

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Mariana Félix de Souza Prudente**

**Lagochilascariase experimental em camundongos A/J e  
B10.A**

**Orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Silvia Carvalhaes**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior**

**Dissertação de Mestrado**

**Goiânia - Goiás, 2006.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**Mariana Félix de Souza Prudente**

**Lagochilascariase Experimental em Camundongos A/J e**

**B10.A**

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Silvia Carvalhaes

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

**Dissertação de Mestrado submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG  
como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em  
Medicina Tropical na área de concentração de Imunologia.**

**Goiânia - Goiás, 2006.**

**Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações."**

Vincent Van Gogh

**"Quanto maior são as dificuldades a vencer, maior será a satisfação."**

Cícero

**"Jamais se desespere em meio às sombrias aflições de sua vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda."**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me guiado nesta trajetória de aprendizagem e ter proporcionado momentos únicos de alegria, amizade, crescimento profissional e pessoal desde o princípio no laboratório;

Aos meus pais, Leonel Carlos Prudente e Sueli D'Abadia Félix de Souza Prudente, que me acompanharam nesta trajetória e se esforçaram muito para que eu conseguisse realizar este trabalho. Agradeço à minha querida mãe pelo amor, pelo apoio, pela dedicação e pela companhia nos momentos mais difíceis da minha vida;

A todos da minha família que sempre torceram pelo meu sucesso e me ajudaram muito sempre que precisei;

Ao Pablo por estar sempre ao meu lado. Agradeço o incentivo, as palavras animadoras, o carinho, o amor e a compreensão que foram tão importantes para mim. Além de companheiro você é um grande amigo;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Silvia Carvalhaes, pela credibilidade, pela paciência, pelo aprendizado e por proporcionar essa grande oportunidade da minha vida;

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Jr pela participação, disposição e principalmente pelo enorme auxílio, sem o qual eu não teria conseguido finalizar o mestrado;

À Jaqueline Gleice de Freitas por ter me transmitido um pouco do seu conhecimento no laboratório e por ter sido uma ótima companheira de experimento. À Alessandra de Pádua pela amizade, companheirismo e pela força nos momentos penosos. Também nunca esquecerei os períodos que passamos juntas;

Aos professores do programa de pós-graduação do IPTSP/UFG, os quais são ótimos profissionais, e me despertaram o interesse cada vez maior pela pesquisa nesta área;

Aos amigos e colegas do mestrado Carina, Milla, Rejane, Liana, Ludimila, Alex, Marcos, Tatiana e a minha grande amiga Josireny por tornar a convivência no instituto muito mais agradável.

Aos técnicos e funcionários do IPSTP/UFG pela colaboração na realização deste trabalho, em especial ao Raimundo e à Vânia;

A todos que mesmo não citados aqui contribuíram direta ou indiretamente para a execução desta dissertação.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	- v -
ABSTRACT.....	- vi -
LISTA DE FIGURAS .....	- viii -
LISTA DE TABELAS .....	- x -
LISTA DE ABREVIATURAS.....	- xi -
INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Lagochilascariase.....	1
1.2 - Morfologia.....	1
1.3 - Ciclo evolutivo natural .....	3
1.4 - Ciclo evolutivo experimental.....	4
1.5 - Lagochilascariase humana.....	5
1.6 - Patogenia.....	7
1.7 - Diagnóstico.....	8
1.8 - Imunologia .....	11
JUSTIFICATIVA .....	17
OBJETIVOS .....	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO GERAL .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## RESUMO

A Lagochilascariase é uma infecção causada por parasitos do gênero *Lagochilascaris*, cuja espécie é conhecida por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Campos *et al.* (1992) descreveram o ciclo evolutivo experimental de *L. minor* utilizando o modelo constituído por camundongo, como hospedeiro intermediário, e gato doméstico, como hospedeiro definitivo. A disponibilidade de linhagens murinas com diferentes características genéticas tem favorecido o estudo das relações parasito-hospedeiro, cruciais no estabelecimento da resistência ou susceptibilidade às infecções. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros parasitológicos, histopatológicos, sorológicos e de sobrevivência na infecção experimental por *L. minor* em camundongos isogênicos B10.A e A/J, a fim de se verificar as diferenças das respostas que poderiam refletir os quadros de resistência e susceptibilidade. Camundongos isogênicos B10.A e A/J foram inoculados por sonda esofágica com 2000 ovos infectantes de *L. minor* por animal. Três camundongos infectados, e 1 não infectado foram sacrificados dos 15 aos 180 dias pós-infecção (DAI) para análise. Grupos de 22 camundongos machos da linhagem B10.A e 19 camundongos da linhagem A/J foram inoculados, e a porcentagem de sobrevivência foi avaliada durante um ano. Após o sacrifício e abatimento da pele dos animais foi determinada a quantidade de nódulos subcutâneos e musculares. Larvas retiradas dos nódulos foram mensuradas quanto ao comprimento e largura. A obtenção de antígenos dos produtos secretados e excretados e dos extratos brutos de larvas de *L. minor* e a detecção de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE séricos foi realizada segundo Freitas (2003). Fragmentos de pulmões, fígado, linfonodos e baço foram fixados e processados pelo método de inclusão em parafina e corado pela hematoxilina – eosina, coloração de Luna e coloração por Tricrômio de Masson. Fez-se análise semi-quantitativa da intensidade do processo inflamatório e caracterização dos tipos celulares. A porcentagem de sobrevivência dos camundongos B10.A e A/J foram 33,3% e 90% respectivamente. Camundongos A/J apresentaram número maior de larvas encistadas no tecido subcutâneo superficial até os 150 DAI. Somente aos 45 e 60 DAI larvas retiradas de camundongos A/J foram significativamente maiores que larvas retiradas de camundongos B10.A. O padrão das lesões pulmonares, nas diferentes linhagens de camundongos foi caracterizado por infiltrado inflamatório focal formando granulomas, predominante de células mononucleares. Os animais A/J apresentaram menor intensidade de inflamação. O fígado, baço e linfonodos apresentaram-se com aspecto reacional à infecção, em ambas linhagens. Os níveis de IgG sérico dos animais A/J e B10.A foram crescentes durante o curso da infecção, sem diferença entre as duas linhagens. Aos 45 DAI, camundongos B10.A apresentaram um alto nível de IgM e IgA sérico contra os antígenos dos produtos

secretados e excretados (SE) de larvas. Já camundongos A/J apresentaram uma alta produção de IgA sérico contra os antígenos do extrato bruto, entre os 90 e 180 DAI. Não foram detectados níveis consideráveis de IgE sérico nos animais infectados. Com base nesses resultados podemos concluir que as lesões pulmonares e a porcentagem de sobrevivência demonstram claramente a diferença de evolução da infecção experimental em camundongos resistentes e susceptíveis. Em relação ao número de nódulos subcutâneos, tamanho das larvas encistadas, sorologia e lesões anatomopatológicas de fígado, baço e linfonodos, as diferenças entre as linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis a *Lagochilascariase* são discretas.

### **ABSTRACT**

*Lagochilascariasis* is an infection caused by a parasite from the genus *Lagochilascaris* and the species is *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Campos *et al.* (1992) described its experimental evolutive cycle using a model constituted by mice as intermediate hosts and by domestic cats as definitive hosts. The availability of murine strains with different genetic characteristics has favored the study of host-parasite relationships, which are crucial to the establishment of susceptibility or resistance to infection. The aim of this work was to evaluate parasitological, histological, serological and survival parameters in experimental infection with *L. minor* in isogenic B10.A and A/J mice to compare the different responses and determine susceptibility or resistance to infection. Isogenic B10.A and A/J mice were each inoculated with 2000 infecting *L. minor* eggs using esophagian sonde. Three infected mice and one non-infected mouse were sacrificed from 15 to 180 days after infection (DAI) aiming analysis. Groups with 22 male B10.A mice and 19 A/J mice were inoculated and the percentage of survival was analyzed during one-year period. After mice sacrifice and skin removal the quantity of subcutaneous and muscular nodules was determined. Larvae removed from nodules were measured in length and width (Paçô e Campos, 1998). The obtention of antigen from crude secreted and excreted products from *L. minor* larvae and the detection of IgM, IgG, IgA and IgE antibodies were performed according to Freitas (2003). Fragments from lungs, liver, lymph nodes and spleen were fixed and processed by method of inclusion in paraffin and stained by hematoxiline-eosin, Luna stain and Masson Tricrome stain. The semi-quantitative analysis of intensity of the inflammatory process and characterization of cell types were performed. The percentage of B10.A and A/J mice survival were 33,3% and 90% respectively. A/J mice presented higher number of encysted larvae in the superficial subcutaneous tissue until 150 DAI. Only at 45 and 60 DAI larvae removed from A/J mice were significantly bigger than larvae removed from B10.A mice. The pattern of pulmonary lesions in both mice strains



was characterized by focal inflammatory infiltrated forming granulomas with mononuclear cell predominance. The A/J mice presented lower inflammatory intensity. The liver, spleen and lymph nodes presented inflammatory reactional aspect in both strains. The seric levels of IgG from A/J and B10.A mice increased during infection with no difference between strains. At 45 DAI B10.A mice presented high level of seric IgM and IgA against the antigens from secreted and excreted products (SE) from larvae. While A/J mice presented high production of seric IgA against antigens from crude extract between 90 and 180 DAI. There were not detected considerable levels of seric IgE in infected animals. Analyzing these results we conclude that the pulmonary lesions and the survival percentage clearly demonstrated the different evolution of susceptible and resistant experimental infection in mice. Relating the number of subcutaneous nodules, size of encysted larvae, serology and anatomopathological lesions of liver, spleen and lymph nodes, the differences found between *Lagochilascariasis* resistant and susceptible strains are discrete.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentagem de sobrevivência de camundongos A/J e B10.A infectados por <i>Lagochilascaris minor</i> .....	27
Figura 2	Quantificação do número de nódulos subcutâneos e musculares superficiais em camundongos A/J e B10.A infectados por <i>Lagochilascaris minor</i> .....	29
Figura 3	Mensuração do comprimento de larvas de <i>Lagochilascaris minor</i> retiradas dos nódulos de camundongos A/J e B10.A infectados.....	31
Figura 4	Mensuração da largura de larvas de <i>Lagochilascaris minor</i> retiradas dos nódulos de camundongos A/J e B10.A infectados. ....	32
Figura 5	Corte transversal de <i>Lagochilascaris minor</i> colhido de tecido muscular superficial de camundongos e corado pela Hematoxilina e Eosina (HE) .....	33
Figura 6	Cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados com $2 \times 10^3$ ovos de <i>Lagochilascaris minor</i> (HE) .....	36
Figura 7	Cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados.....	37
Figura 8	Corte histológico de pulmão de camundongo B10.A.....	38
Figura 9	Fotomicrografia de cortes histológicos de órgãos de camundongos infectados com $2 \times 10^3$ ovos de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	39

Figura 10	Dosagem de anticorpos séricos IgM específicos contra extrato bruto da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	41
Figura 11	Dosagem de anticorpos séricos IgM específicos contra produtos secretados e excretados da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	42
Figura 12	Dosagem de anticorpos séricos IgG específicos contra extrato bruto da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	44
Figura 13	Dosagem de anticorpos séricos IgG anti produtos secretados e excretados das larvas de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	45
Figura 14	Dosagem de anticorpos séricos IgA específicos contra extrato bruto da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	47
Figura 15	Dosagem de anticorpos séricos IgA específicos contra produtos secretados e excretados da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	48
Figura 16	Dosagem de anticorpos séricos IgE específicos contra extrato bruto (EB) da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	50
Figura 17	Dosagem de anticorpos séricos IgE específicos contra produtos secretados e excretados da larva de <i>Lagochilascaris minor</i> .....	51
Figura 18	Cromatografia das subclasses de anticorpos IgG séricos de camundongos A/J e B10.A infectados por <i>Lagochilascaris minor</i> .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comprimento em milímetros (mm) de larvas de <i>Lagochilascaris minor</i> e parasitos adultos retirados de camundongos A/J e B10.A ao longo da infecção experimental .....	33
----------	---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo

CHP – complexo principal de histocompatibilidade ou MHC do inglês  
“major histocompatibility complex”

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

cm - centímetros

DAI – dias após a infecção

DO – densidades ópticas

EB – extrato bruto

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ELISA – ensaio imunoenzimático, do inglês “enzyme linked  
immunosorbent assay”

Fc - porção constante da imunoglobulina

GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito e monócito

HE – hematoxilina-eosina

h – horas

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IFN- $\gamma$  - interferon gama

L3 – larvas de terceiro estágio

L4 – larvas de quarto estágio

MCP-1 – proteína -1 quimiotática para monócito

min – minutos

MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatória de macrófago - 1 alfa

mL - mililitros

mm - milímetros

mn - mononucleares

$\mu$ l - microlitros

$\mu$ m - micrômetros

$\mu$ g - microgramas

NK - células “natural killer” ou naturalmente matadoras

PBS - salina tamponada com fosfatos

RANTES - quimiocina para linfócitos T e monócitos, do inglês “regulated on activation, normal T expressed and secreted”

RPM - rotações por minutos

SE - produtos secretados e excretados

TA - temperatura ambiente

TGF- $\beta$  - fator transformador de crescimento beta

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

UFG - Universidade Federal de Goiás

## **INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Lagochilascariase**

Conceitua-se lagochilascariase ou Lagochilascariose como infecção causada por nematódeos do gênero *Lagochilascaris*.

Este parasito foi classificado inicialmente como *Ascaris lumbricoides* imaturos. Todavia, com o exame minucioso ao microscópio verificou-se tratar de uma nova espécie, nomeada então, de *Lagochilascaris minor*.

Conforme Yamaguti (1961) a classificação sistemática deste nematódeo está organizada em espécie: *Lagochilascaris minor* pertencente ao gênero *Lagochilascaris*, da subfamília Ascaridinae, família Ascarididae, da ordem Ascaridea e classe Nematoda.

Outras espécies deste gênero foram descritas por vários autores. *Lagochilascaris major* encontrado por Leiper (1910), em leões africanos; *Lagochilascaris turgida* por Travassos (1924); *Lagochilascaris buckleyi* retirada de *Felis concolor* infectada, descrito por Sprent (1971) e *Lagochilascaris sprenti* Bowman *et al.* (1983), parasito retirado de marsupiais.

### **1.2 - Morfologia**

O helmintologista da Escola de Medicina de Londres, Robert T. Leiper, em 1909, foi quem descreveu o nematódeo pequeno, branco, apresentando três lábios bem desenvolvidos na extremidade anterior que surgia de abscessos cervicais de nativos de Trinidad.

Estes nematódeos apresentam um lábio subdorsal e dois lábios subventrais separados do resto do corpo por um sulco, o qual sugeriu o nome *Lagochilascaris minor*. Estes lábios são delimitados inferiormente por um espessamento cuticular dando origem aos interlábios que apresentam uma forma de cone ou triangular, o revestimento cuticular é estriado transversalmente. Esses nematódeos possuem duas asas pouco desenvolvidas que percorrem lateralmente o corpo e praticamente

desaparecem no terço final. O tubo digestório está representado por esôfago, intestino, reto e ânus (fêmea) ou cloaca (macho). Os parasitos machos medem de 6 a 14 milímetros (mm), apresentam cinco pares de papilas pós-cloacais e 25 papilas pré-cloacais, apresentam também dois espículos de forma e tamanhos iguais, desprovidos de asas caudais. A extremidade distal é ligeiramente recurvada e curta. O ducto ejaculador é bem desenvolvido, atingindo cerca de duas a três vezes o tamanho do espículo. As fêmeas medem de 5 a 13 mm e apresentam a vulva na parte mediana do parasito, a vagina estende-se a região posterior do corpo se divide em dois ramos, cujas porções terminais se comunicam com o útero e ovários. Possuem uma cauda curta geralmente desprovida de protuberância terminal. Os ovos são semelhantes aos de *Ascaris lumbricoides*, arredondados ou ovalados, de casca espessa e irregular, apresentando de 15 a 26 escavações em torno da linha equatorial. Suas dimensões são variáveis apresentando 40 a 83 x 58 a 98 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Sprent 1971a; Campos *et al.* 1992).

No interior dos ovos encontram-se larvas destes helmintos em vários estágios de desenvolvimento. As larvas de 1º estágio medem aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de comprimento e possuem uma única cutícula. O tubo digestório é constituído pelo esôfago, seguindo o intestino, reto e ânus. As larvas de 2º estágio são observadas após 10 a 15 dias e medem cerca de 400  $\mu\text{m}$  de comprimento. A cutícula única se apresenta descolada nas extremidades anterior e posterior do corpo. Após 15 a 21 dias são encontradas larvas de 3º estágio medindo em torno de 600  $\mu\text{m}$  de comprimento. Estas larvas apresentam duas cutículas descoladas nas extremidades. No ápice da extremidade posterior há uma protuberância terminal em forma de “botão”, oriunda de um estrangulamento na cutícula da larva. Quanto ao sistema digestório a diferença é apresentada pela largura do esôfago, sendo mais largos na porção anterior. As larvas de 4º estágio medem de 8400 a 13800  $\mu\text{m}$  (8,4 a 13,8 mm) de comprimento, apresentam os dois



lábios subventrais e o lábio subdorsal bem desenvolvidos, além de um discreto sulco pós-labial. O tubo digestório continua semelhante, mas neste estágio as larvas já possuem primórdios genitais. As fêmeas apresentam a vulva comunicando-se com a vagina que se diferencia nas primeiras ramificações uterinas. Os machos apresentam um primórdio dos espículos claramente visível na região da extremidade posterior. A formação das primeiras alças testiculares tem início na região que corresponde à cerca de um terço do comprimento do corpo (Campos *et al.* 1992; Lanfredi *et al.* 1998).

### **1.3 - Ciclo evolutivo natural de *L. minor***

Animais silvestres como canídeos, felídeos e roedores são considerados os prováveis reservatórios naturais de *Lagochilascaris minor*. Leiper (1909) afirmou que animais carnívoros seriam os hospedeiros naturais do parasito, e seu *habitat* o canal alimentar (intestino delgado).

Pawan (1927), Winckel and Treuniet (1956) e Draper (1963) consideraram os felídeos silvestres da América do Sul disseminadores do parasito. Fraiha *et al.* (1989) sugeriram a jaguatirica e a onça-pintada como alguns destes disseminadores.

Dezenas de parasitos e ovos foram encontrados no interior de lesões nodulares esofagianas e mediastínicas de cães, *Canis familiares* (Vidotto *et al.* 1982; Sturion *et al.* 1982). Volcan (1990) também relatou a infecção natural por *L. minor* em um cachorro do mato *Speothos venaticus*.

Fraiha *et al.* (1984; 1989) relataram um caso de infecção natural do gato doméstico, com envolvimento da massa muscular cérvico-ventral direita e fístulas no pescoço.

Atualmente pesquisadores da Argentina e Uruguai têm relatado a lagochilascariase natural em gatos sem associação aparente com a doença humana (Sakamoto & Cabrera, 2002).

#### **1.4 - Ciclo evolutivo experimental**

Utilizando o modelo experimental constituído por camundongo e gato doméstico *Felis catus domesticus*, foi descrito o ciclo evolutivo experimental de *L. minor*. Por meio desse modelo, o isolado do parasito tem sido mantido em laboratório. Camundongos comportam-se como hospedeiros intermediários e gatos, hospedeiros definitivos do helminto (Campos *et al.* 1992; Volcan 1992).

Ovos obtidos de fêmeas adultas de *L. minor* pela dissecação do útero mantido por 30 dias em temperatura ambiente em solução de formalina a 1% desenvolvem larvas de 3º estágio. Em camundongos C57BL/6, são inoculados 1000 destes ovos infectantes, por via oral. As larvas eclodem dos ovos nas porções terminais do intestino delgado e ceco entre 4 à 6 horas após a inoculação. Logo em seguida, estas larvas são encontradas no interior dos vasos linfáticos e veia porta, alcançando o parênquima hepático e pulmões entre 24 a 48 h, encistando-se posteriormente na musculatura esquelética e tecido subcutâneo (Farah 1999). As larvas de 3º estágio, recuperadas de fígado e pulmões de camundongos, examinados entre 24 a 48 h pós-inoculação, são morfologicamente semelhantes àquelas obtidas de ovos infectantes por compressão exercida entre lâmina e lamínula. Além da musculatura esquelética e tecido subcutâneo, larvas encistadas podem ser encontradas no coração, bexiga, pulmão e fígado de camundongos infectados (Volcan *et al.* 1982; Campos *et al.* 1992).

Em gatos, hospedeiros definitivos experimentais, inoculados com ovos infectantes por via oral, o parasito parece não alcançar a maturidade sexual; porém, em gatos alimentados com carcaças de camundongos infectados, as larvas de 3º estágio eclodem dos cistos no estômago e migram para as porções superiores do trato digestório, alcançando a fase adulta em tecidos de rino e orofaringe (tonsila, palato mole com lesões uni ou bilaterais), seios nasais, ouvido, mastóide, linfonodos cervicais, pulmões e cérebro. Por volta de 3 horas após a inoculação, as larvas de 3º estágio são encontradas quase que

exclusivamente no estômago, algumas no esôfago, rino e orofaringe. Após 6h, há predominância deste estágio larval em tecidos de rino e orofaringe e um pequeno número no estômago. Larvas de 4º estágio são observadas entre 2 a 8 dias, e parasitos adultos por volta de 9 a 20 dias após a inoculação. Tanto a 3ª como a 4ª muda podem ocorrer em qualquer uma das localizações acima mencionadas (Paçô 1994).

A infecção experimental em gatos resulta na formação de lesões decorrentes da migração de *L. minor* através de tecidos do hospedeiro. Ovos podem ser encontrados no local das lesões ou em fezes, quando abscessos de rino e orofaringe originam pertuitos para a luz do tubo digestório (Campos 1995).

Ao infectar os roedores silvestres, *Dayprocta agouti* (cutia), *Calomys callosus* e *Cavia porcellus* (cobaio ou preá) com ovos infectantes de *L. minor*, Paçô *et al.* (1994; 1999) observaram a formação de nódulos contendo larvas de 3º estágio na musculatura esquelética, nos tecidos subcutâneos, adiposo e vísceras. Helmintos adultos localizados em abscessos da região cervical, rino e orofaringe foram recuperados de gatos alimentados com carcaças dos roedores infectados.

Freitas (2003) demonstrou que camundongos também podem se comportar como hospedeiros definitivos de *L. minor*, pois quando infectados por ovos contendo larvas infectantes, desenvolvem abscessos purulentos maiores com a presença de parasitos adultos.

### **1.5 – Lagochilascariase humana**

Entre as espécies conhecidas, apenas *L. minor* tem sido descrita como agente etiológico desta enfermidade.

A distribuição geográfica da doença humana está registrada restritamente à região neotropical. Vários casos foram relatados na Colômbia, Venezuela Trinidad, Tobago, Suriname, Costa Rica e México. O Brasil lidera a casuística de lagochilascariase humana mundial (Bento *et al.* 1993; Campos *et al.* 1995).

A maioria dos casos brasileiros ocorre no estado do Pará, seguidos de Tocantins, Rondônia, Acre, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Paraná (Fraiha *et al.* 1989).

O primeiro caso humano brasileiro foi registrado por Artigas (1968). A partir desta época, vários casos de abscessos purulentos na região do pescoço (Campos *et al.* 1987; 1995; Costa *et al.* 1986; Fraiha *et al.* 1989; Obeid *et al.* 1985), ouvido (Obeid *et al.* 1985; Rocha *et al.* 1984), seios nasais (Draper 1963; Volcan *et al.* 1982), osso mastóide (Brujining 1957; Brense-Madrigal 1961; Corrêa *et al.* 1978; Moraes *et al.* 1983; Campos *et al.* 1987), rinofaringe (Leão *et al.* 1978) abscesso dentário (Volcan *et al.* 1982), pulmão (Moraes *et al.* 1985; Rosemberg *et al.* 1986), sistema nervoso central (Obeid *et al.* 1985; Rosemberg *et al.* 1986) e osso sacro (Monteiro *et al.* 1988) têm sido descritos.

Os trabalhos de Campos *et al.* (1992) e Paçô *et al.* (1994; 1999) confirmaram a hipótese formulada por Smith *et al.* (1983) de que a infecção humana por *L. minor*, na primo-infecção seja decorrente da ingestão de carne crua ou mal cozida de animais silvestres, contendo larvas encistadas do parasito. Os pacientes acometidos por esta doença são pessoas procedentes da zona rural, tendo em comum o hábito alimentar de ingerir carne crua de animais silvestres (Velooso *et al.* 1992).

Na lagochilascariase humana há o desenvolvimento de nódulos subcutâneos e abscessos, que podem eliminar uma secreção purulenta contendo parasitos em todos os estádios evolutivos no interior das lesões (Moraes 1983; Campos *et al.* 1995; Farah 1999).

Os sintomas e a gravidade da doença dependem da localização do parasito, carga parasitária e certamente, da resposta imune do hospedeiro, que pode permitir, minimizar ou bloquear os processos patogênicos, bem como o surgimento de novas lesões. Sobre a resposta imune, há um registro de deficiência tanto da resposta celular como humoral em paciente resistente à terapêutica. Alguns pacientes apresentam um bom estado geral; entretanto, não são raros os casos

de edemas de membros inferiores, palidez, baixo peso e quadros de desnutrição (Bottero & Little 1984).

### **1.6 - Patogenia**

Há aspectos totalmente desconhecidos no que diz respeito à interação entre o hospedeiro humano e *L. minor*, especialmente na fase inicial da doença. Em uma fase mais avançada da infecção, surgem no homem nódulos abertos ou fechados, nas regiões: cervical, retro-auricular, mastóide, conduto auditivo, seios para-nasais, rinofaringe, sistema nervoso central e pulmões. Esta se apresenta sob forma de pseudocisto, nódulo ou abscesso; e, quando fistulada, drena material sero-purulento, fétido, contendo ovos, larvas e parasitos adultos (Chieffi *et al.* 1981).

A multiplicação do parasito nos tecidos do hospedeiro caracteriza o fenômeno da autoinfecção. Nestas circunstâncias, são detectadas no local da lesão todas as fases do ciclo evolutivo do helminto, tais como ovos e larvas em várias etapas de desenvolvimento, e parasitos adultos (Moraes *et al.* 1985; Campos 1987). Fica evidente que o fenômeno da autoinfecção caracteriza o gato e o homem como hospedeiros definitivos deste helminto, embora autores como Leiper (1909), Artigas *et al.* (1968), Oostburg (1968) afirmarem que o homem seria um hospedeiro acidental de *L. minor*.

Segundo os autores citados, larvas contidas nos tecidos de roedores, uma vez eclodidas dos nódulos no estômago do homem, migrariam para as porções superiores do sistema digestório e tecidos vizinhos à faringe tais como: tonsila, ouvido médio, seios nasais, mastóide e demais localizações onde estes helmintos têm sido encontrados. Supõe-se que as larvas eclodidas dos nódulos alcancem as porções superiores do trato digestório e posteriormente tecidos que se comunicam com a faringe sem a obrigatoriedade do ciclo cardiopulmonar. Campos *et al.* (1992) sugeriram que componentes do trato digestório de carnívoros inviabilizem as larvas de 3º estágio do

interior de ovos de *L. minor*; e ainda, que a passagem do parasito pelo organismo do hospedeiro intermediário seja essencial no sentido de conferir às larvas maior resistência, facilitando, por conseguinte seu desenvolvimento posterior.

Moraes *et al.* (1985) observaram ovos em grande quantidade, muitos já embrionados, no interior de microabscessos e granulomas, em pulmão de paciente que foi a óbito por lagochilascariase. Além de ovos, foram vistos helmintos no centro de granulomas ou de áreas de necrose, e restos larvários circundados por fibrose; no restante do parênquima pulmonar, os alvéolos mostravam-se em grande parte repletos de macrófagos vacuolizados, neutrófilos e fibrina; ao redor dos brônquios, que apresentavam lesão intensa com presença de exsudato contendo linfócitos e plasmócitos, na luz. Os autores observaram a ocorrência do ciclo autoinfectante com a ausência de eosinófilos nos tecidos e sangue periférico.

A migração do parasito, através dos tecidos, origina lesões secundárias próximas ou bem distantes do abscesso inicial. Há relatos do encontro de apenas um nódulo fistulado no pescoço à época do diagnóstico e meses mais tarde parasitos são expulsos através da cavidade oral e conduto auditivo, apesar do uso de anti-helmínticos, tais como thiabendazol (Oostburg 1971; Volcan *et al.* 1982), dietilcarbamazina (Leão 1977), levamisol (Corrêa *et al.* 1978; Chieffi *et al.* 1981), albendazol (Oostburg 1992), metronidazol (Monteiro *et al.* 1998) e cambendazol (Faria *et al.* 2001).

## **1.7 - Diagnóstico**

### *1.7.1 - Diagnóstico Clínico diferencial*

O diagnóstico da lagochilascariase raramente é realizado no início da doença, sendo os fatores sócio-econômicos os principais responsáveis pela demora dos pacientes em procurarem assistência médica especializada.

O fato do parasito já ter sido localizado em vários órgãos e regiões diferentes do organismo humano dificulta ao médico estabelecer um quadro clínico característico.

Os sinais mais comuns são: comprometimento da região cervical com o surgimento de nódulo inicial, pequeno, não doloroso e não fistulizado evoluindo para um nódulo doloroso, fistulizado, eliminando material purulento com a presença de parasitos (Chieffi *et al.* 1981; Obeid *et al.* 1985; Oostburg *et al.* 1971). Este quadro não é sugestivo apenas de lagochilascariase. É importante notar que muitos casos desta doença foram relatados com sintomas e sinais muito diferentes (Rocha *et al.* 1984; Moraes *et al.* 1985; Veloso *et al.* 1992; Zacariotti *et al.* 1998), variando de acordo com a localização do parasito. Assim, existe a exigência do diagnóstico diferencial com outras enfermidades, para melhor escolha da terapêutica.

#### 1.7.2 - Diagnóstico Parasitológico

O exame parasitológico baseia-se na identificação de parasitos adultos, ovos e larvas comumente encontrados no local das lesões; uma vez colhidos dos abscessos, tanto as larvas como os parasitos adultos devem ser fixados em solução de formalina a 10% à quente ou solução de Railliet & Henry. Após a fixação, devem ser clarificados em ácido acético e creosoto de Faia ou lactofenol de Aman.

A instalação do parasito nos tecidos da região cervical, retroauricular e mastóide facilita o diagnóstico uma vez que no local da lesão são encontradas todas as fases do ciclo evolutivo do helminto. Entretanto, não é raro o parasito se instalar em tecidos de rino e orofaringe, oportunidade em que ovos podem ser expulsos através das fezes, quando as lesões se fistulizam para a luz do tubo digestório (Chieffi *et al.* 1981).

No laboratório clínico, ao se empregar o método de sedimentação espontânea em amostras fecais, é fundamental que se estabeleça o diagnóstico diferencial entre ovos de *L. minor* com ovos de *Ascaris lumbricoides*. Ovos podem ser encontrados em material de secreção

pulmonar, seios nasais e exsudato de conduto auditivo na dependência da localização do abscesso (Orihuela *et al.* 1987).

Ainda não existem métodos sorológicos disponíveis para o diagnóstico da lagochilascariase. Esta é uma urgência que se impõe, dadas às limitações existentes no diagnóstico parasitológico, especialmente quando o helminto se instala em localizações em que não há eliminação de ovos, larvas e parasitos adultos através de secreções.

Empregando antígeno protéico de larvas de 3º estágio no método ELISA, Freire-Filha (1997) observou aumento de anticorpos IgM em camundongos infectados experimentalmente. Anticorpos IgG não foram detectados até o 60º dia da infecção.

#### 1.7.3 - Diagnóstico histopatológico e alterações cito-hematológicas

Em cortes histológicos das lesões podem ser visualizados larvas e ovos do parasito envoltos por uma reação inflamatória. As larvas são normalmente encontrada no interior de granulomas primários, secundários ou terciários (Moraes *et al.* 1983; Veloso *et al.* 1992; Farah 1999).

O parasito é identificado pelas estruturas da cutícula, subcutícula ou hipoderme, sistema muscular, asas laterais, tubo digestório e estruturas do sistema reprodutor feminino e masculino (Bowman *et al.* 1987; Cimerman 1999).

Quanto à resposta hematológica, vários autores relataram casos de pacientes com hemograma demonstrando eosinofilia (Winchel & Treurniet 1956; Botero & Little 1984, Rosemberg *et al.* 1986, Orihuela *et al.* 1987), ou eosinopenia sanguínea e tecidual (Moraes *et al.* 1985) ou mesmo casos em que o hemograma não apresentava alterações (Oostburg & Varma 1968; Eulálio *et al.* 1995).

#### 1.7.4 – Diagnóstico por imagem

O diagnóstico por imagem não é conclusivo e nem diferencial, mas é de grande auxílio para o clínico localizar a lesão e encaminhar o paciente para um tratamento adequado. A Tomografia



computadorizada (Zaccariotti *et al.* 1996) é útil para demonstrar hemorragias e lesões provocada pelo helminto. Radiografia em casos de lagochilascariase pulmonar demonstra áreas de diminuição da transparência e lesões exsudativas (Corrêa *et al.* 1978). Exames radiológicos também se mostram importantes (Rocha *et al.* 1984; Zaccariotti *et al.* 1996).

### **1.8 - Imunologia**

O organismo, frente a um agente agressor, tem a capacidade de induzir uma reação inflamatória aguda e/ou crônica e montar uma resposta imune com o objetivo de destruir, diluir ou bloquear o agente na tentativa de inibir qualquer desequilíbrio que resulte em perda (Calich 2001).

A imunidade natural relacionada a helmintos ainda está por ser totalmente elucidada. Os diferentes helmintos ativam diferentes padrões de resposta imune, dificultando o entendimento e até mesmo a intervenção na infecção, no intuito de melhorar a resposta contra estes patógenos.

A resposta imune inata frente a uma infecção helmíntica geralmente envolve uma reação inflamatória intensa. Os fagócitos e outras células secretam substâncias microbidas na tentativa de eliminar o parasito, pois são muito grandes para serem fagocitados. Estas substâncias microbidas são proteínas catiônicas, enzimas proteolíticas, reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio e neurotoxina que são tóxicos para os helmintos. Além desses efeitos, ocorre também a ativação de fosfolipases, que atuam sobre fosfolípídeos de membrana, gerando ácido aracdônico. Este por sua vez, sofre a ação da lipoxigenase, produzindo leucotrienos, e da cicloxigenase, gerando prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano (Oliveira *et al.* 1997).

A infecção por helmintos normalmente caracteriza-se por aumento no número de neutrófilos, mastócitos e principalmente eosinófilos (Dent 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células que chegam no sítio de infecção devido à sua alta concentração de células no sangue e à cinética de expressão de moléculas de adesão (Stadnyk *et al.* 2000; Brattig *et al.* 2001). Estas células atuam na defesa do organismo através da síntese e liberação de metabólitos de oxigênio e enzimas contidas em seus grânulos (Rivero-Nava *et al.* 2001). Juntamente com estas substâncias são liberadas citocinas como, por exemplo, o fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ), mediadores inflamatórios e quimiocinas. Luster (1998) relata que quimiocinas são secretadas no sítio da infecção por células teciduais, leucócitos e células endoteliais ativadas, sendo retidas na matriz e na superfície do endotélio, formando um gradiente de concentração para sinalizar e recrutar outras células inflamatórias.

Em seguida os macrófagos fagocitam os neutrófilos pela ligação com o receptor CD44, induzindo a produção de MCP-1 e o acúmulo de macrófagos no sítio inflamatório (Kaplanski *et al.* 2003).

Mastócitos e basófilos são originados da mesma célula hematopoiética precursora, e seus desenvolvimentos são controlados por citocinas distintas. Ambas as células possuem receptores de alta afinidade para a porção Fc de IgE. Mastócitos se localizam preferencialmente na pele, superfícies mucosas e ao redor de vasos sanguíneos. Os basófilos são encontrados no sistema circulatório (Abraham and Arock 1998).

Estas células são ativadas liberando seus grânulos através da ligação cruzada de receptores Fc $\epsilon$ RI. Após a desgranulação, quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ), citocinas (Interleucina-1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, TNF $\alpha$ , GM-CSF) e substâncias pró-inflamatórias

(histamina, heparina, proteoglicanos) são liberadas (Wedemeyer *et al.* 2000; Abraham and Malaviya 1998).

Os eosinófilos são encontrados principalmente nos tecidos da superfície do corpo que interage com o meio externo. Durante uma infecção helmíntica ocorre um aumento do estímulo para produção e liberação destas células na medula óssea (Falcone *et al.* 2001).

O nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* induz uma forte resposta tipo Th2, assim como eosinofilia dependente de IL-5, hiperplasia de mastócitos e resposta policlonal de IgE dependente de IL-4 (Holland *et al.* 2000).

A IL-5 é produzida por células T ativadas e mastócitos. A IL-5 é importante nos estágios tardios de diferenciação e maturação de eosinófilos. Esta citocina aumenta a secreção de IgA por células B, agindo sozinha ou sinergicamente com TGF- $\beta$  e IL-4, e pode também aumentar a secreção de Imunoglobulina de outras classes (Matthaei *et al.* 1997; Yasue *et al.* 1999). A IL-5 modula a inflamação eosinofílica, por inibir a síntese e secreção de IL-8 a qual inibe a produção de IgE (Faccioli *et al.* 1997), contribuindo para a produção de altos níveis de IgE durante a infecção.

A ativação dos eosinófilos se dá através da ligação de receptores para IgA e IgE, e receptores para componentes do complemento, provocando a sua desgranulação. Os grânulos contêm produtos altamente tóxicos (peroxidase, proteína básica principal, ânion superóxido, proteínas catiônicas e neurotoxina), mediadores inflamatórios e citocinas (IL-3, IL-5, GM-CSF) (Oliveira *et al.* 1997; Behm & Ovington 2002).

Os componentes anti-helmínticos dos eosinófilos são mais efetivos na fase larval. Para a destruição de parasitos adultos outros mecanismos imunológicos estão envolvidos, como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (Dent 2002).

A inflamação causada pelo parasito na infecção desencadeia uma cascata de reações. O sistema complemento é importante na imunidade

inata do organismo principalmente em infecções por helmintos, os quais provocam uma resposta predominantemente humoral. As proteínas do sistema complemento são componentes do sistema imune que estão envolvidas na resposta imune do hospedeiro na tentativa de eliminar o patógeno (Aguiar 2001).

A ação de defesa do complemento é mediada por várias vias da resposta inflamatória, opsonizando moléculas e levando a lesão da membrana de alvos estranhos (Jokiranta *et al.* 1995). Durante a cascata de ativação destas proteínas várias moléculas pró-inflamatórias são geradas (C3a, C4a, C5a) (Ferreira *et al.* 2000). A anafilatoxina C5a provoca múltiplos efeitos nas células alvos: é quimioatraente de neutrófilos, eosinófilos e monócitos; provoca a desgranulação, explosão respiratória; muda a adesividade de células, assim como vasoconstricção; aumenta a permeabilidade vascular e estimula contração de músculos. Esta proteína ativada pode também interagir com reguladores ou receptores da IL-12 e inibir sua produção, impedindo a diferenciação das células Th1 levando a uma polarização da resposta imunológica para Th2 (Binder *et al.* 1999; Wittman *et al.* 1999).

O componente C5 do complemento se mostra importante em várias infecções. Gervais *et al.* 1984 relataram a susceptibilidade do camundongo A/J, deficiente de C5, à infecção por *Listeria monocytogenes*, sugerindo que esta deficiência prejudicaria o influxo de polimorfonucleares e macrófagos no sítio de infecção e a resposta inflamatória fagocitária do animal.

O estímulo crônico da infecção pelos helmintos leva à formação de granulomas. Fibroblastos, fibras de colágenos, vasos neoformados e principalmente macrófagos (células epitelióides) são os constituintes de um granuloma. Neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e B e plasmócitos podem eventualmente fazer parte destas estruturas (Shang *et al.* 2002).

Os macrófagos ativados intensificam sua função e secretam várias citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, entre outras. As citocinas secretadas

por todas estas células apresentam um papel fundamental na regulação e no direcionamento do tipo da resposta imune adquirida que se segue, podendo influenciar na resistência ou susceptibilidade do hospedeiro àquele parasito. Brunet *et al.* (1998) afirmaram que dependendo das citocinas presentes no microambiente e dos sinais recebidos das células apresentadoras de antígenos, os Linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens podem se diferenciar e secretar um painel definido de citocinas, caracterizando-os como células Th1 ou células Th2.

O complexo de histocompatibilidade principal (CHP ou MHC) é um conjunto gênico que codifica diversas proteínas, inclusive as glicoproteínas ligadoras de peptídeos chamadas moléculas de MHC, que são expostas na superfície de células apresentadoras de antígenos juntamente com o peptídeo para ligação e reconhecimento pelo receptor de células T. Estas moléculas são responsáveis pela ativação dos linfócitos T e assim possuem influência na polarização e direcionamento da resposta imune adquirida (Calich 2001).

A região gênica H-2, responsável pela produção das proteínas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP ou em inglês MHC), parece não ser determinante na susceptibilidade/resistência à infecção por *Paracoccidoidis brasiliensis* (Calich *et al.* 1985; Singer-Vermes *et al.* 1993) e por *Mycobacterium lepraemurium* (Adu *et al.* 1983), uma vez que camundongos que apresentam o mesmo haplótipo, comportam-se de maneira diferente frente a infecção. De fato, a resposta anti - *Trichinella spiralis* e a expulsão do parasito de camundongos B10.BR, B10.Q e B10.M infectados parecem ser independentes do controle genético e influenciados pela interação dos produtos dos genes H-2 e não-H-2 (Wassom *et al.* 1983).

Infecções por helmintos normalmente induzem resposta imune do tipo Th2, que pode estar associada com indução de anergia não-específica ou antígeno-específica (Meeusen 1999; Toledo *et al.* 2001; Rodriguez-Sosa *et al.* 2002). Macrófagos alveolares de ratos produzem óxido nítrico e prostaglandina E2 sob estímulos dos antígenos de

*Toxocara canis* inibindo a resposta imune tipo Th1 e estimulando resposta tipo Th2 (Espinoza *et al.* 2002).

Em alguns casos a resposta do tipo Th1 parece ser mais efetiva contra o helminto que a resposta Th2 convencional (Else & Grecis 1991; Pritchard 1995; Terrazas *et al.* 1998; Toledo *et al.* 2001). Na verdade a resposta tipo Th2 não ocorreria naturalmente, mas por um desvio na imunidade provocado pelo helminto, para obter uma postura mais permissiva do hospedeiro (Spellberg and Edwards 2001).

Embora não se tenha muitos trabalhos indexados sobre células NK em infecções por helmintos, esta célula com certeza tem alguma participação, pois a ativação dos macrófagos se dá principalmente pela ação do IFN- $\gamma$  que é secretado pelas células NK e linfócitos. Alguns trabalhos demonstram uma forte evidencia de atuação das células NK na defesa contra infecções helmínticas (Korten *et al.* 2002).

Na infecção murina utilizando linhagens sensíveis e resistentes, pode ser demonstrada uma polarização da resposta imune, frente a diferentes patógenos. Os animais resistentes às doenças granulomatosas, em geral apresentam uma resposta imune envolvendo a ativação de células efectoras Th1. A ativação destas células se traduz pela alta produção de INF- $\gamma$ , altos níveis de anticorpos IgG2a, maior ativação macrofágica e resposta imune precoce. Os animais sensíveis às doenças granulomatosas apresentam, via de regra, respostas imunes do tipo Th2, com baixos níveis de anticorpos específicos e alta produção de IgG1 e IgG2b, e macrófagos pouco ativados (Singer - Vermes *et al.* 1993; Calich *et al.* 1994).

A infecção de camundongos com *L. minor* tem sido um instrumento para o conhecimento e entendimento da fisiopatologia do helminto. As características da resposta imune do hospedeiro frente a infecção e os mecanismos de evasão do organismo utilizados pelo parasito com o objetivo de completar seu ciclo biológico são parâmetros de extrema importância para o esclarecimento desta doença.

## JUSTIFICATIVA

Apesar de a Lagochilascariase humana ser semelhante à infecção desenvolvida em gatos, com formação de nódulos cervicais que se fistulizam, drenam material purulento e eliminam parasitos, o estudo da infecção experimental por *L. minor* em camundongos é de extrema importância, já que constitui um campo pouco explorado e conhecido em relação aos mecanismos de infecção deste nematódeo.

O camundongo é a espécie mais utilizada para o estudo de infecções experimentais devido à facilidade de manuseio, praticidade de criação, e quantidade de estudos prévios que se tem sobre infecções em camundongos. A disponibilidade de linhagens isogênicas com diferentes características genéticas tem favorecido o estudo das relações parasito-hospedeiro, facilitando o estabelecimento da resistência e/ou susceptibilidade à infecção e a tentativa de reproduzir o ciclo evolutivo natural e experimental de diferentes patógenos (Kipnis 1999).

Na Paracoccidiodomicose, Tuberculose, Leishmaniose e Salmonelose a classificação de linhagens isogênicas de camundongos em sensíveis, intermediárias e resistentes, permitiu o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle destas infecções. (Calich *et al.* 1987)

A infecção experimental por *L. minor* em camundongos nos oferece a oportunidade de estudar seu mecanismo de infecção e compará-lo a outros helmintos e parasitos.

Com o intuito de excluir a influência das moléculas do MHC (CHP) no desenvolvimento da susceptibilidade ou resistência a infecção, consideramos importante avaliar a lagochilascariase experimental em camundongos A/J e B10.A, os quais possuem o mesmo aplótipo de MHC (H-2<sup>a</sup>), mas com “background” genético diferente (Kaminsky *et al.* 1985; Quian *et al.* 2005).

O presente estudo pode demonstrar a influência do sistema complemento na resistência ou susceptibilidade a lagochilascariase

experimental, pois o camundongo A/J é C5 deficiente (Mullick *et al.* 2004), ou seja, não produz o componente C5 do sistema complemento, e o camundongo B10.A é C5 suficiente.

Neste trabalho esperamos compreender como organismos susceptíveis e resistentes respondem à infecção e elucidar alguns mecanismos de evasão utilizados pelo helminto.



## **OBJETIVOS GERAIS**

- ❖ Com o objetivo de elucidar a relação entre parasito e hospedeiro, utilizou-se o modelo experimental de camundongos isogênicos A/J e B10.A para avaliar a infecção sob parâmetros de sobrevivência, parasitológicos, histopatológicos e sorológicos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Comparar a porcentagem de sobrevivência de animais A/J e B10.A infectados por *L. minor*;
- ❖ Comparar a quantidade de nódulos no tecido subcutâneo e muscular superficial em camundongos A/J e B10.A infectados;
- ❖ Mensurar o comprimento e largura das larvas de *L. minor* retiradas de camundongos infectados;
- ❖ Comparar os níveis dos anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, específicos para antígenos de *L. minor* nos soros de camundongos A/J e B10.A infectados e controles;
- ❖ Comparar os níveis das subclasses de anticorpos IgG fracionadas em colunas de proteína-A Sepharose obtidas de soros de camundongos A/J e B10.A infectados e não infectados;
- ❖ Analisar e comparar os processos patológicos presentes nos tecidos de pulmão, fígado, baço, linfonodo e nódulos de camundongos A/J e B10.A infectados, por meio da histopatologia;

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Obtenção dos parasitos

Isolado de *Lagochilascaris minor* obtido de lesões foi empregado para manutenção do ciclo experimental do parasito (Campos *et al.* 1992). Gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), com sorologia negativa para toxoplasmose e livres de parasitos intestinais, foram infectados por via oral com 100 nódulos contendo larvas de 3º estágio (L3) de *L. minor* retirados anteriormente do tecido subcutâneo de camundongos infectados (90 dias após infecção). Após 30 dias de infecção, as fezes dos gatos foram coletadas e mantidas em tubos de prolipropileno (Falcon) contendo solução de formalina a 1%, por 40 dias à temperatura de 25°C. Após este período, as fezes foram submetidas aos métodos de Hoffman e Faust para a obtenção dos ovos de *L. minor*. Estes foram centrifugados em solução fisiológica (três vezes) e desta suspensão, retirou-se três alíquotas de 1 µl, as quais foram examinadas entre lâmina e lamínula, com o auxílio de microscópio de luz (10X). A concentração de ovos por mililitro foi calculada por meio do emprego de regra de três simples sobre o resultado da média aritmética das contagens (Oliveira *et al.* 2002).

### 2.2 - Animais e via de inoculação

Foram utilizados camundongos das linhagens A/J e B10.A, todos procedentes do biotério central do Instituto Butantan. Cinquenta animais A/J machos e 51 animais B10.A machos (com três meses de idade e pesando  $20 \pm 2$ g) foram inoculados com 0,2 mL de solução contendo  $2 \times 10^3$  ovos infectantes de *L. minor*, utilizando uma sonda esofagiana. Dezoito animais A/J e 15 animais B10.A de mesma idade e peso, foram inoculados pelo mesmo procedimento com solução salina, para delineamento do grupo controle. Três animais infectados e um animal controle, de cada linhagem, foram sacrificados em Câmara de CO<sub>2</sub> aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias após a infecção

(DAI) para: coleta de sangue para obtenção do soro, contagem do número de nódulos subcutâneos e musculares superficiais, coleta de larvas para mensuração e retirada de órgãos para análise histopatológica. Os animais restantes foram utilizados para análise de sobrevivência. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG.

### **2.3 - Sobrevivência**

Vinte e quatro Camundongos B10.A machos infectados e 19 não infectados e 23 animais A/J machos infectados e 12 não infectados foram utilizados para avaliação da sobrevivência durante a progressão da infecção. O número de mortes foi registrado diariamente em todos os grupos, e a sobrevivência foi calculada pela porcentagem de animais vivos de cada grupo ao final de um ano de experimento. Após este período, os animais que resistiram a infecção foram sacrificados.

### **2.4 - Quantificação dos nódulos e mensuração das larvas de camundongos**

A quantidade de nódulos subcutâneos e musculares superficiais foi determinada pela contagem dos nódulos com o auxílio de lupa após o sacrifício e rebatimento da pele dos animais. Em seguida efetuou-se a média aritmética do número de nódulos encontrados em três camundongos infectados de cada linhagem em cada ponto (DAI). No mínimo cinco larvas foram retiradas dos nódulos de cada camundongo e após clarificação com lactofenol, utilizou-se ocular micrométrica (40X) para mensuração do comprimento e largura das larvas (Paço e Campos 1998). Amostras colhidas em diferentes dias de infecção foram incluídas em parafina e coradas pela hematoxilina & eosina para evidenciar as estruturas características.

### **2.5 - Histopatologia**

Amostras de pulmões, fígado, timo, linfonodos, baço, foram coletadas durante a necrópsia dos camundongos infectados e não infectados e fixadas em formalina 10% tamponada com fosfatos. O material foi processado pelo método de inclusão em parafina. As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina, coloração de Luna e coloração de Tricrômio de Masson e analisadas no microscópio de luz (Axiostar plus, Zeiss).

As lesões histopatológicas foram analisadas quanto à presença ou ausência de processos patológicos das células, do interstício, da circulação, do crescimento celular e inflamação. A inflamação foi também analisada quanto à intensidade, considerando-se inflamação ausente, discreta (1-25%), moderada (26-50%) e acentuada (acima de 51%) de acordo com o comprometimento do corte analisado. Para análise semiquantitativa deste processo nos órgão afetados de ambas as linhagens, atribuiu-se valores para ausência de inflamação = 0, inflamação discreta = 1, moderada = 2 e acentuada = 3 em todos os dias após infecção (DAI) já mencionados. Avaliou-se a significância das diferenças entre as linhagens A/J e B10.A.

## **2.6 - Obtenção dos extratos brutos e produtos excretados e secretados de larvas de camundongos**

Larvas colhidas de camundongos infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor* aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 DAI, e exaustivamente lavadas em PBS (pH 7,2), foram mantidas no mesmo tampão (100 Larvas/ml) em tubos de prolipropileno (eppendorff) durante 24h à temperatura de 37°C. Após este período, retirou-se o sobrenadante que corresponde aos produtos secretados e excretados, estocando-os a -20°C em presença de inibidores de proteases (EDTA-Pharmacia 1mM, Leupeptina-Sigma 1µM, PMSF-Sigma 4mM). As larvas suspensas em PBS pH 7,2 contendo inibidores de proteases foram rompidas em homogenizador de tecido T8-10 IKA, utilizando-se 5 pulsos de 6000 rpm, por 30 segundos. A suspensão foi centrifugada a

10.000g por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente o sobrenadante (correspondendo ao extrato bruto das larvas) foi retirado e estocado à -20° C. As concentrações de proteínas das amostras foram determinadas pelo método do ácido bicinconímico (BCA), PIERCE (Smith *et al.* 1985).

## **2.7 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O nível de anticorpos séricos IgG, IgM, IgA e IgE foi determinado pelo do ensaio imunoenzimático (ELISA). A concentração de antígenos (extrato bruto de larvas de camundongos e produtos secretados e excretados) e a diluição dos soros dos camundongos e dos conjugados de anticorpos foram padronizados por Freitas (2003) com a nossa colaboração, para obtenção de melhor sensibilidade do método.

Os 96 poços das placas de poliestireno (Costar) foram sensibilizados com 50 µL de uma solução de antígeno contendo 100 µg de proteína por mililitro de tampão carbonato. A sensibilização foi feita por um período de 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após sensibilização as placas foram bloqueadas com tampão carbonato e leite em pó desnatado a 2% por 90min à temperatura ambiente (TA), em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 0,5%. Os soros de camundongos infectados e não infectados foram diluídos 1/100 (e 1/50 para detecção de IgE) em PBS-leite em pó desnatado-soro de cabra 2%. Cem microlitros (100 µL) de soros diluídos foram aplicados nos poços e incubados por 90min, TA, em câmara úmida. Em seguida as placas foram lavadas com PBS-tween. Adicionou-se 100 µL de conjugado em cada poço, e incubou-se durante 90 min, TA, em câmara úmida. Os conjugados utilizados foram: IgG de coelho anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase (Sigma) diluído 1/4000, IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma) diluído 1/4000, IgG de coelho anti-IgA de camundongo marcado com peroxidase (Sigma) diluído 1/1000, anticorpo monoclonal de rato anti-IgE de camundongo diluído 1/500

(Sigma) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-cadeia leve de imunoglobulina de rato marcado com peroxidase diluído 1/2000 (Sigma). As placas foram novamente lavadas com PBS-tween e por fim 50  $\mu$ L de solução reveladora (2mg de ortofenilenodiamina, Sigma – 2  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 10 volumes, Merck – 5 mL de tampão citrato pH 5,0) foram adicionadas a cada poço. A reação foi bloqueada após 15min com 50  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico a 1N (Freitas 2003).

As leituras foram efetuadas no leitor de microplacas, Behring EL 3115, a 492nm. O limiar de reatividade ou “cut off” foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas (DO) dos soros padrões negativos obtidos de camundongos inoculados apenas com salina, acrescida de 2 desvios padrões (Larralde *et al* 1986; Bassi *et al* 1991).

## **2.8 - Fracionamento das subclasses de IgG**

Proteína A-Sepharose (Pharmacia Biotech) foi ressuspensa em 8mL de tampão PBS pH 7,0 e empacotada em coluna de vidro a 4°C. A coluna foi lavada três vezes com PBS e em seguida adicionou-se 300  $\mu$ L do “pool” de soros de camundongos infectados (90, 120 e 150 DAI) das linhagens A/J ou B10.A, ou camundongos não infectados A/J, B10.A, diluído  $\frac{1}{2}$  em PBS. Adicionou-se a coluna 10mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e desprezou-se o eluato. Lavou-se a coluna com 10ml de tampão fosfato pH 7,0 e adicionou-se 10ml de tampão fosfato pH 6,0, colhendo-se o material eluído (2ml/tubo). Lavou-se a coluna com tampão fosfato pH 6,0 e acrescentou-se 10ml de tampão fosfato pH 5,0, para coleta do material eluído (2ml/tubo). Novamente adicionou-se 10ml de tampão fosfato pH 5,0 para lavar a coluna e acrescentou-se 10ml de tampão citrato pH 3,5 colhendo-se o material eluído (2ml/tubo) em tubos contendo 20  $\mu$ L de tampão TRIS pH 9,0 para neutralizar o pH ácido. As amostras coletadas foram analisadas a 280nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotec-Ultraespec 2000). No material eluído em tampão de

pH 6,0 encontramos IgG1, em pH 5,0 encontramos IgG2a e IgG2b em pH 3,5 (Ey *et al.* 1978).

## **2.9 - Análise Estatística**

Para a análise estatística foi inicialmente elaborado um banco de dados eletrônico. Em seguida, as variáveis foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se teria distribuição normal e a variância das amostras, nos casos de distribuição normal utilizou-se testes paramétricos, na comparação entre 2 grupos, teste *t* Student e na comparação entre 3 ou mais grupos, utilizou-se a análise de variância para múltiplos grupos. Nos casos de distribuição não normal utilizou-se testes não paramétrico, na comparação entre 3 grupos ou mais utilizamos o teste de Kruskal – Wallis.

As proporções foram comparadas pelo teste do  $\chi^2$  ou teste de Fisher. Na correlação entre as variáveis com distribuição normal foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, caso contrário, foi aplicado o coeficiente de Spearman.

As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro alfa foi menor que 5% ( $p < 0.05$ ).

Para análise da porcentagem de sobrevida dos animais A/J e B10.A experimentalmente infectados por *L. minor* utilizou-se teste de Pissi e teste de Kaplan Meyer.

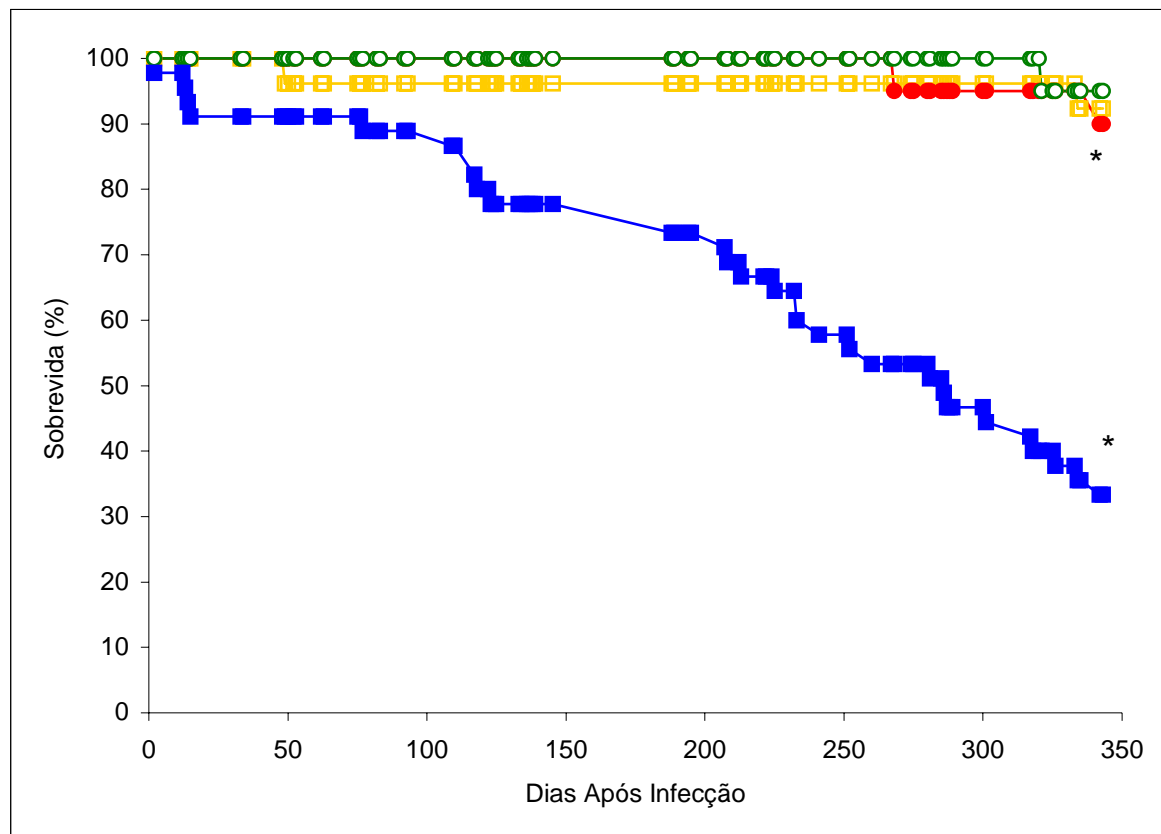
---

## RESULTADOS

### **3.1 - Sobrevida de animais A/J e B10.A infectados experimentalmente por *Lagochilascaris minor***

Camundongos da linhagem A/J infectados com  $2 \times 10^3$  ovos viáveis de *L.minor* apresentaram uma porcentagem de sobrevida após um ano de infecção de 90%, enquanto o grupo controle dessa linhagem apresentou 95% de sobrevida. Já os animais da linhagem B10.A infectados apresentaram somente 33,3% de sobrevida, enquanto que 92,3% dos animais B10.A não infectados apresentavam-se vivos ao final do experimento (Figura 1). Camundongos A/J infectados apresentaram porcentagem de sobrevida significativamente maior que camundongos B10.A infectados por *L. minor* ( $p < 0,05$ ). Esta diferença estatística pôde ser observada desde o 50º dia de infecção.



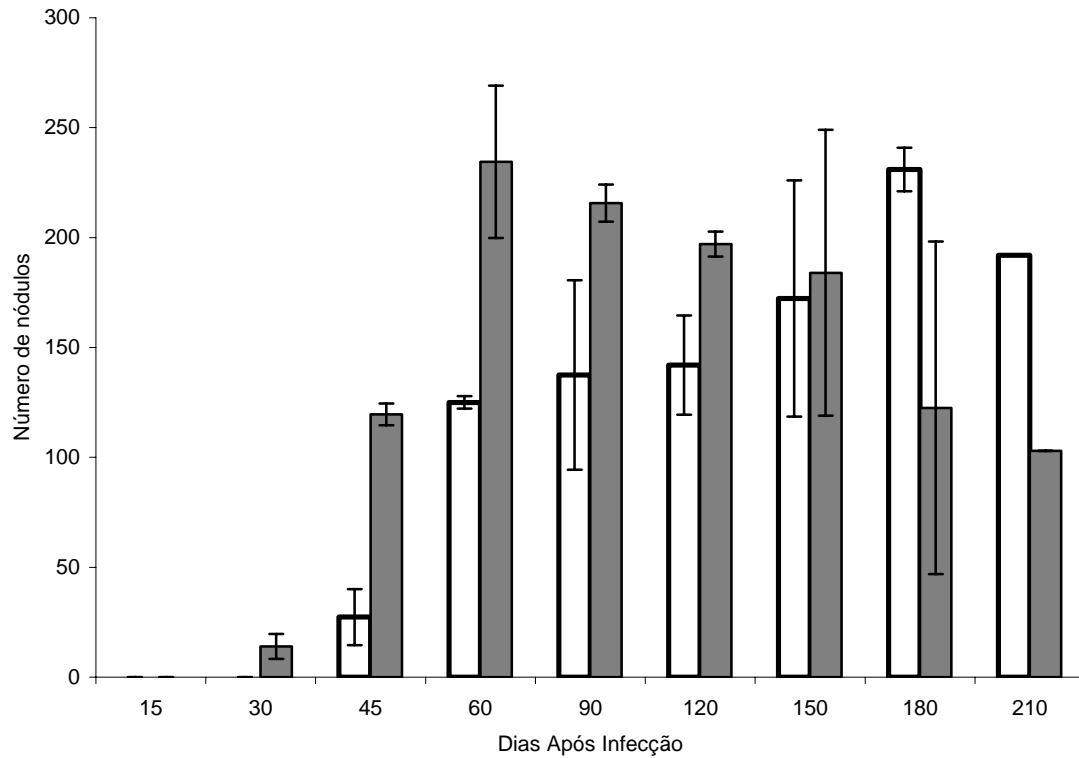


**Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência de camundongos A/J e B10.A infectados por *Lagochilascaris minor*.** Camundongos das linhagens A/J (●) e B10.A (■) foram inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos infectantes de *L. minor* e camundongos controles A/J (○) e B10.A (□) foram inoculados com salina. Os camundongos foram assistidos durante a progressão da doença e o número de mortes registrado diariamente. A sobrevivência foi calculada pela porcentagem de animais vivos ao final do experimento (\* $p < 0,05$ , Kaplan Meyer).

### **3.2 - Número de nódulos em camundongos A/J e B10.A durante a evolução da infecção experimental murina**

O número de nódulos subcutâneos e musculares superficiais foi determinado nos animais infectados nos dias de infecção determinados.

Em cada nódulo foi encontrada a presença de uma única larva encistada. Observou-se que o número de nódulos ou de larvas encistadas foi significativamente maior em camundongos A/J aos 45 ( $119 \pm 5$ ), 60 ( $234 \pm 34$ ) e 120 DAI ( $197 \pm 5$ ) quando comparados com camundongos B10.A aos 45 ( $27 \pm 12$ ), 60 ( $125 \pm 3$ ) e 120 DAI ( $142 \pm 22$ ) decrescendo gradativamente ( $p < 0,05$ ). Em animais da linhagem B10.A, o maior número de nódulos foi observado mais tardiamente, aos 180 DAI ( $231 \pm 9$ ). Após este período demonstrou-se a diminuição de nódulos mais acentuada em camundongos da linhagem A/J (Figura 2).



**Figura 2 – Quantificação do número de nódulos subcutâneos e musculares superficiais em camundongos A/J e B10.A infectados por *Lagochilascaris minor*.** Camundongos das linhagens A/J (■) e B10.A (□) foram inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos infectantes de *L.minor* por sonda esofagiana. A contagem dos nódulos foi feita em diferentes dias após infecção. Os resultados são representados pela média aritmética do número de nódulos encontrados em três camundongos infectados de ambas linhagens em cada ponto. \*Diferença estatisticamente significativa do número de nódulos entre as linhagens ( $p < 0,05$ , Teste t Student).

### **3.3 - Comprimento e largura de larvas de *Lagochilascaris minor* retiradas de camundongos A/J e B10.A durante a infecção experimental**

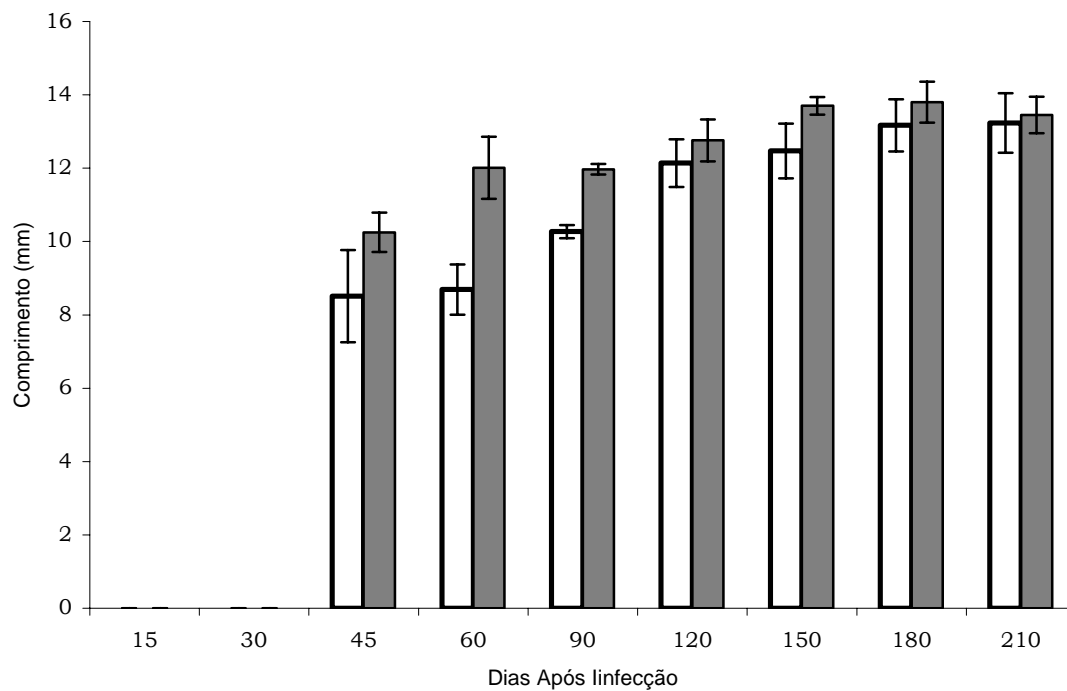
O comprimento e a largura de cinco larvas retiradas dos nódulos subcutâneos e musculares superficiais de animais infectados da mesma linhagem e mesmo tempo de infecção (DAI) foram mensurados e comparados entre as linhagens e dentro de cada linhagem.

Analisando estes dois parâmetros observou-se que o comprimento e a largura das larvas aumentavam significativamente de tamanho com o decorrer da infecção. Diferenças dentro de cada linhagem foram significativas somente quando se considerou larvas colhidas aos 45 DAI e após 180 DAI.

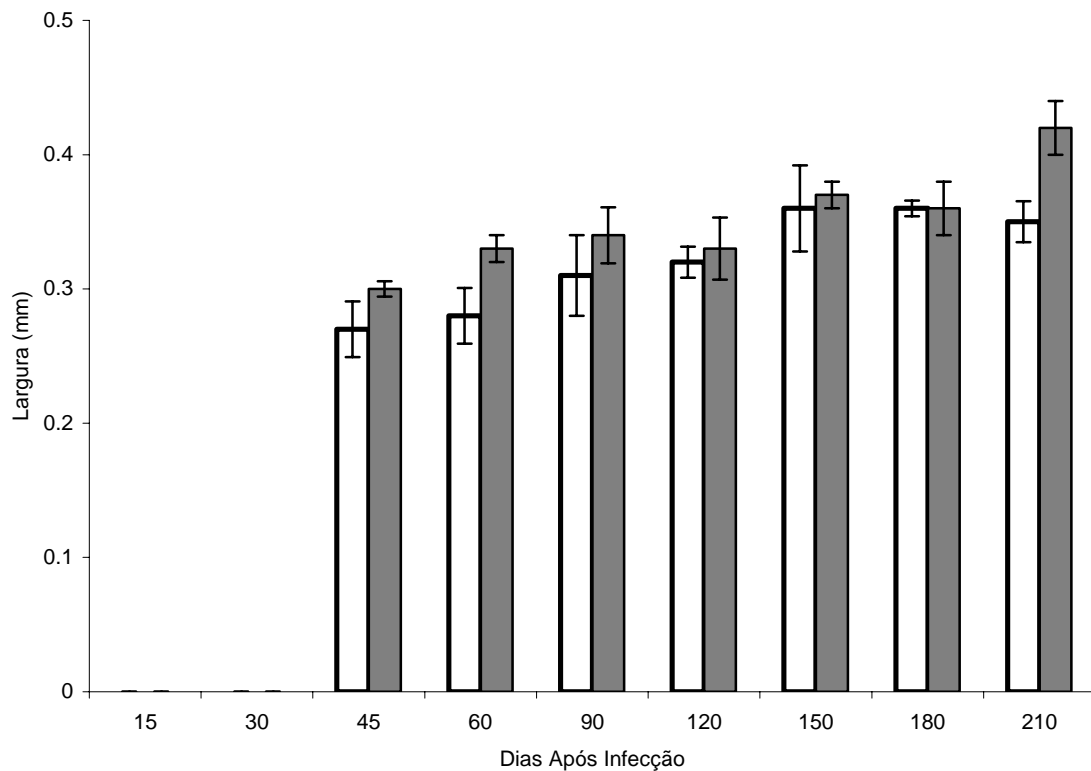
Analisando o comprimento das larvas retiradas dos camundongos infectados, observamos que aos 45 DAI camundongos A/J ( $10,25 \pm 0,5$  mm) apresentavam larvas significativamente maiores que camundongos B10.A ( $8,5 \pm 1,2$  mm) ( $p < 0,05$ ). O mesmo se observou aos 60 DAI, comparando as larvas encistadas em camundongos A/J ( $12 \pm 0,8$ ) e B10.A ( $8,7 \pm 0,7$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Não se observou diferença significativa na largura das larvas retiradas dos nódulos dentro das linhagens e nem entre as linhagens durante o curso da infecção experimental (Figura 4).

Larvas colhidas após 60-90 dias de infecção apresentaram comprimento (Figura 3) e morfologia característicos de larvas L4, e mesmo de vermes adultos (Figura 5).

É importante apontar que após um ano de infecção (365 DAI) foram encontrados nódulos purulentos com de parasito adulto em 10 % de camundongos A/J e 60 % de camundongos B10.A.



**Figura 3 – Mensuração do comprimento de larvas de *Lagochilascaris minor* retiradas dos nódulos de camundongos A/J e B10.A infectados.** Após sacrifício de camundongos das linhagens A/J (■) e B10.A (□) (inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos infectantes de *L. minor* por sonda esofágica) aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias após infecção, larvas foram retiradas dos nódulos de cada animal, clarificadas com lactofenol e com a utilização da ocular micrométrica (40X) mensurou-se o comprimento das mesmas. Os resultados representam a média aritmética das medidas do comprimento de 5 larvas retiradas de camundongos A/J e B10.A. \*Indica diferença estatisticamente significativa do comprimento das larvas entre as linhagens ( $p < 0,05$ , Teste t Student).



**Figura 4 – Mensuração da largura de larvas de *Lagochilascaris minor* retiradas dos nódulos de camundongos A/J e B10.A infectados.** Após sacrifício de camundongos das linhagens A/J (■) e B10.A (□) (inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos infectantes de *L.minor* por sonda esofagiana) aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias após infecção, larvas foram retiradas dos nódulos de cada animal, clarificadas com lactofenol e com a utilização da ocular micrométrica (40X) mensurou-se a largura das mesmas. Os resultados representam a média aritmética das medidas da largura de 5 larvas retiradas de camundongos A/J e B10.A ( $p > 0,05$ , Teste t Student).

**Tabela 1. Comprimento em milímetros (mm) de larvas de *Lagochilascaris minor* e parasitos adultos retirados de camundongos das linhagens A/J e B10.A ao longo da infecção experimental**

<b>Dias Após Infecção</b> <b>Linhagem</b>	<b>45 DAI</b> <b>(ocorrência)</b>	<b>210 DAI</b> <b>(ocorrência)</b>	<b>365 DAI</b> <b>(ocorrência)</b>
<b>A/J</b>	10, 25 ± 0,5 mm (100%)	13, 5 ± 0,4 mm (100%)	20 ± 5 mm (10%)
<b>B10.A</b>	8,5 ± 1,25 mm (100%)	13,23 ± 0,8 mm (100%)	20 ± 4 mm (60%)

Legenda: DAI – dias após infecção, Ocorrência – porcentagem de animais que apresentavam larvas e parasitos adultos.

**Figura 5 - Corte transversal de *Lagochilascaris minor* colhido de tecido muscular superficial de camundongos e corado pela HE. (A)** Larvas colhidas aos 120 dias de infecção, apresentando membrana trilaminar (1, 2, 3 camadas) e tubo digestório (seta); **(B)** Parasitos adultos colhidos um ano após infecção, apresentando três membranas mais espessas (1, 2, 3 camadas), tubo digestório (seta) e glândulas (ponta da seta). Notar que apesar da diferença na largura, a membrana de ambas é trilaminar.

### **3.4 - Análise histopatológica das lesões em animais A/J e B10.A durante a infecção experimental por *Lagochilascaris minor***

Nos cortes histológicos foram observados órgãos como pulmão, linfonodos, baço e fígado dos camundongos infectados de ambas linhagens e de camundongos controle, sacrificados aos 15, 30, 45, 60, 90, 120 dias após o procedimento de infecção.

#### *3.4.1- Análise histopatológica das lesões dos pulmões de camundongos A/J e B10.A infectados*

Os pulmões dos camundongos infectados B10.A e A/J apresentavam os seguintes processos patológicos: 1) Processos inflamatórios: a) inflamação crônica, foi identificada com intensidade variando de discreta a acentuada durante o curso da infecção, a intensidade da inflamação nos camundongos B10.A foi significativamente maior que nos camundongos A/J ( $p = 0,030$ ) (Figura 6 A e B e Figura 8 A e B); b) inflamação granulomatosa, foi identificada a presença de granulomas no pulmão: camundongos A/J apresentaram a formação de granulomas a partir dos 30 DAI, e camundongos B10.A apresentaram formação de granuloma apenas aos 90 DAI (Figura 6 C e D). 2) Patologia da célula: a) Morte celular, identificada no camundongo B10.A aos 90 DAI, demonstrando necrose do tipo caseosa. 3) Patologia do interstício: a) Depósito de colágeno, observado ao redor de granulomas em camundongos A/J (Figura 7 C) e B10.A (Figura 7 D).

O infiltrado inflamatório pulmonar em ambas as linhagens foi composto predominantemente de células mononucleares (MN) (Figura 7 A e B), tais como linfócitos, monócitos e plasmócitos (Figura 8 A). Observou-se também a presença discreta de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos (Figura 8 B).

#### *3.4.2- Histopatologia de linfonodos, baço e fígado em camundongos A/J e B10.A infectados*

Camundongos A/J e B10.A apresentaram linfonodos (Figura 9 A) e baço (Figura 9 B) de aspecto reacional com aumento da celularidade e



---

perda da estrutura normal dos folículos durante todo o curso de infecção.

No fígado dos camundongos infectados encontramos os seguintes processos patológicos: 1) processo inflamatório: a) inflamação crônica não granulomatosa discreta principalmente a partir dos 90 DAI em ambas linhagens, não foi observada a formação de granulomas ao redor de larva de *L.minor* no fígado dos camundongos infectados. 2) Alterações locais da circulação: a) hiperemia discreta, presente durante todo o curso da infecção em camundongos B10.A, enquanto que em camundongo A/J foi detectada após os 90 DAI, sendo que a partir deste período o órgão apresentou um aspecto reacional com hepatócitos maiores apresentando núcleo com cromatina condensada, em ambas linhagens de camundongos (Figuras 9 C e D).

**Figura 6 - Cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *Lagochilascaris minor*.** Fotomicrografias **(A)** Camundongo A/J sacrificado aos 90 DAI, evidenciando infiltrado inflamatório difuso discreto, coloração HE, escala 200 $\mu$ m; **(B)** Camundongo B10.A aos 90 DAI, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório difuso acentuado (seta), coloração HE, escala 200  $\mu$ m; **(C)** Granuloma (seta) envolvendo larva de *L. minor* (ponta da seta) no pulmão de camundongo A/J aos 90 DAI, coloração HE, escala 200  $\mu$ m; **(D)** Granuloma (seta) envolvendo larva de *L. minor* (ponta da seta) no pulmão de camundongo B10.A aos 90 DAI, coloração HE, escala 200 $\mu$ m.

**Figura 7. Cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados.** Fotomicrografias de camundongos A/J e B10.A infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, sacrificados aos 45 dias após infecção. **(A)** Camundongo A/J, coloração pelo método de Luna, evidenciando a ausência de eosinófilos, escala 50 $\mu$ m; **(B)** Camundongo B10.A, coloração pelo método de Luna, evidenciando a ausência de eosinófilos, escala 50 $\mu$ m; **(C)** Camundongo A/J, coloração por Tricrômio de Masson, evidenciando escassa fibrose, escala 50 $\mu$ m; **(D)** Camundongo B10.A, coloração por Tricrômio de Masson, evidenciando fibrose moderada (seta), escala 50 $\mu$ m.

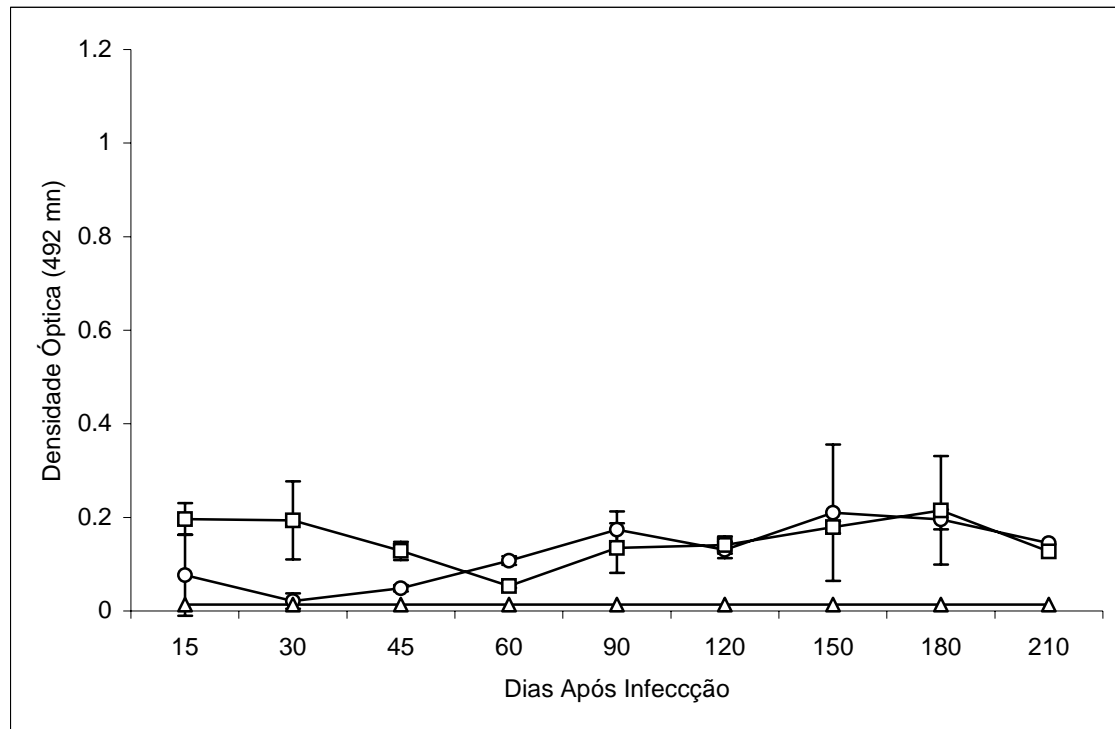
**Figura 8. Corte histológico de pulmão de camundongo B10.A.** Fotomicrografia de pulmão de camundongos B10.A infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor* sacrificados aos 45 DAI. **(A)** Coloração HE destacando infiltrado inflamatório com plasmócitos (seta), escala  $10\mu\text{m}$ ; **(B)** Coloração pelo método de LUNA, destacando eosinófilos (seta), escala  $20\mu\text{m}$ .

**Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos de órgãos de camundongos infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *Lagochilascaris minor*. As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE). (A)** Linfonodo de A/J aos 60 DAI, evidenciando o aspecto reacional à infecção e a perda da estrutura folicular, escala 200  $\mu\text{m}$ ; **(B)** Baço de A/J aos 120 DAI, evidenciando o aspecto reacional à infecção e a perda da estrutura folicular, escala 200  $\mu\text{m}$ ; **(C)** Fígado de B10.A aos 90 DAI, evidenciando hiperemia e infiltrado inflamatório perivascular, escala 100  $\mu\text{m}$ ; **(D)** Fígado de B10.A aos 90 DAI, evidenciando o aspecto reacional dos hepatócitos, escala 10  $\mu\text{m}$ .

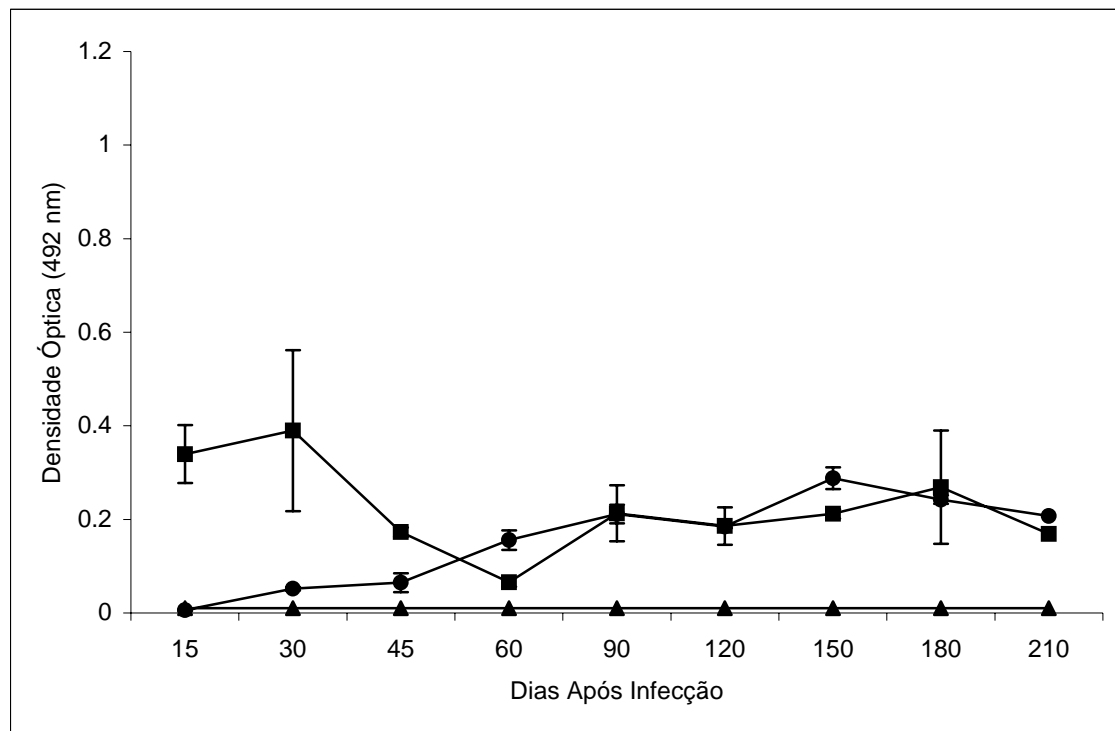
### **3.5 - Determinação dos níveis séricos de anticorpos contra os antígenos do extrato bruto e produtos secretados e excretados das larvas de *Lagochilascaris minor* em camundongos infectados.**

*3.5.1- Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgM específicos contra os antígenos do extrato bruto e contra os produtos secretados e excretados das larvas de L. minor em camundongos infectados.*

Na detecção de anticorpos da classe IgM contra o extrato bruto de larvas de *L. minor*, as densidades ópticas (DO) dos soros de camundongos B10.A infectados foram superiores às DO dos soros de camundongos A/J infectados até os 45 dias após infecção ( $p < 0,05$ ). O mesmo foi observado na detecção de IgM sérico anti SE, porém com maior intensidade. Após este período não houve diferença estatisticamente significativa entre as densidades ópticas dos soros dos animais A/J e B10.A (Figuras 10 e 11).



**Figura 10- Dosagem de anticorpos séricos IgM específicos contra extrato bruto da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (○) e B10.A (□) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor* por sonda esofagiana e animais controles (△) (cujas médias das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase. \*Indica diferença estatisticamente significativa das densidades ópticas entre as linhagens de camundongos ( $p < 0,05$  Teste t Student).



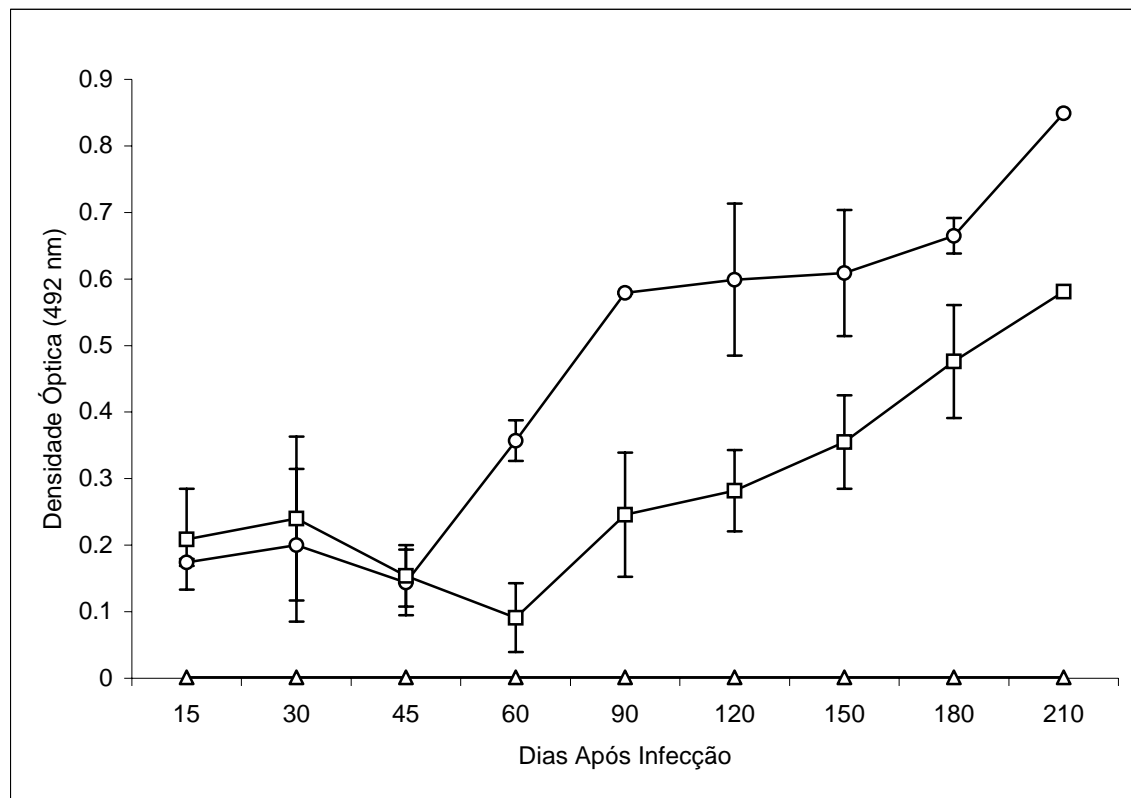
**Figura 11- Dosagem de anticorpos séricos IgM específicos contra produtos secretados e excretados da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (●) e B10.A (□) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofágica e animais controles (▲) (cujas médias das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase. \*Indica diferença estatisticamente significativa das densidades ópticas entre as linhagens de camundongos ( $p < 0,05$  Teste t Student).



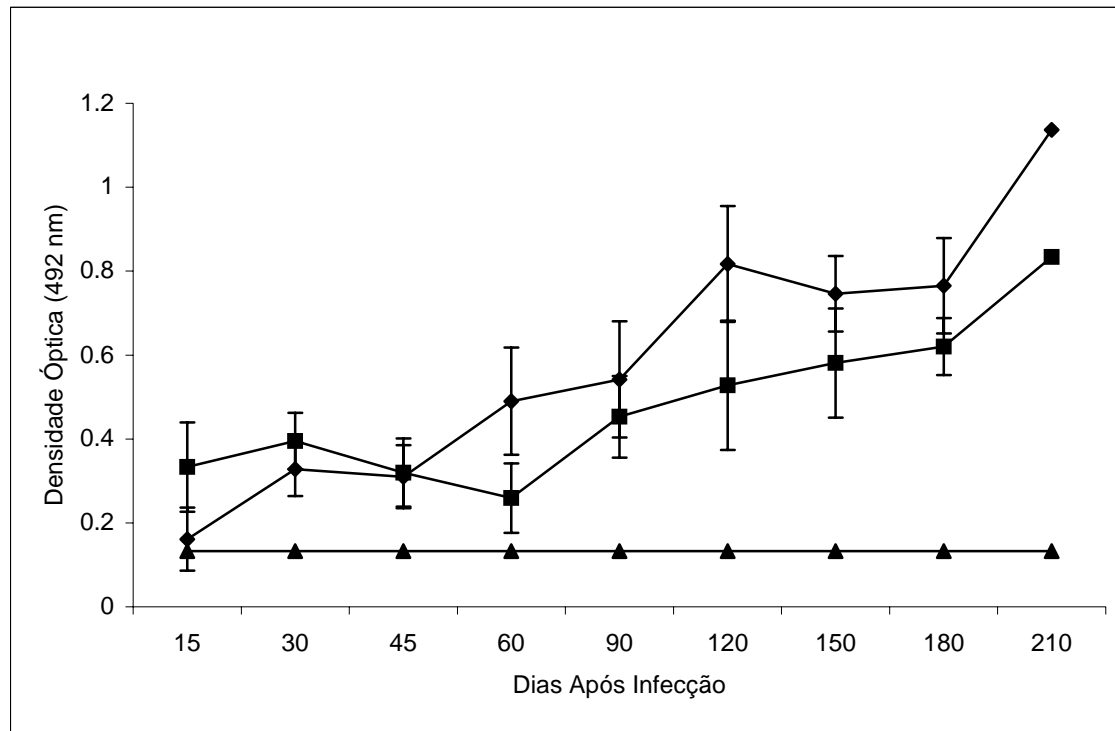
---

3.5.2- *Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgG específicos contra os antígenos do extrato bruto e contra os produtos secretados e excretados das larvas de L. minor em camundongos infectados.*

As DO dos soros de camundongos A/J e B10.A, utilizando-se conjugados anti-IgG, específicos para o antígeno SE e extrato bruto do parasito, foram crescentes durante todo o período avaliado (Figura 12 e 13). As DO de soros de camundongos A/J contra o extrato bruto de larva L3 foram maiores após 60 dias após infecção ( $p < 0,05$ ) (Figura 12). Quando utilizou-se como antígeno os produtos secretados e excretados de larvas de *L. minor*, observou-se que as DO dos soros de ambas linhagens foram superiores as detectadas contra o extrato bruto do parasito. Embora os soros de animais A/J tenham apresentado DO superiores às observadas em animais B10.A esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 13).



**Figura 12 – Dosagem de anticorpos séricos IgG específicos contra extrato bruto da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (○) e B10.A (□) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofagiana e animais controles (△)(cujas médias das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. \*Indica diferença estatisticamente significante das densidades ópticas entre as linhagens de camundongos ( $p < 0,05$  Teste t Student).

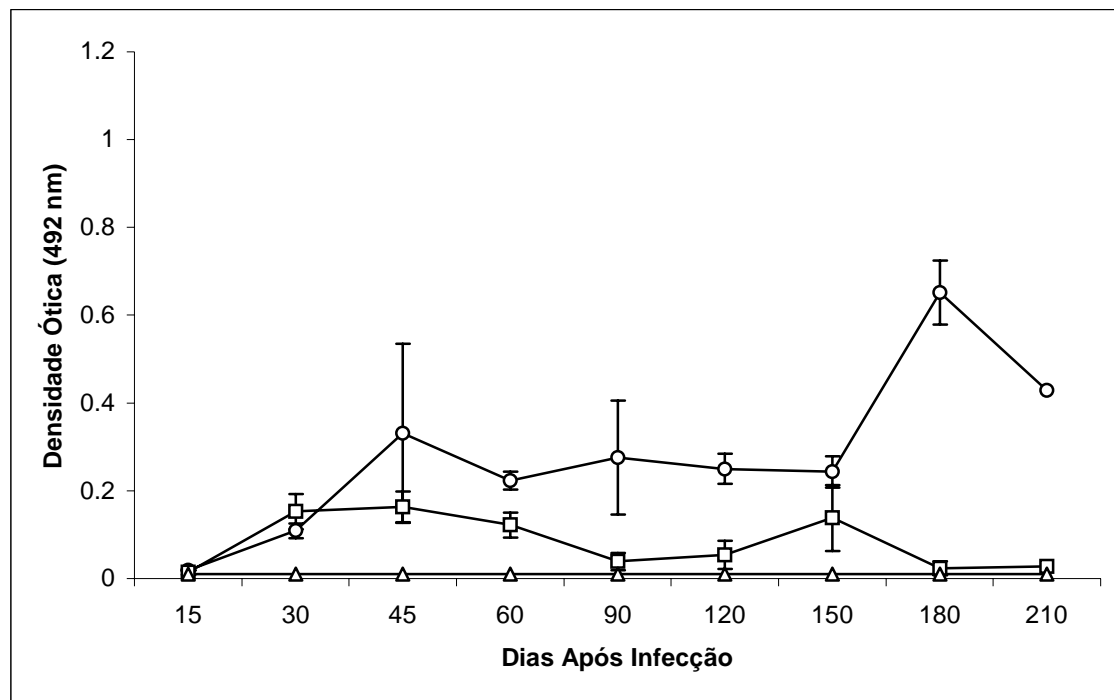


**Figura 13– Dosagem de anticorpos séricos IgG anti produtos secretados e excretados de larvas de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (●) e B10.A (■) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofagiana e animais controles (▲) (cujas médias das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. ( $p > 0,05$  Teste t Student).

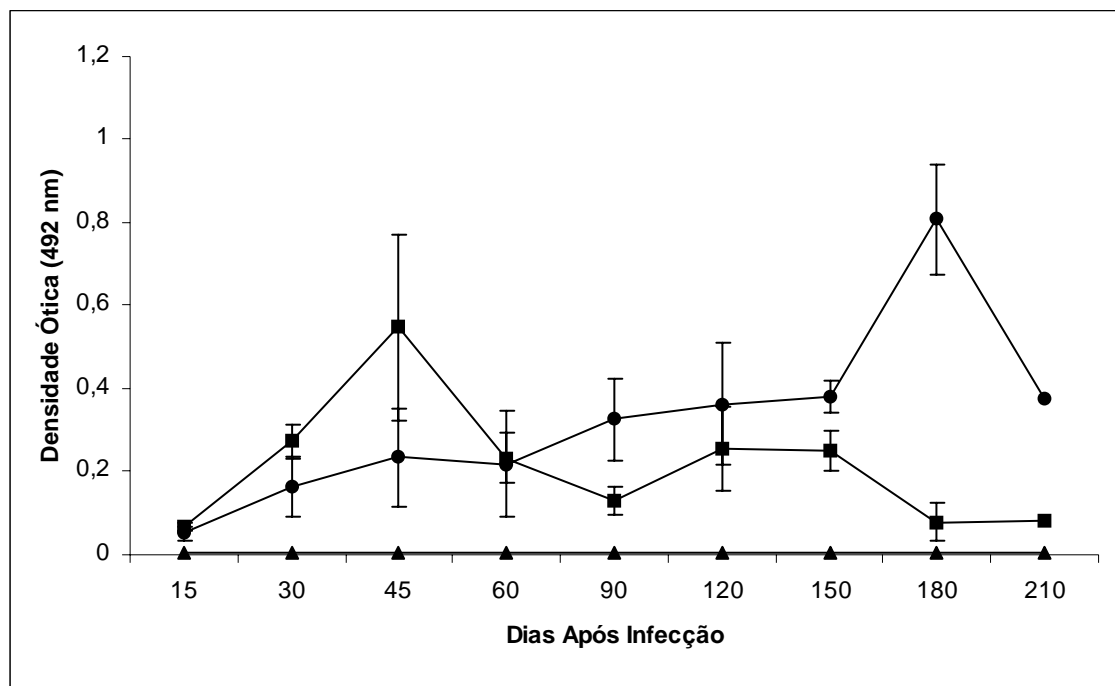
---

3.5.3- *Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgA específicos contra os antígenos do extrato bruto e contra os produtos secretados e excretados das larvas de L. minor em camundongos infectados*

Durante a infecção experimental por *L. minor*, soros de camundongos A/J apresentaram as leituras das densidades ópticas superiores às de B10.A, aos 60, 90 e principalmente 180 DAÍ, correspondendo a uma maior produção de IgA sérico anti-EB (Figura 14). Animais B10.A apresentaram uma tendência de maior produção de anticorpos IgA anti-SE no início da infecção, enquanto que animais A/J apresentaram uma maior produção deste anticorpo na fase mais tardia da infecção, demonstrado pelas DO superiores dos soros destes camundongos aos 90, 150 e 180 dias após infecção ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).



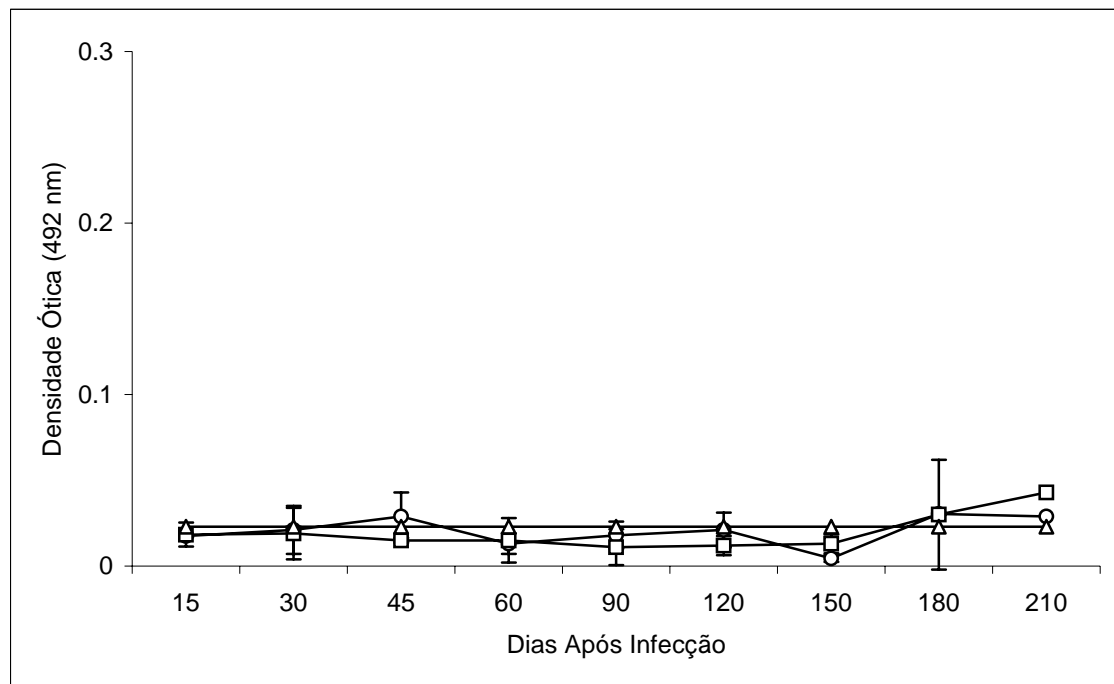
**Figura 14 - Dosagem de anticorpos séricos IgA específicos contra extrato bruto da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (○) e B10.A (□) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofágica e animais controles (△) (cuja média das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgA de camundongo marcado com peroxidase. \*Indica diferença estatisticamente significativa das DO entre as linhagens de camundongos ( $p < 0,05$  Teste t Student).



**Figura 15 - Dosagem de anticorpos séricos IgA específicos contra produtos secretados e excretados da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (●) e B10.A (■) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofagiana e animais controles (▲) (cujas médias das densidades ópticas foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o conjugado anti-IgA de camundongo marcado com peroxidase. \*Indica diferença estatisticamente significativa das DO entre as linhagens de camundongos ( $p < 0,05$  Teste t Student).

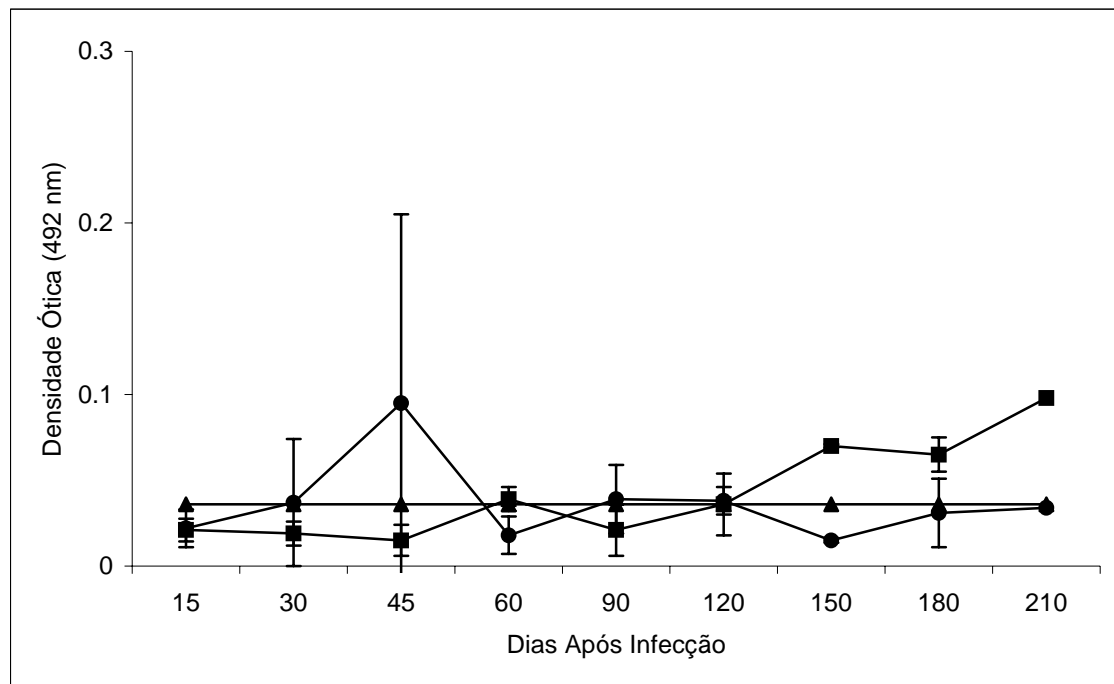
*3.5.4- Determinação dos níveis séricos de anticorpos IgE específicos contra os antígenos do extrato bruto e contra os produtos secretados e excretados das larvas de *L. minor* em camundongos infectados*

As DO dos soros dos camundongos infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor* de ambas linhagens não foram significativamente diferentes das DO dos soros de camundongos controles, demonstrando a baixa produção de anticorpos IgE anti- EB e anti- SE em camundongos A/J e B10.A infectados (Figuras 16 e 17).



**Figura 16 - Dosagem de anticorpos séricos IgE específicos contra extrato bruto (EB) da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (○) e B10.A (□) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofagiana e animais controles (△) (cujas médias das DO foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o primeiro anticorpo Ig de rato anti-IgE de camundongo e conjugado anti-cadeia leve Kappa de Ig de rato marcado com peroxidase ( $p > 0,05$  Teste t Student).





**Figura 17 - Dosagem de anticorpos séricos IgE específicos contra produtos secretados e excretados (SE) da larva de *Lagochilascaris minor*.** Soros de camundongos A/J (●) e B10.A (■) inoculados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor*, por sonda esofagiana e animais controles (▲)(cuja média das DO foram utilizadas para calcular o “cut off” = Média  $\pm$  2 desvio padrão), foram coletados em diferentes dias após infecção. Os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA, com o primeiro anticorpo Ig de rato e conjugado anti-cadeia leve Kappa de Ig de rato marcado com peroxidase ( $p > 0,05$  Teste t Student).

---

### **3.6 - Caracterização das subclasses de IgG em camundongos infectados por *Lagochilascaris minor*.**

Após fracionamento das subclasses de IgG dos soros de camundongos infectados em coluna de Proteína A-Sepharose, observou-se que animais A/J e B10.A apresentaram densidades ópticas semelhantes, no primeiro pico, indicando produção similar de IgG1. No entanto, as densidades ópticas das frações de IgG2a e IgG2b foram respectivamente 2 e 1,5 vezes maiores em camundongos B10.A, quando comparadas às DO das mesmas frações avaliadas no soro de animais A/J (Figura 18). Os anticorpos predominantes em ambas linhagens foram IgG2b.

**Figura 18 – Cromatografia das subclasses de anticorpos IgG séricos de camundongos A/J e B10.A infectados por *Lagochilascaris minor*.** “Pool” de soros de camundongos infectados com  $2 \times 10^3$  ovos de *L. minor* das linhagens A/J (●) e B10.A (■) e camundongos controles A/J (○) e B10.A (□) foram utilizados para fracionamento em coluna de proteína A-Sepharose. As subclasses de IgG foram eluídas de acordo com o pH do tampão utilizado: tubos de ensaio enumerados de 1 a 5 correspondem ao material eluído do tampão de pH 6,0 contendo IgG1, tubos enumerados de 6 a 10 correspondem ao material eluído do tampão de pH 5,0 contendo IgG2a e os tubos de 11 a 15 correspondem ao material eluído em pH 3,5 contendo IgG2b.

## DISCUSSÃO

A lagochilascariase é uma infecção ainda pouco compreendida. Os mecanismos de defesa ativados nos hospedeiros, e de evasão do sistema imune utilizados por esse helminto são ainda obscuros. Com o objetivo de elucidar a relação entre o parasito e o hospedeiro, utilizamos o modelo experimental de camundongos isogênicos com mesmo haplótipo H-2, porém com “background” diferente. Avaliamos a infecção sob os parâmetros: sobrevida, parasitológicos, histopatológicos e sorológicos.

A porcentagem de sobrevida de animais infectados comparados aos animais não infectados representa um importante parâmetro para avaliar a susceptibilidade e resistência a diferentes infecções (Singer-Vermes *et al.* 1995).

Em nossos experimentos, camundongos machos das linhagens A/J e B10.A, infectados por via oral com 2000 ovos do parasito, apresentaram sobrevida de 90% e 33,3%, respectivamente. Quando analisamos comparativamente estes dados, podemos classificar os animais experimentalmente infectados por *L. minor* da linhagens A/J como resistente e B10.A, susceptível. Com base nestes resultados podemos sugerir que os genes do MHC, mais especificamente os genes que codificam as moléculas do MHC de classe I e II, não apresentariam grande interferência na susceptibilidade e resistência à infecção experimental, já que ambas linhagens apresentam o haplótipo H-2<sup>a</sup>. Como a linhagem A/J é deficiente do componente C5 do complemento, pode haver a participação deste fator na susceptibilidade à infecção experimental, com facilitação da formação de fragmentos com atividade inflamatória, aumento da reação inflamatória e migração de células como neutrófilos para o sítio de inflamação.

Para confirmar a ligação entre deficiência de C5 e resistência à infecção experimental, avaliaremos futuramente a infecção em camundongos B10.D2n e B10.D2o, por serem estes geneticamente iguais, mas um C5 deficiente (B10.D2o).

Não encontramos na literatura indexada trabalhos que utilizaram animais A/J e B10.A infectados por *L. minor*, entretanto Freitas (2003) constatou, que camundongos Balb.xid, considerados resistentes, infectados por via oral com 2000 ovos do parasito apresentaram após um ano de acompanhamento sobrevida de 83,4%. Já em camundongos da linhagem Balb/c, considerados susceptíveis ou intermediários, submetidos às mesmas condições de experimentação, denotou-se sobrevida de 52,78 %. Não se observou nestas linhagens diferenças na taxa de sobrevida de camundongos machos e fêmeas.

Pádua *et al* (2005) demonstraram que camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas infectados sob as mesmas condições dos trabalhos acima citados, apresentaram 30% e 50% de sobrevida, respectivamente. Estes dados apontam para maior susceptibilidade de camundongos machos, possivelmente pela influência de hormônios (testosterona, progesterona e estradiol) sobre a resposta imune (Singer-Vermes *et al.* 1995; Mock & Nacy 1998; Vargas-Villavicencio *et al.* 2005).

Quanto aos aspectos parasitológicos, em nossos experimentos, camundongos machos das linhagens A/J e B10.A, submetidos às condições experimentais citadas e sacrificados aos 180 dias de infecção apresentaram respectivamente 123 e 147 nódulos encistados na musculatura e tecido subcutâneo superficiais. Ao analisarmos estes dados, verificamos uma propensão à presença de menor número de nódulos na linhagem A/J, que pela mortalidade pode ser classificada como resistente à infecção experimental por *L. minor*.

Trabalhos utilizando camundongos A/J e B10.A infectados experimentalmente por *L. minor*, não foram encontrados na literatura indexada, porém Freitas *et al* (2003) demonstraram que camundongos Balb.xid infectados pelo parasito e sacrificados aos 180 dias de infecção apresentaram aproximadamente 170 nódulos encistados na musculatura e tecido subcutâneo superficial, enquanto em camundongos da linhagem Balb/c encontrou-se aproximadamente 200 nódulos com larvas encistadas. Não se observou nestas linhagens

diferenças no número de nódulos apresentados por camundongos machos e fêmeas.

Pádua (2005) demonstrou que camundongos C57Bl/6 infectados com o parasito e sacrificados aos 180 dias apresentaram 153 e 166,6 nódulos contendo larvas L3, em camundongos machos e fêmeas, respectivamente.

Camundongos Balb.xid são resistentes a infecção experimental pelo parasito, quando considera-se mortalidade como parâmetro. Estes animais apresentaram, entretanto, número nódulos similar ao descrito em camundongos C57Bl/6, que são considerados intermediários a infecção (utilizando o parâmetro mortalidade).

Assim, considerando os nossos resultados e da literatura geral não podemos inferir que exista maior número de nódulos em animais susceptíveis a infecção experimental por *L. minor* quando se utiliza a mortalidade como parâmetro de susceptibilidade e resistência.

Nossos experimentos demonstram que existe um aumento no comprimento das larvas colhidas em linhagens de camundongos A/J que é dependente do tempo de infecção. Larvas colhidas aos 45 dias de infecção de camundongos B10.A e A/J apresentaram comprimento de 8,5 mm e 10,2 mm, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, que descrevem larvas L3 com comprimento de aproximadamente 8,9 mm retiradas de nódulos de camundongos C57BL/6 infectados (Campos *et al.* 1992). Baseando-nos nestes dados, podemos considerar que as larvas colhidas no presente trabalho aos 45 dias após infecção correspondem a larvas de terceiro estágio. No entanto, larvas colhidas de nódulos em camundongos B10.A e A/J, dos 60 aos 120 dias de infecção apresentaram comprimento de 10mm e de 12 mm, respectivamente. Estas larvas apresentaram comprimento maior que o relatado na literatura, e membrana trilaminar.

As diferenças dos nossos resultados relativos a L3, os de Freitas (2003) e Pádua (2005), quando comparados aos de Campos *et al.* (1992) podem ser devida à época de coleta de material, pois as mensurações

das larvas e sua análise morfológica foram feitas somente aos 45-60 dias após infecção nos trabalhos iniciais.

Larvas colhidas aos 210 dias de infecção de camundongos B10.A e A/J apresentaram comprimento de 13,2 mm e 13,4 mm, respectivamente. Estes resultados condizem com a literatura que descreve L4 apresentando de 8,4 a 13,8 mm, e o parasito adulto retirado de gatos infectados com 9 a 14 mm, ambos com membrana trilaminar (Campos *et al.* 1992).

De fato, Freitas (2003) e Freitas *et al.* (2003) já haviam demonstrado fenômeno semelhante, com larvas colhidas do tecido subcutâneo e muscular superficial medindo aos 180 dias de infecção, de 12 a 13mm. Estes trabalhos não avaliaram a morfologia do material colhido.

Podemos dizer que os parasitos colhidos até 60-90 dias após infecção por *L. minor*, embora apresentem comprimento relativamente maior do que o descrito na literatura correspondem a larvas L3. Já os parasitos colhidos após este período, apresentam comprimento e morfologia de larvas L4.

Nossos resultados demonstram a presença de nódulos maiores e purulentos em 10% de camundongos A/J e 60% de camundongos B10.A infectados e sacrificados após um ano. Estes nódulos apresentavam parasitos com comprimento e aspecto típico de parasitos adultos.

Alguns autores como Paçõ *et al.* (1994), Freitas (2003) haviam admitido a possibilidade do aparecimento eventual de parasitos adultos em camundongos infectados, considerando somente a morfologia e morfometria para classificação. Este fenômeno é verificado também no ciclo experimental de *Lagochilascaris major* (Craig *et al.* 1980).

Pádua (2005) demonstrou parasitos com comprimento entre 12-13 mm, obtidos de nódulos de camundongos C57Bl/6 aos 150-180 dias de infecção. Após coloração com Carmim, verificou-se que estes apresentavam morfologia de parasitos adultos.

De fato, a descrição de ciclo auto-infectante de *L. minor* em pacientes e gatos infectados, fala: em favor da possibilidade deste ciclo efetuar-se em um único hospedeiro, sem necessidade de roedores como intermediários; em favor da possibilidade de roedores se comportarem como hospedeiros definitivos do parasito (Paçô *et al.* 1994; Freitas 2003; Pádua 2005).

Acreditamos que o número de parasitos adultos detectados em nosso trabalho é maior devido a: maior tempo de acompanhamento da infecção experimental e principalmente a melhor adequação da linhagem isogênica B10.A a infecção.

Ao dosarmos os níveis séricos de IgM dirigida contra o extrato bruto do parasito, não detectamos diferenças significativas entre as linhagens. O mesmo não ocorreu com os produtos secretados e excretados do helminto, pois para este antígeno os camundongos da linhagem B10.A apresentaram taxas superiores de anticorpos até o 45º dia de infecção.

Não encontramos trabalhos, na literatura indexada, utilizando estas mesmas linhagens de camundongos na infecção experimental por *L. minor*, porém existem trabalhos utilizando outras linhagens com o objetivo de estudo do perfil de anticorpos específicos contra os antígenos deste nematódeo.

Freire-Filha (1997) demonstra que durante a infecção experimental com 1000 ovos do parasito, camundongos C57BL/6 apresentavam altos níveis de IgM no soro contra o EB do parasito durante todo o período avaliado (60 dias de infecção).

Caldeiras *et al.* (2005) mostra títulos positivos de IgM para o antígeno secretado e excretado de *L. minor*, principalmente aos 15-20 dias após infecção e 90 dias após infecção, em camundongos C57BL/6 acompanhados por um ano.

Pádua *et al.* (2003) também observaram produção de IgM em camundongos da linhagem citada acima, infectados com 2000 ovos de *L. minor*.



Freitas (2003) e Freitas *et al.* (2003), avaliando a infecção experimental em camundongos, observaram a ausência de anticorpos IgM contra ambos antígenos, até os 210 Dias após infecção, na linhagem Balb.xid, que é deficiente de Linfócitos B1. Na linhagem Balb/c observaram a presença de anticorpos IgM contra EB a partir do 45º dia, e em maior grau contra o antígeno secretado e excretado.

Em nosso trabalho camundongos A/J produziram níveis mais altos de anticorpos IgG contra o extrato bruto do parasito, a partir do 60º dia de infecção, ao serem comparados com camundongos B10.A. Porém, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na produção de IgG contra o antígeno de produtos secretados e excretados do parasito, observando uma produção crescente de acordo com a progressão da infecção em ambas linhagens.

Freire-Filha (1997) não detectou níveis significativos de IgG contra o extrato bruto em camundongos C57BL/6 durante os 60 dias de infecção avaliados e sugere que a reação granulomatosa retém as larvas impedindo estas de eliminarem seus produtos metabólicos e assim de estimularem a produção de anticorpos, apud Matsumara *et al.* (1982). Senna Junior (2002) porém, demonstra a presença de proteínas nos extrato bruto do parasito que são reconhecidas por anticorpos IgG na reação de “Immunoblot”.

Caldeiras *et al.* (2005) detectaram dois picos de produção de IgG dirigidos aos antígenos secretados e excretados no soro de camundongos C57BL/6, o primeiro pico aos 90-120 dias de infecção e o segundo em torno de 250 dia de infecção, mas apesar de utilizarem 5 animais por ponto avaliado, a análise estatística não é mostrada (Caldeira 2005). Pádua *et al.* (2003) também detectaram níveis positivos de IgG em camundongos da mesma linhagem infectados com 2000 ovos de *L. minor*.

Freitas (2003) detectou títulos mais altos de IgG específicos contra EB e produtos SE do parasito nos soros de camundongos Balb/c

a partir dos 90 dias de infecção com *L. minor*, quando comparados aos títulos encontrados em camundongos Balb.xid.

A discrepância destes resultados pode ser devida a: número de ovos utilizados para infecção; preparação do material inoculado; tempo de acompanhamento de infecção experimental; preparo e concentração do antígeno utilizado; tempo para coleta dos parasitos de camundongos; utilização de antígenos sonicados ou não; e coleta do antígeno na presença ou ausência de inibidores de proteases. É importante considerar aqui, que os resultados de Freitas (2003), Freitas *et al.* (2003) e Pádua *et al.* (2003) são comparáveis porque os experimentos foram feitos de maneira pareada, obedeceram à mesma padronização (inóculo, tempo de infecção e coleta do material) e as reações de ELISA foram efetuadas ao mesmo tempo, em uma única placa, considerando-se a dosagem de cada classe de anticorpo.

Não podemos atribuir à produção de anticorpos um perfil correspondente à resistência e/ou susceptibilidade dos camundongos em relação à infecção por *L. minor*.

Observamos que camundongos A/J, que apresentaram maior taxa de sobrevivência e maior resistência, não apresentaram um perfil sorológico de IgM tão diferente de camundongos B10.A e C57BL/6 quanto o esperado. O perfil sorológico de A/J também não é similar ao perfil sorológico de animais Balb.xid, considerados resistentes. É importante considerar que camundongos Balb.xid apresentam uma imunodeficiência ligada ao cromossomo X, que leva a baixa presença de linfócitos B1 (produtores de IL-10) e a uma hiper-produção de IFN- $\gamma$  neste modelo, direcionando a resposta em qualquer infecção para T auxiliar do tipo 1 (Minoprio *et al.* 1993). Ressaltamos que o padrão de resposta imune humoral é influenciado pelo tipo de resposta imune celular (Th1, Th2 e etc).

Já, em camundongos A/J temos um perfil sorológico de IgG diferente de camundongos B10.A e C57BL/6, quando se utiliza extrato bruto de larvas como antígeno. Uma apreciação mais detalhada da

sorologia com anticorpos IgG deve ser considerada futuramente, variando-se frações purificadas de antígenos e soros de animais com diferentes inóculos de infecção.

A avaliação da produção de anticorpos IgA contra o extrato bruto demonstrou que camundongos A/J apresentaram níveis maiores dos 90 aos 120 dias após infecção, e ao avaliarmos os níveis de anticorpos IgA contra produtos secretados e excretados observamos que camundongos B10.A apresentam uma propensão a produzir estes anticorpos no início da infecção, enquanto que animais A/J os produzem mais tardiamente (120 dias após infecção).

Caldeiras *et al* (2005) detectaram IgA contra produtos secretados e excretados principalmente aos 45 dias em camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente por *L. minor*. O mesmo foi observado por Pádua *et al.* (2003), que demonstrou que estes animais apresentavam a produção de IgA contra o extrato bruto em níveis decrescentes de acordo com o decorrer da infecção.

Camundongos Balb.xid e Balb/c também apresentam produção de IgA, ressaltando que, camundongos Balb/c produzem altos títulos de IgA sérico contra produtos secretados e excretados aos 180 e 210 dias após infecção. (Freitas 2003).

A IgA é mais abundante nas mucosas interagindo e neutralizando toxinas e outros produtos secretados por patógenos e também se ligando diretamente a ele impedindo sua adesão no tecido. Por evitar uma reação inflamatória este anticorpo é considerado não-inflamatório. Todavia, ao ligar ao antígeno ainda no soro a IgA pode induzir a resposta inflamatória quando o complexo é fagocitado por células CD89<sup>+</sup> (Egmond *et al.* 2001).

Ao determinarmos os níveis de anticorpos IgE nos soros de camundongos A/J e B10.A observamos que as densidades ópticas dos soros de camundongos infectados e controles foram similares para ambos antígenos, demonstrando a baixa produção destes anticorpos na infecção por *L. minor*.

Confirmando nossos resultados, Pádua *et al* (2003) encontram baixos níveis de IgE contra extrato bruto em camundongos da linhagem C57BL/6.

Freitas *et al* (2003) também demonstram níveis inferiores de IgE contra os antígenos do extrato bruto e produtos do secretado e excretado do parasito no soro de camundongos Balb.xid e Balb/c, em relação a produção de anticorpos de outras classes.

Estes dados não condizem com os de vários autores, os quais, relatam que na maioria das helmintíases as respostas imunes são mediadas por Linfócitos Th2, juntamente com a produção de IgE e ativação de eosinófilos, resultando na destruição do helminto e conseqüentemente tornando o hospedeiro resistente à infecção (Behm & Ovington 2000; Allen & Maizels 1997; Brunet *et al.* 1998).

De fato, a padronização da dosagem de anticorpos IgE é bastante difícil, tanto em humanos como em modelos experimentais. Como os anticorpos IgE estão presentes em baixíssimos níveis no soro, mesmo após infecção, os anticorpos IgM, IgG e mesmo IgA que aparecem em maior abundância podem reagir preferencialmente com o antígeno, impedindo a reação com os anticorpos IgE, por competição.

As subclasses de anticorpos IgG estão intimamente relacionadas a polarização da resposta imune. Em camundongos, a produção de IgG1, IgG2b está relacionada à resposta tipo Th2, enquanto que IgG2a está associada à resposta imune do tipo Th1 (Hochreiter *et al.* 2003; Rodriguez-Sosa *et al.* 2002).

Em nosso trabalho observamos que os níveis de IgG1 (policlonal) foram semelhantes nas duas linhagens avaliadas. Porém os níveis de IgG2a e IgG2b foram 2 e 1,5 vezes maiores em camundongos B10.A em relação aos camundongos A/J, predominando IgG2b em ambas linhagens.

Freitas (2003) demonstrou que na infecção experimental por *L. minor*, animais Balb/c apresentavam a predominância de IgG1 e níveis decrescentes de IgG2a e IgG2b, enquanto que em animais Balb.xid

IgG2a foi predominante, com menor quantidade de IgG1 e ausência de IgG2b.

As subclasses e isotipos das imunoglobulinas são produzidas de acordo com o tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Respostas Th1 promovem respostas imunes mediadas por células fagocíticas produzindo citocinas T1 (IFN- $\gamma$ , IL-2), levando a produção de IgG (IgG2a/IgG2b) que aumentam a opsonização. Respostas Th2 promovem respostas inflamatórias mediadas por eosinófilo e regulam respostas Th1 pela produção de citocinas T2 (IL-4, IL-5, IL-13, etc) e a produção de anticorpos IgG1/IgE (Jyonouchi *et al.* 2000). Células T3 produtoras preferenciais de TGF-beta, regulam negativamente as respostas inflamatórias, Ta1 e Ta2, e positivamente a produção de IgA (Jyonouchi *et al.* 2000).

Zakroff *et al.* (1989) determinaram que em camundongos infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*, *Mesocestoides corti*, *Taenia crassiceps* e *Trichinella spiralis* havia um aumento dos níveis de IgE, IgG1 e IgM e uma redução dos níveis de IgG2a, enquanto que os níveis de IgA, IgG2b e IgG3 não sofriam alteração. No entanto, a infecção subcutânea por *T. crassiceps* induziu níveis de IgG2a mais altos que IgG1.

Camundongos Balb/c STAT6 “knokouts” fazem preferencialmente resposta do tipo Th1, pela deficiência de STAT6 e conseqüente deficiência de sinalização de IL-4 e IL-13 para diferenciação de Th2, desenvolvendo uma resposta imune protetora do tipo Th1 com produção de altos níveis de IgG2a e baixos níveis de IgG1 e IgE na infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* (Liwski & Lee 1999) e por *Taenia crassiceps* (Rodriguez-Sosa *et al.* 2002).

Em camundongos, reações anafiláticas podem ser induzidas não só por IgE, mas também imunocomplexos formados por IgG1 e os linfócitos B produtores destes anticorpos são estimulados por IL-4. IgG2a, associado à resposta Th1 pode inibir diretamente a desgranulação de mastócitos e basófilos (Hochreiter *et al.* 2003).

Na histopatologia de pulmões de camundongos infectados observamos inflamação crônica granulomatosa que acentuava com o decorrer da infecção em ambas linhagens, muito embora, camundongos B10.A tenham apresentado uma inflamação mais intensa que animais A/J. Necrose do tipo caseosa foi detectada apenas em camundongos B10.A aos 90 dias após infecção. Deposição de colágeno também foi demonstrado nas duas linhagens. As células inflamatórias presentes no pulmão são predominantemente mononucleares com raros polimorfonucleares.

De fato, a IgA produzida pelos animais infectados da linhagem A/J, aponta para a possível produção de TGF-beta, com tendência à modulação da reação inflamatória.

O baço e os linfonodos dos camundongos infectados de ambas linhagens apresentaram-se reacionais à infecção. O fígado apresenta inflamação crônica não granulomatosa discreta com hiperemia e hepatócitos reacionais em camundongos A/J e B10.A.

Não foram encontrados na literatura indexada trabalhos abordando os aspectos anatomopatológicos dos tecidos de camundongos A/J e B10.A infectados por *L. minor*. No entanto, Seremene *et al.* 2004 observaram as alterações macroscópicas e microscópicas dos tecidos de camundongos C57BL/6, infectados com  $10^3$  a  $3 \times 10^3$  ovos infectantes de *L. minor*, durante 120 dias de infecção. Larvas L3 foram encontradas nos pulmões após 24 horas de inoculação com os seguintes processos patológicos: inflamação crônica granulomatosa a partir do 13º DAI, morte celular por necrose aos 61 DAI, fibrose ao redor do granuloma, perivasculite e vasculite que intensificavam com o decorrer da infecção. O infiltrado inflamatório do tecido apresentava leucócitos polimorfonucleares com a presença de eosinófilos, mais tardiamente o infiltrado inflamatório foi classificado de misto por apresentar mononucleares e polimorfonucleares. No fígado destes animais foram visualizados os processos patológicos de inflamação aguda, inflamação crônica granulomatosa, fenômenos

degenerativos como alteração hidrópico-vacuolar, alteração gordurosa microgoticular e morte células como necrose de hepatócitos entre 6 e 24 horas após a inoculação, o infiltrado inflamatório apresentou as mesmas características. O baço dos camundongos infectados apresentou hiperplasia linfóide, demonstrando o centro germinativo amplificado. Outros tecidos como rins, pâncreas, músculo esquelético, coração e tecido adiposo foram analisados e demonstraram os mesmos processos patológicos citados. Segundo estes autores, a resposta inflamatória crônica não elimina o parasito, pois a larva persiste e cresce dentro dos granulomas. Eles também sugerem que a migração deste parasito é feita pelo sistema porta e grande circulação devido à presença da larva L3 na veia porta, pâncreas, rins, tecido subcutâneo e musculatura esquelética.

Freitas (2003) observou a presença de granulomas formados por células epitelióides, linfócitos, poucos neutrófilos e poucos plasmócitos, envolvendo larvas de *L. minor* em camundongos Balb.xid e Balb/c. Segundo este autor camundongos mais resistentes à infecção apresentaram menor intensidade do infiltrado inflamatório nos pulmões, contendo menor número de linfócitos e plasmócitos quando comparado com Balb/c.

De acordo com nossos resultados, os padrões mais adequados para avaliar susceptibilidade e resistência a infecção por *L. minor* são as lesões pulmonares e principalmente a porcentagem de sobrevivência. Pois em relação ao número de nódulos subcutâneos e musculares superficiais, tamanho das larvas encistadas, sorologia e lesões anatomopatológicas de fígado, baço e linfonodos não há diferenças significativas entre as linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis a lagochilascariase.

## CONCLUSÕES

1. Animais A/J apresentaram maior sobrevivência que animais B10.A na lagochilascariase experimental murina.
2. Camundongos A/J apresentaram maior número de nódulos que camundongos B10.A no início da infecção por *L. minor* e menor número de nódulos na fase final de infecção.
3. Larvas de *L. minor* retiradas de camundongos A/J aos 60 DAI e aos 90 DAI foram maiores que as larvas retiradas de camundongos B10.A.
4. Larvas de *L. minor* retiradas de camundongos A/J e B10.A após 60 DAI podem ser classificadas como L4.
5. Camundongos B10.A apresentaram maior número de parasitos adultos que camundongos A/J, comportando-se como hospedeiro definitivo experimental mais adequado.
6. Os níveis de IgM séricos específicos contra os produtos do SE e EB da larva de *L. minor* se igualaram nas linhagens durante a infecção experimental.
7. Os níveis de IgG sérico anti-produtos secretados e excretados (SE) e anti-extrato bruto (EB) foram crescentes durante a infecção experimental por *L. minor* em ambas linhagens de camundongos, entretanto, os níveis de IgG sérico anti-EB em camundongos A/J foram maiores que em camundongos B10.A.



8. Camundongos B10.A apresentaram alta produção de IgA somente contra SE na infecção experimental por *L. minor* na fase inicial de infecção.
9. Camundongos A/J apresentaram alta produção de IgA na fase final de infecção, contra ambos antígenos .
10. Baixos níveis de IgE sérico foram detectados contra produtos secretados e excretados (SE) e contra produtos do extrato bruto (EB) de *L.minor*.
11. Camundongos B10.A infectados apresentaram maiores níveis de IgG2a e IgG2b total que camundongos A/J.
12. A intensidade da inflamação foi menor nos órgãos analisados de camundongos A/J considerados resistentes à infecção por *L.minor*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abham SN and Malaviya R 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun* 65(9): 3501-3508.
- Abraham SN and Arock M 1998. Mast cells and basophils in innate immunity. *Immunol* 10: 373-381.
- Adu HO, Curtis J, Turk JL 1983. Role of the major histocompatibility complex in resistance and granuloma formation in response to *Mycobacterium lepraemurium* infection. *Infect Immun* 40(2): 720 – 725.
- Aguiar AA 2001. Produtos secretados e excretados por larvas L3 de *Lagochilascaris minor* inibem a atividade lítica do sistema complemento humano. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.
- Allen JE and Maizels RM 1997. Th1 – Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 18 (8): 387-392.
- Artigas PT, Araújo P, Romiti N and Ruivo M. 1968. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10, 78 - 83.
- Bassi GE, Ishiki DK, Ferreira AW, Camargo ME 1991. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquidiano – considerações sobre o limiar de reatividade. *Rev Bras Patol Clin* 27 (2): 49-52.
- Behm CA and Ovington KS 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 16(5): 202-208.

- Bento RF, Mazza CC, Motti EF, Chan YT, Guimarães JRR, Miniti A 1993. Human lagochilascariasis treated successfully with ivermectin: a case report. *Rev Inst Med Trop de São Paulo* 35: 373.
- Betts CJ and Else KJ 1999. Mast cell, eosinophil and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to *Trichuris muris*. *Parasite Immunol* 21: 45-52.
- Binder R, Kress A, Kan G, Herrmann K, Kirschfink M 1999, Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol Immunol* 36: 885-892.
- Botero D and Little MD 1984. Two cases of human *Lagochilascaris* infection in Colombia. *Am Jf Trop Med Hyg* 33: 381.
- Bowman DD, Smit JL, Little MD 1983. *Lagochilascaris sprent* sp N, (Nematoda: Ascarididae) from opossum, *Didelphis Virginiana* (Marsupialia: Didelphidae). *J. Parasitol* 69: 754 – 760.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein- dye biding. *Anal. Bioch.* 72: 248.
- Brattig NW, Buttner DW, Hoerauf A 2001. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbs Infect* 3: 439-446.
- Brenes-Madrugal RR, Brenes AF 1961. Lagochilascariase humana em Costa Rica. Prog. Gen, p. 35. Congresso Latino Americano Y Nacionale Microbiologia, Costa Rica.

- Bruijning CFA, 1957. Notes on *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Doc Med Geogr Trop* 9: 173-175.
- Brunet LR, Dunne DW, Perace EJ 1998. Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today* 14(10): 422-427.
- Caldeira NMS, 2005. Padronização de ensaio imunoenzimático e cinética de produção de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA . Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTSP- UFG.
- Caldeira NMS, Costa-Cruz JM, Barbosa AP, Silva-Filho J, Carvalhaes NO, Santos MJ, Barbosa CA, Campos DMB 2005. Utilização de ensaio imunoenzimático para o estudo da cinética de produção de anticorpos IgM, IgG e IgA na lagochilascariase murina experimental. In: CONPEEX, Goiânia (CD-rom).
- Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM 1994. Resistance mechanisms of inbred mice to *Paracoccidoides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 66: 585.
- Calich VLG, Burguer E, Kashino SS, Fazioli RA, Singer-Vermes LM 1987. Resistance to *Paracoccidoides brasiliensis* in mice is controlled by a single autosomal gene. *Infect Immun* 55: 1919-1923.
- Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burguer E 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidoides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 66:585.
- Calich V e Vaz C 2001. *Imunologia*. 1ª Edição, Livraria e Editora Revinter Ltda, Rio de Janeiro.

Campos DMB, Koma MD, Barbosa W, Santos MAQ, Pinto RNL, Bracéelos M, Carneiro JR 1987. Notas parasitológicas sobre *Lagochilascariase* humana em Goiás. *Rev Patol Trop* 16: 129.

Campos DMB, Freire-Filha LG, Vieira MA, Paçô JM, Maia MA 1992. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper Leiper 1909. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34: 277.

Campos DMB, Santos ER, Paçô JM, Souza MA 1995. *Lagochilascariase* humana. Registo de um novo caso procedente do sul do Pará. *Rev Patol Trop* 24: 313.

Chieffi PP, Frucchi H, Proença NG, Pereira WA, Paschoalotti MA 1981. Infecção cutânea por *Lagochilascaris minor*, tratamento e cura rápida pelo levamisol. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 56: 141.

Cimerman B, Cimerman S 1999. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2ª Edição, Ed. Atheneu, São Paulo.

Corrêa MOA, Hyakutake S, Brandi AJ, Monteiro CG 1978. Novo caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Adolfo Lutz* 38 (2): 59-65.

Costa HMA, Silva AVM, Costa PR, Assis SB 1986. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, (Nematoda Ascaridae) de origem humana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 28: 126.

Craig TM, Robineon RM, McArthur NH, Ward RD 1980. *Lagochilascaris major* in a raccoon. *J Wild Dis* 16(1): 67-70.

- Dent AL 2002. For better or worse: common determinants influencing health and disease in par infection, asthma and reproductive biology. *J Repro Immunol* 2000: 1-18.
- Draper JW & Buckley JJC 1963. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, from a patient in Tobago. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* 57: 7.
- Egmond VM, Damen AC, Spriel van BA, Vidarson G, Garderen van E, Winckel de van JGJ 2001. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22: 205 – 211.
- Else KJ, Grecis RK 1991. Helper T-cell subsets in mouse trichuriasis. *Parasitol Today* 7(11): 313-316.
- Espinoza E, Muro A, Martín MMS, Casanueva P, Pérez-Arellano JL 2002. *Toxocara canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E2 by rat alveolar macrophages. *Parasite Immunol* 24: 311-319.
- Eulálio KD, Lima FGC, Salmito MA, Leal MJ 1995. Lagochilascariase: relato de um caso. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Salvador, 31, p314.
- Ey PL, Prowse JS, Jenkin RC 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunoch* 15: 429-436.
- Faccioli LH, Vargaftig BB, Medeiros AI, Malheiros A 1997. Cytokines in the modulation of eosinophilia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 Sup. II: 109-114.

Falcone HF, Pritchard ID, Gibbs FB 2001. Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends Parasitol* 17: 126-130.

Farah ARS 1999. Migração larvária e cinética da resposta inflamatória na lagochilascarirose experimental: uma avaliação histopatológica. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação do IPTSP-UFG.

Faria CFP, Távora HR, Trovão C, Fortes A, Shozuka MA, Cruz MJLS 2001. Lagochilascariase com invasão de coluna cervical. *J Bras Med* 80(6): 24-25.

Ferreira AM, Irigoín F, Breijo M, Sim RB, Díaz A 2000. How *Echinococcus granulosus* deals with complement. *Parasitol Today* 16(4): 168-172.

Fraiha H, Baros VRLS, Rocha MPC, Carvalho RA 1984. *Lagochilascaris minor* em gato doméstico. Primeiro registro de infecção natural associada a um caso humano. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Salvador. p121.

Fraiha H, Leão RNQ and Costa FSA 1989. Lagochilascariase humana e dos animais domésticos. *Zoon Rev Interna* 1, 25-33.

Freire-Filha LG 1997. Alterações cito-hematológicas e dos anticorpos séricos IgG e IgM em camundongos infectados com *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.

Freitas JGA 2003. Imunodeficiência ligada ao cromossomo X altera a evolução da lagochilascariase experimental em camundongos. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.

Freitas JGA, Pádua A, Prudente MFS, Paula EC, Carvalhaes MS 2003. Imunodeficiência ligada ao cromossomo X interfere na susceptibilidade a lagochilascariase experimental. *Rev Med Trop* 234.

Gervais F, Stevenson M, Skamene 1984. genetic control of resistance to *Listeria monocytogenes*: regulation of leucocyte inflammatory responses by the Hc locus. *J Immunol* 132 (4): 2078 – 2083.

Hochreiter R, Ferreira F, Thalhamer J, Hammerl P 2003. Th1-promoting DNA immunization against allergens modulates the ratio of IgG1/IgG2a but does not affect the anaphylactic potential of IgG1 antibodies: no evidence for the synthesis of nonanaphylactic IgG1. *J Allergy Clin Immunol* 112: 579-584.

Holland MJ, Harcus YM, Riches PL, Maizels RM 2000. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol* 30: 1977 – 1987.

Jokiranta TS, Jokipii L, Meri S 1995. Complement resistance of parasites. *Scand J Immunol* 42: 9-20.

Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, Winship T, Kuchan MJ 2000. Dietary nucleotides modulate antigen-specific type-1 and type-2 T-cell responses in young C57BL/6 mice. *Nutrition* 16: 442-446.

Kaminsky SG, Nakamura I, Cudkowicz G 1985. Genetic control of the natural killer cell activity in SJL and other strains of mice. *J Immunol* 135(1): 665-671.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24(1): 25-29.



- Kipnis APJ 1999. Contribuição dos modelos murinos no estudo da Paracoccidiodomicose. *Rev Med Trop* 28(1):14-25.
- Korten S, Volkman L, Saefel M, Fischer K, Taniguchi M, Fleischer B, Hoerauf A 2002. Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C and LY-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. *J Immunol* 168: 5199 – 5206.
- Lanfredi RM, Fraiha Neto H, Gomes DC 1998. Scanning Electron Microscopy of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (3): 327 – 330.
- Larraldi C, Laclette JP, Madrzo I, Sandoval M, Bojalil R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Diaz LM, Govezensky T, Montoya RM, Goodsaid F 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am J Trop Med Hyg* 35(3): 965-973.
- Leão RNQ, Leão Filho J, Dias LB, Calheiros LB 1978. Infecção humana pelo *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Registro de um caso observado no Estado do Pará (Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 20: 300-306.
- Leão R, Leão-Filho J, Dias LB, Calheiros LB 1977. Infecção humana pelo *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Caso observado no Hospital Carlos Barreto. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília. p187.
- Leiper RT 1909. A new nematode worm from Trinidad, *Lagochilascaris minor*. *Proceed Zool Soc Lond* 4 : 742.

- Liwski RS and Lee TDG 1999. Nematode infection enhances survival of activated T cells by modulating accessory cell function. *J Immunol* 163: 5005-5012.
- Luster AD 1998. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Eng J Med* 4: 436-444.
- Marafion-Martinez R 1980. Parásitos animales de la region buconasofaringea. *Revista da la Asociacion Dental Mexicana* 37: 340-369.
- Matsumara K, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K 1983. The IgM antibody activities in relation to the parasitologic satatus of *Toxocara canis* in dogs. *Zbl Bakt Hyg* 402-405.
- Matthaei IK, Foster SP, Young GI 1997. The role of Interleukin-5 in vivo: studies with IL-5 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 63-68.
- Meeusen ENT 1999. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet Parasitol* 84: 259-273.
- Meeusen ENT and Balic A 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 16: 95-101.
- Minoprio P, Coutinho A, Spinella S, Hontebeyrie-Joskowics M 1991. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas disease. *Int Immunol* (5): 427 – 433.
- Mock BA and Nacy CA 1988. Hormonal modulation of sex differences in resistanse to Leishmania Major systemic infections. *Infect Immun* 56 (12): 3316-3319.

- Mondragon H et al 1973. Primer caso de infección humana por *Lagochilascaris minor* en Colômbia. *Antioquia Medica* 23: 463.
- Monteiro MRCC, Albuquerque HPC, Souza JM, Abdon NP, Fraiha-Neto H, Souza JR and Almeida AJL 1998. Comprometimento do sacro na lagochilascariase. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus.
- Moraes AMP, Arnaud MVC, Lima PE 1983. Novos casos de infecção humana por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, encontrados no Estado do Pará, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25: 139-146.
- Moraes MAP, Arnaud MVC, Macedo RC, Anglada AE 1985. Infecção pulmonar fatal por *Lagochilascaris sp.* provavelmente *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 27: 46.
- Mullick A, Elias M, Picard S, Bourget L, Jovceviski O, Gauthier S, Tuite A, Harakidas P, Bihun C, Massie B, Gros P 2004. Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Am Soc Microb* 72 (10): 5868-5876.
- Obeid JN, Fraiha-Neto H, Vieira FP and Abreu EP 1985. Lagochilascariase com envolvimento cerebelar. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus, 1998.
- Oliveira SHP, Fonseca SG, Romão PRT, Ferreira SH, Cunha FQ 1997. Nitric oxide mediates the microbial activity of eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 Supl II: 233 – 235.
- Oliveira JA, Barbosa CAL, Vieira MA, Paçô JM, Carrijo AS, Fiorini MR, Campos DMB 2002. Isolado de *Lagochilascaris minor*. Procedimentos para obtenção de ovos infectantes. *Rev Patol Trop* 31 (1): 121-128.

Oostburg BFJ and Varma AAO 1968. *Lagochilascaris minor* infection in Surinam. Report of a case. *Am J Trop Med Hyg* 17, 548-550.

Oostburg BFJ 1971. Thiabendazole therapy of *Lagochilascaris minor* infection in Surinam. Report of a case. *Am J Trop Med Hyg* 20, 580 - 583.

Oostburg BFJ 1992. The sixth case of *Lagochilascariasis minor* in Surinam. *Trop Geog Med* 44: 154.

Orihuela R, Botto C, Delgado O, Ortiz A, Suarez JA, Arguello C 1987. Lagochilascariasis humana en Venezuela: descripción de un caso fatal. *Rev Soc Bra Med Trop* 20: 217.

Paçô JM 1994. Comprovação experimental da importância de roedores silvestres na transmissão da lagochilascariase. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.

Paçô JM e Campos DMB 1998. *Lagochilascaris minor*: Nove décadas de revisa bibliográfica. *Rev Patol Trop* 27(1): 11-34.

Paçô JM, Campos DMB, Oliveira JA 1999. Wild rodents as experimental intermediate hosts of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 441-449.

Pádua A, Freitas JGA, Prudente MFS, Paula EC, Carvalhaes MS 2003. Susceptibilidade a lagochilascariase experimental em camundongos é independente dos genes do complexo de histocompatibilidade principal. *Rev Med Trop* 123.

Pádua A 2005. Caracterização da susceptibilidade de camundongos isogênicos (*mus musculus*) C57BL/6 e B10.A à infecção por *Lagochilascaris minor* e sua atuação como hospedeiro definitivo na infecção experimental. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.

Pawan JL 1927. Another case of infection with *Lagochilascaris minor* (Leiper). *Annals Trop Med Parasitol* 21: 45.

Pritchard DI, Walsh EA 1995. The specificity of the human IgE response to *Necator americanus*. *Parasite Immunol* 17(11): 605-607.

Quian Z, Bieler JG, Baldwin III WM, Wasowska BA 2005. Expression of CR1/1 receptor on alloantigen-stimulated mouse t cells. *Trans Proceed* 37: 32-34.

Rivero-Nava L, Aguirre-García J, Shibayaama-Salas M, Hernández-Pando R, tsutsumi V, Calderón R 2001. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Exp Parasitol* 101: 183-192.

Rocha MPC, Fraiha NH, Barreto NACP 1984. Infecção de ouvido médio e mastóide por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda, Ascarididae). Relato de um caso do Sul do Estado do Pará, Amazônia, Brasil. *Hiléia Médica*, 6 (2): 3-14.

Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI 2002. Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 168: 3135 – 3139.

- Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low Interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun* 70 (7) : 3656-3664.
- Rosemberg S, Lopes MBS, Masuda Z, Campos R and Bressan MCR (1986). Fatal encephalopathy due to *Lagochilascaris minor* infection. *Am J Trop Med Hyg* 35, 575 -578.
- Sakamoto T and Cabrera PA 2002. Subcutaneous Infection of *Lagochilascaris minor* in Domestic Cats from Uruguay. *Vet Parasitol* 10; 108(2): 145-152.
- Santos MAQ, Campos DMB, Barnabé W 1987. *Lagochilascaris minor* (Leiper, 1909) em abscesso dentário em Goiânia. *Rev Patol Trop* 16, 1 – 6.
- Senna Junior V, 2005. Identificação de antígenos produzidos por larvas L3 e vermes adultos de *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP-UFG.
- Seremene AR, Junior RSL, Oliveira JA, Magalhães AV, Stefani MMA, Barbosa AP, Campos DMB 2004. Experimental lagochilascariosis: histopathological study of inflammatory response to larval migration in the murine model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(4): 393-398.
- Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burguer E, Calich VLG 1993. Experimental murine paracoccidiodomycosis: relationship among the dissemination of the infection humoral and cellular responses. *Clin Exp Immunol* 94(1): 75-79.

- Singer-Vermes LM, Sakamoto TN, Vaz CAC, Calich VLG 1995. Influence of the genetic pattern and sex of mice in experimental paracoccidiodomycosis. *Clin Exp Immunol* 101: 114-120.
- Shang XZ, Chiu BC, Stolberg V, Lukacs NW, Kunkel SL, Murphy HS, Chensue SW 2002 .Eosinophil recruitment in type-2 hypersensitivity pulmonary granulomas. *Am J Pathol* 161(1): 257-266.
- Smith JL, Bowman DD, Little MD 1983. Life cycle and development of *Lagochilascaris sprenti* (Nematoda: Ascarididae) from opossums (Marsupialia: Didelphidae) in Louisiana. *J Parasitolol* 69: 736.
- Smith PK, Krohn GT, Hermamon AK, Mallia FH, Gartner MD, Provenzano EK, Fujimoto NM, Goeke BJ, Klenk DC 1985. Measurement of protein using bicinchonic acid. *Protein Methods* – Bollag, SM and Stuart JE.
- Spelberg B and Edwards JEJr 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32: 76 – 102.
- Sprent JFA 1971. Speciation and development in the genus *Lagochilascaris*. *Parasitol* 62: 71.
- Sprent JFA 1971. A note on *Lagochilascaris* from the cat in Argentina. *Parasitol* 63: 45.
- Stadnyk AW, Dollard CD, Issekutz AC 2000. Neutrophil migration stimulates rat intestinal epithelial cell cytokine expression during helminth infection. *J Leukocyte Biology* 68: 821-827.
- Sturion DJ, Gaste L, Yamamura MH 1982. Santa Catarina. Alterações esofágicas pelo *Lagochilascaris minor* em cão. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 18, p. 313.

- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84 (1): 74-81.
- Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández M, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E 2001. two epitopes shared against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 69 (3): 1766 – 1773.
- Travassos L 1924. Pesquisas científicas em Angra dos Reis. *Folha Médica* 5: 152 – 153.
- Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, León-Nava MA, Morales-Montor J 2005. Regulation of the immune response to cestode infection by progesterone is due to its metabolism to estradiol. *Microbs Infect* 7: 485-493.
- Veloso MGP, Faria MCAR, Freitas JD, Moraes MAP, Gorin DF, Mendonça JLF 1992. Lagochilascariase humana. Sobre três casos encontrados no Distrito Federal Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34: 587.
- Vidotto O, Araújo P, Artigas PG, Reis ACF, Viotti NMA, Pereira ECP, Yamamura NH 1982. Porto Alegre. Caso de *Lagochilascaris minor* em cão. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 7: 76.
- Volcan GS, Ochoa FR, Medrano CE and Valera Y 1982. *Lagochilascaris minor* infection in Venezuela. Report of a case. *Am J Trop Med Hyg* 31: 1111-1113.
- Volcan GS, Medrano CE 1990. Infección inducida en el roedor selvático *Dasyprocta leporina* (Rodentia: Dasyproctidae), con huevos de



*Lagochilascaris minor* (Nematoda: Ascarididae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 32:6, 1111-1113.

Volcan GS, Medrano CE, Payares G 1992. Experimental heteroxenous cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda: Ascarididae) in white camundongo and cats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87:4, 525 – 532.

Wassom DL, Wakelin D, Brooks BO, Krco CJ, David CS 1984. Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* infections of mice. Hypothesis to explain the role of H-2 genes in primary and challenge infections. *Immunol* 51: 625 – 631.

Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 624-631.

Winckel WEF and Treurniet AE 1956. Infestation with *Lagochilascaris minor* (Leiper) in man. *Doc Med Geo Trop* 8: 23 – 28.

Wittmann M, Zwirner J, Larsson VA, Kirchhoff K, Begemann G, Kapp A, Götze O, Werfel T 1999. C5a suppresses the production of IL-12 by IFN- $\gamma$ -primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol* 162:6763-6769.

Yamaguti S 1961. London, Interscience Publishers, *Syst. Helminth* 3: 573 – 576.

Yasue T, Baba M, Mori S, Mizoguchi C, Uehara S, Takatsu K 1999. IgG1 production by sIgD<sup>+</sup> splenic B cells and peritoneal B-1 cells in response to IL-5 and CD38 ligation. *Int Immunol* 11: 915-923.

Zacariotti AV 1996. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909: Envolvimento do sistema nervoso central com comprometimento raquiano. Monografia, Instituto de Neurologia de Goiânia.

ZaKroff SGH, Beck L, Platzer EG, Spielberg HL 1989. The IgE subclass responses of mice to four helminth parasites. *Cell Immunol* 119(1): 193-201.