,1% e 16,5% (GENTA, 1989); outros países de alta endemicidade são Porto Rico, Honduras e Panamá (FERREIRA, 1991).

Nos países da América do Sul (GENTA, 1989), existem vários estudos que mostram taxas discordantes, provavelmente também devidas às diferenças socioeconômicas e geográficas das populações investigadas. A taxa média de prevalência na Colômbia é de 16%; na Venezuela, 4,4%; e na Bolívia, de 1% a 3%.

No Brasil, a importância do *S. stercoralis* como agente etiológico da estrogiloidíase foi estudada primeiramente por Ribeiro da Luz, em 1880. A partir de então, vários trabalhos têm mostrado dados variáveis, de acordo com a região, havendo relatos de prevalência variando entre 13% e 82% (GENTA, 1989; MACHADO & COSTA-CRUZ, 1998), com uma taxa média de 20% (PEDRO et al., 1988). Essas variações ocorrem em função da idade da população estudada, bem como das diferenças geográficas e socioeconômicas. As maiores taxas foram observadas nos Estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (FERREIRA, 1991; PIRES & DREYER, 1993; NETO & ASSEF, 1996; MACHADO & COSTA-CRUZ, 1998). Nos países tropicais, devido à grande variedade climática e à topografia, a infecção por *S. stercoralis* resulta em variadas situações epidemiológicas (SHIWAKU et al., 1988).

1.2 - Aspectos clínicos da estrogiloidíase

As características clínicas desta geo-helmintíase estão ligadas a diversos fatores, como grau de infecção parasitária; estado nutricional do hospedeiro; ausência de outras parasitoses gastrointestinais; migração das larvas no ciclo pulmonar; permanência e multiplicação da fêmea partenogenética na mucosa intestinal e nos locais ectópicos e estado imunitário do hospedeiro. Em pacientes com doenças crônico-degenerativas associadas que induzem à imunossupressão ou à queda de resistência, os hospedeiros podem desenvolver estrongiloidíase na forma grave e fatal (LIU & WELLER, 1993; PIRES & DREYER, 1993; WOODRIG et al., 1994).

Nas infecções leves, o indivíduo é geralmente assintomático, o que ocorre em cerca de 30% a 50% dos casos, ou oligossintomático, quando o paciente apresenta apenas sintomas gastrointestinais. Nos indivíduos com grandes cargas parasitárias, as manifestações clínicas podem variar de leves a severas, inclusive com quadros de disseminação do parasita potencialmente fatais (ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997).

As manifestações clínicas cutâneas são assintomáticas, quando poucas larvas infectantes penetram no organismo. Porém, quando o número de parasitas é alto, os sintomas são variados, e o hospedeiro pode apresentar eritema, prurido, edema local com formações de lesões urticariformes, erupção na pele e placas eritemato-pruriginosas, com ou sem petéquias hemorrágicas (ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997; DIONISIO et al., 2000). Ocasionalmente, as larvas filarióides assumem trajeto errante, permanecendo no tegumento da região glútea ou lombar, fazendo migrações subcutâneas. São as larvas "migrans" ou larvas "currens". O quadro clínico é caracterizado por dermatite perianal de intenso prurido, com lesões únicas ou múltiplas, urticariformes, pápulas eritematosas e pruriginosas, de aspecto linear ou serpiginosas (PIRES & DREYER, 1993; GORDON et al., 1994; ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997).

Outros sintomas do hospedeiro relacionam-se com a migração e a muda das larvas e o rompimento dos capilares e alvéolos por estas. Frequentemente, é uma síndrome benigna, caracterizada por hemorragias intra-alveolares, tosse, expectoração, febre, mal-estar, dor torácica. Nas infecções intensas, a síndrome é maligna, com o paciente apresentado febre alta, tosse, dor torácica, asma, cefaléia, dispnéia, derrame pleural, expectoração mucopurulenta e sanguinolenta (PIRES & DREYER 1993; WOODRIG et al., 1994; GROVE, 1996; ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997).

Nas manifestações digestivas, os sintomas apresentados pelo homem são classificados em benignos-leves, benignos-moderados e graves. Os sintomas benignos-leves incluem enterite catarral, hemorragia, diarreia leve, anorexia, náusea, vômitos, pequenas úlceras, aumento da secreção de muco no intestino devido ao aumento das células secretoras de mucina e infiltrado mononuclear moderado (PIRES & DREYER, 1993; CHEN et al., 1994; REY, 2001). Os sintomas benignos-moderados caracterizam-se por enterite edematosa, edema da submucosa e da parede, atrofia da mucosa e alargamento das vilosidades devido à reação inflamatória (ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997; REY, 2001). Nos sintomas graves, a enterite é ulcerativa, com rigidez da parede intestinal devido ao edema e fibrose; a mucosa fica atrofiada e com grandes úlceras. Observa-se, também, diarreia persistente, com distúrbios hidroeletrólíticos, motilidade intestinal alterada, dor e tenesmo retal, síndrome de má absorção e desnutrição (PIRES & DREYER, 1993; CHEN et al., 1994; AL SAMMAN et al., 1999).

Na auto-infecção, as localizações extra-intestinais do parasita ganham importância nos indivíduos imunossuprimidos em razão de uma série de fatores como desnutrição, leucemias, linfomas, hanseníase, insuficiência renal crônica, neoplasias avançadas, uso de corticosteróides, AIDS e outros (GENTA et al., 1989; MOURA et al., 1989; BHATT et al., 1990; CONCLON et al., 1990; THOMPSON et al., 1991; DIAS et al., 1992; CELEDON et al., 1994; JAIN et al., 1994; WURTZ et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1996; DE PAULA et al., 2000). Nesses casos, devido à depressão da imunidade celular, ocorre aumento na geração de larvas filarioídes pelas fêmeas partenogenéticas, que ultrapassam a camada serosa intestinal e disseminam-se por todo o organismo. A queda de imunidade celular, juntamente com condições especiais do organismo do hospedeiro, tais como diverticulite, megacólon, hipotonia duodeno-jejunal, íleo paralítico, uso de antidiarréicos e constipação intestinal favorecem a auto-infecção e, em alguns casos, ocorre disseminação do parasita para vários órgãos como pulmão, fígado, coração, tireóide, adrenais, paratireoídes, pâncreas, linfonodos, rins, próstata, vesícula biliar, glândulas mamárias, SNC, etc. (MOURA et al., 1989; LUCAS, 1990; TAVARES-NETO et al., 1991; DIAS et al., 1992; GERMAN et al., 1992; DELAROCQUE et al., 1994; CELEDON et al., 1994; JAIN, 1994; WURTZ et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1999b). Os sintomas apresentados dependem do órgão parasitado. No entanto, pacientes com número normal de células

T, mas com hipogamaglobulinemia seletiva também apresentam estrongiloidíase disseminada (MURPHY et al., 1991; THOMPSON, 1991; CELEDON et al., 1994).

O óbito na estrongiloidíase sistêmica é em torno de 45%, sendo causado por complicações ou por infecções secundárias, como choque septicêmico, insuficiência respiratória, meningite, abscesso cerebral, embolia séptica, cujos agentes etiológicos são geralmente enterobactérias ou, eventualmente, fungos. As bactérias e fungos ganham acesso à circulação sistêmica carreados pelas larvas filarioídes, que transportam estes microrganismos tanto na superfície como no seu tubo digestivo (ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997). Essas infecções de origens bacterianas e fúngicas, muitas vezes, mascaram a estrongiloidíase (FERREIRA, 1991). Assim, na hiperinfecção por *S. stercoralis*, o paciente, por falta de um diagnóstico correto, pode evoluir a óbito mediante o aumento das lesões gastrointestinais e disfunção dos órgãos, em decorrência do aumento exacerbado do parasitismo (MOURA et al., 1989; DIAS, 1992; ANDRADE-NETO & ASSEF, 1997; COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

Dados da literatura sugerem que a morte e a expulsão de helmintos estão diretamente relacionadas à presença de determinadas citocinas, como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IFN- γ (YAMAGUCHI et al., 1988; COFFMAN et al., 1989; SHER et al., 1990; URBAN et al., 1991; KORENAGA et al., 1991; ELSE & GRENCIS, 1991; DESREUMAUX et al., 1992; ELSSES et al., 1992; ROMAGNANI, 1992; STELL & NUTMAN, 1993; LANGE et al., 1994; CAPRON & LAMKHIOUED, 1995; OVINGTON & BEHM, 1997). KORENAGA et al. (1995) demonstraram que camundongos infectados com *S. venezuelensis* ou *S. rattii*, na primeira infecção adquirem imunidade, e, na segunda infecção, tomam-se resistentes ao parasitismo. A resistência foi demonstrada pela diminuição da produção de ovos pelas fêmeas partenogenéticas de ambas as espécies, e os autores sugerem que esta resistência seja dependente da alta produção de interleucina IL-5 e do aumento de eosinófilos. ROTMAN et al., (1997) mostraram que camundongos imunizados com larvas infectantes mortas de *S. stercoralis* geram resposta imune do padrão Th₂, protetora contra uma eventual segunda infecção. Porém, quando os camundongos foram tratados com IL-12, a resposta imune mudou para padrão Th₁, e a imunidade protetora foi abolida. Esses mesmos autores verificaram que os camundongos tratados com IL-12 apresentaram diminuição no número de eosinófilos, enquanto os títulos de IgM e a ativação do complemento não foram alterados. Esses autores

sugerem que a redução dos eosinófilos tenha sido o principal fator responsável pela eliminação da imunidade protetora.

Nas infestações por *Strongyloides* sp, a participação do sistema complemento foi documentada em vários trabalhos. GROVE et al. (1985) demonstraram que células peritoneais de camundongos requerem complemento para aderirem às larvas L₃ de *S. rattii*. DE MESSIAS et al. (1994) relataram que antígenos de larvas filarióides de *S. stercoralis* ativam as vias clássicas e alternativas do sistema complemento, aumentando a aderência de monócitos do sangue periférico e células polimorfonucleares à superfície destas, lisando-as. Esses autores acreditam que o sistema complemento seja a primeira linha de defesa do hospedeiro nessa infecção. Também, ABRAHAM et al. (1995), BRIGANDI et al. (1996) e ROTMAN et al. (1997) demonstraram que larvas filarióides de *S. stercoralis*, após serem implantadas no intestino de camundongos, morrem por mecanismo dependente de IgM, complemento e eosinófilos.

ABRAHAM et al. (1995) relataram que camundongos infectados com *S. stercoralis* desenvolvem imunidade protetora mediada pelo aumento de IgA, IgG e IgM parasita-específico, e IgE parasita-específico e não específico (ABRAHAM et al., 1995). No entanto, em camundongos parasitados com *S. rattii*, só há aumento significativo de IgG e IgM associados com imunidade protetora (DAWKINS & GROVE, 1982), sendo que a depleção de IgE em camundongos não afeta o curso da infecção (KORENAGA et al., 1991). Também em ratos, títulos altos de IgG, mas não de IgE são importantes para a imunidade protetora contra *S. rattii* (UCHIKAWA et al., 1991). No homem com estrongiloidíase assintomática ou com sintomas leves, tem sido demonstrado aumento dos anticorpos da classe IgA, IgE e IgG antígenos específicos do parasita (GENTA, 1989b), embora nem sempre o aumento de IgA esteja relacionado à infecção (GENTA & WEIL, 1982; SATO et al., 1986; GENTA et al., 1986; GENTA et al., 1987; ROSSI et al., 1993b). Nesses casos, o aumento de IgE encontra-se associado a uma intensa eosinofilia. No entanto, estes pesquisadores sugerem que esses parâmetros não podem ser utilizados como indicadores de estrongiloidíase, uma vez que também aparecem em outras helmintíases (GENTA et al., 1987; DE MESSIAS et al., 1987; DOUTCH et al., 1990; ROSSI et al., 1993a; CUTTS & WILSON, 1997).

ATKINS et al. (1997) demonstraram que pacientes infectados com *S. stercoralis* apresentam níveis de IgG1 inversamente correlacionados com a idade dos indivíduos, e que o aumento da IgG4 e a diminuição da IgE facilitam o estabelecimento da infecção e cronificação da estrongiloidíase assintomática. No entanto, o aumento dos títulos de IgA pode estar controlando a infecção crônica e regulando negativamente a IgG1. Nas infecções crônicas, os hospedeiros apresentam aumento da produção IgG específicos, mas títulos baixos ou ausentes de anticorpos IgM e IgA.

Vários são os fatores imunológicos que podem estar envolvidos no recrutamento dos eosinófilos e outras células para o sítio inflamatório, auxiliando na proteção do hospedeiro contra a ação de helmintos e de outros agentes patológicos. Entre eles, podemos citar citocinas IL-1, IL-5, IL-8 (COLLINS et al., 1993; SANZS et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996), quimiocinas como eotaxina (GRIFFITHS-JOHNSON et al. 1993; BAGGIOLINI et al., 1998; POLFRAMAN et al., 1998; CULLEY et al., 2000), membros da família CC (YING et al., 1996; BECK et al., 1997), CXC (HAELENS et al., 1996, PONATH et al., 1996), mediadores lipídicos como PAF, LTB₄ (FACCIOLI et al., 1991), PGE₂, PGI₂ (CASTRO et al., 1987) e fatores C3a e C5a do complemento (ELSNER et al. 1994). Células como neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos alveolares, monócitos, basófilos, endotélio e epitélio são fontes desses mediadores, que podem ser liberados após estímulos (LOTNER et al., 1980; CAMUSSI et al., 1981; SAMUELSSON, 1983; LEWIS et al., 1984; SISSON et al., 1987; LARSEN & JACSON, 1996; PETERS-GOLDEN, 2001).

A eosinofilia sangüínea e intestinal está presente na maioria dos pacientes imunocompetentes com estrongiloidíase, tanto na infecção crônica como na severa. No entanto, nos indivíduos imunossuprimidos, o número de eosinófilos é baixo ou ausente (ALBUQUERQUE et al., 1990; DEES et al., 1990; GYORKOS et al., 1990; GERMAN et al., 1992; BRAUN et al., 1993; FISHER et al., 1993; PIRES & DREYER, 1993; WOODRIG et al., 1994; GORDON et al., 1994). Alguns autores sugerem que na estrongiloidíase, o hospedeiro apresenta combinações de fatores imunológicos tanto locais como sistêmicos, envolvendo a reposta humoral e celular que participam da resolução do parasitismo (GERMAN et al., 1992; WOODRING et al., 1994). Porém, dados recentes mostram que o parasita produz fatores inibitórios como proteases/metaloproteases e leucotrienos/prostaglandinas, que modulam as funções

efetoras dos eosinófilos (DAUGSCHIES & JOACHIM, 2000), permitindo sua sobrevivência e disseminação pelo organismo do hospedeiro.

O papel dos eosinófilos na resposta protetora do hospedeiro contra várias infecções parasitárias até o momento é controverso. É aceito por muitos que os eosinófilos têm como função principal a defesa contra organismos grandes, como os helmintos, os quais não podem ser fagocitados. Esta observação é baseada em resultados de experimentos *in vitro* com larvas de *S. mansoni* que foram lesadas após incubação com eosinófilos (BUTTERWORTH et al., 1977; McLAREN et al., 1978; RAMALHO-PINTO et al., 1978; CAPRON, 1992). Além disso, GLEICH et al. (1979) mostraram que os eosinófilos são ativados durante certas parasitoses, e o tratamento dos animais com soro anti-eosinófilos retarda a expulsão de nematódes. Outras observações *in vivo* têm mostrado correlação entre grande número de eosinófilos e helmintos vivos ou mortos (DOUCTH et al., 1986; SEITZ et al., 1987; WARD & MACLAREN, 1988; BEHM & OVINGTON, 2000). No entanto, outros pesquisadores não encontraram diferenças significativas na expulsão ou morte de parasitas em animais tratados com anticorpos específicos anti-IL-5 e, conseqüentemente, sem eosinófilos (SHER et al., 1990; URBAN et al., 1991; HERNDON & KAYES, 1992; PARSONS et al., 1993; FACCIOLI et al., 1996). Além disso, animais geneticamente deficientes de IL-5 e que possuem número de eosinófilos diminuído não apresentaram diferenças no número e localização de larvas de *Toxocara canis* (TAKAMOTO et al., 1993) e de *Trichinella spiralis* (HOKIBARA et al., 1998), recuperadas após infestação. Porém, em animais infectados com *S. venezuelensis* e *Angiostrongylus cantonensis* (KORENAGA et al., 1991; SASAKI et al., 1993), a recuperação de parasitas foi muito maior nos animais depletados de eosinófilos pelo tratamento dos mesmos com anticorpo anti-IL-5. Por outro lado, animais transgênicos, com superexpressão de IL-5 e que apresentam intensa eosinofilia quando infectados por *T. canis*, não mostraram diferenças no número de parasitas recuperados, quando comparados com animais não transgênicos (SUGANE et al., 1996).

Alguns autores têm relatado que helmintos como *S. mansoni* (PLEASS et al., 2000), *Fasciola hepatica* (BERASAIN et al., 2000), *Paragonimus westermani* (SHIN et al., 2001) e *Necator americanus* (CULLEY et al., 2000) produzem proteases, metaloproteases, leucotrienos e prostaglandinas (DAUGSCHIES & JOACHIM, 2000),

que direta e/ou indiretamente bloqueiam as funções efetoras dos eosinófilos no hospedeiro, permitindo que esses parasitas escapem da resposta imune mediada por esses granulócitos. Na estrogiloidíase humana ou animal, pouco tem sido feito no sentido de se esclarecer os mecanismos usados por esses nematódeos para escapar da resposta imune mediada por eosinófilos do hospedeiro.

Vários autores têm verificado, em roedores, a participação dos mastócitos de mucosa nos mecanismos de defesa e eliminação de helmintos intestinais como *Onchocerca volvulus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *T. spiralis*, *S. ratt*i e *S. venezuelensis* (OKU et al., 1984; NAWA et al., 1985; ABE & NAWA, 1988; GONZALES-MUNOZ et al., 1999). A presença de mastócitos de mucosa é regulada pelos linfócitos T, principal fonte de IL-3, uma das citocinas responsáveis pela proliferação e ativação dessas células.

A importância da IL-3 na indução da mastocitose foi explicada por ABE & NAWA, (1988); ABE et al. (1992); ABE et al. (1998), utilizando-se camundongos nu/nu infectados com *S. ratt*i e tratados com IL-3. Esses autores verificaram a expulsão do parasita, juntamente com mastocitose. Porém, em camundongos nude co-infectados com *S. ratt*i e *N. brasiliensis* e tratados com IL-3, somente *S. ratt*i foi expulso (ABE et al., 1992). ABE et al. (1993) verificaram que camundongos C57BL/c imunologicamente competentes e pré-tratados com IL-3 exógena eram protegidos contra *N. brasiliensis*. Esses autores, tratando esses camundongos com diferentes doses de IL-3 recombinante antes da infecção com *S. ratt*i, observaram redução no número de vermes intestinais. Porém, quando esses animais foram infectados oralmente com larvas desse parasita, observaram mastocitose e aumento de proteases específicas de mastócitos de mucosa “MMCP-1”, relacionados à eliminação do parasita intestinal, mas não afetando a migração das larvas nos tecidos.

MARUYMA et al. (1997; 2000 a,b,c) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, que formas parasitas de *S. venezuelensis* fixam-se à mucosa intestinal secretando substâncias adesivas pela boca, as quais são inibidas por carboidratos sulfatados liberados de mastócitos. Assim, parece que a expulsão dos enteroparasitas depende do tipo de produtos excretados/secretados (proteases) pelos parasitas (GALLI, 1990; HORII et al., 1993), da espécie e da linhagem do roedor, o que afetaria sua capacidade ou não de responder ao estímulo enviado pelo parasita. Esta capacidade

ou não de resposta dependeria da produção de IL-3 e fator estimulador de células “SCF” (ABE et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1998), da expressão fenotípica dos mastócitos de mucosa e do tipo de proteoglicana produzida por essas células (NAWA et al., 1994; SHI et al., 1994), das características físico-químicas naturais das mucinas liberadas pelas células caliciformes (ISHIKAWA et al., 1995) e outros fatores derivados das células T, como IL-4, IL-9 e IL-10, produzidos quando estimulados por helmintos (KITAMURA et al., 1993).

A infecção por *S. stercoralis* é agressiva para o hospedeiro, com penetração do verme nas criptas intestinais, infiltração de mastócitos, eosinófilos e células IgE na lâmina própria e diminuição significativa da IgA e de IgM, principalmente nos pacientes sintomáticos graves. Os pacientes com infecção sintomática leve ou moderada não apresentam aumento de linfócitos T nem de células apresentadoras de antígeno na mucosa intestinal. É possível que *S. stercoralis* tenha uma estratégia de sobrevivência que dependa de fatores de inibição da imunidade, mediada por células e diminuição da proteção do hospedeiro, resultando na queda da tolerância e disseminação da infecção (FOGAÇA et al., 1990; TRAJMAN et al., 1997; ELIA, 2001).

1.3 – Diagnóstico da estrogiloidíase

Na grande maioria dos indivíduos, *S. stercoralis* é encontrado em número muito reduzido, devido à baixa e irregular liberação das larvas nas fezes. Nas infestações moderadas, pode não haver mais que 25 larvas por g/fezes. Por isso, o diagnóstico da estrogiloidíase pelo exame de fezes é pouco sensível (LIU & WELLER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

Para melhorar a sensibilidade dos métodos parasitológicos, tem sido necessária a colheita de até sete amostras fecais, sugerindo uma flutuação da excreção larval durante a evolução da infecção. Este fato constitui um problema constante no controle da cura dessa doença em pacientes após o uso de quimioterápicos (DREYER et al., 1996; PATIL et al., 1999; UPARANUKRAW et al., 1999), pois os pacientes podem ter infecção crônica, e esta não ser diagnosticada com o uso de métodos parasitológicos tradicionais. Vários estudos têm demonstrado que a sensibilidade dos exames de fezes varia de 15 a 24%, elevando-se para 55% a 78% com a utilização de três amostras colhidas em dias consecutivos. Para aumentar a

sensibilidade mediante o exame de fezes, pode-se recorrer aos métodos de cultivo das formas larvárias do parasito, utilizando-se meios de cultura especiais, mas estes métodos são trabalhosos e inviáveis na rotina laboratorial (LINDO et al., 1994; SATO et al., 1995).

As formas larvárias nas fezes podem ser visualizadas em esfregaço fecal direto realizado com solução salina ou pelos métodos de concentração formol-éter (Apud PESSOA, 1978), método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), de Rugai (Apud PESSOA, 1978), de cultura em papel de filtro (Apud REY, 2001) e de cultura em placa de ágar. Os métodos de maior sensibilidade para detecção de larvas são o Baermann-Moraes e o Rugai, que se baseiam no hidro e termotropismo positivo das larvas e têm como vantagens a simplicidade e rapidez de execução. A maior desvantagem é a necessidade de fezes frescas, não utilizadas na rotina laboratorial (LIU & WELLER, 1993; GROVE, 1996; VAN DE FELTZ et al., 1999; COSTA-CRUZ, 2000).

O diagnóstico precoce da estrogiloidíase é fundamental, pois o tratamento nas fases iniciais pode prevenir formas mais graves desta infecção, bem como sua disseminação em pacientes com imunossupressão (MOURA et al., 1989; SIDDIQUI et al., 1997). Por isso, métodos de detecção de anticorpos específicos em amostras de soro, utilizando-se testes imunológicos tais como imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático (ELISA) e "Western blotting" têm sido utilizados com esse objetivo. A detecção precoce da estrogiloidíase é importante para os pacientes do grupo de risco, pois além de os exames de fezes apresentarem baixa sensibilidade, existem variáveis envolvidas na execução da técnica. Além disto, muitas vezes, o diagnóstico é realizado tardiamente, quando o paciente já apresenta as formas graves da doença (BAILEY, 1989; COSTA-CRUZ, 2000). Outra aplicação do diagnóstico sorológico é no controle do tratamento de indivíduos com infecções crônicas, antes que manifestações sistêmicas como bacteriemia ou pneumonite ocorram (GROVE & BLAIR, 1981; SATO et al., 1995).

O imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana tem sido direcionado preferencialmente para detecção de anticorpos da classe IgG que reconheçam antígenos somáticos das larvas. Tais testes são mais sensíveis que o exame parasitológico, mas não são capazes de diferenciar a infecção crônica da infecção aguda (BRASIL et al., 1988; CONWAY et al., 1993b; ROSSI et al., 1993b; LINDO et

al., 1994; ATKINS et al., 1997). Assim, diferentes testes imunológicos para detecção de anticorpos foram desenvolvidos, entre eles, o teste intradérmico (PELLEGRINO et al., 1961; NEVA, et al., 2001); aglutinação indireta (SATO et al., 1991), hemaglutinação indireta (GAM et al., 1987), radioimunoabsorção (DE MESSIAS et al., 1987; SATO et al., 1995); reação de imunofluorescência (COUDERT et al., 1968; DAFFALA, 1972; GROVE & BLAIR, 1981; GENTA & WELL, 1982; CAMPOS et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1997; COSTA-CRUZ et al., 1999a; MACHADO et al., 2001), ELISA (BERJAK, 1975; GILL et al., 1979; LEÃO et al., 1980; CARROL et al., 1981; NEVA et al., 1981; GENTA et al., 1986; MCRURY et al., 1986; GAM et al., 1987; BRASIL et al., 1988; GENTA, 1988; GENTA et al., 1988; CONWAY et al., 1993a; ROSSI et al., 1993b; LINDO et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1999; COSTA-CRUZ et al., 2000), "Immunoblot" (GENTA et al., 1988; GENTA & LILLIBRIDGE, 1989; SATO et al., 1990; CONWAY et al., 1993b; LINDO et al., 1994; CONWAY et al., 1994; UPARANUKRAW et al., 1999; ATKINS et al., 1999) e a técnica de DNA recombinante (SIDDIQUI et al., 2000a,b).

Extratos antigênicos de *Strongyloides* de roedores (*S. ratti* e *S. venezuelensis*) foram comparados com os de *S. stercoralis*, e observou-se que as duas espécies podem ser utilizadas para obtenção de antígenos heterólogos para o diagnóstico sorológico, em substituição ao antígeno de *S. stercoralis*, provendo uma fonte constante e segura de antígeno em laboratório (GROVE & BLAIR, 1981; SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997). Assim, COSTA-CRUZ et al. (1997), padronizaram um teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico da estrogiloidíase humana, empregando antígenos de *S. stercoralis* e *S. ratti*. Estes autores sugerem o uso do segundo antígeno, pela facilidade de sua obtenção em laboratório, uma vez que não houve diferença significativa entre a sensibilidade e a especificidade nos testes utilizando diferentes antígenos, e por este mostrar correlação linear entre os títulos de anticorpos, quando empregados antígenos homólogos e heterólogos. COSTA-CRUZ et al. (1999) padronizaram o teste de ELISA para detecção de IgG, usando extrato salino e alcalino de *S. ratti*. MACHADO et al. (2001) verificaram que o teste de imunofluorescência indireta, usando antígeno particulado das linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% e 96,6% respectivamente, podendo ser utilizado com segurança no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A estrogiloidíase humana torna-se cada vez mais importante devido ao aumento do número de indivíduos imunossuprimidos em decorrência de fatores como: disseminação do vírus da AIDS, aumento de transplantes de órgãos, uso de corticóides, aumento do consumo de bebidas alcóolicas, de drogas e da desnutrição. Sabemos que nesta parasitose alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros apresentam sintomas leves com cura espontânea, e outros, ainda, parasitose disseminada. Os sintomas do hospedeiro são variados, porém não se sabe, até o presente momento, se as diferenças nas manifestações clínicas seriam decorrentes de fatores ligados ao hospedeiro ou se estariam relacionadas à infectividade das linhagens de *Strongyloides* sp. Uma das hipóteses é de que a variação nos sintomas do hospedeiro poderia estar ligada à capacidade do sistema imunológico de desenvolver ou não uma resposta imune contra o parasita e curar a infecção. Outra hipótese é de que diferenças de infectividade das linhagens resultariam em menor ou maior sintomatologia. Como tem sido demonstrado em diversos trabalhos, a infecção por helmintos estimula a produção de anticorpos e de eosinófilos, os quais, em alguns modelos experimentais, auxiliam na expulsão do parasita. Porém, na estrogiloidíase, as funções dos anticorpos e dos eosinófilos ainda não são totalmente compreendidas, uma vez que, em alguns casos, estes elementos da resposta imune estão elevados enquanto em outros estão baixos ou mesmo ausentes. Até o momento, não existem dados na literatura que expliquem esses fenômenos.

Com o propósito de melhor compreender os fatores que influenciam a relação parasita-hospedeiro, tivemos como objetivos:

1. Verificar se larvas de linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*, obtidas de diferentes roedores silvestres e mantidas em ratos de laboratório, modificam sua infectividade, induzindo variações nas respostas imunes inata e adquirida em camundongos.

2. Verificar se larvas da linhagem L-2 de *S. venezuelensis*, mantidas em ratos de laboratório, induzem variação nas respostas imunes inata e adquirida em camundongos, após serem cultivadas em tempos e temperaturas diferentes.
3. Em camundongos infectados com a linhagem L-2 de *S. venezuelensis*, verificar a participação dos leucotrienos na indução da eosinofilia sistêmica, peritoneal e pulmonar; na modulação da liberação das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ no pulmão e na fecundidade do parasita.
4. Verificar se os antígenos obtidos pelo método de extração alcalina de oito linhagens diferentes de *S. venezuelensis*, isoladas de roedores silvestres e mantidas por passagens sucessivas em ratos de laboratório, apresentam diferenças quanto às suas características antigênicas.

CAPÍTULO I

Comparação da resposta imune de camundongos infectados com duas linhagens L-2 ou L-49 de *Strongyloides venezuelensis*.

Running title: Resposta imune por linhagens de *S. venezuelensis*

*E. R. MACHADO, *M. T. UETA, *E. V. LOURENÇO, #F. F. ANIBAL., *J. B. A. OLIVEIRA, *M. C. ROQUE-BARREIRA, #L. H. FACCIOLI.

*Departamento de Parasitologia - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - SP., Brasil.

*Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP., Brasil.

#Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SP., Brasil.

#Autor para correspondência: Lúcia Helena Faccioli. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SP., Brasil. E-mail: faccioli@fcrp.usp.br

OBS: O trabalho será submetido a revista "Int. J. Parasitology".

RESUMO

No presente estudo comparamos as respostas imunes inata e adquirida de camundongos infectados com linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Camundongos machos, Swiss, pesando entre 12 a 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram subdivididos em três grupos: G1: animais controles não infectados; G2: animais infectados com L-2; G3: animais infectados com L-49. Os animais receberam, por injeção subcutânea, 1500 larvas filarióides recuperadas de culturas de fezes, mantidas por 7 dias a 28°C. Nos 1º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º dias após infecção, os animais foram sacrificados e foi analisado o aumento de células inflamatórias no sangue e seu recrutamento para a cavidade peritoneal (LCP) e espaço broncoalveolar (LBA), a produção de citocinas nos pulmões e a concentração de IgG no soro. Nos 5º e 7º dias após infecção o número de ovos/g/fezes e de fêmeas parasitas também foram determinados. Houve aumento significativo semelhante de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares no sangue, LCP e LBA dos animais infectados com ambas linhagens durante os períodos observados. As duas linhagens induziram produção de IgG, porém esta foi significativamente maior para L-2. Linhagens desse parasita induziram síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂ da resposta imune, porém com maior tendência para o padrão TH₂. A linhagem L-2 induziu precoce e maior síntese de IL-4, IL-5 e IFN- γ . O número de ovos/g/fezes e fêmeas parasitas recuperadas dos animais infectados com a linhagem L-2 foi menor. Os resultados mostram que as linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* apresentam diferente grau de infectividade, induzindo resposta imune inata semelhante, porém resposta imune adquirida diferente.

Palavras chave: *S. venezuelensis*, estrongiloidíase, imunoglobulinas, citocinas, linhagens, eosinofilia, leucócitos, células mononucleares, camundongos, fêmeas partenogenéticas.

INTRODUÇÃO

Strongyloides sp (Grassi, 1879) parasitam a mucosa do intestino delgado de diversos vertebrados e são conhecidas aproximadamente 54 espécies do gênero (1). Este enteroparasito é o único, cuja forma parasitária adulta é a fêmea partenogenética, e que realiza um ciclo de vida duplo com uma ou mais gerações de vida livre com machos e fêmeas. A geração de machos e fêmeas de vida livre dá-se pelo ciclo indireto (heterogônico) e de larvas filarióides pelo ciclo direto (homogônico). A infecção se dá por penetração da larva L3 na pele (2).

A estrongiloidíase humana é uma infecção causada pelo *S. stercoralis*. Este parasita apresenta distribuição mundial, com maior frequência nas áreas tropicais e subtropicais (3). A maioria dos indivíduos com esta parasitose são assintomáticos (30 a 50% dos casos) ou oligossintomáticos, com sintomas gastrointestinais (4). Nas infecções com grande carga parasitária, as manifestações podem variar de leves a severas, podendo ocorrer disseminação do parasita e ser potencialmente fatais (5). Nos indivíduos imunossuprimidos, como nos quadros de desnutrição, leucemias, linfomas, AIDS e principalmente pelo uso de corticóides (6,7,8,9) pode ocorrer hiperinfecção, com uma taxa de óbito de aproximadamente 80% dos pacientes (5,10).

No entanto, apesar de os sintomas da estrongiloidíase serem variados, e sendo esta infecção algumas vezes fatal, pouco tem sido investigado sobre as causas destas variações. As diferenças nas manifestações clínicas no indivíduo parasitado parece ser devido à existência de diferentes linhagens de *Strongyloides* sp (11). Essas linhagens, isoladas de diferentes hospedeiros naturais, evoluem para o ciclo direto e/ou indireto, gerando larvas filarióides com grau de infectividade variado. Neste caso, quando o hospedeiro se infecta com linhagem não virulenta, desenvolve uma infecção assintomática com cronificação. Por outro lado, se a infecção se dá com linhagens de baixa ou alta virulência, o hospedeiro desenvolve a estrongiloidíase sintomática e/ou a síndrome da hiperinfecção, respectivamente (12).

Dados da literatura têm mostrado que *S. stercoralis* de cão apresenta morfologia e biologia indistinguível do *S. stercoralis* humano. As linhagens isoladas do homem podem infectar cães e linhagens de cães podem infectar humanos (13). Outras observações têm mostrado que linhagens de *S. stercoralis* isoladas do

homem podem também infectar o macaco *Erythrocebus patas* (14) e o gerbil *Meriones unguiculatus* (8). Por outro lado, *S. fülleborni*, originalmente descritos como parasitas de babuínos e chimpanzés da África, também são capazes de infectar o homem (15), enquanto a forma *S. fülleborni kellyi*, tem sido documentada como importante parasita de recém-nascidos e crianças na Papua Nova Guiné (16). Além de uma mesma espécie ser capaz de desenvolver-se em diferentes hospedeiros, tem sido demonstrado que linhagens dentro da mesma espécie de *S. ratti* podem apresentar diferenças na rota do ciclo evolutivo. Algumas linhagens realizam exclusivamente o ciclo homogônico, outras linhagens mostraram mistura no desenvolvimento do ciclo homogônico e heterogônico (17). Esses trabalhos sustentam hipóteses prévias a respeito da existência de clones de *Strongyloides* (11) e sugerem que estas variações estejam correlacionadas com as diferentes origens geográficas e diferentes hospedeiros.

Resultados da literatura mostram que infecções de ratos com linhagens homogônicas e heterogônicas apresentaram diferenças no tempo de migração das L3 no hospedeiro, sendo que as L3 homogônicas atingem os órgãos alvo como pulmões e intestino delgado em menos tempo (18). A resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro contra *Strongyloides* sp é caracterizada por eosinofilia sistêmica (19), mastocitose intestinal (20,21), aumento na produção de citocinas do padrão TH₂ como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (22,23,24) e de anticorpos IgA, IgE, IgG e IgM (1,25,26). Porém, até o momento, não foi esclarecido se linhagens de *Strongyloides* obtidas de diferentes hospedeiros silvestres e submetidas a passagens sucessivas em ratos adquirem ou não um diferente grau de infectividade, induzindo sintomas e resposta imune variados no hospedeiro.

Assim, tivemos como objetivo estudar se passagens sucessivas de linhagens de *S. venezuelensis* em ratos poderiam influenciar na infectividade do parasita, induzindo resposta imune inata e adquirida diferenciadas em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 12 a 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - SP e do Biotério da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP-USP). Os animais tiveram acesso livre a água e alimento. Os procedimentos adotados nos experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo nº 19-2).

Parasitas: As linhagens de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) foram isoladas de roedores silvestres, sendo a linhagem L-2 (abril de 1986) de *Bolomys lasiurus*, e a L-49 (agosto de 1988) de *Nectomys squamipes*. Ambas linhagens foram mantidas em *Rattus norvegicus* Wistar experimentalmente infectados no laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Infecção dos animais: Larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis* foram obtidas de fezes de ratos infectados e cultivadas em carvão animal, por 7 dias a 28°C, segundo Looss (27). As larvas foram recuperadas pelo método de Rugai (28). Após quantificação das L3, os camundongos foram infectados com 1500 larvas por via subcutânea (s.c.) e sacrificados nos dias 1º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º após infecção. Foram utilizados nove camundongos por ponto analisado e os experimentos foram repetidos duas vezes.

Contagem de ovos por gramas de fezes: Nos dias 5, 7 e 14 após infecção os animais foram colocados individualmente para defecarem sobre papel toalha limpo e úmido. A estimativa do número de ovos/g/fezes foi feita utilizando-se o método quantitativo de Cornell-McMaster (29). Os exames parasitológicos foram repetidos duas vezes e foi considerada a média dos resultados obtidos.

Contagem das fêmeas parasitas: Para contagem dos vermes adultos parasitas, os camundongos foram sacrificados após anestesia com solução de Thionembutal e um fragmento do intestino delgado medindo 10 cm foi removido, colocado em placa de Petri contendo salina, seccionado longitudinalmente e incubado a 37°C por 2 h. A contagem das fêmeas parasitas adultas foi realizada segundo Sato (30).

Produção do extrato alcalino: Extrato alcalino de 100.000 larvas L3 de ambas linhagens de *S. venezuelensis* foi preparado adicionando-se 1,5 mL de NaOH 0,15 M (Merck, Germany) e 150 µL de fenilmetilsulfonila [PMSF (Sigma Chemical. Co, St. Louis, MO, USA)], mantendo-se a mistura sob agitação lenta por 18 h a 4°C. Subseqüentemente, adicionou-se de HCl 0,3 M (Merck, Germany), até atingir pH aproximado de 7,0. Esta preparação foi centrifugada a 10000 g por 30 min a 4°C. A dosagem protéica dos sobrenadantes foi realizada utilizando-se o método do Coomassie, conforme instruções do fabricante (Fluka, USA).

Contagem de células do sangue: Os camundongos foram anestesiados com Thionembutal [0,25 mg/g (North Chigaco, Illinois, USA)] e amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca. Para contagem total das células, 20 µL do sangue foram diluídos em 380 µL de solução de Turk. A contagem foi feita em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaço sangüíneo corado por Rosenfeld, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, segundo Faccioli e colaboradores (31).

Lavado broncoalveolar: Os camundongos foram sacrificados após anestesia com solução de Thionembutal, e 1 mL de solução salina fosfatada (PBS) contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/SC) a temperatura ambiente, foi injetado nos pulmões por cânulas de poliestireno introduzidas na traquéia. As células presentes no lavado broncoalveolar (LBA) foram recolhidas imediatamente. O procedimento foi repetido duas vezes. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaço preparado em citocentrífuga e corado por Rosenfeld. A contagem de leucócitos no LBA foi realizada como descrito anteriormente (31).

Células peritoneais: As células da cavidade peritoneal (LCP) foram obtidas pela lavagem da cavidade com 3,0 mL de PBS/SC, empregando-se uma seringa de 3 mL. Somente 2 a 2,5 mL do fluido foram recolhidos para contagem das células, conforme descrito anteriormente (31).

Obtenção e homogeneização do pulmão: Os pulmões dos animais parasitados ou não com *S. venezuelensis* foram retirados, lavados com salina, secos em papel de

filtro e pesados. Após pesagem, os pulmões foram colocados em tubos de homogeneização de células com 1 mL de PBS pH 7,4, no gelo e homogeneizados a 2000 g por 5 min a 4°C, utilizando-se um homogeneizador de órgãos (Polytron Homogenizer, Brinkmann). Após centrifugação, os sobrenadantes foram distribuídos em alíquotas e congelados a -20°C.

Dosagem de citocinas: A quantificação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ nos homogeneizados dos pulmões foi realizada por ensaio imunoenzimático, segundo instruções do fabricante (PharMingen, San Diego, CA). A concentração de cada citocina nas amostras foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir da curva padrão realizada para cada citocina e os resultados foram expressos em pg por mg de tecido (pg/mg). Placas de poliestireno de 96 poços (Costar) foram incubadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IL-4 (BVD4-1D11, 1 μ g/ml), anti-IL-5 (TRFK-5, 500 μ g/ml), anti-IL-10 (JES5-2A5, 1 μ g/ml), anti-IL-12 (C15.6, 1 μ g/ml) ou anti-IFN- γ (XMG1.2, 1 μ g/ml), diluídas em tampão carbonato com pH 9,0 e incubadas por 18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes (3x) com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween [PBS-T (PBS 1x + 0,05% Tween)] e depois incubadas com tampão de bloqueio (TB) [PBS-T + BSA 1% (m/v)], por 2 h a temperatura ambiente (TA). Após lavadas (3x) com PBS-T, as placas foram incubadas com 100 μ L dos homogeneizados ou com as citocinas recombinantes para obtenção da curva padrão (PharMingen). As concentrações das citocinas diluídas em TB variaram de 0,48 a 5.000 pg/ml. Após incubação por 18 h a 4°C, as placas foram lavadas (3x) com PBS-T e incubadas com o anticorpo biotinilado para detecção das respectivas citocinas diluído em TB. Após 2 h de incubação a temperatura ambiente (TA), as placas foram novamente lavadas com PBS-T, receberam 100 μ L do reagente AB (Avidina/Biotina) na concentração de 0,5 mg/mL e foram incubadas por 1 hora a TA. Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada adicionando-se 100 μ L da solução de substrato contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina [TMB (Genzyme Diagnostics)], e as placas foram então incubadas por 5 a 30 min a TA e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ L de ácido sulfúrico (1N de H₂SO₄), e os valores da absorbância foram determinados em leitor de ELISA (Metertech Inc., modelo 960) a 490 nm.

Quantificação de imunoglobulina no soro: O nível de IgG específica no soro de camundongos foi determinado por ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo instruções do fabricante (LGC Scientific Supply, Inc). As concentrações da IgG total foram calculadas pela Unidade Relativa de Luz (URL). Foram usadas placas opacas de 96 poços e de alta afinidade (Corning Science Products). As placas foram incubadas com 1 µg/ml (50 µL/poço) do extrato proteico de *S. venezuelensis* diluído em tampão carbonato (Tc) pH 9.6 por 18 h a 4°C. Após lavagem (2x) com PBS-T (PBS 1x + 0,05% Tween), as placas foram incubadas com solução de bloqueio PBS-T + BSA 1% (m/v) [PBS -T + BSA], por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionadas as amostras de soro diluído 1/100, sendo IgG total de coelho usada como controle da reação, todos diluídos em (PBS-T + BSA) e incubados por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas (5x) e receberam anticorpo monoclonal secundário conjugado com (HRPO) na concentração de 1/5000 diluído em (PBS-T + BSA) e foram então novamente incubadas por 2 h a 37°C. Após lavagem (8x) foi adicionada a solução reveladora (Kit Trial - Super Signal Chemiluminescente, Pierce) na concentração de 1/8 diluída em Tc e realizou-se a leitura no leitor de quimioluminescência (EG&G Berthold, Gaithersburg, MD).

Análise estatística: Os resultados foram analisados estatisticamente usando o método Student t test. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Análise comparativa do aumento de leucócitos circulantes em camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*

A Fig. 1 mostra qualitativa e quantitativamente o aumento de leucócitos no sangue de camundongos em resposta à infecção s.c com larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. O número de leucócitos totais no sangue foi significativo para ambas linhagens, quando comparado com o grupo de animais controle ($2,79 \pm 0,66 \times 10^6$). O pico da leucócitos nesses animais foi no 3º dia após da infecção e o número de leucócitos estava diminuído nos demais tempos estudados

(Fig. 1A). As linhagens L-2 e L-49 induzem número semelhante de leucócitos totais no sangue.

A eosinofilia induzida pelas linhagens L-2 ou L-49 no sangue está demonstrada na Fig. 1B. Observa-se que o aumento do número de eosinófilos no sangue foi tempo-dependente para ambos os grupos infectados, quando comparados com o grupo de animais controle ($0,24 \pm 0,05 \times 10^5$), sendo o pico no 21º dia após infecção, porém não houve diferença significativa entre as linhagens na indução da eosinofilia.

As células mononucleares também apresentaram-se aumentadas no sangue nos dois grupos de animais infectados, quando comparados com os animais controle ($2,35 \pm 0,24 \times 10^6$), a partir do 3º dia da infecção (Fig. 1C). O pico destas células foi observado no 14º dia, porém sem diferença significativa na indução destas células por estas linhagens.

Os resultados mostram que linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* apresentam diferenças de infectividade no aumento de leucócitos totais e eosinófilos no sangue nos primeiros dias da infecção.

Análise comparativa do influxo de células inflamatórias para a cavidade peritoneal de camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*

O influxo de leucócitos totais para a cavidade peritoneal foi tempo-dependente (Fig. 2A), sendo o pico destas células no 14º dia, quando comparados com os animais controle ($0,67 \pm 0,09 \times 10^6$). O número de leucócitos nos animais infectados com L-2 foi significativamente menor no 1º e 14º dia após infecção, em comparação com animais infectados com L-49.

O recrutamento de eosinófilos para a cavidade peritoneal foi significativo e tempo-dependente em resposta à infecção, a partir do 5º dia para L-2 e em todos os períodos analisados para L-49, quando comparado com os animais do grupo controle ($0,11 \pm 0,03 \times 10^5$). O pico destas células foi observado nos animais infectados com L-49 no 14º dia e com L-2 no 21º (Fig. 2B). Nos animais infectados com L-2 o número destas células estava diminuído, quando comparado com animais infectados com L-49 somente no 3º dia.

O número de células mononucleares na cavidade peritoneal também foi maior que no grupo controle ($0,64 \pm 0,12 \times 10^6$) e tempo-dependente, a partir do 3º dia da infecção para ambos os grupos de animais infectados. O pico destas células foi observado no 14º dia, nos dois grupos (Fig. 2C). Neste compartimento, as linhagens L-2 e L-49 induziram de forma semelhante a migração destas células.

Estes resultados mostram que as linhagens L-2 e L-49 induzem de forma semelhante o aumento de células inflamatórias no LCP, sugerindo que diferentes linhagens de *S. venezuelensis* não variam em sua infectividade e não influenciam a resposta celular inflamatória na cavidade peritoneal.

Análise comparativa do influxo de células inflamatórias para o LBA de camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*

Como demonstrado na (Fig. 3A), larvas filarióides de *S. venezuelensis* induziram recrutamento significativo de leucócitos totais para o LBA, quando comparados com o grupo de animais controle ($0,97 \pm 0,08 \times 10^5$), sendo o pico destas células no 14º dia para ambos os grupos de animais infectados. Observou-se que as linhagens induzem migração celular semelhante.

No LBA a eosinofilia foi significativa nos animais infectados com L-2 a partir do 3º dia da infecção, enquanto com L-49 isto ocorreu a partir do 5º dia, quando comparados com os animais controle ($0,01 \pm 0,01 \times 10^5$). O pico destas células para ambas as linhagens foi observado no 14º dia (Fig. 3B). Observa-se que ambos os grupos de animais infectados induziram de forma semelhante a migração de eosinófilos para o LBA.

A migração das células mononucleares para o espaço broncoalveolar (Fig. 3C), aumentou de forma significativa a partir do 3º dia após infecção para ambos os grupos de animais infectados, quando comparados com o grupo controle ($0,13 \pm 0,11 \times 10^6$), sendo o pico para L-2 no 14º dia e no 7º dia para L-49 (Fig. 3C). Comparando o número destas células entre os animais infectados, observa-se diminuição significativa para os animais infectados com L-2 somente no dia 7º após infecção.

Os resultados mostram que as linhagens L-2 e L-49 induzem de forma semelhante e significativa migração de células inflamatórias para o LBA, sugerindo

que a origem das linhagens deste parasita não influencia na sua infectividade e na indução de resposta celular no hospedeiro.

Influência das linhagens *S. venezuelensis* na fertilidade e expulsão das fêmeas parasitas

Nas Fig. 4 e 5 são demonstrados, respectivamente, os números de fêmeas parasitas e de ovos/g/fezes, recuperados de animais infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. A média do número de fêmeas parasitas recuperadas no 5º dia após infecção dos animais parasitados com L-2 ou L-49 foi respectivamente 197 ± 7 e 148 ± 14 , sendo significativamente maior para a linhagem L-2. No 7º dia, a média foi de 426 ± 15 e 564 ± 12 , sendo significativamente maior (24%) para L-49 (Fig. 4) e no 14º dia apenas 6 fêmeas foram recuperadas para a L-49. Nestes animais, a contagem do número de ovos/g/fezes também foi realizado no 5º e 7º dia após infecção (Fig. 5). A média do número de ovos/g/fezes foi de $11,3 \pm 5,9 \times 10^3$ e $11,1 \pm 3,3 \times 10^3$ no 5º dia e de $30,7 \pm 6,9 \times 10^3$ e $36,0 \pm 8,5 \times 10^3$ no 7º dia para L-2 e L-49, respectivamente. No 14º dia após infecção o número de ovos por gramas de fezes foi zero para as duas linhagens. Embora no 7º dia o O.P.G. tenha sido 5% maior para L-49, por este parâmetro não houve diferença entre as duas linhagens. Estes resultados mostram que maior quantidade de fêmeas parasitas da linhagem L-49 de *S. venezuelensis* fixaram melhor no hospedeiro e consequentemente eliminaram maior número de ovos.

Influência das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis* na indução da síntese de anticorpo

A IgG específica foi quantificada no soro dos animais sacrificados no 21º dia após infecção com larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 e no grupo controle (Fig. 6). A concentração da IgG no soro foi significativamente maior para ambos os grupos de animais infectados, quando comparados com os animais controle. A linhagem L-2 induziu de forma significativa maior produção de IgG (33%), quando comparado com L-49 ($p < 0,001$). Estes resultados sugerem que a linhagem L-2 de *S. venezuelensis* é mais infectante que a L-49 na indução da síntese da resposta humoral.

Influência das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis* e seu efeito na síntese de citocinas

O perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ foi determinado no homogeneizado de pulmão de camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis* e de animais controle (0,2 pg/mg de tecido) não infectados (Fig. 7 e Fig. 8). Níveis significativos de IL-4 foram observados durante todos os tempos observados (Fig. 7A) para ambas as linhagens. Nos animais infectados com a linhagem L-2, picos de IL-4 foram observados no 1º e no 7º dia após infecção, e nos animais infectados com L-49 no 5º e 7º. Não houve diferença significativa na indução da síntese desta citocina pelas duas linhagens. Os resultados mostram que a linhagem L-2 induz precoce e maior síntese desta citocina (33%). Também, os níveis de IL-5 nos camundongos infectados foram significativos (Fig. 7B), quando comparados com os animais controle (0,5 pg/mg de tecido). O pico na concentração desta citocina foi observado no 7º dia após infecção para ambas as linhagens. Porém, observa-se que a linhagem L-2 induziu, de forma significativa, maior produção de IL-5 (72%) do que a L-49 nos primeiros dias após infecção. A Fig. 7C mostra aumento significativo da citocina IL-10 em todos períodos analisados, quando comparados com animais controle (2,5 pg/mg de tecido). Porém, os dados mostram que a linhagem L-49 induz maior síntese desta citocina no 1º e 3º dia após infecção (14%), enquanto a L-2 apresenta maior síntese somente no 14º dia. Nos demais dias houve homogeneidade entre os valores da IL-10 para ambos os grupos experimentais. Assim como observado na síntese de IL-4, IL-5 e IL-10, animais infectados com a linhagem L-2 ou L-49 também apresentaram aumento significativo na síntese de IL-12 durante toda a infecção (Fig. 8A) quando comparados com animais controle (0,8 pg/mg de tecido). Estes resultados mostram que as duas linhagens de *S. venezuelensis* induzem, de modo geral, síntese semelhante de IL-12, porém no primeiro dia esta citocina foi maior para L-49 (14%). Também o nível de IFN- γ no homogeneizado de pulmão (Fig. 8B) apresentou concentração aumentada durante o período estudado, quando comparado com os animais controle (1 pg/mg de tecido), sendo o pico para IFN- γ em ambos os grupos infectados no 5º dia após

infecção. A síntese desta citocina nos primeiros dias após infecção foi maior para L-2 (30%), nos demais dias foi semelhante nos dois grupos experimentais.

Os resultados demonstram que ambas as linhagens induzem síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂ da resposta imune, porém com maior tendência para citocinas do padrão TH₂. Entretanto, a linhagem L-2 induziu maior produção de IL-4, IL-5 e IFN γ , existindo, portanto, diferença de infectividade entre as duas linhagens.

Relação entre eosinofilia, fertilidade das fêmeas parasitas, síntese de IgG e citocinas entre os animais infectados com linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*

A Tabela. 1 mostra um sumário dos dados no 7º dia após infecção. A eosinofilia sangüínea, no LCP e no LBA dos animais infectados com a L-49 foi maior, porém sem diferença significativa quando comparados com animais infectados com L-2. O número de fêmeas parasitas e de ovos/g/fezes recuperados neste dia também foi maior para L-49, quando comparados com animais infectados com L-2. Por outro lado, a resposta imune humoral, avaliada pela síntese de IgG total, foi significativamente menor nos animais infectados com a linhagem L-49. No entanto, a indução da síntese de citocinas IL-4 foi menor, porém não significativa para a linhagem L-49, enquanto os níveis de IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ foram maiores para esta linhagem, apesar de não haver diferença significativa na indução de síntese destas citocinas entre as duas linhagens.

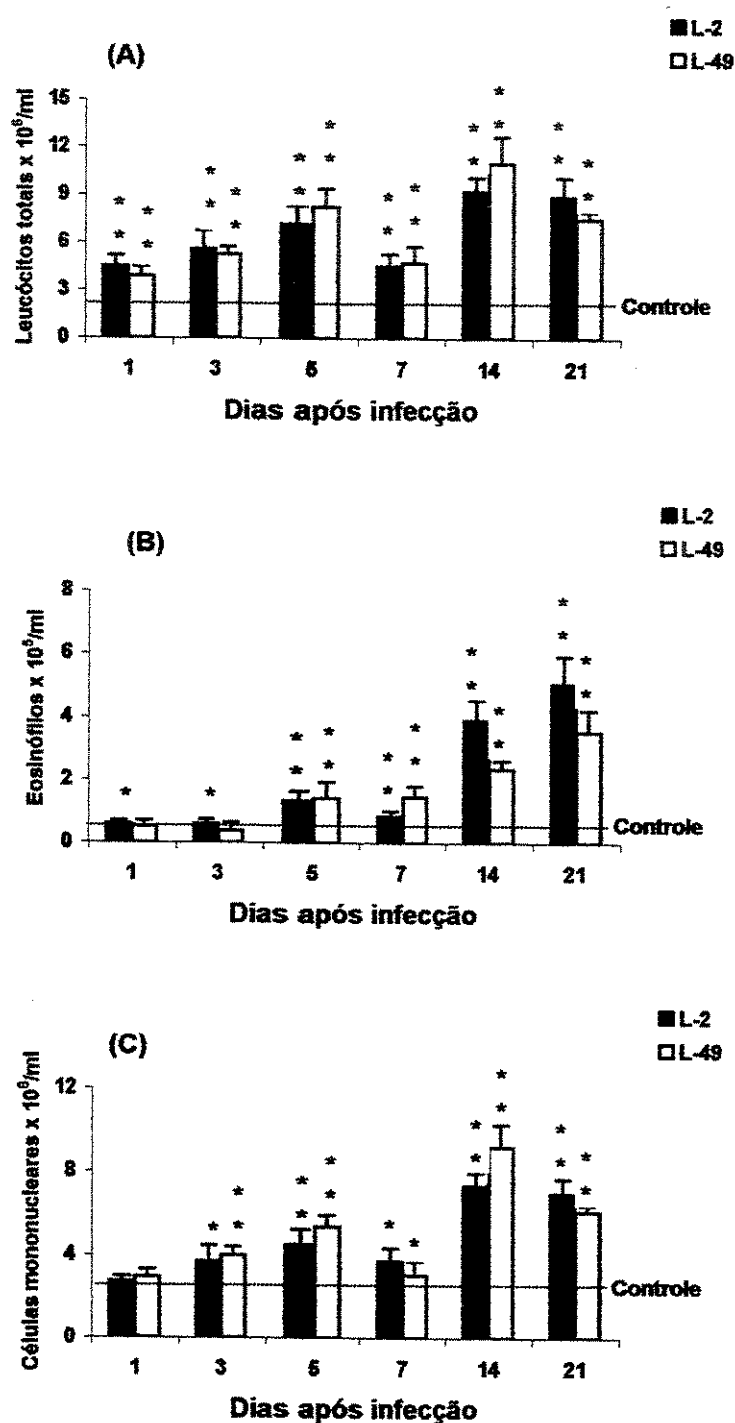


Fig. 1. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no sangue de camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

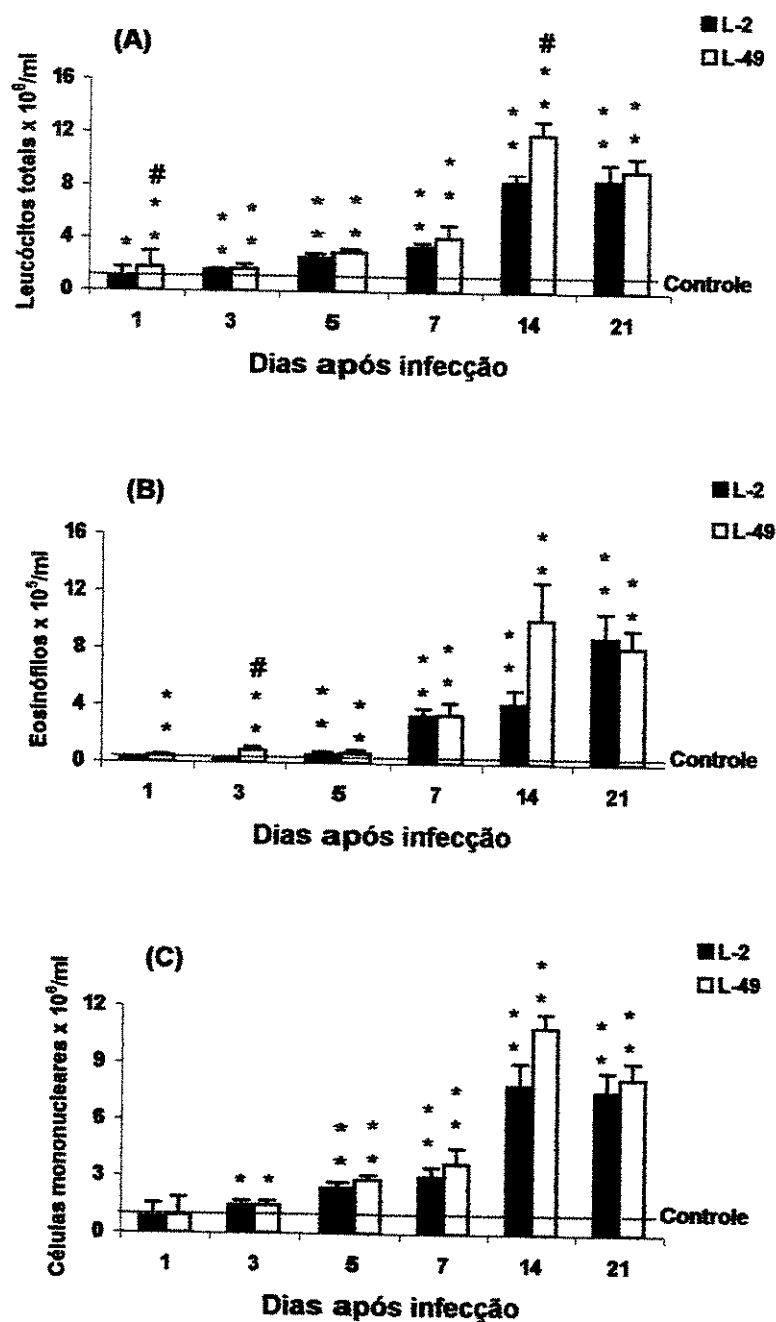


Fig. 2. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) na cavidade peritoneal (LCP) de camundongos infectados com linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados e # entre as duas linhagens. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

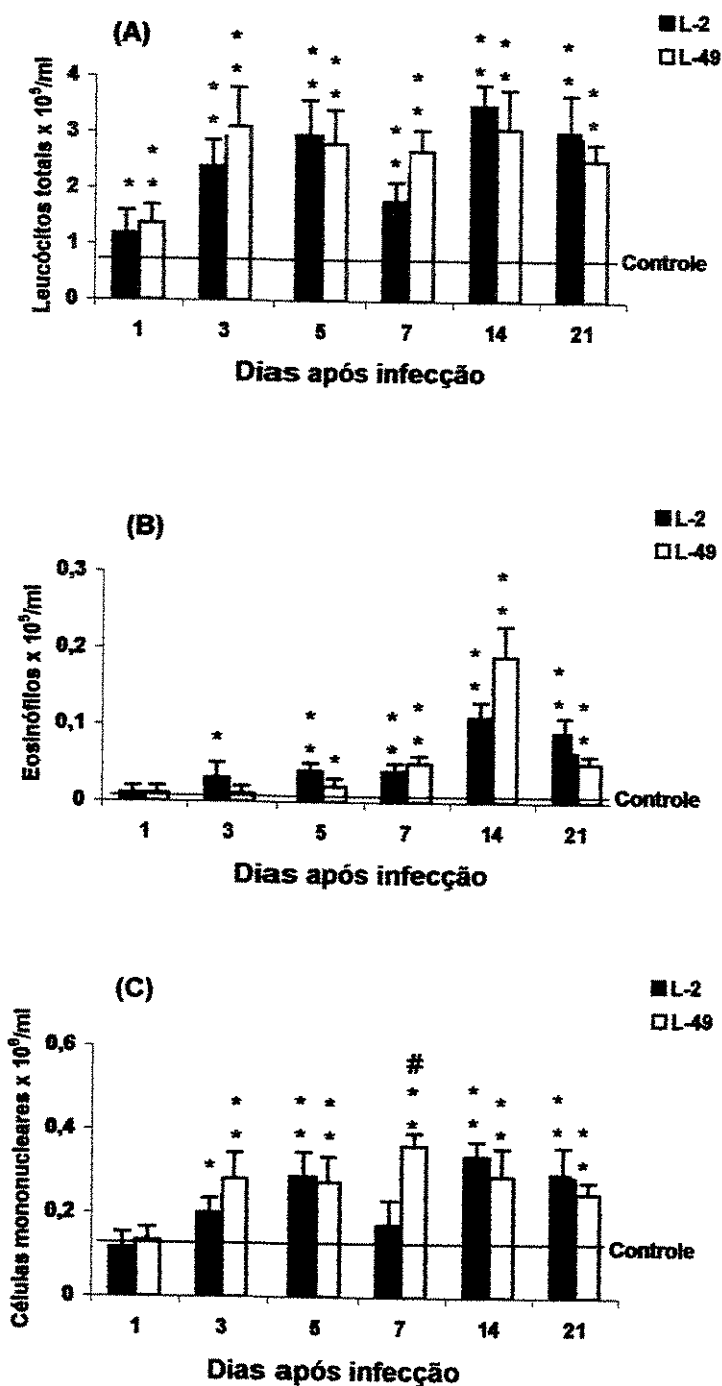


Fig. 3. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados com as linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados e # entre as duas linhagens. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

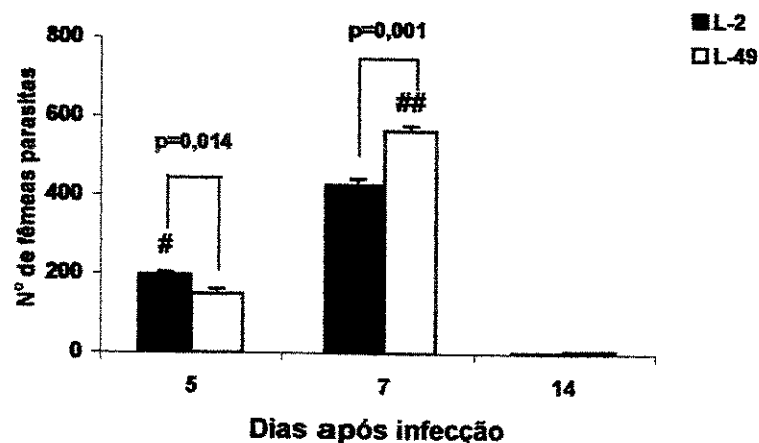


Fig. 4. Número de fêmeas parasitas recuperadas de camundongos, infectados com larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, # representam diferenças significativas entre as duas linhagens. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

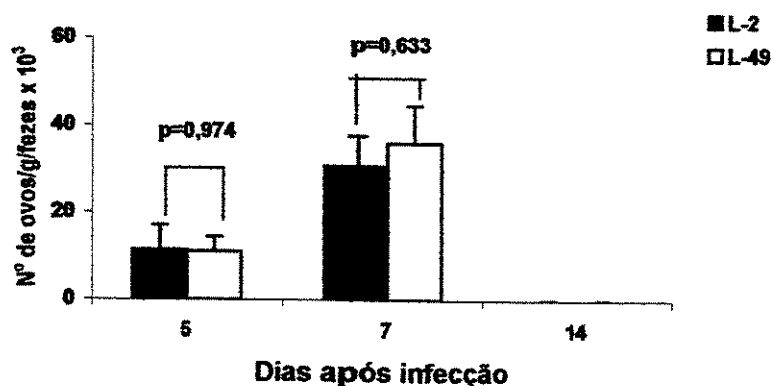


Fig. 5. Número de ovos/gramas/fezes de camundongos, infectados com larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais).

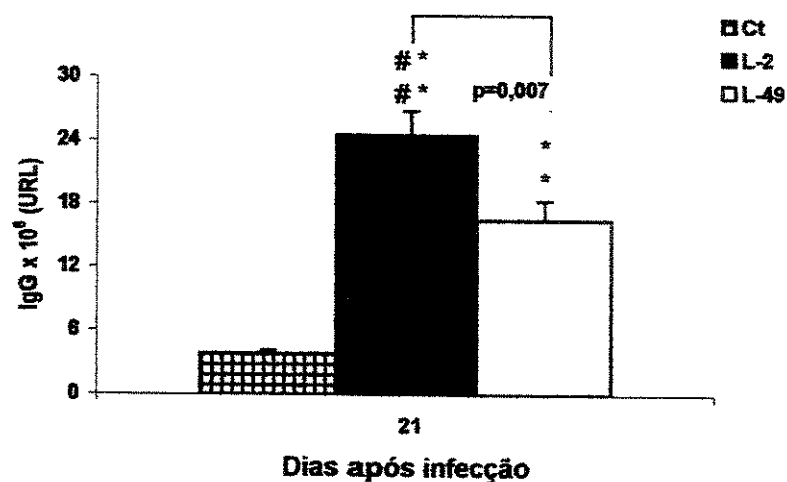


Fig. 6. Concentração de IgG no soro de camundongos infectados com larvas filarióides das linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados e # entre as duas linhagens. *** $p < 0,001$.

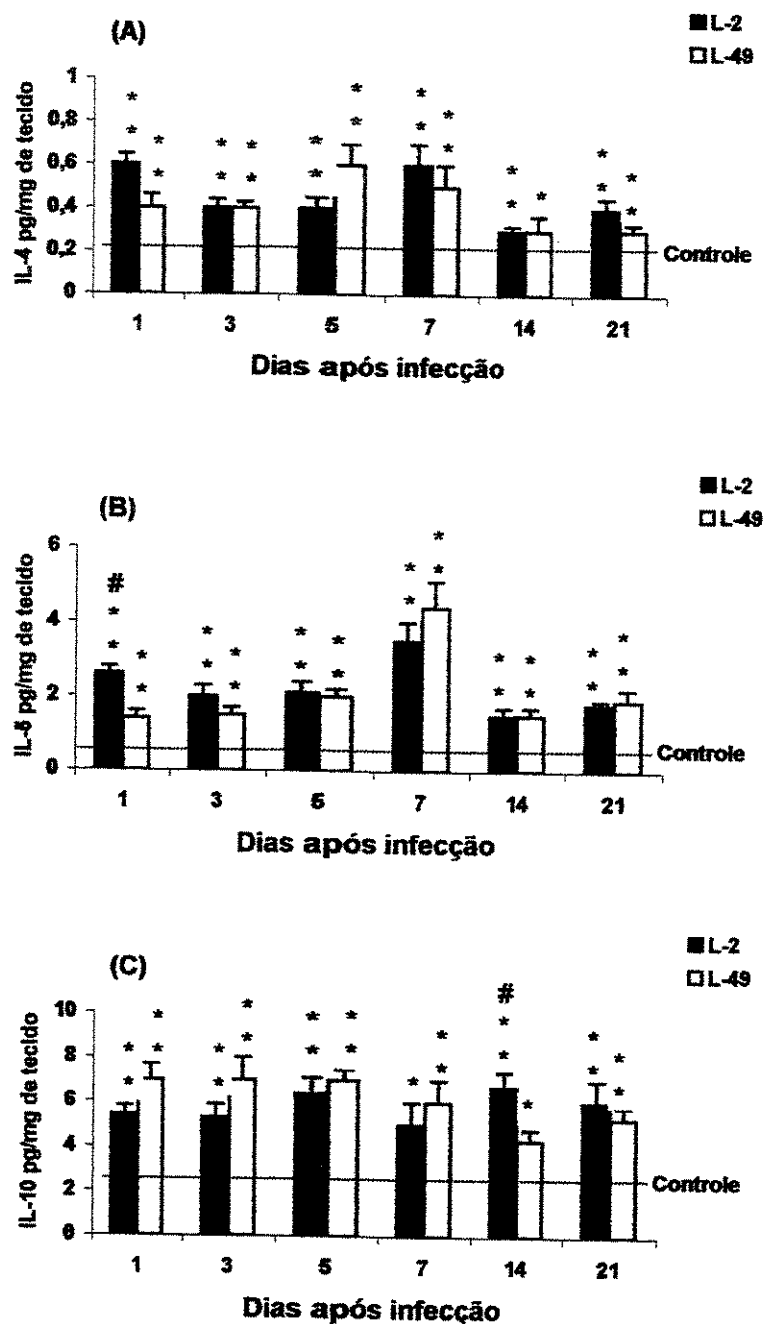


Fig. 7. Concentração de citocinas IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-10 (C) no pulmão de camundongos infectados com linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. e três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados e # entre as duas linhagens. * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

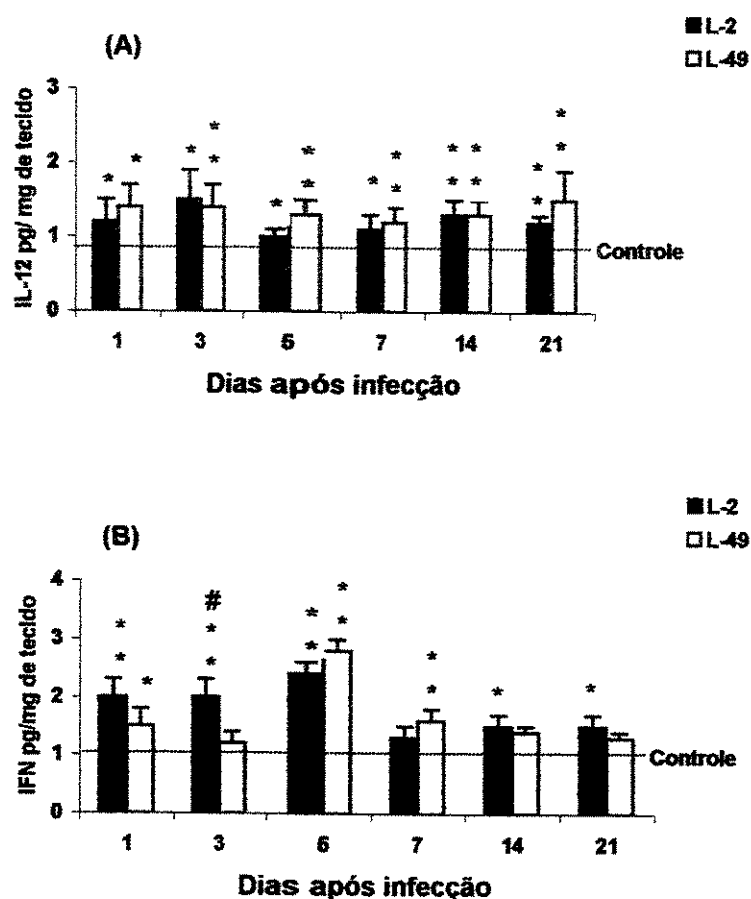


Fig. 8. Concentração de citocinas IL-12 (A) e IFN-gama (B) no pulmão de camundongos infectados com linhagens L-2 ou L-49 de *S. venezuelensis*. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados e # entre as duas linhagens. $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Tabela 1: Síntese entre o número de eosinófilos, fêmeas parasitas, ovos/gífezes, URL de imunoglobulina IgG total e citocinas em camundongos infectados com larvas das linhagens L-2 ou L-49 de *Strongyloides venezuelensis*, no 7º dia após infecção.

Animais	Nº de eosinófilos			Fecundidade das fêmeas parasitas		Anticorpo (URL)	Citocinas (pg/mg de tecido)				
	Sangue $\times 10^6$ cel/ml	LCP $\times 10^6$ cel/ml	LBA $\times 10^6$ cel/ml	Nº fêmeas	O.P.G. ($\times 10^3$)		IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IFN- γ
L-2	0,8 $\pm$ 0,15	3,3 $\pm$ 0,6	0,04 $\pm$ 0,01	428 $\pm$ 15	30,7 $\pm$ 6,9	24,6 $\pm$ 2,3 ^{##}	0,6 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2
L-49	1,5 $\pm$ 0,4 p=0,087	3,4 $\pm$ 0,9 p=0,935	0,05 $\pm$ 0,01 p=0,638	584 $\pm$ 12 p=0,001	36,0 $\pm$ 8,5 p=0,834	16,6 $\pm$ 1,9 P=0,007	0,5 $\pm$ 0,1 P=0,779	4,4 $\pm$ 0,7 P=0,850	6,0 $\pm$ 1,0 P=0,461	1,2 $\pm$ 0,2 P=0,871	1,6 $\pm$ 0,2 P=0,328

Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n=27). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre as duas linhagens
^{##} p<0,001. Cel= células.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisamos pela primeira vez se linhagens heterólogas de *S. venezuelensis* mantidas por passagens sucessivas em ratos experimentalmente infectados apresentam graus de infectividade variados, capazes de induzir diferentes respostas imunes inata e adquirida em camundongos.

Camundongos infectados por via subcutânea com larvas filarióides das linhagens L-2 e L-49 apresentaram números aumentados de leucócitos totais, eosinófilos e de células mononucleares no sangue, LCP e LBA entre o 1º e 21º dias após infecção. Os parasitas induziram também aumento significativo de neutrófilos durante todo os períodos observados no sangue, e no LCP e LBA somente até o 5º dia após infecção. Porém, nestes animais, o número de mastócitos foi significativo somente no LCP (dados não mostrados). Embora os números de leucócitos totais no LCP no 1º e 14º dias, eosinófilos no LCP no 3º dia, e células mononucleares no LBA no 7º dia após infecção tenham sido menores para L-2, os dados mostram que as linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* causam aumento e recrutamento celular semelhantes, em camundongos. Dados da literatura têm mostrado que infecções por helmintos estão associadas com eosinofilia sangüínea, no LCP, no LBA e tecidual (32). Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados na literatura, os quais explicam que a strongiloidíase humana ou animal é caracterizada por eosinofilia (22,33), mastocitose (20) e aumento de linfócitos T CD4⁺, células B e células caliciformes (26).

Também, a infecção por *S. venezuelensis* aumenta significativamente a produção de citocinas do padrão TH₂, como IL-4, IL-5 e IL-10, em todos os pontos analisados no estudo, sem diferenças marcantes entre as duas linhagens. Os dados obtidos também estão de acordo com outros descritos na literatura, que mostram que *Strongyloides* sp induzem, em roedores, uma resposta celular marcante, acompanhada de aumento da síntese de citocinas do padrão TH₂ e de anticorpos (22,26). A resposta do hospedeiro à infecção por *Strongyloides* sp tem influência no tamanho do parasita, altera a fecundidade e a expulsão do mesmo, influenciando também a proteção contra reinfecções (22). Ambas as linhagens estimularam também produção de citocinas do padrão TH₁ da resposta imune, IL-12 e IFN- γ . Embora a produção de IL-10 tenha ocorrido durante toda a infecção, também houve

síntese e liberação de IL-12 e IFN- γ nos mesmos períodos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em *Toxocara canis* (34), mostrando que esse nematoda também induz a liberação de IL-12 e IFN- γ . Os resultados sugerem que o efeito protetor da IL-12 e do IFN- γ para o parasita foram neutralizados pela IL-4, uma vez que parasitas adultos de ambas linhagens foram completamente expulsos após o 14º dia de infecção. Esses resultados se assemelham aos dados da literatura, os quais mostram que a IL-4, mesmo em pequenas concentrações, é capaz de induzir eficientemente a produção de anticorpos IgG, porém com baixa síntese de IgE (35). Estes fatores estão relacionados à citotoxicidade mediada por anticorpos "ADCC", exercida por eosinófilos (36) e pela degranulação de mastócitos (37).

Os resultados encontrados revelam que as linhagens estimulam de forma diferente a liberação de IL-5, citocina responsável pela produção, proliferação e aumento de eosinófilos. Esses dados demonstram haver uma correlação direta entre maior produção, na L-2, de IL-5 e maior número de eosinófilos no início da infecção no sangue. Nos outros compartimentos, o número destas células foi igual para as duas linhagens, demonstrando que a diferença nos níveis de IL-5 encontrados não tem influência no recrutamento diferenciado de células para o LCP e LBA. É importante destacar que L-2 e L-49 do parasita induzem aumento da IL-5, e isto se reflete no aumento de eosinófilos. A síntese desta citocina e suas funções como mediador protéico na inflamação mediada por helmintos têm sido detalhadamente estudadas (22,38,39). Comparando o percentual de aumento das diferentes citocinas em relação aos animais controle, observa-se que ambas linhagens deste parasita induzem aumento de citocinas do padrão TH₁ e TH₂, porém, com maior tendência para resposta TH₂.

Na infecções humana e animal por *Strongyloides* sp, há produção de anticorpos da classe IgG, IgM, IgA e IgE, com um aumento característico de IgE, IgG4 em humanos e IgG1 em animais (40,41,42). Os resultados obtidos mostram que, ambas linhagens induzem significativamente aumento na produção de IgG, porém em camundongos infectados com L-2, a síntese de IgG foi maior do que com L-49 (33%). A maior síntese de IgG induzida pela L-2 pode ser devida à maior produção de IL-4 no 1º dia da infecção (33%). O maior nível de IgG circulante parece proteger o hospedeiro, pois nos camundongos infectados com L-2 o número de

fêmeas parasitas recuperadas (24%) e o número de ovos/g/fezes foram menores (15%) que nos camundongos infectados com L-49, os quais apresentaram menor concentração de IgG específicas circulantes. Embora não tenha sido quantificado o isótipo IgG1, os resultados sugerem que esse anticorpo esteja aumentado, e que sua síntese seja dependente da IL-4 e com função anafilática, pois todos os vermes foram expulsos a partir do 14º dia após infecção. Dados da literatura (43) revelam a existência de dois isótipos de IgG1, um dependente de IL-4 para síntese, com atividade anafilática, o outro dependente de IL-12 e IFN γ , portanto, não anafilático. Os resultados mostram que linhagens de *S. venezuelensis* apresentam diferentes graus de fecundidade, pois o número de ovos/g/fezes recuperado foi menor nos animais infectados com L-2. Analisando-se por este parâmetro, as linhagens L-2 e L-49 apresentam graus de infectividade diferentes. O pico de ovos/g/fezes detectado no 7º dia nestes experimentos são semelhantes aos descritos por outros pesquisadores (22,44), mesmo utilizando outras linhagens de camundongos.

Concluimos que as linhagens de *S. venezuelensis* mantidas por passagens sucessivas em animais de laboratório apresentam diferenças de infectividade, influenciando a síntese de anticorpos e de IL-4. Apesar de L-2 induzir maior síntese de IL-4 e IgG e maior expulsão de parasitas, não investigamos as diferenças entre as linhagens do parasita responsáveis por esse fenômeno. Portanto, faz-se necessária a realização de novos experimentos empregando outras abordagens metodológicas, tais como a Biologia Molecular, para que seja possível detectar o perfil protéico ou os diferentes epitopos expressos nos parasitas. Uma vez conhecidos os antígenos mais imunogênicos nesta parasitose, será possível utilizar ensaios imunológicos e verificar se linhagens heterólogas apresentam maior ou menos grau infectividade, induzindo nos hospedeiros manifestações clínicas diferenciadas. Estudos neste sentido são de fundamental importância, devido à grande procura por antígenos heterólogos que possam ser utilizados no diagnóstico da strongiloidíase humana.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] Grove DI, Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol* 1996; 38: 251-309.
- [2] Anderson RC. 1992. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. C.A.B. International, Wallingford, Oxford, England, 578 pp.
- [3] Pires ML, Dreyer G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 1993; 48: 175-82.
- [4] Jacob CI, Patten SF. *Strongyloides stercoralis* infection presenting as generalized prurigo nodularis and lichen simplex chronicus. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 357-61.
- [5] Nozais JP, Thellier M, Datry A, Danis M. Disseminated strongyloidiasis. *Presse Med* 2001; 30: 813-18.
- [6] Dutcher JP, Marcus SL, Tanowitz HB, Wittner M, Fuks JZ, Wiernik PH. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. *Cancer* 1990; 66: 2417-20.
- [7] Tabacof J, Feher O, Katz A, Simon SD, Gansl RC. *Strongyloides* hyperinfection in two patients with lymphoma, purulent meningitis and sepsis. *Cancer* 1991; 68: 1821-23.
- [8] Ramachandran S, Gam AA, Neva FA. Molecular differences between several species of *Strongyloides* and comparison of selected isolates of *S. stercoralis* using a polymerase chain reaction-linked restriction fragment length polymorphism approach. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 61-5.
- [9] Satoh M, Toma H, Sato Y, Takara M, Shiroma Y, Kiyuna S, Hirayama K. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 carriers related to enhanced expression of IFN-gamma and TGF-beta. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 354-59.
- [10] German JC, Flores JH, Chiesura G, Ruiz EM, Flores SS, Laudanna AA. Fatal strongyloidiasis in immunodepressed patients following renal transplantation. *Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo* 1992; 47: 31-3.
- [11] Genta RM. *Strongyloides stercoralis*: Immunobiological considerations on an unusual worm. *Parasit Today* 1986; 2: 241-46.

- [12] Neva FA. Biology and immunology of human strongyloidiasis. *J Infect Dis* 1986; 153: 397-406.
- [13] Grove DI, Northern C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 833-38.
- [14] Harper JS 3rd, Genta RM, Gam AA, London WI, Neva FA. Experimental disseminated strongyloidiasis in *Erythrocebus patas*. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 444-50.
- [15] Ashford RW, Barnish G, 1989. *Strongyloides fülleborni* and similar parasites in animals and man. Grove DI, ed. *Strongyloidiasis: A major roundworm infection of man*. New York: Taylor & Francis, 271-86.
- [16] Ashford RW, Barnish G, Viney ME. *Strongyloides fülleborni kellyi*. infection and disease in Papua New Guinea. *Parasitol Today* 1992; 8: 314-18.
- [17] Viney ME, Matthews BE, Walliker D. On the biological and biochemical nature of clone populations of *Strongyloides ratti*. *J Helminthol* 1992; 66: 45-52.
- [18] Wilson PA, Simpson, NE. Dynamic of infection in rats given low doses of homogonic and heterogonic *Strongyloides ratti*. *Parasitology* 1981; 83: 459-75.
- [19] Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 495-503.
- [20] Tegoshi T, Okada M, Nishida M, Arizono N. Early increase of gut intraepithelial mast cell precursors following *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Parasitology* 1997; 114: 181-87.
- [21] Onah DN, Uchiyama F, Nagakui Y, Ono M, Takai T, Nawa Y. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease 1 during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcRgamma- knockout mice. *Infect Immun* 2000; 68: 4968-4971.
- [22] Korenaga M, Hitoshi Y, Yamaguchi N, Sato Y, Takatsu Y, Tada I. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection

- in mice. *Immunology* 1991;72: 502-12.
- [23] Kobayashi T, Tsuchiya K, Hara T, Nakahata T, Kurokawa M, Ishiwata K, Uchiyama F, Nawa Y. Intestinal mast cell response and mucosal defence against *Strongyloides venezuelensis* in interleukin-3 hyporesponsive mice. *Parasite Immunol* 1998; 20:279-84.
- [24] Rotman HL, Schnyder-Candrian S, Scott P, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. IL-12 eliminates the Th₂ dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol* 1997; 19: 29-39.
- [25] Abraham D, Rotman HL, Haberstroh FH, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol* 1995; 80: 297-307.
- [26] Herbert DR, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite Immunol* 2002; 24: 95-101.
- [27] Pessoa SB, Martins AV. **Parasitologia médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978. p. 986.
- [28] Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificações do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1954; 14: 5-8.
- [29] Gordon HM, Whitlock HVA. New technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Comm Sci Indust Organizat*, 1939; 12: 17-8.
- [30] Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int J Parasitol* 1990; 20: 57-62.
- [31] Faccioli LH, Medeiros AI, Malheiro A, Pietro RC, Januário A, Vargaftig BB. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. *Mediators Inflammation* 1998; 7: 41-7.
- [32] Lambroza A, Dannenberg AJ. Eosinophilic ascites due to hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 89-91.
- [33] Watanabe K, Noda K, Hamano S, Koga M, Kishihara K, Nomoto K, Tada I. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitol Res* 2000; 86: 188-93.
- [34] Kuroda E, Yoshida Y, Shan Em B, Yamashita U. Suppression of

- macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor- α production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol* 2001; 23: 305-11.
- [35] Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JV, Paul WE. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988; 141: 2335-41.
- [36] Van Milligen FJ, Cornelissen JB, Herdriks IM, Gaasenbeek CP, Bokhout BA. Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol* 1998; 20: 285-92.
- [37] Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Schopf L, Madden KB, Finkelman FD. Cutting Edge: IL-4 receptor expression by non-bone marrow derived cells is required to expel gastrointestinal nematode parasites. *J Immunol* 2001; 167: 6078-81.
- [38] Korenaga M, Hitoshi Y, Takatsu K, Tada I. Regulatory effect of anti-interleukin-5 monoclonal antibody on intestinal worm burden in a primary infection with *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Int J Parasitol* 1994; 24: 951-57.
- [39] Limaye AP, Abrams JS, Silver JE, Ottesen EA, Nutman TB. Regulation of parasite induced eosinophilia: selectively increased interleukin-5 production in helminth infected patients. *J Exp Med* 1990; 172: 399-402.
- [40] Atkins NS, Conway DJ, Lindo JF, Bailey JW, Bundy DA. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlation with larval output. *Parasite Immunol* 1999; 21: 517-26.
- [41] De Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes D de M, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 119-21.
- [42] Uchikawa R, Ichiki H, Komaki E. Antibody responses and protective immunity in rats receiving repeated inoculations of *Strongyloides ratti*. *J Parasitol* 1991; 77: 737-71.
- [43] Faquim-Moura E, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting Edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999; 163: 3572-76.
- [44] Khan AI, Horri Y, Tiuria R, Sato Y, Nawa Y. Mucosal mast cells and the

expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. Int J Parasitol 1993; 23: 551-55.

CAPÍTULO II

Influência da temperatura e do tempo de cultura na infectividade de *Strongyloides venezuelensis*

Running title: Infectividade de *S. venezuelensis*

*E. R. MACHADO, *M. T. UETA, ^ψE. V. LOURENÇO, #F. F. ANIBAL., *J. B. A. OLIVEIRA, ^ψM. C. ROQUE-BARREIRA, #L. H. FACCIOLI.

*Departamento de Parasitologia - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - SP., Brasil.

^ψDepartamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP., Brasil.

#Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP., Brasil.

#Autor para correspondência: Lúcia Helena Faccioli. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SP., Brasil. faccioli@fcfrp.usp.br

OBS: O trabalho será submetido a revista "Int. J. Parasitology".

RESUMO

Neste trabalho estudamos a influência da temperatura e do tempo de cultura na infectividade da linhagem L-2 de *S. venezuelensis*. Camundongos machos, Swiss, pesando entre 12 e 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram divididos em quatro grupos: animais controles não infectados (G1), animais infectados por via subcutânea com 1500 larvas L3, mantidas por (G2) 3dias/28°C, ou (G3) 7dias/28°C ou (G4) 7dias/18°C. Nos dias 1, 3, 5, 7, 14 e 21 após infecção, os animais foram sacrificados e foi determinado o número de células no sangue, na cavidade peritoneal (LCP) e no espaço broncoalveolar (LBA); quantificadas citocinas no pulmão e imunoglobulinas no soro; realizado o O.P.G. e contagem de fêmeas parasitas. Os dados mostram aumento de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares no sangue, no LCP e no LBA nos três grupos experimentais. O menor tempo de permanência das larvas na cultura influenciou a infectividade do parasita, induzindo resposta imune inata mais intensa e eliminação mais rápida dos parasitas. Temperaturas mais altas influenciaram a expressão antigênica das larvas, induzindo eosinofilia mais intensa e precoce no LCP, enquanto em temperaturas mais baixas a eosinofilia foi menor e mais tardia. Larvas mantidas por maior tempo nas culturas e em temperaturas mais altas induziram maior resposta humoral. Infecções por *S. venezuelensis* induzem síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂ da resposta imune, porém com maior tendência para o padrão TH₂. Larvas mantidas em temperaturas mais altas induzem maior síntese de IL-4 e IL-10. Entretanto, o tempo e a temperatura das larvas nas culturas não influenciaram a indução de IL-5. Larvas que permaneceram menor tempo nas culturas induziram maior síntese de IL-12, enquanto maior tempo favoreceu a produção de IFN- γ . Assim, a temperatura e o tempo têm influência na infectividade de *S. venezuelensis*, sendo as diferenças capazes de gerar no hospedeiro sintomatologia diferente.

Palavras chaves: *S. venezuelensis*, estrogiloidíase, leucócitos, células mononucleares, eosinófilos, citocinas, imunoglobulinas, temperatura, infectividade.

INTRODUÇÃO

As estrogiloidíases são parasitoses intestinais, causadas por nematodeos do gênero *Strongyloides* e ocorrem em homens, mamíferos domésticos e silvestres, aves, répteis e anfíbios [1]. Esta helmintíase apresenta distribuição mundial, principalmente na áreas tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento das formas de vida livre [2].

Os ciclos de vida das espécies de *Strongyloides* sp são semelhantes e apresentam duas fases: uma de vida livre e outra, parasitária. Na fase parasitária encontra-se somente fêmeas partenogenéticas no intestino do hospedeiro infectado, as quais se reproduzem por partenogênese [3]. As larvas recém nascidas podem desenvolver-se em fêmeas e machos de vida livre ou diretamente em larvas infectantes (L3). Os adultos de vida livre se reproduzem sexualmente, no meio ambiente e todos os descendentes se desenvolvem em L3. As larvas descendentes das fêmeas parasitas e dos adultos de vida livre são morfologicamente indistinguíveis e infectam o novo hospedeiro por penetração ativa na pele [4].

Nos hospedeiros imunocompetentes, o parasita freqüentemente causa infecção crônica assintomática ou com sintomas moderados [5]. Indivíduos com estrogiloidíase crônica, quando tornam-se imunossuprimidos, podem apresentar hiperinfecção com ou sem disseminação do parasita [6]. As larvas presentes no intestino aumentam em número, tornam-se invasivas e causam manifestações clínicas significativas [3]. As manifestações gastrointestinais nos estágios mais avançados da infecção incluem enterite ulcerativa, diarreia persistente, motilidade intestinal alterada, síndrome de má absorção, desnutrição, hepatite granulomatosa, bacteremia por bactérias gram negativas, multiplicação e migração descontrolada de larvas por todo corpo, o que atualmente é freqüente em indivíduos com imunossupressão [3,6,7].

A relação entre *Strongyloides* sp e hospedeiro é caracterizada por uma resposta imune celular mediada por eosinófilos, mastócitos, juntamente com um aumento significativo da síntese de algumas citocinas do padrão TH₂, como IL-3, IL-4, IL-5 [8] e anticorpos como IgA, IgE, IgG e IgM [3,9,10]. Tanto no homem como em modelos animais, a resposta imune desenvolvida contra esse helminto pode eliminar a infecção, porém em alguns animais o parasita evade da resposta protetora e

produz infecções crônicas, persistindo por muitos anos na forma assintomática [11]. Porém, quando ocorre queda na resposta imunológica do hospedeiro, o parasita pode se disseminar [12]. Apesar de alguns aspectos da resposta imune na estrogiloidíase serem conhecidos, até o presente momento não se sabe se diferenças nas manifestações clínicas do paciente seriam decorrentes de fatores ligados ao hospedeiro ou se estariam relacionadas a diferenças de infectividade nas linhagens de *Strongyloides* sp.

Vários trabalhos [13,14,15] mostraram que variações ambientais como temperatura, pH, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, oferta de alimento e tempo de cultura influenciam e direcionam o ciclo evolutivo em diferentes espécies deste nematoda para direto ou indireto. A baixa densidade populacional de larvas de *S. planiceps* nas fezes e/ou a pouca quantidade de ovos/gramas de fezes favorecem o desenvolvimento de fêmeas de vida livre e escasso de larvas filarióides homogônicas. Porém, condições contrárias favorecem o desenvolvimento de larvas filarióides homogônicas e torna escassas as fêmeas de vida livre [13], sem afetar o número de machos. Em *S. papillosus* foi observado que fêmeas de vida livre são mais numerosas em cultura a 30°C, enquanto que a 20°C predominam as L3 homogônicas, sendo o número de machos constante em ambas as temperaturas [14]. Estes autores também mostraram que a temperatura ótima para o desenvolvimento de fêmeas de vida livre de *S. stercoralis* é entre 20 a 30°C, de 28 a 36°C para *S. planiceps* e de 35°C para *S. papillosus*. No entanto, para o desenvolvimento das larvas filarióides, as temperaturas variaram de 35 a 40°C para *S. stercoralis*, de 12 a 16°C para *S. planiceps* e de 20°C para *S. papillosus* [14,15]. Por outro lado, variações na temperatura e no tempo de cultivo das larvas de *S. venezuelensis* influenciam no crescimento, na formação das estruturas morfológicas, na expressão de proteínas imunodominantes [16] e de choque térmico [17].

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se variações da temperatura e do tempo de cultura das larvas filarióides de *S. venezuelensis* influenciam a infectividade deste parasita e a indução da resposta imune inata e adquirida no hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 12 a 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - SP e do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP-USP). Os animais tiveram livre acesso à água e alimento. Os procedimentos adotados nos experimentos foram aprovados pela Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo nº 19-2).

Parasitas: A linhagem L-2 de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) utilizada nos experimentos foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). A linhagem é mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Infecção dos animais: As larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas das fezes de ratos infectados, mantidas em culturas de carvão mineral, por 3 dias/28°C (G2), 7 dias/28°C (G3) ou 7 dias/18°C (G4), segundo Looss (18). As larvas foram recuperadas pelo método de Rugai (19). Após quantificação das L3, os camundongos foram infectados com 1500 (L3) por via subcutânea (s.c.). Nos dias 1, 3, 5, 7, 14 e 21 os animais infectados e controles foram sacrificados e foram realizados os experimentos. Foram utilizados para cada ponto do experimento nove camundongos. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Contagem dos ovos por gramas de fezes: Nos dias 5, 7 e 14 após infecção, os animais foram colocados individualmente para defecarem sobre papel-toalha limpo e úmido. A estimativa do número de ovos/g/fezes foi feita utilizando-se o método quantitativo de Cornell-McMaster (20). O exame parasitológico foi repetido duas vezes e foi considerada a média dos resultados obtidos.

Contagem das fêmeas parasitas: Para contagem dos vermes adultos parasitas, os camundongos foram sacrificados com solução de Thionembutal (1 ml/50 g) e 10 cm

do intestino delgado foram removidos, colocados em placa de Petri contendo salina, seccionados longitudinalmente e incubados por 2 h a 37°C. A contagem das fêmeas parasitas adultas foi realizada segundo Sato e colaboradores (21).

Produção do extrato alcalino: Extrato alcalino de 100.000 larvas L3, da linhagem L-2 mantidas nos diferentes tempos de cultura e temperatura foi preparado, adicionando-se NaOH 0,15 M (Merck, Germany) e 150 µL de fenilmetilsulfonila [PMSF (Sigma Chemical. Co, St. Louis, MO, USA)], permanecendo por 18 h a 4°C sob agitação lenta. Subseqüentemente adicionou-se 0,5 mL de HCl 0,3 M (Merck, Germany), até se atingir pH 7,0. Estas preparações foram centrifugadas a 10000 g por 30 min a 4°C. A dosagem protéica dos sobrenadantes foi realizada utilizando-se o método do Coomassie, conforme instruções do fabricante (Fluka, USA).

Contagem de células do sangue: Os camundongos foram anestesiados com Thionembutal [0,25 mg/g (North Chigaco, Illinois, USA)] e amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca. Para contagem total das células, 20 µL do sangue foram diluídos em 380 µL de solução de Turk. A contagem foi feita em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi feita em esfregaços sangüíneos corados por Rosenfeld, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100 x, segundo Faccioli e colaboradores (22).

Lavado broncoalveolar: Os camundongos foram sacrificados após serem anestesiados com solução de Thionembutal, e 1 mL de solução salina fosfatada (PBS) contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/SC), a temperatura ambiente, foi injetado nos pulmões por cânulas de poliestireno introduzidas na traquéia. As células presentes no lavado broncoalveolar (LBA) foram recolhidas imediatamente. Os procedimentos foram repetidos duas vezes. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaços preparados em citocentrífuga e corados por Rosenfeld. A contagem de leucócitos no LBA foi realizada como descrito anteriormente (22).

Células peritoneais: As células da cavidade peritoneal (LCP) foram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal com 3,0 mL de PBS/SC. Somente 2 a 2,5 mL do fluido foram recolhidos para contagem das células, como descrito anteriormente (22).

Obtenção e homogeneização do pulmão: Os pulmões dos animais parasitados ou não com *S. venezuelensis* foram retirados, lavados com salina, secos em papel de filtro e pesados. Após pesagem, os pulmões foram colocados em tubo de homogeneização de células com 1 mL de PBS pH 7,4, no gelo, e homogeneizados em 2000 g por 5 min a 4°C, utilizando-se homogeneizador de órgãos (Polytron Homogenizer, Brinkmann). Após centrifugados, os sobrenadantes foram distribuídos em alíquotas e congelados a - 20°C.

Dosagem de citocinas: A detecção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ nos homogeneizados dos pulmões foi realizada por ensaio imunoenzimático, segundo instruções do fabricante (PharMingen, San Diego, CA). A concentração de cada citocina nas amostras foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir da curva padrão realizada para cada citocina, e os resultados foram expressos em pg por mg de tecido (pg/mg). O volume de 100 μ l de tampão carbonato, pH 9,0, contendo anticorpo monoclonal de captura anti-IL-4 (BVD4-1D11, 1 μ g/ml), anti-IL-5 (TRFK-5, 500 μ g/ml), anti-IL-10 (JES5-2A5, 1 μ g/ml), anti-IL-12 (C15.6, 1 μ g/ml) ou anti-IFN- γ (XMG1.2, 1 μ g/ml) foi adicionado aos 96 poços de placa de poliestireno (Costar) e deixado por 18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes (3x) com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween [PBS-T (PBS 1x + 0,05% Tween)] e depois foram adicionados 100 μ l de tampão de bloqueio (TB) [PBS-T + BSA 1% (m/v)], e deixadas por 2 h a temperatura ambiente (TA). Após lavadas (3x) com PBS-T, foram adicionados aos poços 100 μ L dos homogeneizados ou das citocinas, para obtenção da curva padrão conforme instruções do fabricante (PharMingen). As concentrações das citocinas diluídas em TB, variaram de 0,48 a 5.000 pg/ml. Após 18 h a 4°C, as placas foram lavadas (3x) com PBS-T, seguindo-se a adição dos anticorpos de detecção biotinilados e diluídos em TB para as respectivas citocinas. Após 2 h a temperatura ambiente (TA), as placas foram

novamente lavadas com PBS-T e foram adicionados 100 μ L do reagente AB (Avidina/Biotina) na concentração de 0,5 mg/mL e deixadas por uma hora a TA. Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada adicionando-se 100 μ L da solução de substrato contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina [TMB (Genzyme Diagnostics)] e após 5 a 30 min, ao abrigo da luz e a TA, a reação foi interrompida, adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico (1N de H₂SO₄). Os valores de absorbância foram determinados em leitor de ELISA (Metertech Inc., modelo 960) a 490 nm.

Quantificação de imunoglobulina no soro: Os níveis de IgG específica no soro de camundongos foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) segundo instruções do fabricante (Pierce). As concentrações da IgG total foram calculadas pela Unidade Relativa de Luz (URL). Foram usadas placas opacas de 96 poços de alta afinidade (Corning Science Products). O volume de 50 μ L /poço, contendo 1 μ g/ml do extrato antigênico de *S. venezuelensis* diluído em tampão carbonato (Tc) pH 9.6 foi adicionado aos poços e deixado por 18 h a 4°C. Após lavagem duas vezes (2x) com PBS-T (PBS 1x + 0,05% Tween), foram adicionados 100 μ L/poço da solução de bloqueio PBS-T + BSA 1% (m/v) [PBS -T + BSA], e as placas foram deixadas por uma hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados os soros na concentração 1/100. Como controle da reação, foi usada IgG total, diluída em (PBS-T + BSA). As placas foram incubadas por uma hora a 37°C, seguindo-se (5x) lavagens e adição do anticorpo monoclonal secundário conjugado com (HRPO) na concentração de 1/5000 diluído em (PBS-T + BSA). Após o período de 2 h a 37°C, as placas foram lavadas (8x), e foi adicionada a solução reveladora (Kit Trial - Super Signal Chemiluminescente, Pierce), na concentração de 1/8 diluída em Tc. A leitura foi realizada no leitor de quimioluminescência (EG&G Berthold, Gaithersburg, MD).

Análise estatística: Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M. e foram analisados estatisticamente usando o método não paramétrico Student t test. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Análise comparativa do aumento do número de leucócitos circulantes no sangue em resposta à infecção por *S. venezuelensis* cultivadas em três diferentes condições

A Fig. 1 mostra qualitativa e quantitativamente o aumento de leucócitos circulantes no sangue nos animais infectados com larvas mantidas em três condições experimentais diferentes. Em comparação com o grupo controle (G1), as larvas cultivadas por 3d/28°C (G2), 7d/28°C (G3) e 7d/18°C (G4) induziram aumento significativo de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares no sangue, entre o 1º e 21º dias após infecção. O pico de leucócitos totais e eosinófilos induzidos por larvas G2 ou G4 ocorreu no 14º dia após infecção, e para G3 no 21º (Fig. 1A e B). Porém, o pico de células mononucleares foi semelhante no 14º dia para os três grupos experimentais (Fig. 1C). No 7º e 14º dia, o número de eosinófilos em resposta à infecção com larvas cultivadas de 3d/28°C foi de 37% e 42% maior que as mantidas a 7d/28°C, e de 52% e 51% com relação às de 7d/18°C, respectivamente. Ainda nestes mesmos dias, larvas cultivadas por 3d/28°C induziram aumentos de 27% e 20% de células mononucleares com relação às larvas de 7d/28°C, e de 4% e 16% com relação às mantidas a 7d/18°C. Assim, larvas cultivadas a 3d/28°C induziram eosinofilia e células mononucleares sangüíneas mais intensa e precocemente.

Comparação entre o recrutamento de células inflamatórias para a cavidade peritoneal e espaço broncoalveolar de camundongos infectados com larvas *S. venezuelensis* cultivadas em temperaturas e tempos diferentes

De maneira semelhante ao ocorrido no sangue, larvas cultivadas a 3d/28°C induziram recrutamento de leucócitos totais (Fig. 2A), de eosinófilos (Fig. 2B) e de células mononucleares (Fig. 2C) para a cavidade peritoneal mais precocemente, em comparação com a migração celular induzida pelas larvas cultivadas a 7d/28°C ou 7d/18°C. Quantitativamente, as diferenças foram discretas ao longo da infecção, no entanto, larvas cultivadas a 7d/18°C foram menos efetivas em recrutar eosinófilos ao

longo da infecção, entre o 1º e o 21º dias, com exceção do 14º dia, onde os valores de todos os grupos foram semelhantes entre si. Diferenças discretas foram observadas entre os grupos G2 e G3, quanto ao recrutamento de células mononucleares.

Quanto ao número de células recuperadas do espaço broncoalveolar, pequenas variações entre os grupos foram observadas ao longo da infecção (Fig. 3A). Exceto pelo fato de as larvas cultivadas por 7d/18°C terem induzido o pico de eosinofilia no 21º dia (Fig. 3B), enquanto naquelas cultivadas por 3d/28°C ou 7d/28°C o pico ocorreu no 14º dia após infecção. Todos os grupos infectados apresentaram aumento significativo de células mononucleares no espaço broncoalveolar (Fig. 3C), quando comparados com o grupo controle.

Influência da temperatura e tempo das culturas na fertilidade e expulsão das fêmeas parasitas

O número de fêmeas recuperadas dos grupos infectados com larvas cultivadas nas três condições experimentais, ou seja, 3d/28°C (G2), 7d/28°C (G3) e 7d/18°C (G4) no 5º dia após infecção foram semelhantes. No entanto, no 7º dia após infecção, a média de fêmeas recolhidas foi de 310 ± 62 para G2, de 426 ± 15 para G3 e de 489 ± 49 para G4 (Fig. 4), com diferença significativa entre G2 e G3 e/ou G2 e G4. No 14º dia após infecção todas as fêmeas parasitas foram expulsas. A contagem do número de ovos/g/fezes também foi realizado nesses animais, no 5º, 7º e 14º dia após infecção (Fig. 5). Em nenhum dos períodos houve diferença significativa quanto à postura de ovos pelas fêmeas parasitas cultivadas nas três condições experimentais. Esses resultados demonstram que a temperatura na qual as culturas foram mantidas não influenciou na fertilidade das fêmeas parasitas. No entanto, maior número de fêmeas foram recuperadas dos animais infectados com larvas cultivadas por 7d/18°C, sugerindo que menos larvas foram mortas durante seu trajeto no ciclo no hospedeiro.

Influência da temperatura e tempo da cultura na infectividade de *S. venezuelensis* com relação à síntese de anticorpo

A IgG total antígeno específica foi quantificada no soro dos animais sacrificados 21 dias após infecção, com larvas mantidas nas três condições experimentais 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4), comparados com animais controle (Fig. 6). Animais infectados com larvas filarióides obtidas das três condições experimentais induziram produção significativa de IgG, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$). Porém, a síntese deste anticorpo foi maior nos animais do G3, quando comparado a G2 e G4. Estes resultados sugerem que temperaturas mais altas e o maior tempo de permanência das larvas nas culturas induzem maior resposta imune humoral.

Influencia da temperatura e tempo de cultura na infectividade de *S. venezuelensis* com relação à síntese de citocinas

Os resultados mostram níveis significativos de IL-4 para G2 e G3 no 1º e no 14º dia após infecção. No entanto, para G4, a concentração da IL-4 foi significativa somente no 1º dia, quando comparada aos animais controle (0,2 pg/mg de tecido) não infectados (Fig. 7A). Os resultados revelam que larvas mantidas em temperatura mais elevadas são mais infectivas e induzem maior síntese de IL-4.

A IL-5 foi significativa entre o 1º e o 21º dia após infecção nas três diferentes condições experimentais (Fig. 7B), em comparação aos animais controle (0,5 pg/mg de tecido). O pico desta citocina, para G2, foi observado no 3º dia, para G3 no 7º e para G4 no 5º dia. Os dados encontrados mostram que temperatura e/ou tempo de permanência das larvas nas culturas não influenciam a indução da produção de IL-5.

A síntese de IL-10 (Fig. 7C) foi significativa em todos os períodos observados para G3 e G4, apresentando pequenas variações. No entanto, para G2, os níveis desta citocina somente foram significativos no 1º e no 3º dia após infecção, quando comparados com os animais controle (2,5 pg/mg de tecido). Assim, os resultados mostram que o tempo das larvas nas culturas influencia a síntese de IL-10.

A concentração de IL-12 também foi significativa nos três diferentes grupos experimentais em todos os tempos observados (Fig. 8A), quando comparada ao grupo controle (0,8 pg/mg de tecido). Entretanto, larvas mantidas a 3d/28°C induziram maior síntese desta citocina. Assim, o menor tempo das larvas nas culturas influencia de forma significativa a produção de IL-12.

O nível de IFN- γ (Fig. 8B) no homogeneizado do pulmão, foi aumentado para G3 e G4 em todos os períodos analisados. Porém, para G2, foi significativo somente no 1º e no 3º dia, quando comparado com o grupo controle (1 pg/mg de tecido). O pico desta citocina foi observado no 1º dia após estímulo para G2 e G4 e no 5º dia para G3. Os resultados obtidos para IFN- γ demonstram que a permanência das larvas por maior tempo nas culturas influencia a síntese desta citocina.

Relação entre eosinofilia, fertilidade das fêmeas parasitas, síntese IgG e citocinas entre os animais infectados com *S. venezuelensis* mantidas por 3d/28°C, ou 7d/28°C ou 7d/18°C

A Tabela 1 mostra o sumário dos resultados no 7º dia após infecção. A eosinofilia sangüínea no LBA neste dia, nos animais infectados com larvas mantidas por 3d/28°C (G2) foi maior, em comparação com animais infectados por larvas de 7d/28°C (G3) e 7d/18°C (G4). No LCP, o recrutamento de eosinófilos foi maior para G2 e G3, enquanto a eosinofilia no LBA foi significativamente maior para G2. O número de fêmeas parasitas e o número de ovos/g/fezes foram maiores para G3 e G4. A resposta imune humoral, avaliada pela concentração de IgG, foi maior para os animais do grupo G3, com relação aos animais do G2 e G4. A indução das citocinas IL-4 e IL-5 foi maior para G3, em relação a G2 e G4, enquanto as concentrações de IL-10 e de IFN- γ foram maiores para G3, em relação a G2 e menor para G3 em relação a G4. Os níveis da IL-12 nos três grupos experimentais foram semelhantes neste dia.

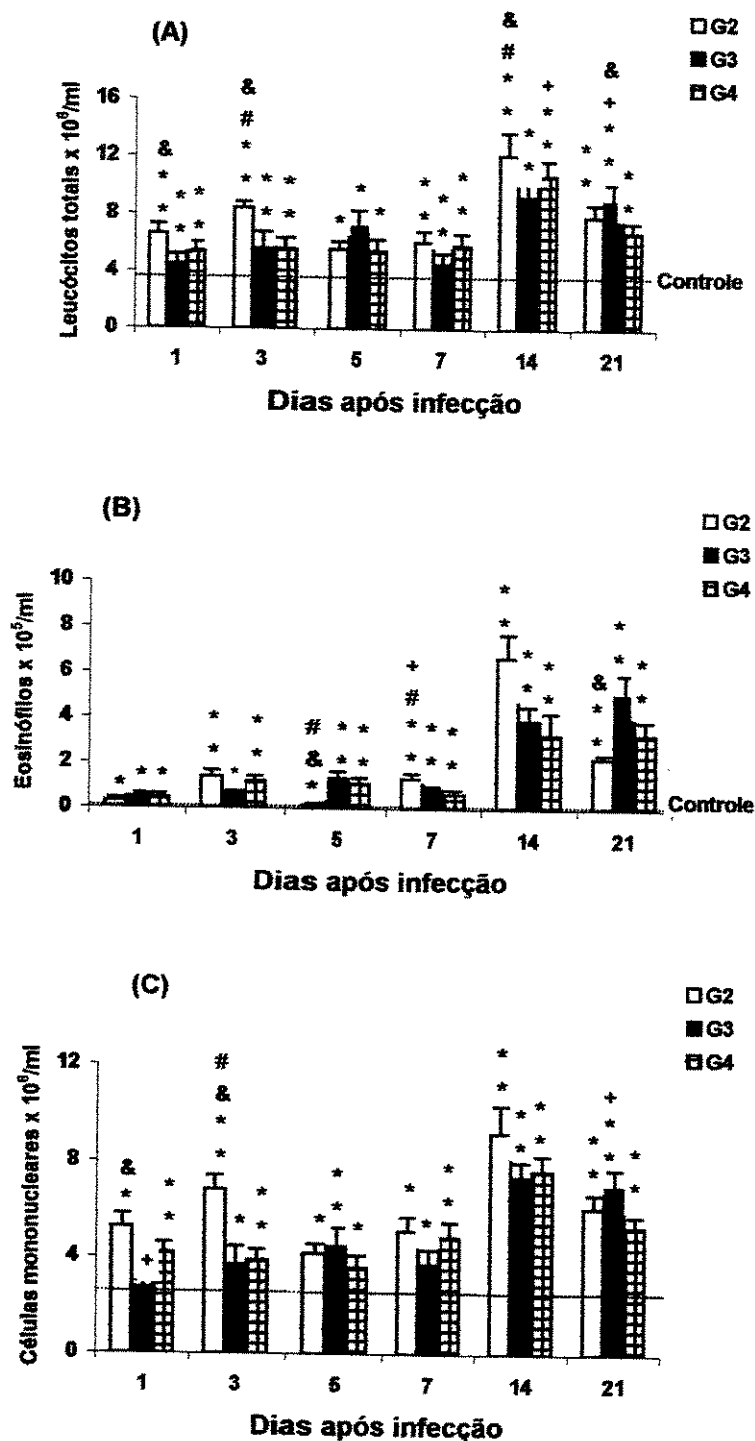


Fig. 1. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no sangue de camundongos, infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n= 27 animais). Os símbolos, representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4 *p<0,05; **p<0,001.

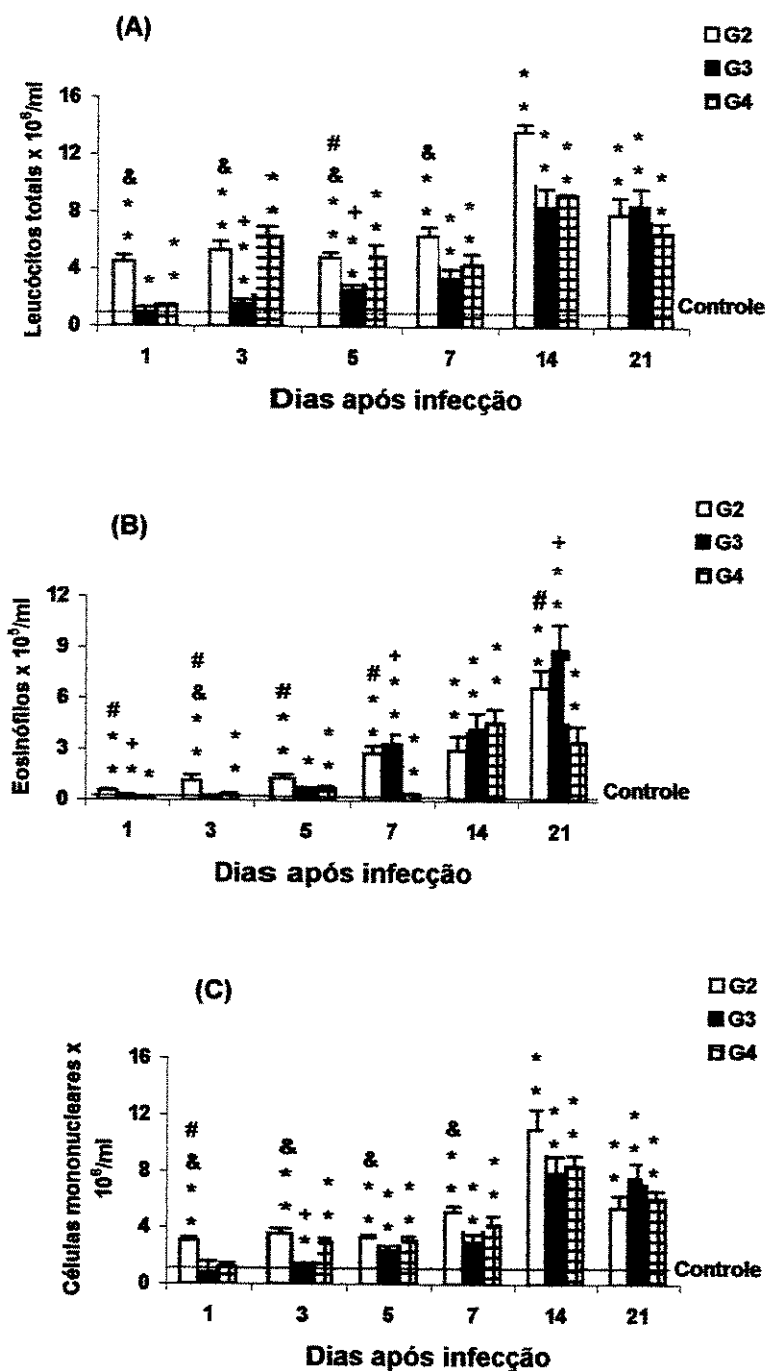


Fig. 2. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) na cavidade peritoneal de camundongos, infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n= 27 animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

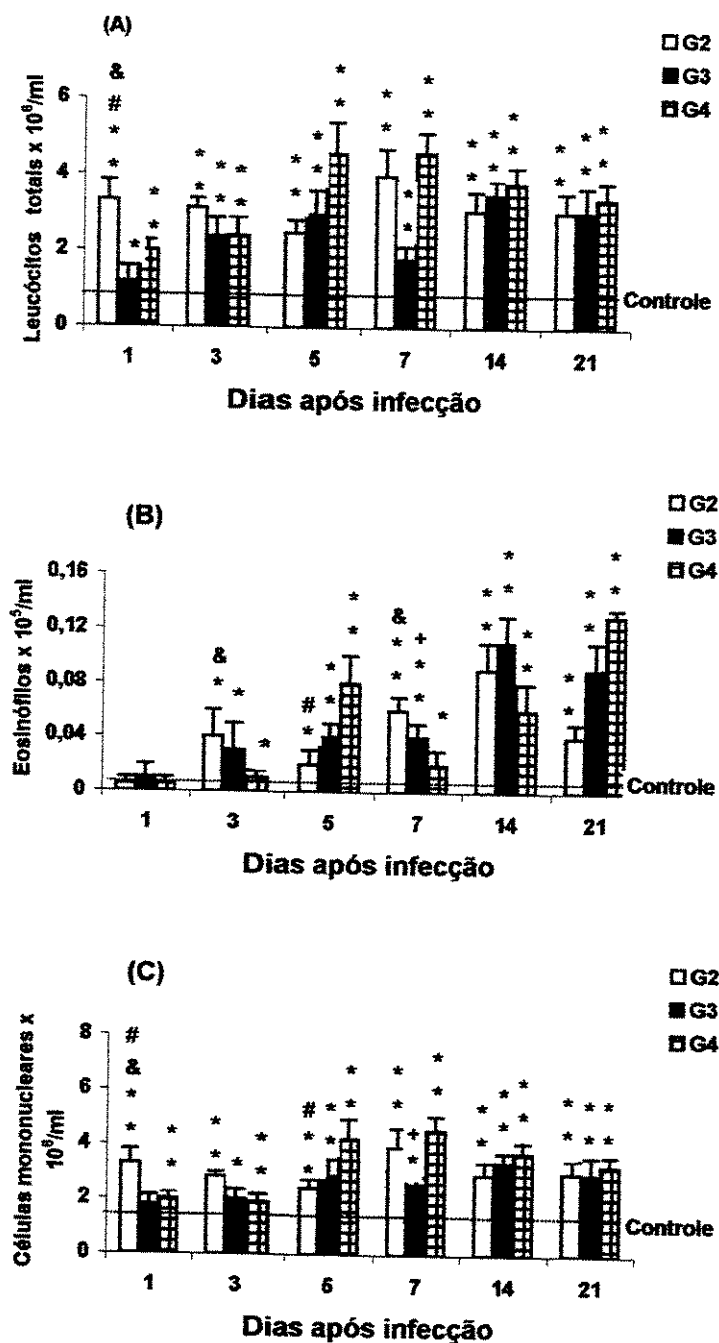


Fig. 3. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no lavado broncoalveolar de camundongos, infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n= 27 animais). Os símbolos, representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. *p<0,05; **p<0,001.

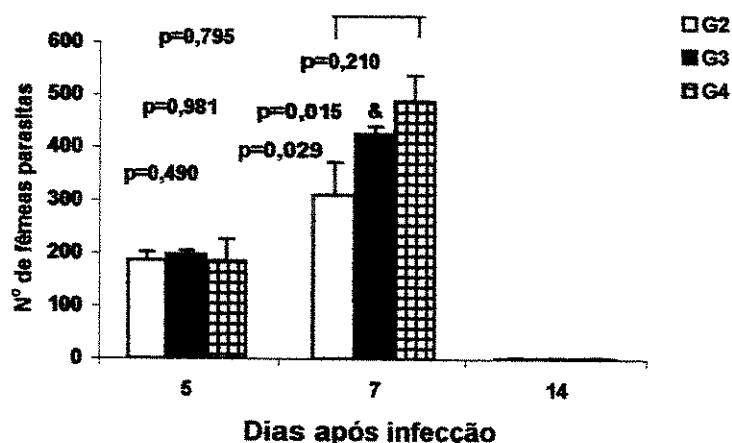


Fig. 4. Número de fêmeas parasitas recuperados de camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

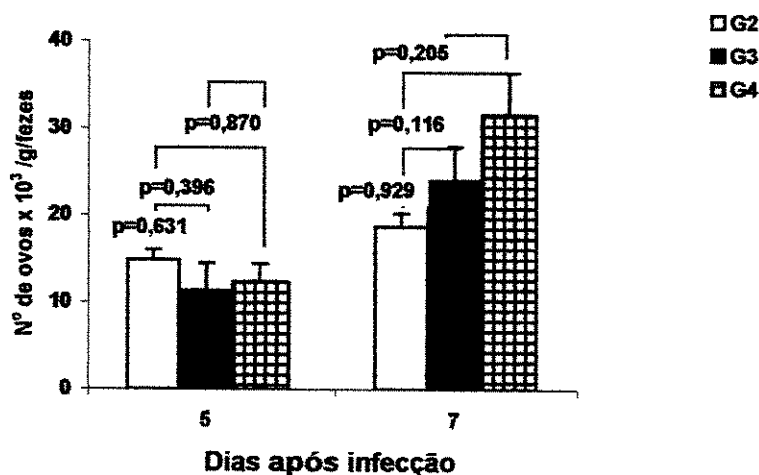


Fig. 5. Número de ovos/g/fezes de camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

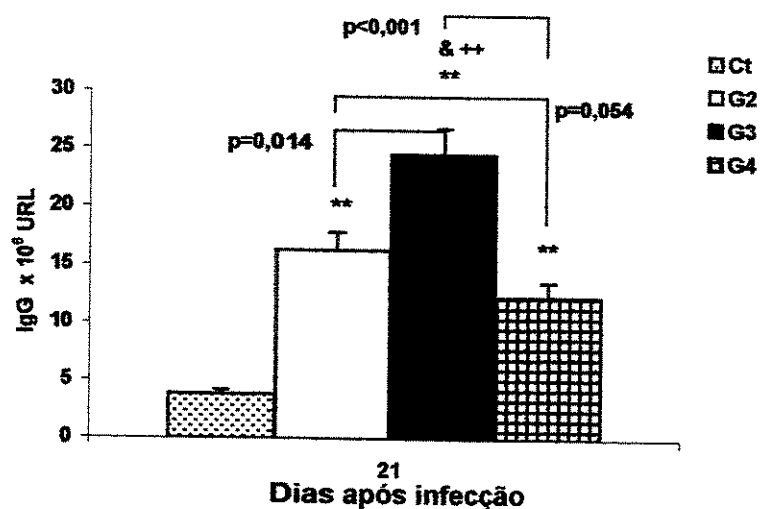


Fig. 6. Concentração de IgG total no soro de camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de três experimentos independentes (n = 27 animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. *p<0,05; **p<0,001.

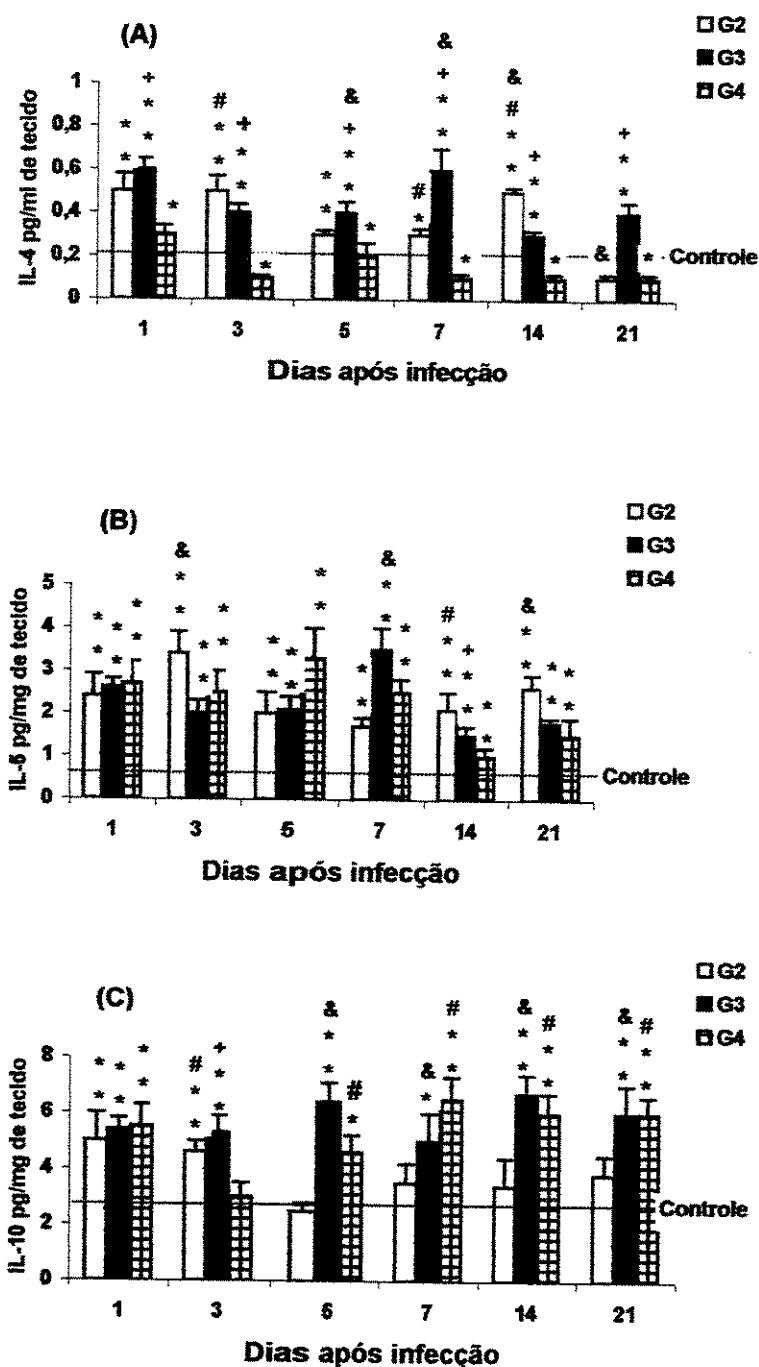


Fig. 7. Concentração de citocinas IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C), no pulmão de camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. * $<p0.05$;

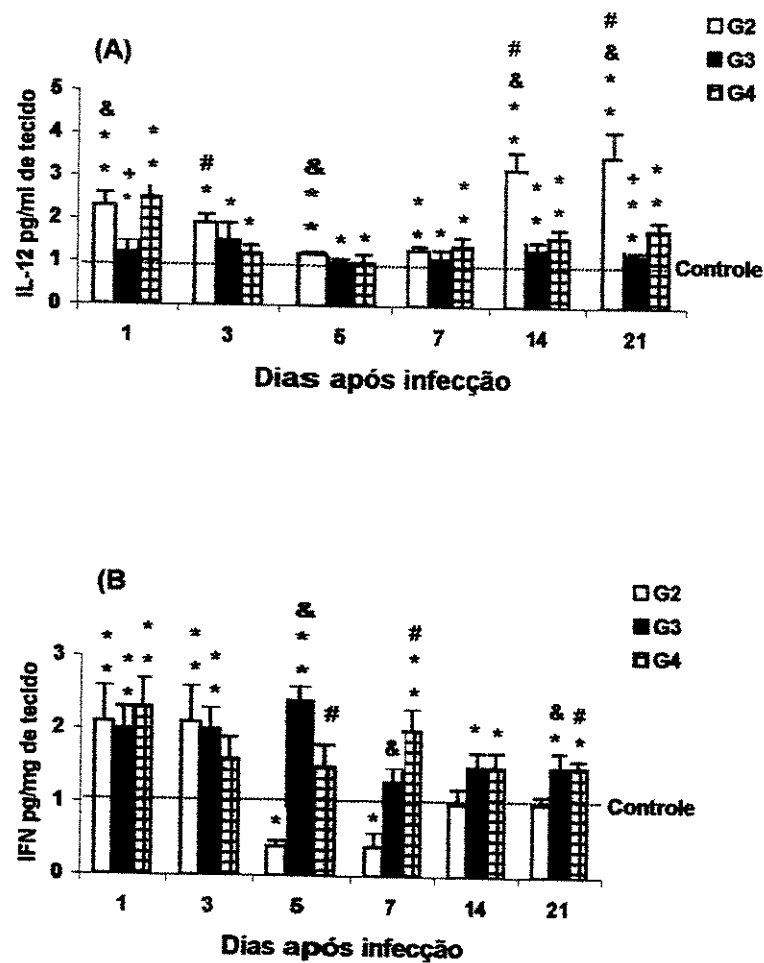


Fig. 8. Concentração de citocinas IL-12 (A) e IFN-gama (B) no pulmão de camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas em culturas de 3d/28°C (G2), ou 7d/28°C (G3) ou 7d/18°C (G4). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n = 27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; & entre G2 x G3; # G2 x G4; + G3 x G4. * $<p0,05$;

Tabela 1: Síntese entre o número de eosinófilos, fêmeas parasitas, O.P.G., URL de imunoglobulina IgG específica e citocinas em camundongos infectados com *S. venezuelensis* mantidas por 3d/28°C, ou 7d/28°C ou 7d/18°C, no 7° dias após infecção.

Animais	Nº de eosinófilos			Fertilidade das fêmeas (7º d.i)		Anticorpo	Citocinas (pg/mg de tecido)				
	Sangue x 10 ⁶ cells/ml	LCP x 10 ⁶ cells/ml	LBA x 10 ⁵ cells/ml	Nº fêmeas	O.P.G. x10 ³		IgG URL x 10 ⁶	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12
3d/28°C (G2)	1,34±0,2 p=0,078	2,74±0,46 p=0,441	0,06±0,01 p=0,061	310±62 p=0,030	14,81±1,49 p=0,235	16,318±1,56 p=0,015	0,3±0,03	1,7±0,2 p=0,007	3,5±0,7 p=0,003	1,3±0,1 p=0,474 & #	0,4±0,2 p<0,005
7d/28°C (G3)	0,84±0,15 p=0,017 &	3,31±0,57 p=0,012	0,04±0,01 p=0,005	426±15 & p=0,066	30,71±6,90 p=0,117	24,54±2,29 p=0,055 &	0,6±0,2 p=0,005 &	3,5±0,5 p=0,060 &	5,0±1,0 p<0,001&	1,1±0,2 p=0,447	1,3±0,2 p<0,001&
7d/18°C (G4)	0,65±0,16 P=0,040 # +	0,37±0,05 P=0,003 # ++	0,02±0,01 P=0,018 ## +	489±49 P=0,015 #	31,76±5,75 P=0,910	12,33±1,26 P<0,001++	0,1±0,02 P=0,043 # +	2,5±0,3 P=0,0,83	6,5±0,8 p=0,234 #	1,4±0,2 P=0,214	2,0±0,3 P=0,079 #

Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n=27). Os símbolos, & representa diferenças entre G2 x G3, # G2 x G4, + G3 C x G4.
*p<0,05; **p<0,001.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram claramente que larvas da linhagem L-2 de *S. venezuelensis* mantidas em diferentes condições experimentais, como 3d/28°C, 7d/28°C ou 7d/18°C, induziram aumento de células inflamatórias no sangue e recrutamento destas células para LCP ou LBA em camundongos. Embora tenha se observado algumas variações significativas no número destas células no sangue, no LCP e LBA nos três grupos experimentais em todos os períodos analisados, os resultados mostram que o menor tempo de permanência das larvas na cultura influencia a infectividade do parasita, e estes induzem resposta imune inata mais intensa no sangue, no LCP e no LBA.

Os resultados mostram que a temperatura mais alta altera a infectividade do parasita, e este induz eosinofilia mais intensa e precoce no sangue, no LCP e LBA, enquanto em temperatura mais baixa a eosinofilia foi menor e mais tardia. Possivelmente, as fêmeas parasitas oriundas da temperatura de 28°C expressam na cutícula ou excretam/secretam antígenos mais imunogênicos, capazes de induzir mais eficientemente as células do sistema imune a produzir e liberar mediadores químicos e lipídicos quimioatraentes para eosinófilos. Os resultados encontrados para células mononucleares sofreram variações semelhantes nas três condições experimentais, no sangue e LBA. O tempo de permanência das larvas nas culturas influenciou a infectividade do parasita, e este induziu maior migração de células mononucleares e mastócitos para LCP (dados não mostrados). Esse melhor reconhecimento dos antígenos expressos ou liberados por esse nematoda neste compartimento, talvez seja devido à capacidade das células residentes *in loco* de reconhecerem mais eficientemente antígenos expressos tanto pelas larvas infectantes como pelas fêmeas parasitas.

Um dos aspectos intrigantes, tanto na estrogiloidíase humana como na animal são as variações nas manifestações clínicas da infecção. Alguns indivíduos ou modelos animais, quando infectados, desenvolvem infecções assintomáticas ou oligossintomáticas com sintomas gastrointestinais moderados. Porém, em outros indivíduos, as manifestações clínicas variam de leves a severas, podendo ocorrer disseminação do parasita (1,7).

Outra característica importante desta parasitose é que, em alguns pacientes e/ou animais, as manifestações clínicas, mesmo em casos de infecção severa, podem não apresentar resposta imune celular alterada, especialmente por eosinófilos (3,23,24,25). Alguns autores (25) sugerem que estas diferenças nos sintomas e na resposta imune celular nos hospedeiros estejam relacionadas a diferenças no grau de infectividade do parasita, existindo, portanto, linhagens diferentes de *Strongyloides*. As condições ambientais, como tempo de permanência e a temperatura do solo no qual as larvas filarióides são mantidas determinariam o grau de infectividade. Dados da literatura relatam que modificações na temperatura afetam e direcionam o ciclo de vida de *Strongyloides* sp para homogônico ou heterogônico (14,15).

Analisando-se macroscopicamente a evolução das larvas nas três condições experimentais, observou-se que em cultura de 3d/28°C, a maioria das larvas encontravam-se no estágio de L3 e apresentavam grande motilidade, enquanto em 7d/28°C a maioria das larvas eram L3 infectantes, porém com movimentos mais lentos, enquanto em culturas de 3d/18°C era baixo o número de L3 e somente a partir do 7º dia atingiam o pico máximo, apresentando grande motilidade.

Os resultados obtidos mostram que o pico de recuperação das formas parasitas e do número de ovos/g/fezes nestas condições experimentais foi no 7º dia, e no 14º todos os parasitas foram eliminados. Estes resultados estão em concordância com dados descritos na literatura (26), os quais relatam que o pico de recuperação de fêmeas e de ovos/g/fezes para *S. venezuelensis* é no 7º dia após infecção. Os resultados demonstram que o tempo de permanência das larvas nas culturas influencia de forma significativa na fixação das fêmeas partenogênicas na mucosa intestinal e na sua fertilidade, porém, na temperatura mais baixa o número de fêmeas que fixaram e conseqüentemente o número de ovos recuperados foi maior. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados no recrutamento celular, parasitas mantidos por tempo menor em temperaturas mais altas são mais imunogênicos e capazes de induzir maior migração de eosinófilos, células mononucleares e mastócitos (dados não mostrados) para LCP, sendo conseqüentemente eliminados mais rapidamente pelos mecanismos efetores destas células.

Relatos da literatura mostram que a morte ou expulsão de helmintos depende direta e indiretamente da resposta imune celular mediada por eosinófilos (27), mastócitos (28), células intraepiteliais (29), células B (30) e células caliciformes (31). A produção, proliferação e ação destas células nas infecções por helmintos dependem da capacidade do sistema imune do hospedeiro em produzir mediadores quimioatraentes como citocinas, imunoglobulinas e sistema complemento (32).

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que L3 mantidas por 3d/28°C ou 7d/28°C, induziram maior síntese de IL-4 em todos os tempos observados. Nestas duas condições, os dados mostram que larvas oriundas de temperaturas mais altas e que permaneceram por maior tempo em culturas são mais imunogênicas e induziram maior síntese de IL-4. É possível que as proteínas expressas nas L3 de 7d/28°C estejam expressas em maiores quantidades e estimulem mais eficientemente a produção de IL-4 que L3 de 3d/28°C. Estes resultados concordam com os apresentados na literatura (33,34,35), que mostram que infecções por helmintos induzem síntese de IL-4, importante na indução de síntese de imunoglobulinas pelas células B, proliferação de mastócitos e de eosinófilos. Quanto a IL-5, os resultados mostram que tempo e/ou temperatura não influenciam a expressão antigênica do parasita. Foram relatados resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para IL-5 em infecções por *Strongyloides* sp e outros helmintos. Estes induzem a síntese desta citocina, relacionada à proliferação, migração e funções efectoras dos eosinófilos e mastócitos (35,36).

Por outro lado, os dados obtidos revelam que parasitas mantidos por maior tempo nas culturas induziram maior síntese de IL-10. Os resultados mostram que parasitas L3 mantidos por 3d/28°C possivelmente não expressam na cutícula ou excretam/secretam pequenas quantidades de antígenos, incapazes de induzir macrófagos e linfócitos T a produzirem e excretarem esta citocina, enquanto parasitas obtidos de 7d/28°C ou 7d/18°C expressam ou secretam antígenos mais imunogênicos, induzindo estas células a sintetizar uma quantidade maior de IL-10. Os dados encontrados para parasitas de culturas de 3d/28°C divergem dos dados apresentados na literatura (37,38), os quais mostram que infecções por helmintos induzem síntese de IL-10. A função desta citocina é direcionar a resposta imune para o padrão TH₂, regulando a produção de IL-12 e IFN- γ (39). Os resultados mostram que parasitas mantidos por 3dc/28°C induzem precária síntese de IL-10, e

inversamente boa produção de IL-12, quando comparados a parasitas mantidos sob outras condições experimentais. O tempo das L3 nas culturas induzem maior expressão de antígenos no parasita, e estes são conservados durante o ciclo de vida e expressos nas formas adultas, pois a produção de IL-10 foi semelhante em todos os períodos observados. A síntese de IFN- γ também foi influenciada, mas a temperatura não interferiu na produção desta citocina. Observou-se que, mesmo em altas concentrações, a IL-10 inibiu parcialmente a síntese de IL-12 e de IFN- γ durante a infecção. Assim, infecções com *S. venezuelensis*, independentemente do tempo e da temperatura em que são mantidas, induzem síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂, porém com maior tendência para o padrão TH₂.

A síntese de IL-10, IL-12 e IFN- γ necessita ser melhor explorada neste modelo experimental, considerando-se não só as variáveis temperatura e tempo de permanência do parasita em culturas, como também o material biológico usado para quantificar estas citocinas, como soro, sobrenadantes de culturas de células do pulmão, linfonodos e baço de camundongos infectados, pois os dados obtidos no homogeneizado de tecido pulmonar, contrapõem os apresentados na literatura para *Toxocara canis* (39), *Strongyloides* sp (40), onde não produzem ou produzem baixa quantidade IL-12 e IFN- γ ou não expressam mRNA para IL-10 e IFN- γ (39).

Na estrongiloidíase humana, a maioria dos indivíduos desenvolve anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE específicos (30,34). A longa permanência do parasita no hospedeiro humano e a contínua passagem da larvas filarióides através dos tecidos resultam em uma incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários, gerando uma resposta mediada por IgG4 nesta helmintíase, o que parece modular as reações alérgicas mediadas por IgE (41). Camundongos experimentalmente infectados com *Strongyloides* sp, mostram alta produção de anticorpos da classe IgG, IgG1, IgE (42). A IL-4 está relacionada a muitas funções no sistema imune, incluindo a produção de IgG1 e IgE em camundongos (43). Como a IL-4 está diretamente ligada à indução da síntese de anticorpos, e os resultados obtidos demonstraram que a temperatura influencia em sua síntese, verificamos que a temperatura também influencia a produção de IgG específica. Os dados revelam que *S. venezuelensis* induz produção de IgG específica, indiferente do tempo e da temperatura de manutenção do parasita nas culturas, porém, parasitas mantidos em

temperaturas mais altas induzem maior síntese de anticorpo, existindo, portanto, diferença de infectividade entre os parasitas na indução da resposta imune humoral.

Os resultados mostram uma relação direta entre menor temperatura, menor expressão antigênica no parasito com menor síntese de citocinas do padrão TH₂ (IL-4, L-5), menor produção de eosinófilos no sangue, LCP e LBA, conseqüentemente com maior fixação do parasita na mucosa e oviposição do parasita. Dados da literatura (44) mostram que existem dois isótipos IgG1, um com síntese dependente de IL-4, portanto com atividade anafilática, e outro com síntese dependente de IL-12 e IFN- γ , porém sem atividade anafilática. A síntese deste isótipo de IgG1 é dependente do tipo de antígenos expressos e do seu reconhecimento pelas células do sistema imune. Embora não tenha sido quantificada a IgG1, os dados sugerem que níveis altos desse anticorpo estejam presentes e com atividade anafilática, pois todos os parasitas foram eliminados 14 dias após infecção.

Os resultados (45) descrevem que IL-12 e IFN- γ , nas infecções por *Strongyloides* sp e outros helmintos, protegem o parasita da resposta do hospedeiro. Os dados encontrados neste estudo sugerem que parasitas obtidos de temperaturas mais baixas são protegidos pela IL-12 e IFN- γ , pois o número de ovos/g/fezes e de fêmeas parasitas recuperados foram maiores nesta condição experimental.

Concluimos que o tempo e a temperatura influenciam a infectividade de *S. venezuelensis*, induzindo respostas imune inata e adquirida diferentes em camundongos. Portanto, existem linhagens com diferentes graus de infectividade, capazes de induzir sintomatologia diferenciada nos hospedeiros. Sugerimos que futuras pesquisas analisem o perfil protéico somático e secretado/excretado pelo parasito e seu reconhecimento por anticorpos de camundongos e humanos, para melhor caracterizá-los, e que estes sejam utilizados em imunizações, no sentido de se reconhecer as proteínas imunogênicas e se avaliarem os sintomas desencadeados nos hospedeiros. De posse destas informações será possível melhorar o imunodiagnóstico e preparar futuras vacinas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)-Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] Grove DI. Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol* 1996; 38: 251-309.
- [2] Moncol DJ, Triantaphyllou AC. *Strongyloides ransomi*: factors influencing the in vitro development of the free living generation. *J Parasitol* 1978; 64: 220-25.
- [3] Genta R. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. *Parasitol Today* 1986; 2: 241-46.
- [4] Harvey SC, Viney ME. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics* 2001; 158:1527-33.
- [5] Neva FA. Biology and immunology of human strongyloidiasis. *J Infect Dis* 1986; 153: 397-406.
- [6] Kinjo T, Tsuchioka K, Nakazato I, Ito E, Sato Y, Koyanagi Y, Iwamasa T. Extensive intra-alveolar haemorrhage caused by disseminated strongyloidiasis. *Int J Parasit* 1998; 28: 323-30.
- [7] Dionisio D, Manneschi LI, di Lollo S, Orsi A, Tani A, Papucci A, Esperti F, Leoncini F. *Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 2000; 53: 110-6.
- [8] Maruyama H, Osada Y, Yoshida A, Futakuchi M, Kawaguchi H, Zhang R, Fu J, Shirai T, Kojima S, Ohta N. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum* infected mice. *Parasite Immunol* 2000; 22: 279-86.
- [9] Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R, Pulcheri W. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 346-50.
- [10] Herbert DR, Nolan TJ, Schad GA, Lustigman S, Abraham D. Immunoaffinity isolated antigens induce protective immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Exp Parasitol* 2002; 100: 112-20.
- [11] Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1040-7.

- [12] Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Rossini IR. Intestinal parasites in AIDS and + HIV patients in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 685-6.
- [13] Arizono N. Studies on the free-living generations of *Strongyloides planiceps* Rogers, 1943. II. Effects of temperature on the developmental types. Jap J Parasitol 1976b; 25: 328-35.
- [14] Nwaorgu OC. The development of the free-living stages of *Strongyloides papillosus*. I. Effect of temperature on the development of the heteropenic and homogenic nematodes in faecal culture. Vet Parasit 1983; 13: 213-23.
- [15] Shiwaku K, Chigusa Y, Kadosaka T, Kaneko K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. Parasitology 1988; 97: 129-38.
- [16] [Tsuji N, Fujisaki K. Development *in vitro* of free-living infective larvae to the parasitic stage of *Strongyloides venezuelensis* by temperature shift. Parasitology 1994; 109: 643-8.
- [17] Tsuji N, Ohta M, Fujisaki K. Expression of a 70-kDa heat shock related protein during transformation from free living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. Parasit Res 1997; 83: 99-102.
- [18] Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia médica. 10^o ed. Rio de Janeiro: 1978, p. 986.
- [19] Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematodeos das fezes; modificações do método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz 1954; 14: 5-8.
- [20] Gordon HM, Whitlock HVA. New technique for counting nematodae eggs in sheep faeces. J Commonw Sci Indust Organizat 1939; 12: 17-8.
- [21] Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. Int J Parasitol 1990; 20: 57-62.
- [22] Faccioli LH, Medeiros AI, Malheiro A, Pietro RC, Januário A, Vargaftig BB. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. Mediators Inflamm 1998; 7: 41-7.
- [23] Genta RM, Ottesen EA, Poindexter R, Gam AA, Neva FA, Tanowitz HB, Wittner M. Specific allergic sensitization to *Strongyloides* antigens in human

- strongyloidiasis. Lab. Invest 1983; 48: 633-8.
- [24] Bhatt BD, Cappell MS, Smilow PC, Das KM. Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to *Strongyloides stercoralis* infection. Am J Gastroenterol 1990; 85: 1034-6.
 - [25] Genta RM. *Strongyloides stercoralis*: Immunobiological considerations on an unusual worm. Parasit Today 1986; 2: 241-6.
 - [26] Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. 1990. Int J Parasitol 1990; 20: 57-62.
 - [27] Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Gleich GJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. Exp Parasitol 1996; 82: 267-78.
 - [28] Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. J Immunol 2000;164: 3749-54.
 - [29] Abe T, Sugaya H, Yoshimura K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymphonode cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. J Helminthol 1998; 72: 1-8.
 - [30] Herbert DR, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. Parasite Immunol 2002; 24: 95-101.
 - [31] Ishikawa N, Shi BB, Khan AI, Nawa Y. Reserpine induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. Parasite immunol 1995; 17: 581-6.
 - [32] Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF, Sher A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. Immunol Today 1991; 62-5.
 - [33] Finkelman, FD, Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. Annu Rev Immunol 1997; 15: 505-33.

- [34] Negrão-Correa D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43: 291-99.
- [35] Korenaga M, Hitoshi y, Yamaguchi N, Sato Y, Takatsu K, Tada I. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 1991; 72: 502-7.
- [36] Faccioli LH, Mokwa VF, Silva CL, Rocha GM, Araujo JI, Nahori MA, Vargafing BB. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. *Mediators Inflamm* 1996; 5: 24-31.
- [37] Hirata M, Kage M, Hara T, Yoneda Y, Zhang M, Fukuma T. *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation in the interleukin-4 or interferon- γ deficient host. *Parasite Immunol* 2001; 23: 271-80.
- [38] Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Gorra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.
- [39] Kuroda E, Yoshida Y, En Shan B, Yamashita U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumor necrosis factor- α production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol* 2001; 23: 305-11.
- [40] Neva FA, Oliveira-Filho J, Gam AA, Thompson R, Freitas V, Melo A, Carvalho EM. Interferon- γ and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. *J Infect Dis* 1998; 178: 1856-59.
- [41] Lindo JF, Atkins SN, Lee MG, Robinson RD, Bundy DA. Short report: long term serum antibody isotype responses to *Strongyloides stercoralis* filariform antigens in eight patients treated with Ivermectin. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 474-76.
- [42] Lantz CS, Yamaguchi M, Oettgen HC, Katona IM, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ. IgE regulates mouse basophil Fc ϵ RI expression in vivo. *J Immunol* 1997; 158: 2517-21.
- [43] Okano M, Satoskar AR, Abe M, Harn DA, Okano M, Nishizaki K, Takeda Y, Yoshino T, Brombacher F, Satoskar AA. Interleukin-4 independent

- production of Th2 cytokines by nasal lymphocytes and nasal eosinophilia in murine allergic rhinitis. *Allergy* 2000; 55: 723-31.
- [44] Faquim-Moura EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting Edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999; 163: 3572-76.
- [45] Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, Katona IM, Morris SC, Gately MK, Hubbard BR, Gause WC, Urban JF. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp Med* 1994; 179: 1563-72.

CAPÍTULO III

Papel dos leucotrienos na resposta imune em camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*

Running title: Papel dos leucotrienos em infecções por *S. venezuelensis*

¹Machado E. R., ¹Ueta, M. T., ¹Oliveira, J. B. A., ^{*2}Faccioli, L. H.

¹Departamento de Parasitologia - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, SP., Brasil.

^{*2}Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, SP., Brasil.

***Autor para correspondência:** Lúcia Helena Faccioli. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, SP., Brasil. E-mail: faccioli@fcfrp.usp.br

OBS: O trabalho será submetido a revista "J. Immunology".

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o papel dos leucotrienos na resposta imune inata e adquirida em camundongos infectados com linhagem L-2 de *S. venezuelensis*. Camundongos machos, Swiss, pesando de 12 e 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram subdivididos em três grupos: G1: animais não infectados (controle); G2: animais infectados; G3: animais infectados e tratados diariamente com MK-886. Os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1500 larvas filarióides de *S. venezuelensis* recuperadas de culturas, mantidas por 3 dias a 28°C. Nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 após infecção, os animais foram sacrificados e foram determinados a leucocitose circulante e o recrutamento celular para a cavidade peritoneal (LCP) e espaço broncoalveolar (LBA). O nível de citocinas nos pulmões foi determinado em todos os dias observados, e no 5º e 7º dias após a infecção foram realizadas contagens de ovos/g/fezes e de fêmeas parasitas. A infecção (G2) pelo *S. venezuelensis* induziu aumento significativo no número de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares no sangue, e migração destas células para LCP e LBA. O tratamento dos animais infectados com MK-886 (G3) inibiu de forma significativa a migração celular nos dois compartimentos e o número de leucócitos circulantes, no período observado. O número de ovos por grama de fezes e fêmeas parasitas férteis recuperadas dos animais do G3 foram maiores do que no G2. Quanto à liberação das citocinas IL-4 e IL-12, houve aumento na produção em ambos os grupos infectados em todos os dias analisados, em comparação ao G1, enquanto a concentração de IL-5 foi significativamente menor no G3. As citocinas IL-12 e IFN- γ estão envolvidas na proteção do parasita contra a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a cronificação da infecção.

Palavras-chave: *Strongyloides venezuelensis*, leucotrienos, MK886, eosinófilos, citocinas, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ .

OBS: O trabalho será submetido a revista "J. Immunology".

Introdução

Strongyloides sp é um parasita intestinal do homem e animais, com distribuição mundial, sendo endêmico nos países em desenvolvimento (1). A infecção ocorre quando larvas filarióides e de vida livre penetram na pele, passam para a circulação e chegam aos pulmões. Nos pulmões, caem nos alvéolos, sendo então deglutidas. Na mucosa do intestino delgado, as larvas transformam-se em fêmeas partenogenéticas, as quais põem ovos, de onde saem larvas de primeiro estágio (L₁) (2). A resposta inflamatória na estrongiloidíase está associada com a presença do parasita nos pulmões e na mucosa intestinal, porém esta resposta inflamatória nem sempre é acompanhada por manifestações da doença.

Nos hospedeiro imunocompetente, o parasita pode causar infecção crônica ou subclínica, que pode persistir por décadas (3). Outras pessoas apresentam desconforto intestinal intermitente, lembrando sintomas de úlcera ou diarreia episódica. Nos indivíduos imunossuprimidos com doença de Hodgkins, linfomas, leucemias, desnutrição, infecção pelo HIV ou tratamento após transplantes ou submetidos a terapia com corticóides (4, 5), geralmente ocorre a síndrome da hiperinfecção, com disseminação do parasita por todo o organismo (3, 6). Nas infecções disseminadas, a mortalidade varia de 50 a 70% se não forem diagnosticadas precocemente (5, 7).

Alguns trabalhos sugerem que a proteção, no homem e/ou animais, contra infecções por helmintos está relacionada com a presença de células efectoras do sistema imune, principalmente eosinófilos (8, 9, 10, 11) e mastócitos(12), e com aumento da produção de citocinas do padrão TH₂, como IL-3 (13, 14), IL-4 (15, 16), IL-5 (15, 17, 18), IL-9, IL-10, e IL-13 (16, 19), juntamente com síntese elevada de IgA, IgE, IgG e IgM (20, 21). A síntese, proliferação e migração de células para o foco inflamatório é dependente de fatores quimiotáticos com citocinas (22, 23), quimiocinas (24), fatores C3a e C5a (25), de mediadores lipídicos como PAF, LTB₄ (26) e de PGE₂ e PGI₂ (26). Estes mediadores são produzidos e liberados por neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos alveolares, monócitos, basófilos e células epiteliais, após estímulos químicos, físicos e/ou patógenos (27).

Os mediadores lipídicos, dentre eles os leucotrienos, são importantes no recrutamento celular durante o processo inflamatório e na regulação de citocinas da resposta imune em mamíferos (28). Atualmente, dados da literatura mostram que drogas anti-inflamatórias específicas, como o MK-886, são produzidas com o objetivo de se estudar a participação de diferentes mediadores no recrutamento celular. O MK-886 é uma droga não esteróide capaz de inibir a síntese de leucotrienos *in vivo* e em células intactas *in vitro*. Esse composto não tem efeito direto sobre a 5-lipoxigenase do citosol, mas é capaz de ligar-se a FLAP, impedindo que ocorra a ligação desta enzima à membrana plasmática, inibindo consequentemente a síntese dos leucotrienos (29,30). O MK-886 mostrou-se potente inibidor da síntese de LTB₄ e LTC₄ em neutrófilos e eosinófilos estimulados com ionóforo de cálcio (31), bem como da resposta inflamatória das vias aéreas de cobaias imunes e desafiadas com alérgenos (32). Esse composto inibiu também a liberação de fatores quimiotáticos para eosinófilos, de mastócitos e macrófagos, estimulados com salina e sefadex (33). Entretanto, o tratamento de PMN com MK-886 antes da estimulação com *Mycobacterium tuberculosis* inibiu a síntese de LTB₄ e, em consequência, a liberação de IL-8 (34). Os estudos com inibidores da 5-lipoxigenase são importantes e necessários, não só para se determinar a participação dos leucotrienos em diferentes doenças, mas também pelo fato destes inibidores representarem um método alternativo para o controle da reação inflamatória, como na asma, rinite e outros, sem os efeitos adversos causados pelos corticóides ou agentes citotóxicos (35).

Infecções por helmintos (36) induzem os hospedeiros a produzirem quantidades significativas de leucotrienos. Dados expostos na literatura mostram que altas concentrações de LTB₄ e LTC₄ no muco da mucosa intestinal de camundongos infectados com *Trichostrongylus columbriformis* reduzem os movimentos das larvas, atuando também sobre o parasita diminuindo sua fertilidade (37). Embora os leucotrienos participem da regulação da síntese de citocinas inflamatórias, proliferação de linfócitos T e granulócitos (38), células importantes na resposta imunológica protetora em várias infecções, até o momento não há relatos sobre a participação destes mediadores nas infecções

por *Strongyloides* sp. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a participação dos leucotrienos na indução da eosinofilia sistêmica, peritoneal e pulmonar; na modulação da liberação das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ no pulmão e na fecundidade do parasita em camundongos infectados com a linhagem L-2 de *S. venezuelensis*.

Material e Métodos

Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando de 12 e 14 g e com idade entre 21 a 30 dias, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - SP. e do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP-USP). Os animais tiveram acesso livre à água e alimento. Os procedimentos adotados nos experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo nº 19-2).

Parasitas

A linhagem L-2 de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* em abril de 1986. A linhagem é rotineiramente mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Infecção dos animais

Larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas de fezes de ratos infectados e cultivadas em carvão mineral, por três dias a 28°C segundo Looss (1934) (39). As larvas foram recuperadas pelo método de Rugai (40). Após quantificação das L3, os camundongos foram infectados com 1500 (L3) por via subcutânea (s.c.) e sacrificados nos dias 1, 3, 5, 7, 14 após infecção.

Contagem dos ovos por grama de fezes

Nos dias 5 e 7 após infecção os animais foram colocados individualmente para defecarem sobre papel-toalha limpo e úmido. A estimativa do número de ovos/g/fezes foi realizada utilizando-se o método quantitativo de Cornell-McMaster (41). O exame parasitológico foi repetido duas vezes e foi considerada a média dos resultados.

Contagem das fêmeas parasitas

Para contagem dos vermes adultos parasitas, os camundongos foram sacrificados por overdose do anestésico Thionembutal e 10 cm do intestino delgado foram removidos, colocados em placa de Petri contendo salina, seccionados longitudinalmente e incubados por duas horas a 37°C. A contagem das fêmeas parasitas adultas foi então realizada.

Contagem de células do sangue

Os camundongos foram anestesiados com Thionembutal [0,25 mg/g (North Chicago, Illinois, USA)] e amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca. Para contagem total das células, 20 µL do sangue foram diluídos em 380 µL de solução de Turk e contados usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços sangüíneos corados por Rosenfeld (42).

Lavado broncoalveolar

Os camundongos foram sacrificados após anestesia com solução de Thionembutal, e 1 mL de solução salina fosfatada (PBS) contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/SC) a temperatura ambiente foi introduzido nos pulmões, usando-se uma cânula de poliestireno introduzida na traquéia. As células presentes no lavado broncoalveolar (LBA) foram recolhidas imediatamente. Os procedimentos foram repetidos duas vezes. A contagem diferencial das células foi realizada em esfregaços preparados em citocentrífuga e corados pelo Rosenfeld. A contagem de leucócitos no LBA foi realizada como descrito anteriormente (42)

Células peritoneais

As células da cavidade peritoneal (LCP) foram obtidas pela injeção de 3,0 mL de PBS/SC na cavidade peritoneal. Somente 2 a 2,5 mL do fluido foram recolhidos para contagem das células, como descrito anteriormente (42)

Tratamento dos animais com MK886

O composto MK886 ou L663,536 (3-[1-(4-clorobenzil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácido dimetilpropanóico (MERCK-FROSST, CANADA INC) é um inibidor da síntese de leucotrienos. A droga foi diluída em 100 μ L de etanol absoluto, seguido da adição de 900 μ L de água filtrada. Após esta diluição, o volume foi acertado com água destilada para uma concentração de 1 mg/mL. Os animais infectados foram tratados diariamente com 1 mg/kg em intervalos de 24 h, por via oral, sendo a primeira dose administrada 1 h antes da infecção com as larvas L3, e a última dose 1 h antes do sacrifício no tempo preestabelecido (43). O grupo de animais infectados foi tratado diariamente com água.

Obtenção e homogeneização dos pulmões

Os pulmões dos animais parasitados ou não com *S. venezuelensis* foram retirados inteiros, lavados com salina, secos em papel de filtro, e pesados. Após pesagem, os pulmões inteiros foram colocados em tubos de homogeneização de células com 1 mL de PBS pH 7,4 no gelo, e homogeneizados utilizando-se

homogeneizador de órgãos (Polytron Homogenizer, Brinkmann), e centrifugados em 2000 g por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram distribuídos em alíquotas e congelados a - 20°C.

Dosagem de citocinas

A detecção das concentrações de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ nos homogeneizados dos pulmões foi realizada por ensaio imunoenzimático, conforme instruções do fabricante (PharMingen). A concentração de cada citocina nas amostras foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir da curva padrão realizada para cada citocina, e os resultados foram expressos em pg da citocina por mg de tecido (pg/mg). Placas de poliestireno de 96 poços (Costar) foram incubadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IL-4 (BVD4-1D11, 1 μ g/ml), anti-IL-5 (TRFK-5, 500 μ g/ml), anti-IL-10 (JES5-2A5, 1 μ g/ml), anti-IL-12 (C15.6, 1 μ g/ml) ou anti-IFN- γ (XMG1.2, 1 μ g/ml) diluídas em tampão carbonato pH 9,0, e incubadas por 18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes (3x) com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween [PBS-T (PBS 1x + 0,05% Tween)], e depois incubadas com tampão de bloqueio (TB) [PBS-T + BSA 1% (m/v)], por 2 h a temperatura ambiente (TA). Após lavadas 3x com PBS-T, as placas foram incubadas com 100 μ L dos homogeneizados e com as citocinas recombinantes para obtenção da curva padrão (PharMingen). As concentrações das citocinas diluídas em TB variaram de 0,48 a 5.000 pg/ml. Após incubação por 18 h a 4°C, as placas foram lavadas 3x com PBS-T e incubadas com o anticorpo de detecção biotinilado diluído em TB, para as respectivas citocinas. Após 2 h de incubação a temperatura ambiente (TA), as placas foram novamente lavadas com PBS-T e foram adicionados 100 μ L do reagente AB (Avidina/Biotina) na concentração de 0,5 mg/mL e foram então incubadas por 1 h a TA. Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada adicionando-se 100 μ L da solução de substrato, contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina [TMB (Genzyme Diagnostics)] e as placas foram novamente incubadas por 5 a 30 min ao abrigo da luz a TA. A reação foi interrompida adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico (1N de H₂SO₄), e os valores

de absorvância foram determinados em leitor de ELISA (Metertech Inc., modelo 960) a 490 nm.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ S. E. M. e foram analisados estatisticamente usando o método não paramétrico Student t test. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Cinética da contagem de leucócitos no sangue de camundongos infectados com *S. venezuelensis*. Efeito do tratamento com MK-886

A Fig. 1 mostra qualitativa e quantitativamente o aumento de células no sangue em resposta à infecção com larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis* e o efeito do tratamento dos animais com o composto MK-886, inibidor da síntese de leucotrienos. A infecção com L3 induziu aumento significativo de leucócitos totais no sangue dos camundongos, em comparação com o grupo controle, o qual atingiu o pico no 14º dia após infecção. Porém, quando estes animais foram tratados com o composto MK-886 e infectados, o número de leucócitos no sangue apresentou valores semelhantes ou abaixo dos encontrados nos animais controle entre o 1º e o 7º dias após infecção. O número de leucócitos totais voltou a ficar acima dos valores do controle somente no 14º dia após estímulo (Fig. 1A), mas permaneceu 62% abaixo dos animais infectados sem tratamento.

Houve aumento significativo no número de eosinófilos (Fig. 1B) no sangue em resposta à infecção com L3, em todos os tempos analisados, atingindo o pico no 14º dia após estímulo, de maneira similar ao observado nos leucócitos totais. O composto MK-886 inibiu o aumento de eosinófilos no sangue, sendo os valores inferiores aos encontrados no grupo controle entre o 1º e 7º dia após infecção. No entanto, no 14º dia da infecção, o número destas células no sangue ficou acima dos valores dos animais controle, mas diminuídos cerca de 79%, em comparação com os camundongos somente infectados.

Perfil semelhante ao descrito acima para eosinófilos, de aumento induzido pela infecção com o parasita e diminuição de 44% após o tratamento com o composto MK-886, foi observado para as células mononucleares (Fig. 1C).

Cinética do recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal de camundongos infectados com *S. venezuelensis*. Efeito do tratamento com MK-886

Como mostra a Fig. 2, a infecção s.c com larvas L3 de *S. venezuelensis* induz recrutamento de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal, quando comparado com o grupo controle. Nestes animais, o aumento de leucócitos totais e de eosinófilos foi tempo-dependente e significativo durante todo o tempo de observação (Fig. 2A, B), mas para células mononucleares, somente a partir do 3º dia após infecção (Fig. 2C). O pico de recrutamento de todos os tipos de células ocorreu no 14º dia. O tratamento dos animais com MK-886 inibiu o recrutamento de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares para esse compartimento, tendo os números destas células permanecido semelhantes aos do grupo controle até o 7º dia. No entanto, no 14º dia os valores encontrados para leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares estavam acima do grupo controle, mas inibidos cerca de 54%, 67% e 24% respectivamente, em relação aos animais somente infectados.

Estes dados mostram que leucotrienos modulam a síntese e o influxo de células inflamatórias para a cavidade peritoneal.

Cinética do recrutamento de leucócitos para LBA de camundongos infectados com *S. venezuelensis*. Efeito do tratamento com MK-886

Como mostrado na Fig. 3, infecção s.c com larvas L3 de *S. venezuelensis* também induz recrutamento significativo de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares para o LBA, em comparação com o grupo controle. O pico de leucócitos totais (Fig. 3A) e de células mononucleares (Fig. 3C) foi detectado no 5º dia da infecção, e para eosinófilos no 14º dia (Fig. 3B). O tratamento dos animais com MK-886 inibiu de forma significativa recrutamento de leucócitos totais (30%) e

de eosinófilos (86%) para o LBA durante todo o período estudado, sendo os valores semelhantes aos dos animais controles. Comparando os valores destas células entre os grupos infectados tratado e sem tratamento, houve diminuição significativa de leucócitos totais no 5º e no 7º dia após estímulo, e para eosinófilos no 5º, 7º e 14º dias. A migração de células mononucleares nos animais tratados com MK-886 manteve-se a nível basal e semelhante ao grupo controle, nos dias 1º, 3º, 5º e 7º, aumentando significativamente no 14º (45%). Comparando o recrutamento destas células entre o grupo infectado e o grupo tratado, observou-se diminuição significativa somente no 5º e 7º dia. No pulmão, a migração destas células também foi modulada por leucotrienos.

Efeito do tratamento com MK-886 na longevidade e fertilidade das fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*

Como mostra a Fig. 4, o tratamento dos animais infectados com *S. venezuelensis* com o composto MK-886 aumentou de modo significativo a eliminação de fêmeas, a fertilidade e a oviposição das fêmeas parasitas deste helminto. O número de fêmeas recuperadas no 5º e no 7º dia após infecção aumentou de forma significativa entre 66% a 58% respectivamente, nos animais tratados com MK-886 (Fig. 4A). Nestes animais, um aumento significativo de 85% também foi observado no número de ovos/g/fezes, somente no 7º dia (Fig. 4B). Assim, esses resultados sugerem que leucotrienos modulam a expulsão deste nematoda, permitindo que maior número de fêmeas parasitas fixam na mucosa intestinal e liberam maior número de ovos.

Liberação de citocinas nos animais infectados com *S. venezuelensis*. Efeito do tratamento com MK-886

O perfil de concentração das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ no homogeneizado pulmonar de animais infectados s.c com larvas filarióides de *S. venezuelensis*, tratados ou não com MK-886, está representado na Fig. 5. Os níveis de IL-4 nos animais tratados ou não foram semelhantes e acima dos valores do grupo controle, entre o 1º e o 14º dias (Fig. 5A). O tratamento com MK-886 não

alterou a síntese nem a liberação de IL-4 durante o tempo observado. A infecção pelo *Strongyloides* induziu aumento significativo de IL-5 entre o 1º e o 14º dia após infecção, sendo que o tratamento dos animais inibiu de forma significativa a liberação desta citocina durante todo o período de observação (Fig. 5B). Quanto à IL-10, como mostra a (Fig. 5C), houve aumento significativo e semelhante entre os grupos infectados, tratados ou não com MK-886, somente no 1º e no 3º dia após infecção, quando comparados com grupo controle.

Em relação à concentração de IL-12 (Fig. 6A), houve aumento significativo entre os grupos infectados tratados ou não com MK-886, quando comparados com os animais do grupo controle, durante todos os períodos estudados. O pico da concentração de IL-12 foi detectado no 14º após infecção para o grupo de animais infectados tratados ou não com MK-886. Observou-se que os leucotrienos induziram síntese de IL-12 em infecções por *Strongyloides*. Os níveis de IFN- γ (Fig. 6B), nos animais tratados ou não foram semelhantes e acima dos valores do grupo controle no 1º e 3º dia após infecção. Porém, no 5º e 7º dias, os valores de IFN- γ sofreram redução significativa nos camundongos infectados, quando comparados aos animais do grupo controle. Entretanto, nos animais infectados e tratados com MK-886, no 5º e 7º dias os valores desta citocina foram semelhantes aos animais controle.

A Tabela I sintetiza todos os parâmetros estudados em animais infectados com *S. venezuelensis*, tratados ou não com inibidor da síntese de leucotrienos, no 7º dia após infecção.

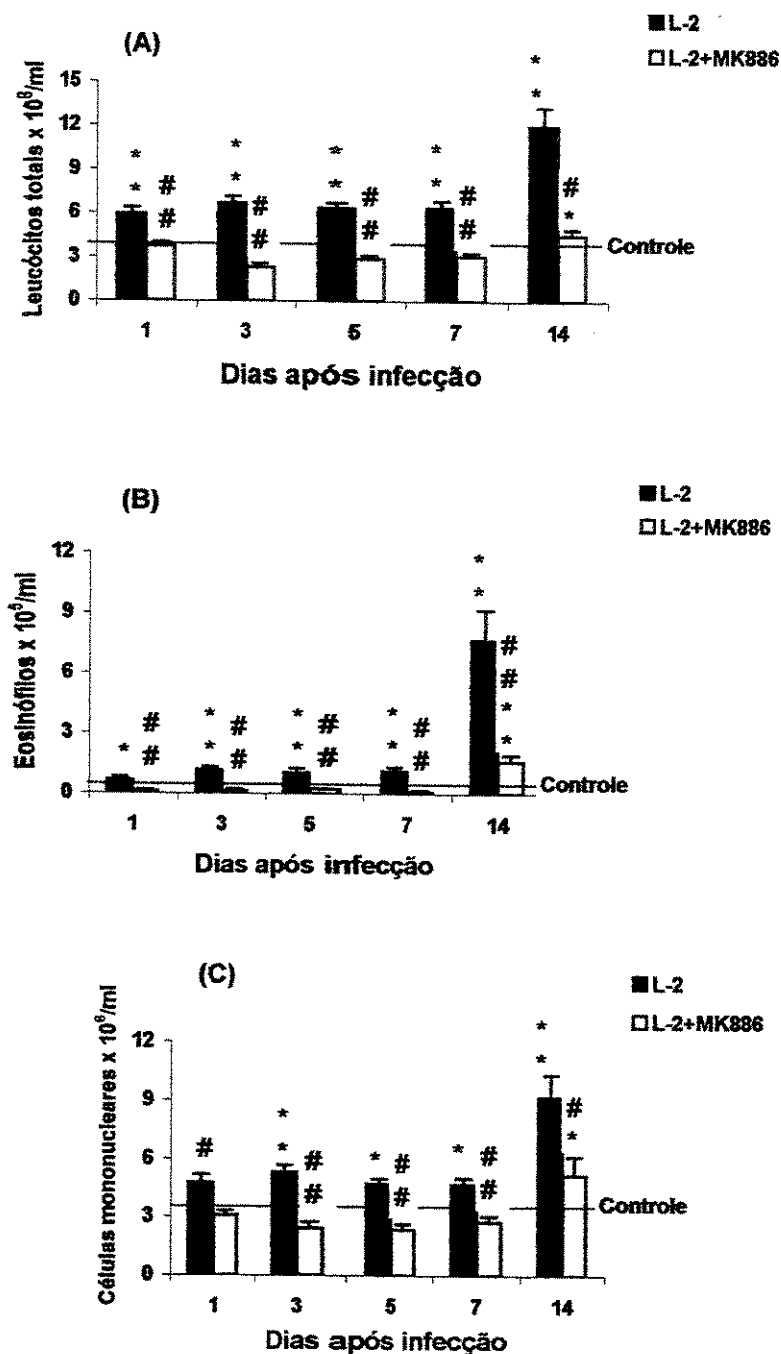


Fig. 1. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no sangue de camundongos infectados tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M de três experimentos independentes (n=27 animais). Os símbolos, representam diferenças significativas entre os animais infectados, tratados e infectados e os não infectados; # entre os animais infectados e tratados e infectados. $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

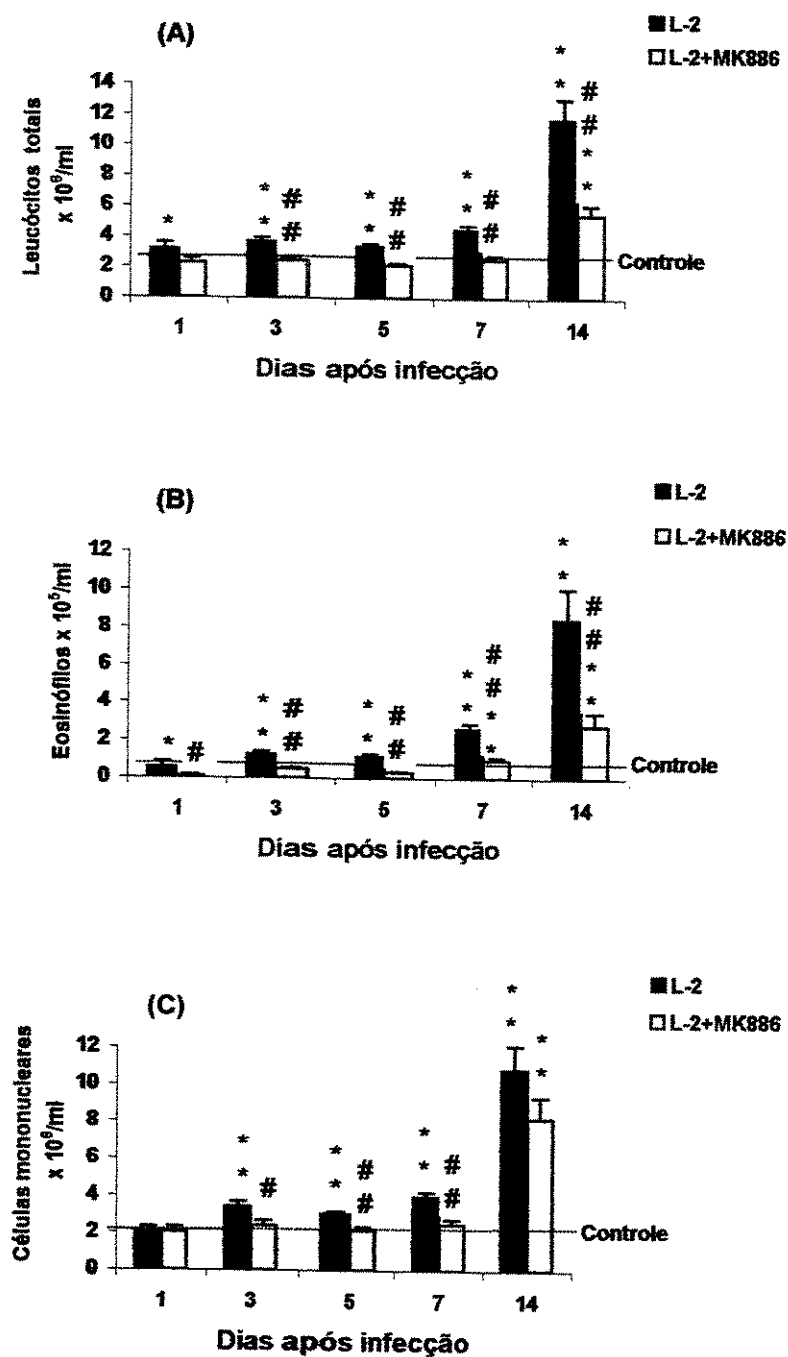


Fig. 2. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *S. venezuelensis* tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados, tratados e infectados e os não infectados; # entre os animais infectados e tratados e infectados. * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

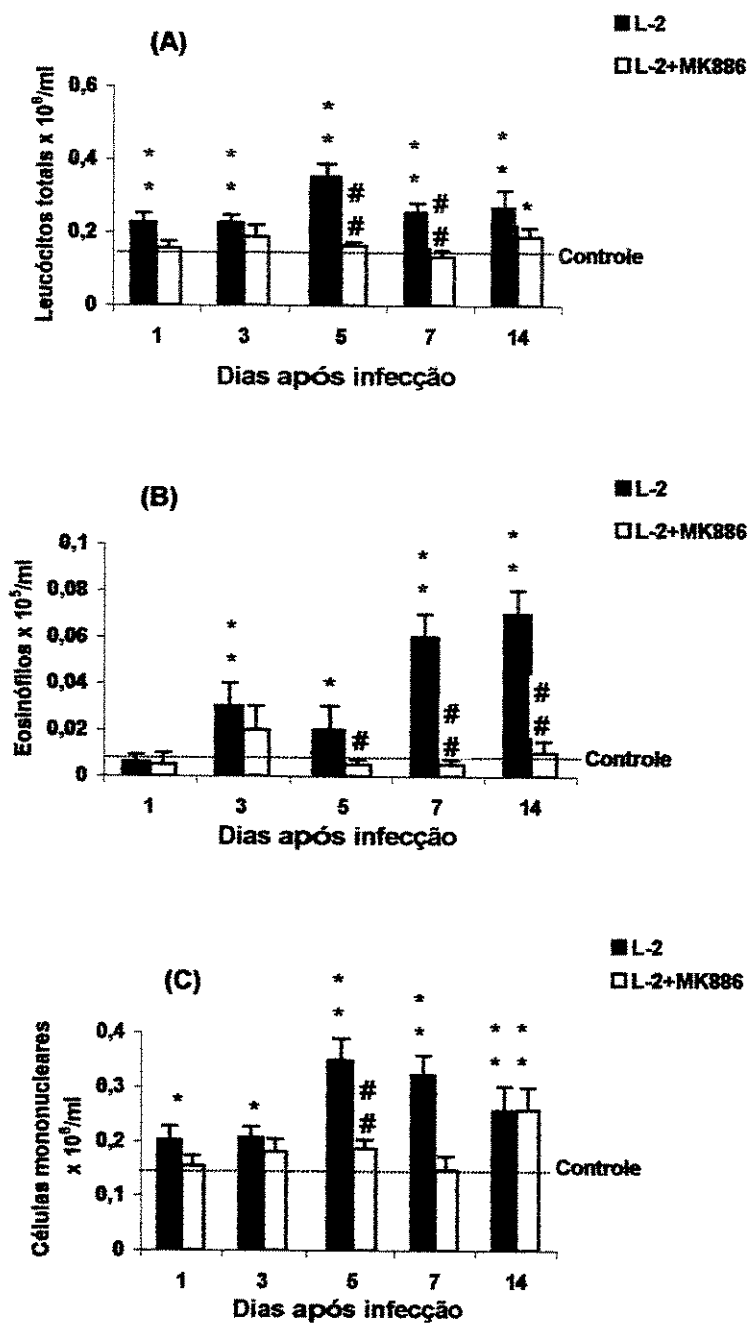


Fig. 3. Número de leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados, tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, *representam diferenças significativas entre os animais infectados, tratados e infectados e os não infectados; # entre os animais infectados e tratados e infectados. * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

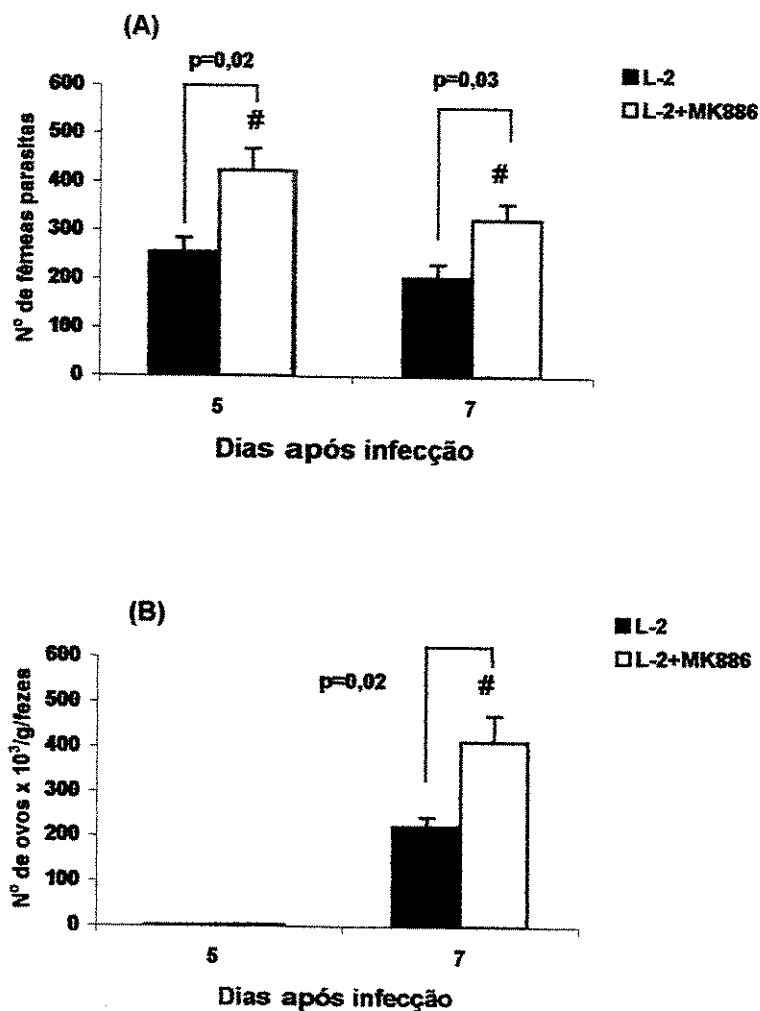


Fig. 4. Número de fêmeas parasitas (A) e ovos/g/fezes (B) recuperados de camundongos infectados com *S. venezuelensis* tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M de três experimentos independentes (n=27 animais). Os símbolos, # representam diferenças significativas entre L-2 e L-2+MK-886. *p<0,05; **p<0,001.

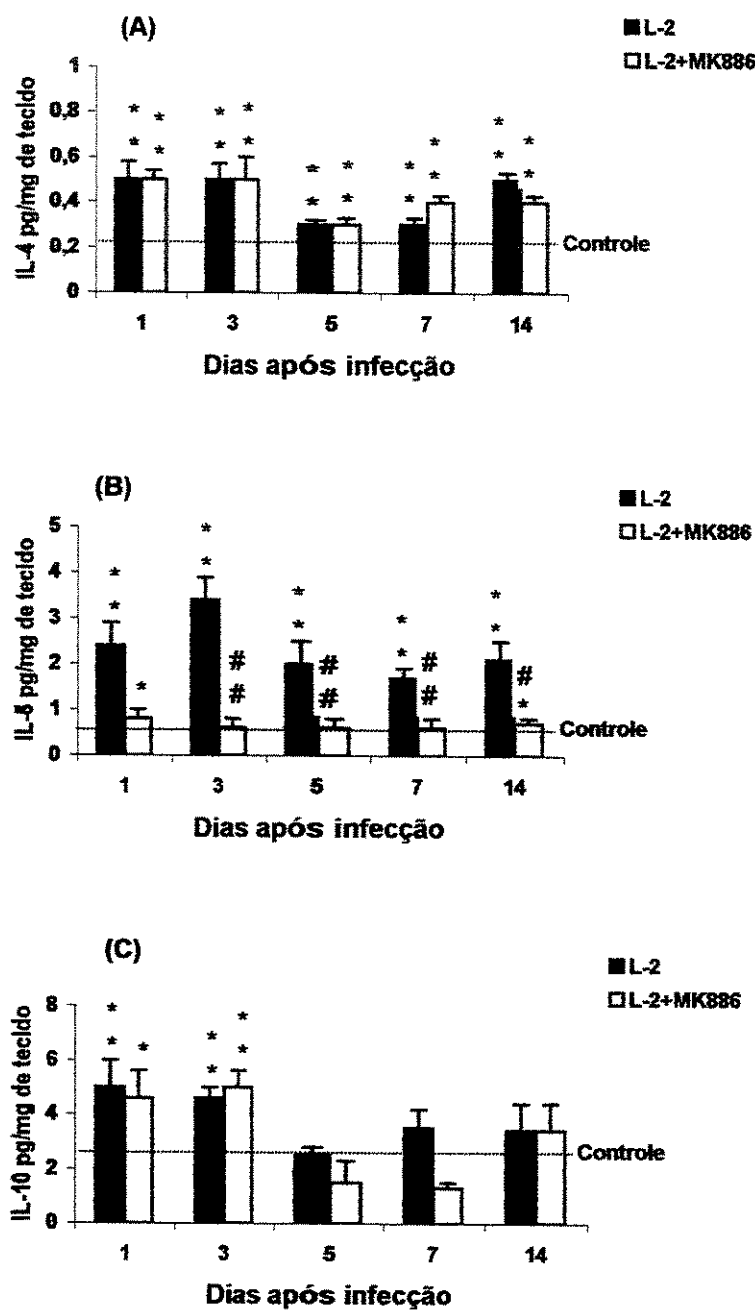


Fig. 5. Citocinas IL-4 (A), IL-5 (B) e (IL-10) no pulmão de camundongos infectados com *S. venezuelensis* tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M de três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; # entre os animais infectados. * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

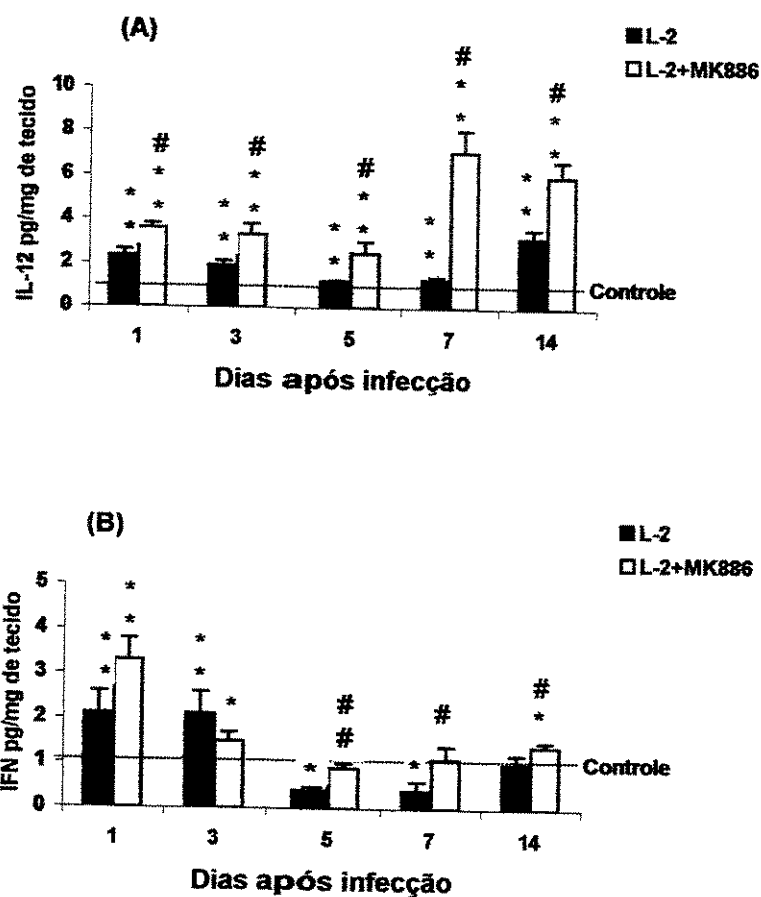


Fig. 6. Citocinas IL-12 (A) e IFN-gama (B) no pulmão de camundongos infectados com *S. venezuelensis* tratados ou não com MK-886. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M de três experimentos independentes ($n=27$ animais). Os símbolos, * representam diferenças significativas entre os animais infectados e os não infectados; # entre os animais infectados. * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Tabela 1: Síntese entre o número de eosinófilos, células mononucleares, fêmeas parasitas, ovos/g/fezes e citocinas nos pulmões de camundongos infectados com *S. venezuelensis* tratados ou não com MK-886, no 7° dia após infecção.

Grupos	Nº de células												
	Eosinófilos			Células mononucleares			Fecundidade			Citocinas (pg/mg de tecido)			
Animais	Sangue	Cp	LBA	Sangue	Cp	LBA	Nº fêmeas	O.P.G	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IFN-γ
L-2 + H ₂ O	1,12±0,18	2,61±0,29	0,06±0,01	4,68±0,31	3,96±0,24	0,33±0,04	205±27	223x10 ³ ± 21	0,3±0,003	1,7±0,2	3,5±0,7	1,3±0,1	0,4±0,2
L-2 +K886	0,11±0,04	0,95±0,13	0,005±0,002	2,74±0,30	2,50±0,26	0,15±0,03	324±33	413x10 ³ ± 59	0,4±0,03	0,6±0,2	1,3±0,2	7,1±1,0	1,1±0,3
	p=0,029	p<0,001	p=0,004	p<0,001	p=0,002	p=0,826	p=0,035	p=0,028	p=0,030	p=0,002	p=0,406	p<0,001	p=0,018

Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes (n=27), obtidos no 7° dia após infecção. Os símbolos, # representam diferenças significativas entre os dois grupos infectados. *p<0,05; **p<0,001; Dias após infecção (d . i); Cp= capa; LBA= lavado broncoalveolar; O.P.G.= ovos por gramas de fezes

Discussão

Os experimentos realizados no presente estudo demonstraram que *S. venezuelensis* induz aumento de leucócitos no sangue e migração destas células para a cavidade peritoneal e para os pulmões em camundongos. O número de leucócitos observado após infecção com L3 aumentou entre o 1º e 14º dia, embora com diferenças na cinética durante o período observado. O número de eosinófilos, célula descrita como o principal elemento envolvido na eliminação de helmintos, aumentou de forma significativa desde o início do parasitismo, atingindo o pico no 14º dia após infecção. Estes dados estão de acordo com os descritos na literatura, que mostram aumento de eosinófilos no sangue periférico e no intestino delgado de animais parasitados com *S. venezuelensis* (8, 15). Nos animais infectados também houve aumento de células mononucleares, porém com diferenças no recrutamento para os compartimentos, com pico no 5º dia no LBA e no 14º dia no sangue e cavidade peritoneal. Recentemente demonstramos que infecção com *S. venezuelensis* aumenta o número de leucócitos totais e células mononucleares no sangue, na LCP e no LBA (trabalho submetido). Estes dados estão de acordo com os da literatura para outros parasitas (8, 10, 15, 30). Embora não tenhamos usado uma metodologia específica para a contagem de mastócitos no fluido da LCP, foi observado aumento significativo destas células (dados não mostrados) em todos os tempos analisados. Estes resultados estão de acordo com os dados descritos na literatura (14), que mostram que infecções por *S. venezuelensis* induzem mastocitose no tecido intestinal, fator importante para a expulsão deste nematoda.

O recrutamento de células inflamatórias para o foco inflamatório depende de mediadores proteicos e lipídicos. Os mediadores lipídicos PAF e LTs são potentes quimioatraentes liberados por células no sítio inflamatório, induzindo a ativação de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares *in vivo* (26). Estes mediadores apresentam funções importantes nas inflamações pulmonares, como na asma, alergias respiratórias, fibrose pulmonar e infecções por parasitas (42, 44). Para verificar a contribuição dos LTs

no recrutamento de leucócitos induzidos por L3 de *S. venezuelensis*, camundongos foram tratados diariamente com MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos (42). O tratamento dos animais parasitados inibiu significativamente leucócitos totais, eosinófilos, células mononucleares e mastócitos no sangue, LCP e LBA, em todos os períodos estudados, sugerindo o envolvimento deste mediadores na leucocitose e no recrutamento celular por esse parasita. Resultados da literatura mostram que LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 são quimioatraentes para eosinófilos (26, 42).

Os leucócitos são recrutados para o foco inflamatório por citocinas como IL-1, IL-5, IL-8 (10, 11, 23, 24), por sua vez produzidas por células TCD_4^+ . Os resultados obtidos mostram que *S. venezuelensis* induziu síntese de IL-4 e IL-5 durante todo o período da infecção. Estes dados confirmam os dados expostos na literatura (11, 19), que mostram que IL-4 e IL-5 são liberadas nas infecções por helmintos, caracterizadas por mastocitose, aumento na produção de IgE e eosinofilia (45, 46, 47, 48). Os efeitos biológicos da IL-4 em infecções por helmintos são indução da produção de IgE pelas células B, diferenciação e proliferação das células TH_2 e proliferação de mastócitos (49), enquanto que IL-5 relaciona-se com a produção e ativação de eosinófilos, proliferação de células B e produção de IgA.

Os resultados obtidos mostram que a infecção por *S. venezuelensis* induz produção significativa de IL-10 nos primeiros dias do estímulo, mas a partir do 5º dia os valores foram semelhantes aos do grupo controle. Em *Schistosoma mansoni* (49), estudos anteriores mostraram que a forma de esquistossômulos na pele induz produção de PGE_2 , a qual aumenta a produção de IL-10 e diminui a síntese de IL-12, permitindo que o hospedeiro desenvolva resposta TH_2 importante no controle da infecção. É possível que em *S. venezuelensis* IL-10 ocorra um fenômeno semelhante, nos primeiros períodos de migração da larva na pele. Estes resultados confirmam os dados descritos na literatura (13), que mostram que células dos linfonodos mesentéricos e linfócitos intraepiteliais de camundongos infectados com *S. rattii* não expressam mRNA para IL-10 nos 7º e 12º dias após infecção, mas discordam dos resultados obtidos em camundongos

infectados com *Taenia crassiceps*, que apresentaram alta produção de IL-10 (50), a qual protege o parasita da ação de citocinas do padrão TH₁.

Nossos resultados mostram que *S. venezuelensis* induz também síntese de IL-12 e IFN- γ , sendo que IL-12 está aumentada ao longo de todo o período estudado, com discreta elevação no 14º dia após infecção, enquanto IFN- γ só foi liberado em níveis acima do grupo controle entre o 1º e o 3º dia após infecção. Estas duas citocinas apresentam efeito promotor da sobrevivência de parasitas gastrointestinais (51, 52). Camundongos infectados com *Trichuris muris*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *S. stercoralis*, quando tratados com IL-12 e IFN- γ apresentaram cronificação da infecção, aumento da sobrevivência do parasita no hospedeiro e a fertilidade das formas adultas (17). Embora *S. venezuelensis* tenha induzido a produção destas citocinas em concentrações acima dos valores encontrados nos animais controles, o que poderia tornar a infecção crônica, isto não foi observado, possivelmente porque IL-4 e IL-10, mesmo em pequenas quantidades, neutralizaram os efeitos destas citocinas, desviando o padrão da resposta para TH₂, onde o aumento de eosinófilos, juntamente com mastócitos e IgG (trabalho submetido) expulsaram o parasita a partir do 7º dia após infecção. O tratamento com MK-886 não alterou a liberação de IFN- γ , mas aumentou a liberação de IL-12, principalmente no 7º e 14º dias após infecção. Estes dados estão de acordo com os acima descritos e mostram nos animais infectados e tratados com inibidor de leucotrienos uma estreita correlação entre aumento da liberação de IL-12 nos 7º e 14º dias após a infecção, com aumento do número de fêmeas e de ovos por gramas de fezes, sugerindo que a IL-12 favorece a cronificação da infecção.

O tratamento de camundongos infectados com o composto MK-886 não modificou o perfil de liberação de IL-4 e IL-10, sendo os valores semelhantes entre os animais infectados e os tratados e infectados. Nos animais infectados e tratados com MK-886, a liberação de IL-5 foi inibida, fato este correlacionado à diminuição de eosinófilos em todos os compartimentos estudados.

O aumento do número de fêmeas parasitas adultas no intestino e a maior fertilidade destas, talvez tenha sido resultado do efeito somatório da síntese de

IL-5, aumento de IL-12, inibição do número de eosinófilos, células mononucleares e mastócitos. Este conjunto de fatores se contrapõem à ação biológica da IL-4, que induz à expulsão do parasita da mucosa intestinal (15, 16).

Estes resultados sugerem que a resposta protetora em camundongos infectados com *S. venezuelensis* depende do exato balanço entre a produção de IL-5, de eosinófilos, de células mononucleares, de IL-12 e IFN- γ , e que esse balanço é regulado pelos leucotrienos (17). Assim, torna-se de suma importância entender a relação entre *Strongyloides* sp e hospedeiro, tanto no campo da síntese e ação das citocinas, como também dos mecanismos de ação de drogas que inibem a produção de LTs, possibilitando que mais pesquisas sejam realizadas pelas indústrias farmacêuticas, com relação ao uso drogas antagonistas de LTs no tratamento de inflamações pulmonares. Com o uso destas drogas, a resposta imune protetora do hospedeiro pode ser bloqueada, tornando o paciente portador de estrongiloidíase crônica predisposto à estrongiloidíase disseminada.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Brasil.

Referências

1. Mahmoud, A. A. 1996. Strongyloidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 23: 949-952.
2. Dionisio, D., Manneschi, L. I., di Lollo, S., Orsi, A., Tani, A., Papucci, A., Esperti, F. and F. Leoncini. 2000. *Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* 53: 110-116.
3. Neva, F. A., 1986. Biology and Immunology of Human Strongyloidiasis. *J. Infect. Dis.* 153: 397-406.
4. Dutcher, J. P., Marcus, S. L., Tanowitz, H. B., Wittner, M., Fuks, J.Z. and P. H. Wiernik. 1990. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system

- involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. *Cancer*, 66: 2417-2420.
5. Chieffi, P. P., Chiatton, C. S., Feltrim, E. N., Alves, R. C. and M. A. Paschoalotti. 2000. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo City, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 95: 711-712.
 6. Igra-Siegman, Y., Kapila, R., Sen, P., Kaminski, Z. C. and D. B. Louria. 1981. Syndrome of hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. *Rev. Infect. Dis.* 3: 397-407.
 7. De Vault, G. A. Jr, King, J. W., Rohr, M. S., Landreneau, M. D., Brown, S. T 3rd. and J. C. McDonald. 1990. Opportunistic infection with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. *Rev. Infect. Dis.* 12: 653-671.
 8. Korenaga, M., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Sato, Y., Takatsu, K. and I. Tada. 1991. The role of interleucine-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 72: 502-507.
 9. Sasaki, O., Sugaya, H., Ishida, K. and K. Yoshimura. 1993. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol.* 15: 349-354.
 10. Sugane, K., Kusama, Y., Takamoto, M., Tominaga, A. and K. Takatsu. 1996. Eosinophilia, IL-5 level and recovery of larvae in IL-5 transgenic mice infected with *Toxocara canis*. *J. Helminthol.* 70: 153-158.
 11. Faccioli, L. H., Medeiros, A. I., Malheiro, A., Pietro, R. C., Januário, A., Vargaftig, B. B. 1998. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. *Mediators Inflamm.* 7: 41-47.
 12. Abe, T. and Y. Nawa. 1988. Kinetic study of mast-cell growth factor production by lymphocytes during the course of *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitol. Res.* 74: 484-488.
 13. Abe, T., Sugaya, H. and K. Yoshimura. 1998. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymphonode cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti*-infected mice. *J. Helminthol.* 72: 1-8.
 14. Kobayashi, T., Tsuchiya, K., Hara, T., Nakahata, T., Kurokawa, M., Ishiwata, K., Uchiyama, F. and Y. Nawa. 1998. Intestinal mast cell response and mucosal defence against *Strongyloides venezuelensis* in interleukin-3 hyporesponsive mice. *Parasite*

Immunol. 20: 279-284.

15. Maruyama, H., Osada, Y., Yoshida, A., Futakuchi, M., Kawaguchi, H., Zhang, R., Fu, J., Shirai, T., Kojima, S. and N. Ohta. 2000. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum* infected mice. *Parasite Immunol.* 22: 279-286.
16. Finkelman, F. D., Wynn, T. A., Donaldson, D. D., Urban, J. F. 1999. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr. Opin Immunol.* 11: 420-426.
17. Rotman, H. L., Schnyder-Candrian S, Scott, P., Nolan, T.J., Schad, G. A., Abraham, D. 1997. IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 19: 29-39.
18. Herbert, D. R., Lee, J. J., Lee, N. A., Nolan, T. J., Schad, G. A. and D. Abraham. 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J. Immunol.* 165: 4544-4551.
19. Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan C. A., Morris, S. C., Madden, K. B., Gause, W. C., Urban, J. F. Jr. 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 505-33.
20. Rossi, C. L., Takahashi, E. E., Partel, C. D., Teodoro, L. G. and L. J. da Silva. 1993. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 35: 361-365.
21. Abraham, D., Rotman, H. L., Haberstroh, F. H., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Nolan, T. J. and G. A. Schad. 1995. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp. Parasitol.* 80: 297-307.
22. Sanzs, M. J., Weg, V. B., Bolanowski, M. A. and S. Nourshargh. 1995. IL-1 is a potent inducer of eosinophil accumulation in rat kin. Inhibition of response by a platelet-activating factor antagonist and an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* 154: 1364-1373.
23. Oliveira, S. H. P., Faccioli, L. H., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. 1996. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111: 244-252.
24. Collins, P. D., Weg, V. B., Faccioli, L. H., Watson, M. L., Moqbel, R., Williams, T. J. 1993. Eosinophil accumulation induced by human interleukin-8 in the guinea-pig *in vivo*. *Immunology.* 79: 312-318.

25. Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., Dobos, G., Schopf, E., Norgauer, J. and A. Kapp. 1994. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur. J. immunol.* 24: 518-522.
26. Faccioli, L. H., Nourshargh, S., Moqbel, R., Williams, F. M., Sehmi, R., Kay, A. B. and T. J. Williams. 1991. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammation mediators, *in vivo*. *Immunology* 73: 222-227.
27. Samuelsson, B. 1983. Leukotriene: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 11: 1-13.
28. Peters-Golden, M. 2001. Regulation of the leukotriene biosynthetic pathway. *Clin. Exp. Allergy Rev.* 1: 128-132.
29. Gillard, J., Ford-Hutchinson, A. W., Chan, C., Charleson, S., Denis, D., Foster, A., Fortin, R., Lesger, S., McFarlane, C. S., Morton, H., Piechuta, H., Riendeau, D., Rouzer, C. A., Rokach, J., Young, R. 1989. L- 663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-imethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67: 456-564.
30. Ford-Hutchinson, A. W. 1991. FLAP: a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes. *Trends. Pharmacol. Sci.* 12: 68-70.
31. Memard, L., Pilote, S., Naccache, P.H., Laviolette, M., Borgeat, P. 1990. Inhibitory effects of MK-886 on arachidonic acid metabolism in human phagocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 15-20.
32. Friedman, B. S., Bel, E. H., Buntinx, A., Tanaka, W., Han, Y. H., Shingo, S., Spector, R. Sterk, P. 1993. Oral leukotriene inhibitor (MK-886) blocks allergen-induced airway responses. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147: 839-844.
33. Oliveira, S. H., Faccioli, L. H., Ferreira, S. H., cunha, F. Q. 1997. Participation of interleukin-5, interleukin-8 e leukotriene B4 in eosinophil accumulation in two different experimental models. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: (Supp.II), 205-210.
34. Riedel, D. D., Kaufmann, S. H. 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect. Immun.*, 65: 4620-4623.
35. Lewis, R. A., Austen, K. F., Soberman, R. J. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human

- diseases. *N. Engl. J. Med.*, 323: 645-655.
36. Perdue, M. H., Ramage, J. K., Burget, D., Marshall, J. and S. Masson. 1989. Intestinal mucosal injury is associated with mast cell activation and leukotriene generation during *Nippostrongylus* induced inflammation in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 34: 724-731.
 37. Jones, W. O., Window, R. G., Steel, J. W. and P. M. Outteridge. 1990. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus columbriformis*. *Int. J. Parasitol.* 20: 1075-1079.
 38. Morita, H., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K. Immunosuppressive effect of leukotriene B₄ receptor antagonist *in vitro*. 1999. *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 264: 321-326.
 39. Pessoa, S. B., Martins, A. V. Parasitologia médica. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. p. 986.
 40. Rugai, E., Mattos, T., Brisola, A. P. 1954. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14: 5-8.
 41. Gordon, H. M., Whitlock, H. V. A. 1939. New technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Comm. Sci. Ind. Organiz.*, 12: 17-18.
 42. Faccioli, L. H., Souza, G. E., Cunha, F. Q., Poole, E., Ferreira, S. H. 1990. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions*, 30: 344-349.
 43. Medeiros, A. I., Silva, C. L., Malheiro, A., Maffei, C. M., Faccioli, L. H. 1999. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the β -glucan present in their cell wall. *Br. J. Pharm.*, 128: 1529-1537.
 44. Tohda, Y., Nakajima, S., Schizawa, T., Maeda, K., Ohmori, S., Satoh, H., Ishii, T. and T. Kamitani. 1997. The inhibitory effect of TMK688, a novel anti-allergic drug having both 5-lipoxygenase inhibitory activity and anti-histamine activity, against bronchoconstriction, leukotriene production and inflammatory cell infiltration in sensitized guinea pig. *Clin. Exp. Allergy*. 27: 110-118.
 45. Diamant, Z., Hiltermann, J. T., Van Rensen, E. L., Callenbach, P. M., Veselic-Charvat, M., van der Veen, H., Sont, J. K. and P. J. Sterk. 1997. The effect of inhaled leukotriene D₄ and methacholine on sputum cell differentials in asthma. *Am. J.*

- Respir. Crit. Care Med.* 155: 1247-1253.
46. Negrão-Corrêa, D. 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 43: 291-299.
 47. Rotman, H. L., Yutanwiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Gleich, G. J., Nolan, T. J., Schad, G. A., Abraham, D. 1996. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp. Parasitol.*, 82: 267-78.
 48. Dent, L. A., Daby, C. M., Mayrhofer, G., Zimmerman, T., Hallett, A., Bignold, L. P., Creaney, J., Parsons, J. C. 1999. Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. *Infect. Immun.*, 67: 989-993.
 49. Watanabe, K., Hamano, S., Yada, S., Noda, K., Kishihara, K., Nomoto, K., Tada, I. 2001. The effect of interleukin-4 on the induction of intestinal mast cells and chronological cytokine profiles during intestinal nematode *Strongyloides ratti* infection. *Parasitol. Res.*, 87: 149-154.
 50. Ramaswamy, K., Kumar, P., He, Y. X. 2000. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10 mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 165: 4567-4574.
 51. Mooney, K. A., Spolski, R. J., See, E. J., Kuhn, R. E. 2000. Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice. *Infect. Immunit.*, 68: 2393-2401.
 52. Finkelman, F. D., Madden, K. B., Cheever, A. W., Katona, I. M., Morris, S. C., Gately, M. K., Hubbard, B. R., Gause, W. C., Urban, J. F. Jr. 1994. Effects of interleukin-12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J. Exp. Med.*, 179: 1563-1572.

CAPÍTULO IV

Identidade antigênica de oito linhagens de *Strongyloides venezuelensis* no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

*Eleuza Rodrigues Machado, †Lúcia Helena Faccioli [‡]Julia Maria Costa-Cruz,
‡Elaine Vicente Lourenço, ‡Maria Cristina Roque-Barreira, [‡]Maria do Rosário de
Fátima Gonçalves-Pires, *Marlene Tiduko Ueta.

Runnig title: Identidade antigênica de *S. venezuelensis*.

^{*}Dep. de Parasitologia – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas – SP., Brasil.

[‡]Dep. de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia-MG., Brasil.

[†]Dep. de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP., Brasil.

[‡]Dep. de Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP., Brasil.

*Autor para correspondência: Marlene Tiduko Ueta. Dep. de Parasitologia – Instituto de Biologia – UNICAMP. Cidade Universitária – Severino Vaz, Bairro: Barão Geraldo, Campinas, Cx. Postal: 6109, Cep. 13083-970, São Paulo, Brasil. **E-mail:** mtu@unicamp.br

OBS: O trabalho será submetido a revista "Clinical Immunology".

RESUMO

Nesse estudo, verificamos a identidade antigênica de oito linhagens de *S. venezuelensis*, empregando os testes de imunofluorescência indireta, de ELISA e de "Immunoblot". Larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis* das linhagens L-2, L-11, L-12, L-27, L-46, L-49, L-50 e L-cepa, foram obtidas de culturas de fezes de *Rattus norvegicus*. Na IFI foram utilizados cortes de 4 µm de L3, e no ELISA e "Immunoblot", extrato alcalino. Foram testadas 90 amostras de soro, sendo 30 de pacientes com *S. stercoralis*, 30 pacientes com outras parasitoses e 30 de indivíduos negativos para enteroparasitas. A sensibilidade e especificidade média entre as oito linhagens, tanto na IFI como no ELISA, foram de 93% e 100% respectivamente, e no "Immunoblot" de 97% e 100%. No "Immunoblot", IgG anti-*S. stercoralis* reconheceu uma única fração antigênica de peso molecular aparente de 45 kDa. Amostras de soro de pacientes com *S. stercoralis* reconheceram com alta sensibilidade e especificidade antígenos de diferentes linhagens de *S. venezuelensis*, indicando identidade antigênica. O uso de antígenos destas diferentes linhagens pode ser recomendado para o imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

Palavras chave: *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, strongiloidíase, antígeno, anticorpos, ELISA, IFI, "Immunoblot", identidade antigênica, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Strongyloides stercoralis apresenta distribuição mundial e acomete aproximadamente 30 milhões de pessoas, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais (1). O curso clínico da estrongiloidíase é usualmente benigno, com poucos sintomas e com moderada diarreia. Entretanto, casos da forma invasiva da doença, caracterizada por choque séptico, meningite e grande aumento da carga parasitária e associados com alta mortalidade já foram descritos (2, 3).

A infecção humana por esse nematoda é de difícil diagnóstico, pois na maioria dos indivíduos, o parasita é encontrado em número muito reduzido, além da mínima e irregular liberação de larvas nas fezes. Assim, o diagnóstico parasitológico da estrongiloidíase, mesmo utilizando-se métodos específicos para a detecção de larvas nas fezes (4) é pouco sensível e de confirmação extremamente difícil (5,6,7).

Muitos estudos sugerem que a detecção de anticorpos espécie específica em amostras de soro de indivíduos com *S. stercoralis* possa ser importante no complemento do diagnóstico desta infecção. A maioria das pesquisas tem se concentrado na detecção de anticorpos IgG específicos diretamente contra antígenos de larvas de *S. stercoralis*, utilizando-se testes imunológicos, como imunofluorescência indireta (IFI) (8,9,10), ELISA (11,12,13) e "Immunoblot" (14, 15,16), os quais contribuem para um diagnóstico precoce da infecção, importante para os pacientes do grupo de risco.

A dificuldade de obtenção de larvas de *S. stercoralis* tem sido um fator limitante para o desenvolvimento de reações mais sensíveis e específicas que possam ser empregadas no imunodiagnóstico desta helmintíase. Assim, seria conveniente o uso de antígenos provenientes de outras espécies, como *Strongyloides cebus* (17), *S. ratti* (9,10) e *S. venezuelensis* (18), que fossem reconhecidos por anticorpos anti-*S. stercoralis* presentes nas amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase e que apresentassem alta sensibilidade e especificidade. Estas espécies produzem um grande número de larvas filarióides a

partir de culturas de fezes de ratos experimentalmente infectados, o que simplifica a obtenção de extratos antigênicos (8,19).

O objetivo deste estudo foi verificar se oito linhagens de *S. venezuelensis* apresentam identidade antigênica com *S. stercoralis*, empregando os testes de IFI, ELISA e "Immunoblot", no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Parasitas: As linhagens de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934), utilizadas nesta pesquisa foram obtidas de diferentes roedores e receberam denominações de acordo com a data de isolamento na Universidade Estadual de Campinas: linhagem L-2 isolada de *Bolomys lasiurus* (abril de 1986), L-11 de *Rattus norvergicus* (maio de 1986), L-12 de *Zygodontomys* sp (junho de 1986), L-27 de *Holochilus brasiliensis* (julho de 1986), L-46 de *Rattus rattus* (maio de 1987), L-49 de *Nectomys squamipes* (agosto de 1988), L-50 de *Myocastor coypus* (novembro de 1988) e L-cepa [roedor silvestre (1984), fornecida pelo ICB - Belo Horizonte, MG]. Todas as linhagens de *S. venezuelensis* são mantidas em *Rattus norvergicus*-Wistar no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil. Larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas de fezes de ratos experimentalmente infectados e cultivadas em carvão mineral, por três dias a 28°C pelo método de Loos (20). As larvas foram recuperadas pelo método de Rugai (21), lavadas cinco vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M pH 7.2, contendo 400 IU/ml de benzyl penicilina e 2 mg/ml de streptomycin sulfate e estocada a - 70°C em PBS.

Cortes em crio-micrótomo: Os cortes em crio-micrótomo foram realizados segundo Costa-Cruz e colaboradores (10). Larvas filarióides de cada linhagem foram embebidas em "Tissue Tek®" e cortadas em secções de 4 µm com crio-micrótomo (Cryocut 1800 Reichert-Jung). As secções foram colocadas em lâminas extrafinas (76mm x 24mm) previamente desengorduradas em solução de álcool-

éter, secas a temperatura ambiente e conservadas a -20°C até o momento de uso. Foram colocadas dez secções por lâmina.

Extratos alcalinos de *S. venezuelensis*: Extratos alcalinos de aproximadamente 170.000 larvas de cada linhagem de *S. venezuelensis* foram preparados, adicionando-se 1 ml de NaOH 0.15 M (Merck, Germany) às larvas e mantendo-se por 6 h sob agitação lenta a 4°C. Subseqüentemente, adicionou-se 0.5 ml de HCl 0.3 M (Merck, Germany), até atingir o pH 7.0. Estas preparações foram então centrifugadas a 12.400 g por 30 min a 4°C. A dosagem protéica dos sobrenadantes foi realizada utilizando-se o método de Lowry (22). Estes extratos antigênicos foram utilizados no ELISA e "Immunoblot".

Amostras de soro: 90 amostras de soro foram utilizadas: 60 de pacientes com exames fecais positivos pelo método parasitológico de Ritchie (23) realizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. Destes, 30 eram de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *estrongiloidíase*, 30 de pacientes com outros enteroparasitas, como: *Ancylostoma* sp (5 casos); *Enterobius vermicularis* (5 casos); *Hymenolepis nana* (5 casos); *Trichuris trichiura* (5 casos); *Ascaris lumbricoides* (5 casos) e *Giardia lamblia* (5 casos). As 30 amostras restantes foram de estudantes sadios da área Biomédica da mesma Universidade, que tinham três amostras de fezes negativas pelos métodos de Baermann (24) e Lutz (25) e sem história prévia de *estrongiloidíase*. Todos os procedimentos humanos e animais realizados nesta pesquisa foram respectivamente aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil e da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Reação de imunofluorescência indireta: Duas amostras de soro de controles positivos, negativos e amostras teste foram diluídos 1:20 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,2, e depositadas nas lâminas contendo os cortes das larvas filarióides das diferentes linhagens de *S. venezuelensis*. As

amostras de soro positivas foram testadas em diluições seriadas na razão dois. Após incubação por 30 min a 37°C, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por 5 min, e adicionou-se a seguir o conjugado de anti-IgG humana marcada com fluoresceína (Biolab) no título de 150, diluído em PBS contendo 1% de azul de Evans como coloração de contraste e incubados por 30 min a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas, secas e montadas adicionando-se glicerina tamponada pH 9.5, recobertas com lamínulas e examinadas ao microscópio de imunofluorescência (Olympus BH 2 RFC), sob aumentos de 200 e 400X. Os resultados foram expressos em títulos, e considerados positivos quando ≥ 20 . Os testes foram realizados ao mesmo tempo para cada amostra de soro contra os oito antígenos.

ELISA: Os testes imunoenzimáticos foram realizados usando microplacas de poliestireno (Difco, São Paulo, Brasil), e os reagentes testados usando 50µl/poço. As placas foram sensibilizadas com extratos alcalinos de cada linhagem de *S. venezuelensis* (10 µg/ml) diluídos em tampão carbonato - bicarbonato 0.06 M pH 9.6 e incubadas por 18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes (3x) por 5 min com PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T) pH 7,2 e incubadas com as amostras de soros, incluindo amostras controle padrão positivo e negativo, diluídas a 1:80 em PBS-T por 45 min a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, as placas foram incubadas com o conjugado de coelho anti-IgG humana (Fc chain specific) marcado com peroxidase (Sigma, USA) diluído a 1:2000 em PBS-T por 45 min à 37°C. Após nova lavagem, adicionou-se o substrato enzimático consistindo de H₂O₂ (Merck, Germany) mais o-phenylenodiamine (OPD) diluídos em tampão citrato - fosfato (Na₂HPO₄) 0.1 M, pH 5.5 e as placas foram novamente incubadas por 15 min na ausência de luz. As reações foram interrompidas com 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N). Os valores de absorbância foram determinados no leitor de ELISA (Metrolab, Argentina) a 490 nm. O “cut-off” foi estabelecido utilizando-se a média aritmética de 3 amostras de soro não reativos mais dois desvios padrões (26), considerando-se títulos ≥ 80 como critério de positividade.

SDS-PAGE: As proteínas do extrato alcalino das L3 de todas as linhagens e *S. venezuelensis* foram analisadas quanto à sua homogeneidade em eletroforese. As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida (10% - m/v) sob condições desnaturantes “SDS-PAGE” (27), em sistema Mini V-80.10 vertical Gel Electrophoresis System (Gibco BRL, Rockville, MD). Antígenos alcalinos das L3 (10 µg) foram ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,5, SDS a 2% (m/v) e glicerol a 20% (v/v) e aplicados no gel. As corridas eletroforéticas foram de 40 min (80-120 mA, 200 V constante). As proteínas separadas no gel foram coradas com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant blue R-250, Pierce). Foram usados marcadores padrão de baixo peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech). A eletrotransferência dos componentes protéicos separados por SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose (Gibco BRL) (28). foi realizada em cuba contendo Tris a 24 mM, glicina a 198 mM, metanol a 10%, pH 8,3, por 2 h a temperatura ambiente (TA) (80-120 mA, 200 V constantes - Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis system, Gibco BRL)

“Immunoblot”: As proteínas das L3 eletrotransferidas para as membranas de nitrocelulose foram incubadas com solução de bloqueio [PBS-T contendo gelatina a 3% (m/v) e lactose a 0,2 M], por 18 h a 4°C. As membranas foram incubadas com as 30 amostras de soro dos pacientes com *S. stercoralis* (1/50), 30 amostras de soro de pacientes monoinfectados com outros enteroparasitos (1/50) e 30 amostras de soro de indivíduos normais (1/50), por 1 h a TA. Após quatro lavagens (4x) por 5 min com PBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase (Sigma, USA), por 1 h a TA. As membranas foram lavadas 5 vezes por 5 min e as reações foram reveladas com solução diaminobenzidina [DAB (Sigma, USA)]. A massa molecular aparente das bandas imunorreagentes foi determinada pelo método de Shapiro (29).

Análise estatística: Procedeu-se à estatística dos dados pelo teste Qui-quadrado (X^2).

RESULTADOS

Reconhecimento de antígenos das oito linhagens de *S. venezuelensis* pela IgG anti-*S. stercoralis* na IFI, ELISA e “Immunoblot”.

O reconhecimento dos antígenos em cortes obtidos das oito linhagens de *S. venezuelensis* detectados pelo IFI está representado na (Tab. 1A). Observa-se que as amostras de soro dos pacientes com *S. stercoralis* reagiram com antígenos das oito linhagens, sendo a sensibilidade média de 93%. Não houve diferença significativa entre as linhagens no reconhecimento antigênico pela IgG anti-*S. stercoralis* (X^2 calculado: 1,133 GL= 7 p >0,05). A especificidade média da reação IFI entre as oito linhagens foi de 100%.

O reconhecimento do extrato alcalino obtido das oito linhagens de *S. venezuelensis* pela IgG anti-*S. stercoralis* detectados pelo teste ELISA pode ser observado na (Tab. 1B). A sensibilidade média do teste ELISA entre as oito linhagens foi de 93%. Analisando o reconhecimento antigênico pela IgG anti- *S. stercoralis* pelo teste X^2 observa-se que não houve diferença significativa entre as oito linhagens (X^2 calculado= 1,933 GL= 7 p >0,05). Das 60 amostras de soro controle, nenhuma reagiu com antígenos obtidos das oito linhagens, sendo a especificidade dos ensaios de 100%.

O rendimento protéico de 170.000 larvas infectantes no extrato alcalino foi semelhante entre as oito linhagens do parasita, sendo a concentração média de 354 μ g/mL. O perfil das proteínas no gel está demonstrado na (Fig. 1), para as linhagens L-2, L-12, L-46 e L-49 (dados não mostrados para as demais linhagens). No “Immunoblot”, as amostras de soro positivos para estrogiloidíase reconheceram de forma semelhante uma única fração protéica, de peso molecular aparente de 45 kDa, nos extratos antigênicos das oito linhagens de *S. venezuelensis* (Fig. 2), sendo a sensibilidade do IgG anti-*S. stercoralis* em reconhecer antígenos das oito linhagens do parasito de 97% e a especificidade do teste de 100%.

Distribuição dos títulos de IgG anti-*S. stercoralis* na IFI e no ELISA.

Os títulos das amostras de soro dos pacientes com *S. stercoralis* na reação de IFI variaram de 20 a 1.280 (Tab. 2) e no ELISA de 80 a 20.480, como demonstrado na Tab. 3.

Comparação entre os testes IFI, ELISA e “Immunoblot” na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* utilizando-se antígenos de *S. venezuelensis*.

A Tab. 4 mostra os resultados concordantes e discordantes entre os três testes imunológicos realizados em 30 amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase. Observa-se que não houve diferença significativa nos testes utilizados no reconhecimento antigênico pela IgG anti-*S. stercoralis* entre as diferentes linhagens (X^2 calculado= 7 GL= 7 $p>0,05$). A média de concordância positiva entre as linhagens foi de 90%, e negativa, de 3%. Quanto aos casos de discordância, houve um caso para L-11 e L-49, dois casos para L-27 e quatro casos para L-50 no IFI+/ELISA-/WB+. Ainda no IFI-/ELISA+/WB+, houve um caso de discordância para L-2 e L-27, dois casos para L-46 e L-49 e três casos para L-12. As 60 amostras de soro controle apresentaram concordância negativa para todas linhagens, nos três testes utilizados.

TABELA 1. Reatividade das oito linhagens de *S. venezuelensis* na detecção de IgG pelo teste de imunofluorescência indireta (A) e pelo teste ELISA (B) na estrogiloidiase humana.

Soros		IFI - Antígeno em cortes de 4 µm									
		L-2	L-11	L-12	L-27	L-46	L-49	L-50	L-cp		
(A)	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
+/ <i>S. stercoralis</i>	30	28 (93,0)	28 (93,0)	27 (90,0)	27 (90,0)	27 (90,0)	27 (90,0)	29 (97,0)	29 (97,0)	29 (97,0)	29 (97,0)
+/Outras parasitoses	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativos	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(B)											
ELISA – Antígeno extrato alcalino											
+/ <i>S. stercoralis</i>	30	29 (97,0)	27 (90,0)	29 (97,0)	26 (87,0)	29 (97,0)	28 (93,0)	25 (83,0)	29 (97,0)	29 (97,0)	29 (97,0)
+/Outras parasitoses	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativos	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+ = positivos nos exames parasitológicos. Outras parasitoses= ancilostomídeos, *E. vermicularis*, *H. nana*, *T. trichiura*, *A. lumbricoides* e *G. lamblia*.
L-cp= cepa

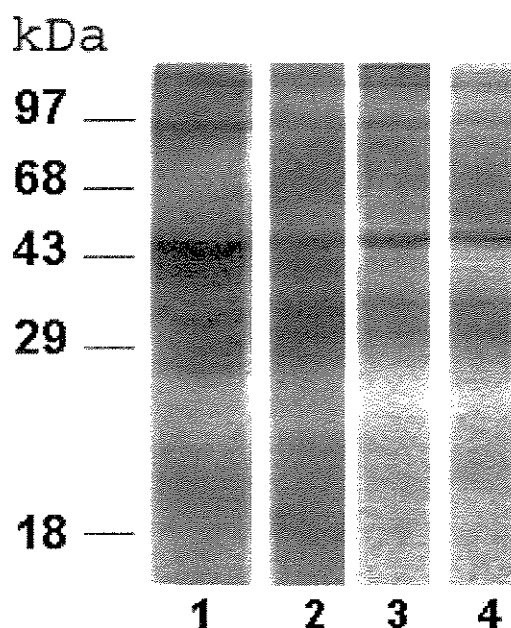


Fig. 1: Perfil protéico do extrato alcalino de larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Larvas infectantes (L3) das linhagens L-2, L-12, L-46, L-49 e de *S. venezuelensis* foram mantidas em cultura por 3 dias a 28°C (pistas 1, 2, 3 e 4, respectivamente). Após incubação dessas larvas com NaOH a 0,15 M por 6 horas, amostras das proteínas obtidas (15 µg) foram separadas por SDS-PAGE em condições redutoras e o gel foi corado pelo azul de Coomassie. Migrações de marcadores protéicos de MM conhecidas estão indicadas na figura.

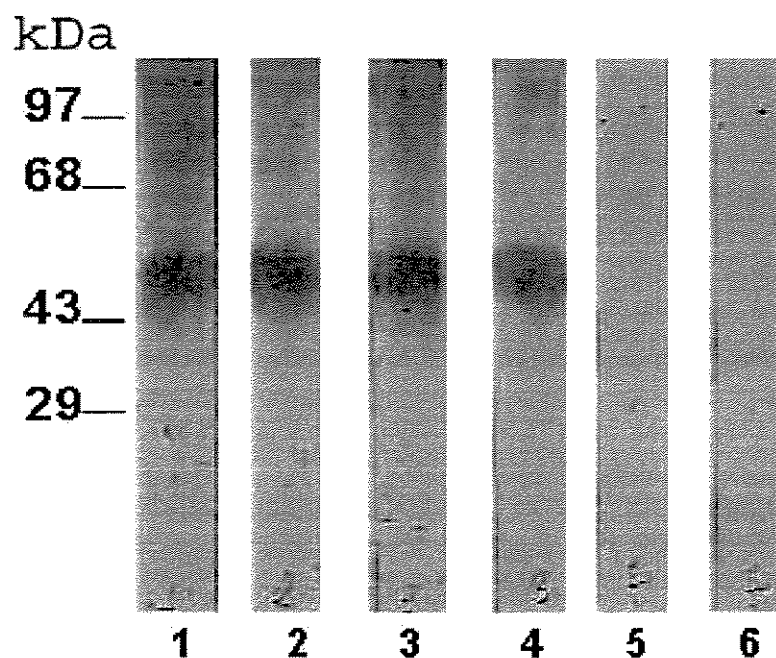


Fig. 2: Immunoblot. Proteínas (20 μ g) obtidas de larvas infectantes das linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* foram separadas por SDS-PAGE em condições redutoras e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Essas membranas foram incubadas com: soro (1:50) de pacientes com estrongiloidíase (pistas 1 - 4), soro (1:50) de indivíduo sadio (pista 5) e soro (1:50) de paciente com outra parasitose (pista 6). Migrações de marcadores protéicos de MM conhecidas estão indicadas na figura.

TABELA 2. Distribuição dos títulos dos anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* detectados pela IFI empregando cortes de 4µm de larvas filarióides das linhagens de *S. venezuelensis*

IFI - Títulos de anticorpos anti-IgG <i>S. stercoralis</i>									
Linhagens (L)	Soros (n)								
		<20	20	40	80	160	320	640	1.280
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
L-2	30	2 (7,0)	5 (17,0)	7 (23,0)	9 (30,0)	6 (20,0)	0	1 (3,0)	0
L-11	30	2 (7,0)	13 (43,0)	8 (27,0)	5 (17,0)	2 (7,0)	0	0	0
L-12	30	4 (13,0)	9 (30,0)	3 (10,0)	4 (13,0)	4 (13,0)	4 (13,0)	2 (7,0)	0
L-27	30	3 (10,0)	5 (17,0)	4 (13,0)	9 (30,0)	5 (17,0)	4 (13,0)	0	0
L-46	30	3 (10,0)	5 (17,0)	12 (40,0)	5 (17,0)	2 (7,0)	3 (10,0)	0	0
L-49	30	3 (10,0)	5 (17,0)	8 (27,0)	5 (17,0)	6 (20,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)
L-50	30	1 (3,0)	6 (20,0)	9 (30,0)	6 (20,0)	5 (17,0)	3 (10,0)	0	0
L-cp	30	1 (3,0)	0	16 (53,0)	7 (23,0)	6 (20,0)	0	0	0

Foram utilizados 30 soros de pacientes com estrongiloidíase considerando positivos, as amostras com títulos ≥ 20 ; cp = cepa

TABELA 3. Distribuição dos títulos dos anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* detectados pelo teste ELISA empregando antígeno extrato alcalino das linhagens de *S. venezuelensis*.

ELISA - Títulos de anticorpos anti-IgG <i>S. stercoralis</i>											
		<80	80	160	320	640	1.280	2.560	5.120	10.240	20.480
Linhagens (L)	Soros (n)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
L-2	30	1 (3,0)	1 (3,0)	4 (13,0)	5 (17,0)	7 (23,0)	7 (23,0)	1 (3,0)	3 (10,0)	1 (3,0)	0
L-11	30	3 (10,0)	3 (10,0)	10 (33,0)	2 (7,0)	7 (23,0)	2 (7,0)	1 (3,0)	2 (7,0)	0	0
L-12	30	1 (3,0)	4 (13,0)	2 (7,0)	4 (13,0)	7 (23,0)	5 (17,0)	3 (10,0)	3 (10,0)	0	1 (3,0)
L-27	30	4 (13,0)	0	3 (10,0)	4 (13,0)	4 (13,0)	11 (37,0)	2 (7,0)	2 (7,0)	0	0
L-46	30	1 (3,0)	3 (10,0)	7 (23,0)	4 (13,0)	10 (33,0)	2 (7,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	0
L-49	30	2 (7,0)	5 (17,0)	3 (10,0)	4 (13,0)	5 (17,0)	6 (20,0)	1 (3,0)	3 (10,0)	1 (3,0)	0
L-50	30	5 (17,0)	5 (17,0)	10 (33,0)	2 (7,0)	8 (27,0)	0	0	0	0	0
L-cp	30	1 (3,0)	4 (13,0)	10 (33,0)	3 (10,0)	8 (27,0)	3 (10,0)	0	0	0	0

Foram utilizados 30 soros de pacientes com esrongiloidíase considerando positivas, as amostras com títulos ≥80.; cp = cepa

TABELA 4 Comparação entre os resultados dos testes Imunofluorescência Indireta, ELISA e Immunoblot (IB) na detecção de IgG anti-*S. stercoralis*, utilizando linhagens de *S. venezuelensis* em 30 amostras de soro de pacientes com strongiloidíase.

Pacientes com strongiloidíase (n = 30)																
Testes	L-2		L-11		L-12		L-27		L-46		L-49		L-50		L-cp	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Concordantes																
IFI+/ELISA+/IB+	28	(93,0)	28	(93,0)	26	(87,0)	26	(87,0)	27	(90,0)	26	(87,0)	25	(83,0)	29	(97,0)
IFI-/ELISA-/IB-	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)	1	(3,0)
Discordantes																
IFI+/ELISA-/IB+	0		1	(3,0)	0		2	(7,0)	0		1	(3,0)	4	(13,0)	0	
IFI-/ELISA+/IB+	1	(3,0)	0		3	(10,0)	1	(3,0)	2	(7,0)	2	(7,0)	0		0	
IFI+/ELISA+/IB-	0		0		0		0		0		0		0		0	
IFI+/ELISA-/IB-	0		0		0		0		0		0		0		0	
IFI-/ELISA+/IB-	0		0		0		0		0		0		0		0	
IFI-/ELISA-/IB+	0		0		0		0		0		0		0		0	
Total	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)

% = porcentagem; cp = cepa IB = Immunoblot; X^2 calculado = 7; GL = 7 e $p > 0,05$

DISCUSSÃO

O uso da sorologia na detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis* através de testes imunológicos tem sido valorizada na avaliação da resposta imune do hospedeiro nas formas assintomáticas, no esclarecimento do diagnóstico clínico e em inquéritos soroepidemiológicos, por apresentarem maior sensibilidade que os métodos parasitológicos (30).

Como foi observado, o isolamento das linhagens de *S. venezuelensis* em períodos diferentes, de roedores silvestres e mantidas em ratos experimentalmente infectados no laboratório não influenciou na expressão antigênica das larvas infectantes, uma vez que os antígenos das oito linhagens empregadas no estudo apresentaram rendimento e perfil protéico, bem como reconhecimento pela IgG anti-*S. stercoralis* semelhantes. Assim, estes resultados ampliam de forma segura as fontes de antígenos heterólogos que poderão ser utilizadas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Ao avaliar-se a sensibilidade e especificidade da IFI com cortes de larvas infectantes, dos métodos ELISA e "Immunoblot" com o antígeno alcalino de *S. venezuelensis*, os resultados foram promissores na detecção de IgG sérica específica para *S. stercoralis* no soro humano. Apesar da facilidade de obtenção de larvas de *S. venezuelensis* e a utilidade das mesmas nas pesquisas sobre mecanismos de expulsão de parasitas intestinais, não existem relatos na literatura sobre a utilização do extrato alcalino desta espécie no diagnóstico da estrogiloidíase.

A sensibilidade média da IFI entre as linhagens foi de 93%. Os resultados obtidos demonstram que a sensibilidade para as linhagens L-2, L-11 foi semelhante à descrita na literatura com antígeno de *S. stercoralis* e *S. ratti* (10,31, 32) e inferior aos resultados obtidos com *S. stercoralis* e *S. ratti* (9). Porém, para as linhagens L-12, L-27, L-46 e L-49, os resultados foram inferiores aos descritos com antígenos de *S. stercoralis* e *S. ratti* (9, 10, 32), enquanto que para as linhagens L-50 e L-cepa, a sensibilidade foi semelhante aos resultados

apresentados na literatura para *S. stercoralis* e *S. ratti* (9). A especificidade da IFI neste estudo foi de 100% para as oito linhagens, sendo superior ao descrito utilizando-se *S. stercoralis* e *S. ratti* (9, 10, 32). A especificidade encontrada nesta pesquisa utilizando-se cortes em crio-micrótomo foi semelhante aos dados descritos na literatura (23), demonstrando que IFI utilizando antígeno particulado de duas linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* mantidas nas mesmas condições experimentais apresentaram especificidade de 96,6% e 100%, respectivamente. Assim, cortes de larvas infectantes podem ser usados com segurança no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

A sensibilidade média do ELISA usando-se os extratos antigênicos das diferentes linhagens na detecção de IgG foi de 93%. Para as linhagens L-2, L-11, L-12, L-27, L-46, L-49 e L-cepa, a sensibilidade do teste foi superior à descrita na literatura com antígeno salino de *S. stercoralis* pelo ELISA (11,12,13,15,30) e inferior para L-50. Por outro lado, a especificidade do teste para todas as linhagens foi de 100%. A especificidade do teste, até o momento, somente havia sido maior que 90% (13,15,31) com extrato salino homólogo. Assim, os resultados sugerem que o extrato alcalino das diferentes linhagens de *S. venezuelensis* pode ser utilizado com segurança no diagnóstico desta parasitose, uma vez que a especificidade foi de 100%. Apesar de a literatura relatar casos de reatividade cruzada entre estrogiloidíase e outras parasitoses detectadas pelo ensaio ELISA, nesta pesquisa isto não ocorreu. Embora sem diferença significativa, observou-se que os antígenos das linhagens L-2, L-12, L-49 na IFI e no ELISA e da linhagem L-46 no ELISA foram reconhecidos por pequenas concentrações de IgG, apresentando maiores títulos, enquanto que as linhagens L-50 e L-cepa apresentaram títulos menores.

A utilização do extrato alcalino das diferentes linhagens de *S. venezuelensis* neste estudo alcançou resultados importantes no teste “Immunoblot” para detecção de IgG sérica no diagnóstico da estrogiloidíase humana. Até o momento, nenhum trabalho utilizando extrato alcalino de *S. venezuelensis* no “immunoblot” foi publicado. Nesse trabalho, amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase reconheceram de forma semelhante e com sensibilidade de 97%

uma única fração protéica, com peso molecular aparente de 45 kDa. Resultados apresentados na literatura (13,14,15), demonstram que antígeno obtido de larvas filarióides de *S. stercoralis* apresentaram várias frações protéicas de peso molecular aparente de 17, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 40, 41, 44, 46, 55, 78, 78, 90, 100 kDa, as quais foram reconhecidas pela IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro humano. No presente trabalho, uma única fração antigênica no extrato alcalino das diferentes linhagens de peso aparente de 45 kDa foi reconhecida pela IgG. Este dado é muito importante, por facilitar a obtenção de grande quantidade de antígenos específicos de larvas filarióides que poderão ser usados para produção de extrato alcalino, purificação da proteína e no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Comparando-se os antígenos das oito linhagens, observa-se que houve poucos casos de discordância nos três testes entre as linhagens de *S. venezuelensis*. Os casos negativos diagnosticados na IFI e no ELISA foram confirmados pelo "Immunoblot". Assim, os resultados obtidos sugerem o uso de três métodos imunológicos no diagnóstico da estrogiloidíase humana, independentemente da linhagem do parasita utilizada como fonte de antígeno heterólogo. Um único paciente diagnosticado como positivo para *S. stercoralis* foi soronegativo nos três testes. Neste caso, o indivíduo poderia estar parasitado com *Ancylostoma* sp, e devido à semelhança entre as larvas rabditóides destes helmintos, ter sido erroneamente diagnosticado como portador de *S. stercoralis*.

A distribuição dos títulos da IgG na IFI e no ELISA foram semelhantes entre as oito linhagens, sugerindo que a origem da linhagem de *S. venezuelensis* e o tempo de manutenção da mesma em condições experimentais no laboratório não influencia sua expressão antigênica. Mesmo obtendo-se títulos altos nos dois testes, não é possível determinar-se a carga parasitária, nem o tempo da infecção, nem identificar-se a infecção como assintomática ou sintomática, sendo apenas possível demonstrar se o indivíduo esteve ou está parasitado com *S. stercoralis*. Porém, os testes sorológicos podem ser de grande importância na triagem de pacientes, principalmente nos indivíduos imunossuprimidos e portadores de

estrongiloidíase assintomática, pois estes podem desenvolver a forma disseminada do parasito.

Assim, os resultados mostram que os extratos alcalinos de diferentes linhagens de *S. venezuelensis* podem ser empregados como antígenos heterólogos no diagnóstico da estrongiloidíase humana, independentemente de sua origem. As vantagens apresentadas pelo uso desta espécie como fonte alternativa de antígeno são a facilidade na manutenção das linhagens no laboratório, com passagem sucessiva em ratos sem alterar a constituição antigênica do parasita; a facilidade de preparação e produção de larvas filarióides em grandes quantidades, sem a necessidade de equipamentos sofisticados ou reagentes caros; e o tempo relativamente pequeno gasto no preparo do extrato alcalino. Devido à boa padronização da IFI, do ELISA, a sensibilidade e a especificidade foram altas, superando as reações cruzadas e inespecíficas, podendo-se utilizar estes métodos na rotina laboratorial e em estudos soroepidemiológicos. Outro dado importante neste trabalho foi o fato de as amostras de soros reconhecerem um só componente antigênico de massa molecular aparente de 45 kDa pelo "Immunoblot" no extrato larval. Sua caracterização somente é possível pelo seqüenciamento e conseqüente expressão pela técnica de cDNA, o que possibilitará sua utilização como proteína recombinante no imunodiagnóstico e preparação de uma vacina contra esta parasitose.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Brasil. Agradecemos à Prof^ª. Dr^ª. Elaine A. Del Bel da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP-SP) pelo uso do criomicrotomo, ao Prof. de Estatística Vanderli Anacleto de Campos, da Fundação Educacional de Ituiutaba (UEMG), Minas Gerais, pelo auxílio na análise estatística

e ao Sr. João Batista Alves de Oliveira, técnico do laboratório de Parasitologia, pelo auxílio na realização das culturas e recuperação das larvas.

REFERÊNCIAS

1. Genta, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Ver. Infect. Dis.*, **11**, 755-767, 1989.
2. Pires, M. L. and Dreyer, G. The importance of *Strongyloides stercoralis* revisited. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo.*, **48**, 175-182, 1993.
3. Ferreira, M. S., Nishioka, S de A., Borges, A. S., Costa-Cruz, J. M., Rossin, I. R. Rocha, A., Silvestre, M. T. A. and Nunes-Araujo, F. R. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency vírus: 25 cases at a Brazilian teaching hospital including seven cases of hyperinfection syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, **28**, 154-155, 1999.
4. Lima, J. P. and Delgado, P. G. Diagnosis of strongyloidiasis: importance of Baermann's method. *Am. J. Digest. Dis. New Series.*, **6**, 899-904, 1961.
5. Koga, K., Kasuya, S., Khamboonruang, C., Sukhavat, K., Ieda, M., Takatsuka, N., Kita, K. and Ohtomo, H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**, 518-521, 1991.
6. Dreyer, G., Fernandes-Silva, E., Alves, S. Rocha, A., Albuquerque, R. and Addiss, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens- Implications for diagnosis and clinical trials. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2568-2571, 1996.
7. Siddiqui, A. A. and Berk, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin. Infect. Dis.*, **33**, 1040-1047, 2001.
8. Coudert, J., Ambroise-Thomas, P., Kien-Truong, T. and Pothier, M. A. Serologic diagnosis of human anguilluliasis by immunofluorescence (preliminary results). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Ses. Fil.*, **61**, 74-80, 1968.

9. Grove, D. I. and Blair, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 344-349, 1981.
10. Costa-Cruz, J. M., Bullamah, C. B., Gonçalves-Pires, M do R., Campos, D. M. and Vieira, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, **39**, 313-317, 1997.
11. Carroll, S. M., Karthigasu, K. T. and Grove, D. I. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 706-709, 1981.
12. Neva, F. A., Gam, A. A. and Burke, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. *J. Infect. Dis.*, **144**, 427-432, 1981.
13. Genta, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **89**, 391-394, 1988.
14. Sato, Y., Inoue, F., Matsuyama, R. and Shiroma, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **84**, 403-406, 1990.
15. Lindo, J. F., Conway, D. J., Atkins, N. S., Bianco, A. E., Robinson, R. D. and Bundy, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**, 175-179, 1994.
16. Atkins, N. S., Conway, D. J., Lindo, J. F., Bailey, J. W. and Bundy, D. A. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. *Parasite Immunol.*, **21**, 517-526, 1999.
17. Campos, D. M. B., Oliveira, O. S., Barbosa, W., Campos, M. L. L., Rosa, Z. S. and Souza, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico de estrongiloidíase humana. *Rev. Pathol. Trop.*, **17**, 17-23,

- 1988.
18. Machado, E. M., Ueta, M. T., Gonçalves-Pires, M do R., Oliveira, J. B., Faccioli, L. H. and Costa-Cruz, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Exp. Parasitol.*, **99**, 52-55, 2001.
 19. Bailey, J. W. A serological test for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* antibodies in ex Far East Prisoners of War. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **83**, 241-247, 1989.
 20. Pessoa, S. P, Martins, A. V **Parasitologia médica**. 10º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978. P. 986.
 21. Rugai, E., Mattos, T. and Brisola, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **14**, 5-8, 1954.
 22. Lowry, O. H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
 23. Ritchie, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. N. S. Army Med. Dep.*, **8**, 326-334, 1948.
 24. **Baermann, G.** Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden): Larven in Erdproben. **Mededeel. Mit. H. Geneesk. Batavia, Lab. Weltevreden. Feestbundel, 1917. p. 41-47.**
 25. Lutz, A. V. *Schistosoma mansoni* e a schistossomose, segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **11**, 121-125, 1919.
 26. Bassi, G. E., Ishiki, D. K., Ferreira, A. W., Camargo, M. E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano – considerações sobre o limiar de reatividade. *Rev. Bras. Pat. Clín.*, **27**, 49-52, 1991.
 27. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
 28. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354, 1979.

29. Shapiro, A. L., Vineula, L., Maizel, J. V. Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **28**, 815-820, 1967.
30. Costa-Cruz, J. M., Machado, E. R. and Campos, D. M. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected in filter paper, in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **40**, 329-331, 1998.
31. Conway, D. J., Atkins, N. S., Lillywhite, J. E., Bailey, J. W., Robinson, R. D., Lindo, J. F. and Bundy, D. A., Bianco, A. E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 173-176, 1993.
32. Genta, R. M. and Weil, G. J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. *Lab. Invest.*, **47**, 87-90, 1982.

CONCLUSÕES GERAIS

Capítulo I

1. Linhagens L-2 e L-49 de *Strongyloides venezuelensis* apresentam diferenças de infectividade no aumento de leucócitos totais e eosinófilos no sangue nos primeiros dias da infecção.
2. Linhagens L-2 e L-49 apresentam diferenças de infectividade na indução da resposta imune humoral.
3. Linhagens L-2 e L-49 de *S. venezuelensis* induzem síntese de citocinas do padrão TH₁ ou TH₂ da resposta imune, porém com maior tendência para o padrão TH₂.
4. Os resultados demonstram existir diferença de infectividade entre as linhagens L-2 e L-49 nos primeiros dias após infecção na indução de síntese de IL-4, IL-5 e IFN γ .
5. Há uma correlação positiva entre a indução de maior síntese de IL-4 com uma maior síntese de IgG e maior expulsão do parasita para a linhagem L-2.
6. Há uma correlação positiva entre indução de maior síntese de IL-5 e aumento de leucócitos totais e de eosinófilos no sangue para a linhagem L-2 nos primeiros dias após infecção.

Capítulo II

1. O menor tempo de permanência das larvas na cultura influencia a infectividade dos parasitas, os quais induzem resposta imune inata mais intensa no sangue e na cavidade peritoneal, com uma mais rápida eliminação dos parasitas.

2. Temperatura mais alta influencia a infectividade das larvas, as quais induzem eosinofilia mais intensa e precoce no LCP, enquanto em temperatura mais baixa, a eosinofilia é menor e tardia.
3. Larvas mantidas por menor tempo nas culturas induzem resposta imune celular capaz de matar ou expulsar mais rapidamente os parasitas.
4. Larvas mantidas por maior tempo nas culturas e em temperaturas mais altas são mais infectivas e induzem maior resposta imune humoral.
5. Larvas mantidas em temperatura mais alta são mais infectivas e induzem maior síntese de IL-4 e de IL-10.
6. Os dados sugerem que tempo e/ou temperatura das larvas nas culturas não influenciam a indução da síntese de IL-5.
7. Os dados mostram que menor tempo de permanência das larvas nas culturas influencia a infectividade das larvas e induz maior síntese de IL-12, enquanto que a síntese de IFN- γ é influenciada por larvas obtidas nesta condição experimental somente na infecção tardia.

Capítulo III

1. Linhagem L-2 de *S. venezuelensis* mantida por 3 dias a 28°C induz resposta imune inata mediada por eosinófilos, mastócitos e células mononucleares e resposta imune adquirida com síntese de citocinas do padrão TH₂, como a IL-4, IL-5 e IL-10.
2. Leucotrienos participam do aumento de leucócitos totais, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares no sangue e no recrutamento destas células para a cavidade peritoneal e pulmão, na estrogiloidíase.

3. Além dos leucotrienos, a IL-5 está envolvida com o aumento de leucócitos no sangue e seu recrutamento para o espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.
4. Os resultados sugerem que as citocinas IL-12 e IFN- γ estão envolvidas na proteção do parasita contra a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a cronificação da infecção.

Capítulo IV

1. Linhagens L-2, L-11, L-12, L-27, L-46, L-49, L-50, L-cepa de *Strongyloides venezuelensis* obtidas de diferentes roedores silvestres e mantidas em laboratório por passagens sucessivas em ratos apresentam identidade eletroforetica semelhante ou sem diferença estatística nas amostras utilizadas.
2. Os extratos alcalinos obtidos de larvas infectantes das oito linhagens de *S. venezuelensis* apresentaram o mesmo perfil antigênico, com uma única fração de massa molecular aparente de 45 kDa, reconhecida pela IgG anti-*S. stercoralis*.
3. Antígenos de larvas infectantes das oito linhagens, em cortes de 4 μ m, utilizados na IFI e do extrato alcalino no ELISA e "Immunoblot" apresentaram alta sensibilidade e especificidade, podendo ser empregados com alto grau de confiabilidade no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ABE, T.; NAWA, Y. Kinetic study of mast-cell growth factor production by lymphocytes during the course of *Strongyloides ratti* infection in mice. **Parasitol. Res.**, v. 74, n. 5, p. 484-8, May. 1988a.
- ABE, T.; NAWA, Y. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti* infected nude mice. **Immunology**, v. 63, n. 2, 181-5, Feb. 1988b.
- ABE, T.; NAWA, Y.; YOSHIMURA, K. Protease resistant interleukin-3 stimulating components in excretory and secretory products from adult worms of *Strongyloides ratti*. **J. Helminthol.**, v. 66, n. 2, p. 155-8, Jun. 1992.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Different susceptibility to the IL-3-induced protective effects between *Strongyloides ratti* and *Nippostrongylus brasiliensis* in C57BL/6 mice. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 11, p. 643-5, Nov. 1993.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymphnode cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti*-infected mice. **J. Helminthol.**, v. 72, n. 1, p. 1-8, Mar. 1998.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K.; NAWA, Y. Induction of the expulsion of *Strongyloides ratti* and retention of *Nippostrongylus brasiliensis* in athymic nude mice by repetitive administration of recombinant interleukin-3. **Immunology**, v. 76, n. 1, p.10-4, May. 1992.
- ABRAHAM, D.; ROTMAN, H. L.; HABERSTROH, F. H.; YUTANAWIBOONCHAI, W., BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. **Exp. Parasitol.**, v. 80, n. 2, p. 297-307, Feb. 1995.
- ALBUQUERQUE, L. M. M.; CAVALCANTI-JUNIOR, C. B.; RIBEIRO, M. D. Eosinofilia sanguínea em crianças com helmintíases intestinais. **Rev. Anál. Clin.**, v. 22, n. 1, p. 26-30, Jan. 1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AL SAMMAN, M.; HAQUES, S.; LONG, J. D. Strongyloidiasis colitis: a case report and review of the literature. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 28, n. 1, p. 77-80, Jan. 1999.

ANDRADE-NETO, J.; ASSEF, M. C. V. Estrongiloidíase *In*: Veronesi, R. et al. **Tratado de Infectologia**, São Paulo: Atheneu, 1997. p. 1373-8.

ARIZONO, N. Studies on the free-living generations of *Strongyloides planiceps*. Rogers, 1943. I. Effects of quantity of food and populations density on the developmental types. **Jap. J. Parasitol.**, v. 25, n. 1, p. 274-82, 1976a.

ARIZONO, N. Studies on the free-living generations of *Strongyloides planiceps*. Rogers, 1943. II. Effects of temperature on the developmental types. **Jap. J. Parasitol.**, v. 25, n. 1, p. 328-35, 1976b.

DELAROCQUE A. E.; HADENGUE, A.; DEGOTT, C.; VILGRAIN, V.; ERLINGER, S.; BENHAMOU, J. P. Biliary obstruction resulting from *Strongyloides stercoralis* infection: Report of a case. **Gut**, v. 35, n. 5, p. 705-6, May. 1994.

ATKINS, N. S.; LINDO, J. F.; LEE, M. G.; CONWAY, D. J.; BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 5, p. 609-13, Sep-Oct. 1997.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunol.**, v. 21, n. 10, p. 517-26, Oct. 1999.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden): Laeven in Erdproben. Medeel. Mit. H. Geneesk. Batavia, **Lab. Weltevereden. Feestbundel.**, 1917. p. 41-7.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BAILEY, J. W. A serological test for the diagnosis of *Strongyloides* antibodies in ex-far East Prisoners of War. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 83, n. 3, p. 241-7, Jun. 1989.

BARNISH, G.; ASHFORD, R. W. *Strongyloides cf fülleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community, and results of an intervention study. **Ann Trop. Med. Parasitol.**, v. 83, n. 5, p. 499-506, Oct. 1989.

BECK, L. A.; DALKE, S.; LEIFERMAN, K. M.; BICKEL, C. A.; HAMINTON, R.; ROSEN, H.; BOCHNER, B. S.; SCHLEIMER, R. P. Cutaneous injection of RANTES causes eosinophil recruitment: comparison of nonallergic and allergic human subjects. **J. Immunol.**, v. 159, n. 6, p. 2962-72, Sep. 1997.

BEHM, C. A.; OVINGTON, K. S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitol. Today**, v.16, n. 5, p. 202-9, May. 2000.

BERASAIN, P.; CARMONA, C.; FRANGIONE, B.; DALTON, J. P.; GONI, F. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. **Exp. Parasitol.**, v. 94, n. 2, p. 99-110, Feb. 2000.

BEZJAK, B. Immunoglobulin studies in strongyloidiasis with special reference to raised serum IgE levels. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, n. 6, p. 945-8, Nov. 1975.

BHATT, B. D.; CAPPELL, M. S.; SMILOW, P. C.; DAS, K. M. Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 85, n. 8, p. 1034-6, Aug. 1990.

BOUREE, P.; TAUGOURDEAU, A.; BARTHELEMY, M.; PEQUIGNOT-RICOME, H.; PASSERON, J.; BOUVIER, J.B. Strongyloidiasis: a clinical, biological and epidemiological study of 350 cases. **Nouv. Press. Med.**, v. 10, n.9, p. 679-81, Feb. 1981.

BRASIL, R.; BADARÓ, R.; ANDRADE, J. A. F.; ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M. Diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana pelo método imunoenzimático ELISA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, n. 3, p. 139-43, jul./sep. 1988.

BRAUN, R.K.; FRANCHINI, M.; ERARD, F.; RIHS, S.; DE VRIES, I. J.; BLASER, K.; HANSEL, T. T.; WALKER, C. Human peripheral blood eosinophils produce and

release IL-8 on stimulation with calcium ionophore. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 4, p. 956-60, Apr. 1993.

BRIGANDI, R. A.; ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. **Exp. Parasitol.**, v. 82, n. 3, p. 279-89, Apr. 1996.

BUIKHUISEN, W. A. ; WETSTEYN, J. C.; VAN GOOL, T.; KAGER, P. A. Recurrent, itching and creeping skin lesions in (former) travellers to the tropics: strongyloidiasis. **Ned. Tijdschr. Geneesk.**, v. 146, n. 10, p. 477-81, Mar. 2002.

BUTTHERWORTH, A. E.; DAVID, J. R.; FRANKS, D.; MAHMOUD, A. A.; DAVID, P. H.; STURROCK, R. F.; HOUBA, V. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 51Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: damage by purified eosinophils. **J. Exp. Med.**, v. 145, n. 1, p. 136-50, Jan. 1977.

CACERES, M. H; GENTA, R. M. Pulmonary microcalcifications associated with *Strongyloides stercoralis* infection. **Chest**, v. 94, n. 4, p. 862-5, Oct. 1988.

CAMUSSI, G.; ANGLIETTA, M.; CODA, R.; BUSSOLINO, F.; PIACIBELLO, W.; TETTA, C. Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. **Immunology**, v. 42, n. 2, p. 191-9, Feb. 1981.

CAMPOS, D. M. B.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, M. L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico de strongiloidíase humana. **Rev. Patol. Trop.**, v. 17, n.1, p. 17-23, maio. 1988.

CAPRON, M. Dual function of eosinophils in pathogenesis and protective immunity against parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl. 5, p. 83-9, maio. 1992.

CARROLL, S. M.; KARTHIGASU, K. T.; GROVE, D. I. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 5, p. 706-9, May. 1981.

CASTRO, G. A.; HARARI, Y.; RUSSELL, D. Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 253, n. 4, p. 540-8, Oct. 1987.

CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 73, n. 5, p. 256-63, Sep. 1994.

CHEN, J. J.; LEE, C. M.; CHANGCHAN, C. S. Duodenal *Strongyloides stercoralis* infection. **Endoscopy**, v. 26, n. 2, p. 272, Feb. 1994.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, v. 245, n. 4915, p. 308-10, Jul. 1989.

COLLINS, P. D.; WEG, V. B.; FACCIOLI, L. H.; WATSON, M. L.; MOQBEL, R., WILLIAMS, T. J. Eosinophil accumulation induced by human interleukin-8 in the guinea-pig *in vivo*. **Immunology**, v. 79, n. 2, p. 312-8, Jun. 1993.

CONCLON, C. P.; PINCHING, A. J.; PERERA, C. U.; MOODY, A.; LUO, N. P.; LUCAS, S. B. HIV-related enteropathy in Zambia: a clinical, microbiological, and histological study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, n. 1, p. 83-8, Jan. 1990.

CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; LILLYWHITE, J. E.; BAILLEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; LINDO, J. F.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 2, p. 173-6, Mar./Apr. 1993a.

CONWAY, D. J.; BAILLEY, J. W.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 168, n. 3, p. 784-7, Sep. 1993b.

CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Exp. Parasitol.**, v. 79, n. 2, p. 99-105, Sep. 1994.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* IN: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**, São Paulo: Atheneu, 2000. p. 247-56.

COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; ROSSIN, I. R. Intestinal Parasites in AIDS and HIV + patients in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 685-6, nov./dec. 1996.

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. do R.; CAMPOS, D. M.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, n. 6, p. 313-7, nov./dec. 1997.

COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, L. P.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M. B. Comparação entre os testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA extrato salino na detecção de anticorpos IgG utilizando antígeno de *Strongyloides ratti*, no diagnóstico da estrongiloidíase humana. IN: **Congresso Brasileiro de Parasitologia**, Poços de Caldas, 1999, p.15.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI, E. A. Determinação de IgE específica e total por ELISA em amostras de soro na estrongiloidíase humana. IN: **VII Congresso Brasileiro de Biomedicina**, Goiânia, 2000, p.15.

COUDERT, J.; AMBROISE-THOMAS, P.; KIEN, T. T.; POTHIER, M. A. Serologic diagnosis of human anguilluliasis by immunofluorescence (preliminary results). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v. 61, n. 1, Jan./Feb. p. 74-80, 1968.

CULLEY, F. J.; BROWN, A.; CONROY, D. M.; SABROE, I.; PRITCHAR, D. I.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. **J. Immunol.**, v. 165, n. 11, p. 6447-53, Dec. 2000.

CUTTS, L.; WILSON, R. A. Elimination of a primary *Schistosoma* infection from rats coincides with elevated IgE titles and mast cell degranulation. **Parasite Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 91-102, Feb. 1997.

DAFFALA, A. A. The indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of strongyloidiasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, n. 6, p. 109-11, Jun. 1972.

DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A. Eicosanoids in parasites and parasitic infections. **Adv. Parasitol.**, v. 46, n. 1, p. 181-2240, Jan. 2000.

DAWKINS, H. J.; GROVE, D. I. Immunisation of mice against *Strongyloides ratti*. **Z. Parasitenkd.** v. 66, n. 3, p. 327-33, Mar. 1982.

DEES, A.; BATENBURG, P. L.; UMAR, H. M.; MENON, R. S.; VERWEIJ, J. *Strongyloides stercoralis* associated with a bleeding gastric ulcer. **Gut**, v. 31, n. 12, p. 1414-5, Dec. 1990.

DELAROCQUE, A.E.; HADENGUE A.; DEGOTT, C.; VILGRAIN, V.; ERLINGER, S.; BENHAMOU, J.P. Biliary obstruction resulting from *Strongyloides stercoralis* infection. Report of a case. **Gut**, v. 35, n. 5, p. 705-6, May. 1994.

DE MESSIAS, I. T.; TELLES, F. Q.; BOARETTI, A. C.; SILVA, S.; GUIMARRES, L. M.; GENTA, R. M. Clinical, immunological and epidemiological aspects of strongyloidiasis in an endemic area of Brazil. **Allergol. Immunophthol.**, v. 15, n. 1, p. 37-41, Jan./Feb. 1987.

DE MESSIAS, I. J.; GENTA, R. M.; MOHREN, W. D. Adherence of monocytes and polymorphonuclear cells to infective larvae of *Strongyloides stercoralis* after complement activation. **J. Parasitol.**, v. 80, n. 2, p. 267-74, Apr. 1994.

DE PAULA, F. M.; DE CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M.; MARCAL, M.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 42, n.1, p. 51-5, jan./fev. 2000.

DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; COLOMBELM, J. F.; PRIN, L.; PLUMAS, J.; EMILIE, D.; TORPIER, G.; CAPRON, A.; CAPRON, M. Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. **J. Exp. Med.**, v. 175, n. 1, p. 293-6, Jan. 1992.

DIAS, R. M.; MANGINI, A. C.; TORRES, D. M.; VELLOSA, S. A., da SILVA, M. I.; da SILVA, R. M.; CORREA, M. O.; COLETTI, C. Ocorrência de *Strongyloides stercoralis* em pacientes portadores da Síndrome de imunodeficiência Adquirida (AIDS). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 34, n. 1, p. 15-7, jan./fev. 1992.

DIONISIO, D.; MANNESCHI, L. I.; Di LOLLO, S.; ORSI, A.; TANI, A.; PAPPUCCI, A.; ESPERTI, F.; LEONCINI, F. *Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, n. 2, p. 110-6, Feb. 2000.

DOUTCH, P. G.; HARRISON, G. B.; ELLIOTT, D. C.; BUCHANAN, L. L.; GREER, K. S. Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to *Trichostrongyle* infections in sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 20, n. 4, p. 315-31, Apr. 1986.

DREYER, G.; FERNANDES-SILVA, E.; ALVES, S.; ROCHA, A.; ALBUQUERQUE, R., ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens - Implications for diagnosis and clinical trials. **J. Clin. Microb.**, v. 34, n. 10, p. 2569-71, Oct. 1996.

DUTCHER, J. P.; MARCUS, S. L.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; FUKS, J. Z.; WIERNIK, P. H. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. **Cancer**, v. 66, n. 11, p. 2417-20, Dec. 1990.

ELIA, C. Parasitoses intestinais. IN: ELIA, C.; PIMENTEL, M. L.; CARNEIRO, A. J. V.; CARVALHO, A. T. P. **Imunologia da mucosa intestinal**. Local: Rio de Janeiro, Atheneu, 2001. v. 1, p. 137-40.

ELSE, K. J.; GRENCIS, R. K. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. **Immunology**, v. 72, n. 4, p. 508-13, Apr. 1991a.

ELSE, K.J.; HULTNER, L.; GRENCIS, R.K. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of TH cell subset in resistant versus susceptible mice. **Immunology**, v. 75, n. 2, p. 232-37, Feb. 1992.

ELSNER, J.; OPPERMANN, M.; CZECH, W.; DOBOS, G.; SCHOPF, E.; NORGAEUER, J.; KAPP, A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 518-22, Mar. 1994.

FACCIOLI, L. H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F. M.; SEHMI, R.; KAY, A. B.; WILLIAMS, T. J. The accumulation of ^{111}In -eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. **Immunology**, v. 73, n.2, p. 222-7, Jun. 1991.

FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L.; ROCHA, G. M.; ARAUJO, J. I.; NAHORI, M. A.; VARGAFTIG, B. B. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissue in visceral larva migrans syndrome. **Mediators Inflamm.**, v. 5, n. 1, p. 24-31, Jun. 1996.

FERREIRA, M.S. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R.; FACACCI, R.; DIETZE, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 856-65.

FISHER, D.; McCARRY, F.; CURRIE, B. Strongyloidiasis in the northern territory. under-recognised and under-treated? **Med. J. Aust.**, v. 159, n. 2, p. 88-90, Jul.1993.

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **F. Med (BR)**., Rio de Janeiro, v. 100, p. 229-35, Dec. 1990.

GALLI, S. J. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.**, v. 62, n. 1, p. 5-33, Jan. 1990.

GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 37, n.1 p. 157-61, Jun. 1987.

GENTA, R. M. Immunobiology of strongyloidiasis. **Trop. Geogr. Med.**, v. 36, n. 3, p. 223-9, Sep. 1984.

GENTA, R. M. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. **Parasitol. Today**, v. 2, n. 4, p. 241-6, Apr. 1986.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, n. 5, p. 755-67, Sep./Oct. 1989.

GENTA, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 89, n. 3, p. 391-4, Mar. 1988.

GENTA, R. M.; DOUCE, R. W.; WALZER, P. D. Diagnostic implications of parasite-specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 6, p. 1099-103, Jun. 1986.

GENTA, R. M.; GATTI, S.; LINKE, M. J.; CEVINI, C.; SCAGLIA, M. Endemic strongyloidiasis in northern Italy: clinical and immunological aspects. **Q. J. Med.**, v. 68, n. 257, p. 679-90, Sep. 1988.

GENTA, R. M.; LILLIBRIDGE, J. P. Proeminence of IgG4 antibodies in the human responses to *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 160, n. 4, p. 692-9, Oct. 1989.

GENTA, R. M.; MILES, P.; FIELDS, K. Opportunistic *Strongyloides stercoralis* infection in lymphoma patients. Report of a case and review of the literature. **Cancer**, v. 63, n. 7, p. 1407-11, Apr. 1989.

GENTA, R.M.; WEESNER, R.; DOUCE, R. W.; HUITGER-O'CONNOR, T.; WALZER, P.D. Strongyloidiasis in US veterans of the Vietnam and other wars. **JAMA**, v. 258, n. 1, p. 49-52, Jul. 1987.

GENTA, R. M.; WEIL, G. J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab. Invest.**, v. 47, n. 1, p. 87-90, Jul. 1982.

GERMAN, J. C.; FLORES, J. H.; CHIESURA, G.; RUIZ, E. M.; FLORES, S. S.; LAUDANNA, A. A. Fatal strongyloidiasis in an immunodepressed patient following renal transplantation. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 47, n. 1, p. 31-3, jan./feb. 1992.

GLEICH, G. J.; OLSON, G. M.; HERLICH, H. The effect of antiserum to eosinophils and susceptibility and acquired immunity of the guinea-pig to *Trichostrongylus colubriformis*. **Immunology**, v. 37, n. 4, p. 873-80, Aug. 1979.

GILL, G. V.; BELL, D. R.; FIFIELD, R. Lack of immunoglobulin E response to longstanding strongyloidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.37, n. 2, p.292-4, Aug. 1979.

GONZALEZ-MUNOZ, M.; GARATE, T.; PUENTE, S.; SUBIRATS, M.; MONEO, I. Induction of histamine release in parasitized individuals by somatic and cuticular antigens from *Onchocerca volvulus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v: 60, n. 6, p. 974-9, Jun. 1999.

GORDON, S.M.; GAL, A. A.; SOLOMON, A. R.; BRYAN, J. A. Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestations in immunocompromised host. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 2, p. 255-9, Aug. 1994.

GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; COLLINS, P. D.; ROSSI, A. G.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro* and causes their accumulation into the lung *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 197, n. 3, p. 1167-72, Dec. 1993.

GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. **Adv. Parasitol.**, v. 38, p. 251-309, 1996.

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, n. 2, p. 344-9, Mar. 1981.

GROVE, D. I.; NORTHERN, C.; DAWKINS, H. J. Interactions of *Strongyloides ratti* free living and skin penetrated infective larvae and parasitic adults with serum and cells in vitro. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 63, n. 5, p. 521-9, 1985.

GYORKOS, T.W.; GENTA, R. M.; VIENS, P.; MACLEAN, J. D. Seroepidemiology of *Strongyloides* infection in the Southeast Asian refugee population in Canada. **Am. J. Epidemiol.**, v. 132, n. 2, p. 257-64, Aug. 1990.

HAELENS, A.; WUYTS, A.; PROOST, P.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G.; van DAMME, J. Leukocyte migration and activation by murine chemokines. **Immunobiology**, v. 195, n. 4/5, p. 499-521, Oct. 1996.

HERNDON, F. J.; KAYES, S. G. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. **J. Immunol.**, v. 149, n. 11, p. 3642-7, Dec. 1992.

HOKIBARA, S.; TAKAMOTO, M.; ISOBE, M.; SUGANE, K. Effects of monoclonal antibodies to adhesion molecules on eosinophilic myocarditis in *Toxocara canis* – infected CBA/J mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 236-44, Nov. 1998.

HORII, Y.; KHAN, A. I.; NAWA, Y. Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 3, p.175-9, Mar. 1993.

ISHIKAWA, N.; SHI, B. B.; KHAN, A. I.; NAWA, Y. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. **Parasite Immunol.**, v. 17, n. 11, p. 581-6, Nov. 1995.

JAIN, A. K.; AGARWAL, S. K.; EL SADR, W. *Streptococci* bovis bacteremia and meningitis associated with *Strongyloides stercoralis* colitis in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 2, p. 253-4, Feb. 1994.

KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; ARIZONO, N.; MASUDA, H. Development of mast cells and basophils: Processes and regulation mechanisms. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, n. 3, p. 185-91, Sep. 1993.

KOBAYASHI, T.; TSUCHIYA, K.; HARA, T.; NAKAHATA, T.; KUROKAWA, M.; ISHIWATA, K.; UCHIYAMA, F.; NAWA, Y. Intestinal mast cell response and mucosal defence against *Strongyloides venezuelensis* in interleukin-3 hyporesponsive mice. **Parasite Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 279-84, Jun. 1998.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, Y.; TADA, I. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v. 72, n. 4, p. 502-7, Apr. 1991.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; TAKATSU, K.; TADA, I. Cross - resistance between *Strongyloides venezuelensis* and *S. ratti* in mice. **J. Helminthol.**, v. 69, n. 2, p. 119-23, Jun. 1995.

LANGE, A. M.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; SCOTT, P.; ABRAHAM, D. IL-4 and IL-5 dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/CBYJ mice. **J. Immunol.**, v. 153, n. 1, p. 205-11, Jul, 1994.

LARSEN, J. S.; JACKSON, S. K. Antileukotriene therapy for asthma. **Am. J. Health. Syst. Pharm.**, v. 53, n. 23, p. 2821-30, Dec. 1996.

LEÃO, R. C.; TOLEDO-BARROS, M. M.; MENDES, E. Immunological study of human strongyloidiasis I: analysis of IgE levels. **Allerg. Immunopathol.**, v.8, n. 1, p. 31-4, Jan./Feb. 1980.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man.** 2nd ed. Minneapolis: Burgess, 1979.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. **J. Clin. Invest.**, v. 73, n.4, p. 889-97, Apr. 1984.

LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, n. 2, p. 175-9, Aug. 1994.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.7, n. 3, p. 655-82, Sep. 1993.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-75, 1952.

LOTNER, G. Z.; LYNCH, J. M.; BETZ, S. J.; HERSON, P. M. Human neutrophil-derived platelet activating factor. **J. Immunol.**, v. 124, n. 2, p. 676-84, Feb. 1980.

- LUCAS, S.B. Missing infections in AIDS. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, Suppl. 1, p. 34-8, Jan. 1990.
- MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n.2, p. 161-4, Mar./Apr. 1998.
- MACHADO, E. M.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M do R.; de OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 52-5, Sep. 2001.
- MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 1, p. 10-5, Jan. 1997.
- MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **J. Immunol.**, v. 164, n. 7, p. 3749-54, Apr. 2000a.
- MARUYAMA, H.; HATANO, H.; KUMAGAI, T.; EL-MALKY, M.; YOSHIDA, A. OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: heparin-binding adhesion substances in immunologically damaged adult worms. **Exp. Parasitol.**, v. 95, n.3, p 170-5, Jul. 2000b.
- MARUYAMA, H.; OSADA, Y.; YOSHIDA, A.; FUTAKUCHI, M.; KAWAGUCHI, H.; ZHANG, R.; FU, J.; SHIRAI, T.; KOJIMA, S.; OHTA, N. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 279-86, Jun. 2000c.
- McLAREN, D. J.; RAMALHO-PINTO, F. J.; SMITHERS, S. R. Ultrastructural evidence for complement and antibody-dependent damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. **Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 313-24, Dec. 1978.
- McRURY, J.; De MESSIAS, I. T.; WALZER, P. D.; HUITGER, T.; GENTA, R. M. Specific IgE responses in human strongyloidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 65, n. 3, p. 631-8, Sep. 1986.

- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.**, v. 1, n.1, p. 507-24, 1948.
- MOURA, H.; FERNANDES, O.; VIOLA, J. P.; SILVA, S. P.; PASSOS, R. H.; LIMA, D. B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 527-33, out./dec. 1989.
- MURPHY, R. A.; BARTON, G.; PINKAS, H.; SHAEFER, R. Severe colitis due to *Strongyloides stercoralis* in a patient with cutaneous Kaposi's sarcoma. **Gastrointest. Endosc.**, v. 37, n. 1, p. 79-82, Jan./Feb. 1991.
- NAWA, Y.; KIYOTA, M.; KORENAGA, M.; KOTANI, M. Defective protective capacity of *W/W^v* mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. **Parasite Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 429-38, Jul. 1985.
- NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORRI, Y.; ABE, T.; KHAN, A. I.; BING-SHI, I.; ITOH, H.; UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunol.**, v. 16, n. 7, p. 333-8, Jul. 1994.
- NEVA, F. A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 153, n. 3, p. 397-406, Mar. 1986.
- NEVA, F. A.; GAM, A. A.; BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **J. Infect. Dis.**, v. 144, n. 5, p. 427-32, Nov. 1981.
- NEVA, F. A.; GAM, A. A.; MAXWELL, C.; PELLETIER, L.L. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared from infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 567-72, Nov. 2001.
- OKU, Y.; ITAYAMA, H.; KAMIYA, M. Expulsion of *Trichinella spiralis* from the intestine of *W/W^v* mice reconstituted with haematopoietic and lymphopoietic cells and origin of mucosal mast cell. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 337-44, Oct. 1984.
- OLIVEIRA, S. H.; FACCIOLI, L. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 111, n. 3, p. 244-52, nov. 1996.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. A. The enigmatic eosinophil: investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, Suppl. 2, p. 93-104, jan. 1997.

PARSONS, J. C.; COFFMANN, R. L.; GRIEVE, R. B. Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 9, p. 501-8, Sep. 1993.

PATIL, P.; JAYSHREE, R. S.; ACHARYA, R. S.; SRIDHAR, H.; BABU, G.; SURESH, T. M. Fulminant fatal *Strongyloides stercoralis* infection in a postchemotherapy immunosuppressed cancer patient. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 33, n. 5, p. 504-5, Nov. 1999.

PEDRO, R. J.; RAMOS, M. C.; BRANCHINI, M. L. M. Parasitoses intestinais I: Aspectos clínicos. In: AMATO-NETO, V.; VALDY, J. L. S (Ed). Doenças transmissíveis. 3ª ed, São Paulo: Sarvier, 1988. p. 663-89.

PELLEGRINO, J.; CHAIA, G.; POMPEU-MEMORIA, J. M. Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrongiloidíase. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 3, n. 1, p. 181-6, jul. 1961.

PESSOA, S. P.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 10º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978. p. 986.

PETERS-GOLDEN, M. Regulation of the leukotriene biosynthetic pathway. **Clin. Exp. Allergy Rew**, v. 1, n. 1, p. 128-32, Jan. 2001.

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 175-82, jul./ago. 1993.

PLEASS, R.; KUSEL, J. R.; WOOF, J. M. Cleavage of human IgE mediated by *Schistosoma mansoni*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 121, n. 3, p. 194-204, Mar. 2000.

POLFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. M. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2240-8, Apr. 1998.

PONATH, P. D.; QIN, S.; RINGLER, D. J.; CLARK-LEWIS, I.; WANG, J.; KASSAM, N.; SMITH, H.; SHI, X.; GONZALO, J. A.; NEWMAN, W.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; MACKAY, C. R. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 3, p. 604-12, Feb. 1996.

RAMALHO-PINTO, F. J.; McLAREN, D. J.; SMITHERS, S. R. Complement-Mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 147, n. 1, p. 147-56, Jan. 1978.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 856.

ROMAGNANI, S. Human TH₁ and TH₂ subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 98, n. 4, p. 279-85, Apr. 1992.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; TEIXEIRA, A. L. S.; BARROS-MAZON, S.; TREVISAN, R. C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.26, n. 2, p. 83-7, abr./jun. 1993a.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO, L. G.; da SILVA, L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 35, n.4, p. 361-5, jul./ago. 1993b.

ROTMAN, H. L.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCOTT, P.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larvae *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 29-39, Jan. 1997.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematodes das fezes; modificações do método de Baermann. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 14, n. 1, p. 5-8, jan. 1954.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.**, v. 11, n. 1, p. 1-13, Jan. 1983.

SANZS, M. J.; WEG, V. B.; BOLANOWSKI, M. A.; NOURSHARGH, S. IL-1 is a potent inducer of eosinophil accumulation in rat skin. Inhibition of response by a platelet activating factor antagonist and an anti-human IL-8 antibody. **J. Immunol.**, v. 154, n.3, p.1364-73, Feb. 1995.

SASAKI, O.; SUGAYA, H.; ISHIDA, K.; YOSHIMURA, K. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 6, p. 349-54, Jun. 1993.

SATO, Y.; OTSURU, M.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y. Intradermal reactions in strongyloidiasis. **Int. J. Parasitol.**, v. 16, n. 1, p. 87-91, Feb. 1986.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 35-41, jan./feb. 1995.

SATO, Y.; INOUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.84, n. 3, p. 403-6, May./Jun. 1990.

SATO, Y.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y. Gelatin particule indirect agglutination test for mass examination for strongyloidiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n.4, p. 515-18, Jul./Aug. 1991.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of strongyloidiasis infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n.3, p. 248-50, Sep. 1995.

SEITZ, H. M.; COTTRELL, B. J.; STURROCK, R. F. A histological study of skin reactions of baboons to *Schistosoma mansoni* schistosomula. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 385-90, Mar. 1987.

SHER, A.; COFFMAN, R. L.; HIENY, S.; CHEEVER, A. W. Ablation of eosinophil and IgE response with anti-IL-5 or and anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. **J. Immunol.**, v. 145, n. 11, p. 3911-6, Dec. 1990.

SHI, B. B.; ISHIKAWA, N.; ITOH, H.; IDE, H.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; UCHIYAMA, F.; NAWA, Y. Globlet cell mucins of four genera of the subfamily Cricetinae with reference to the protective activity against *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunol.**, v. 16, n. 10, p. 553-9, Oct. 1994.

SHIN, M. H.; KITA, H.; PARK, H. Y.; SEOH, J. Y. Cysteine protease secreted by *Paragonimus westermani* attenuates effector functions of human eosinophils stimulated with immunoglobulin G. **Infect. Immun.**, v. 69, n.3, p. 1599-604, Mar. 2001.

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 129-38, Aug. 1988.

SIDDIQUI, A. A.; KOENIG, N. M.; SINENSKY, M.; BERK, S. L. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 7, p. 655-8, Jul. 1997.

SIDDIQUI, A. A.; STANLEY, C. S.; BERK, S. L. cDNA encoding the highly immunodominant antigen of *Strongyloides stercoralis*: gamma-subunit of isocitrate dehydrogenase (NAD⁺). **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 4, p. 279-83, Apr. 2000a.

SIDDIQUI, A. A.; STANLEY, C. S.; SKELLY, P. J.; BERK, S. L. cDNA encoding a nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 1, p. 24-9, Jan. 2000b.

SIMPSON, W. G.; GERHARSTEIN, C.; THOMPSON, J. R. Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection. **South. Med. J.**, v. 86, n. 7, p. 821-5, Jul. 1993.

SISSON, J. H.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A. Production of platelet activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B₄ metabolism. **J. Immunol.**, v. 138, n. 11, p. 3918-26, Jun. 1987.

STEEL, C.; NUTMAN, T. B. Regulation of IL-5 in onchocerciasis. A critical role for IL-2. **J. Immunol.**, v. 150, n. 12, p. 5511-8, Jun. 1993.

SUGANE, K.; KUSAMA, Y.; TAKAMOTO, M.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K. Eosinophilia, IL-5 level and recovery of larvae in IL-5 transgenic mice infected with *Toxocara canis*. **J. Helminthol.**, v. 70, n. 2, p. 153-8, Jun. 1996.

TAKAMOTO, M.; OVERTON, K. S.; BEHM, C. A.; SUGANE, K.; YOUNG, I. G.; MATTHAEL, K. I. Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57Bl/6 mice genetically deficient in IL-5. **Immunology**, v. 90, n.4, p. 511-7, Apr. 1997.

TAKAMOTO, M.; SUGANE, K. Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: in vitro production of interleukin-5 by cells of both normal and congenitally athymic nude mice. **Parasite immunol.**, v. 15, n. 9, p. 493-500, Sep. 1993.

TAVARES-NETO, J.; ALVES, D. B.; FRANCISCON, C. J. U.; SERRANO, R. S. Estrongiloidíase em pacientes com pênfigo foliáceo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, n. 3, p. 145-9, jul./set. 1991.

THOMPSON, J. R., BERGER, R. Fatal adult respiratory distress syndrome following successful treatment of pulmonary strongyloidiasis. **Chest**, v. 99, n. 3, p. 772-4, Mar. 1991.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; TORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep. 1979.

TRAJMAN, A.; MACDONALD, T. T.; ELIA, C. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Clin. Pathol.**, v. 50, n.12, p. 991-5, Dec. 1997.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 6, p. 967-73, Jun. 1999.

URBAN, J. F. Jr; KATONA, I. M.; PAUL, W. E.; FINKELMAN, F. D. Interleukin-4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 13, 5513-7, Jul. 1991.

- UCHIKAWA, R.; ICHIKI, H.; KOMAKI, E. Antibody responses and protective immunity in rats receiving repeated inoculations of *Strongyloides ratti*. **J. Parasitol.**, v. 77, n. 5, p. 737-41, Oct. 1991.
- VAN DER FELTZ, M.; SLEE, P. H.; VAN HEES, P. A.; TERSMETTE, M. *Strongyloides stercoralis* infection: how to diagnose best?. **Neth J. Med.**, v. 55, n.3, p. 128-31, Sep. 1999.
- WARD, R. E.; McLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: evidence that eosinophils and/or macrofages contribute to skin-phase challenge attraction in vaccinated CBA/Ca mice. **Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 63-84, Feb. 1988.
- WOODRIG, J. H.; HALFHILL, H.; REED, J. C. Pulmonary strongyloidiasis: clinical and imaging features. **AJR. Am. J. Roentgenol.**, v. 162, n. 3, p. 537-42, Mar. 1994.
- WURTZ, R.; MIROT, M.; FRONDA, G.; PETERS, C.; KOCKA, F. Short report: gastric infection by *Strongyloides stercoralis*. **Am. J. Trop. Hyg.**, v. 51, n. 3, p. 339-40, Sep. 1994.
- YAMADA, M.; MATSUDA, S.; NAKAZAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **J. Parasitol.**, v.77, n.4, p. 592-4, Aug. 1991.
- YAMAGUCHI, Y.; SUDA, T.; SUDA, J.; EGUCHI, M.; MIURA, Y.; HARADA, N.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K. Purified interleukin-5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **J. Exp. Med.**, v. 167, n. 1, p. 43-56, Jan. 1988.
- YING, S.; MENG, Q.; TABORDA-BARATA, L.; CORRIGAN, C. J.; BARKANS, J.; ASSAUF, B.; MOQBEL, R.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 70-6, Jan. 1996.