

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**EOSINÓFILOS COMO CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO
DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *TOXOCARA CANIS***

JOICE MARGARETH DE ALMEIDA RODOLPHO

São Carlos – SP

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**EOSINÓFILOS COMO CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO
DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *TOXOCARA CANIS***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética evolutiva e Biologia molecular da
Universidade Federal de São Carlos como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

Ms. Joice Margareth de Almeida Rodolpho

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal

São Carlos – SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Relatório de Defesa de Tese

Candidata: **Joice Margareth de Almeida Rodolpho**

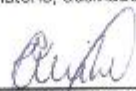
Aos 15/12/2017, às 13:30, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de tese de doutorado sob o título: **EOSINÓFILOS COMO CÉULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR TOXOXARA CANIS**, apresentada pela candidata Joice Margareth de Almeida Rodolpho. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito
Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal	Presidente	UFSCar	<u>A</u>
Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira	Titular	UFSCar	<u>A</u>
Profa. Dra. Patrícia Brassolatti	Titular	UFSCar	<u>A</u>
Prof. Dr. Márcia Benedita de Oliveira	Titular	UFTM	<u>A</u>
Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia	Titular	USP	<u>A</u>

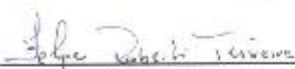
Resultado Final: A

Parecer da Comissão Julgadora*:


Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.




Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal



Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira



Profa. Dra. Patrícia Brassolatti



Prof. Dr. Márcia Benedita de Oliveira



Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia



Representante do PPG: Ivanildes Menezes

Não houve alteração no título da tese () Houve. O novo título passa a ser:

Observações:

a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Dedico este trabalho a minha família e
a todos que torceram pelo meu
caminho para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por toda sabedoria até aqui alcançada e por conseguir enfrentar todos os obstáculos.

Agradeço a **FAPESP** (Fundação Amparo de Pesquisa do estado de São Paulo) de nº 2012/08024-3 pelo financiamento aplicado ao meu projeto de pesquisa do Doutorado.

A minha família: meus pais Orlando e Roselene que sempre confiaram no meu potencial e me incentivaram chegar até aqui. Ao meu irmão que sempre foi meu espelho de como ser uma pessoa de caráter, e sincera. A minha cunhada Camila e a nova princesinha da família Helena.

A equipe do laboratório LIDI, que sempre dispostos, me ajudaram a concretizar esse trabalho, em especial Luciana Camillo que sempre disposta abdicou de suas coisas para viajar comigo e ajudar a desenvolver meu projeto em Belo horizonte na Fiocruz. Ao Ricardo companheiro de laboratório desde 2009, Laís que sempre com uma palavra amiga mesmo de longe esteve presente.

A minha irmã que Deus colocou na minha vida Débora Neris, obrigado por tudo pelas horas de acolhimento, conversas, abraços, amizade que vou levar para o resto da vida minha cumadre.

Quero agradecer a minha nova família Artur, e meu noivo Freid que entrou na minha vida e tem me mostrado como é bom formar uma família. Obrigado por tudo e que nossas vidas seja sempre assim um apoiando o outro.

A minha orientadora Fernanda de Freitas Anibal pelo apoio, carinho e respeito dedicado. Obrigado pela oportunidade da realização desse trabalho, acreditando na minha capacidade e nas possibilidades de crescimento tanto profissional como pessoal. Agradeço pela pessoa que me fez tornar, pelas conversas tanto de laboratório ou não, pelos momentos de angustia e de choro que estava sempre a me ouvir. Fer eu só tenho a agradecer, pela pessoa que você é. Obrigada por tudo.

Agradeço também a equipe do Centro de Pesquisa René Rachou Fiocruz de Belo Horizonte que me acolheu em todos os experimentos e análises realizadas.

-Profª Drª Andréa Teixeira-Carvalho

-Profº Drº Olindo Assis Martins-Filho

-Drª Elaine Speziali de Faria

- Drº Marcio Sobreira Silva Araujo

As Técnicas do Laboratório da plataforma de citometria de fluxo do Centro de Pesquisa René Rachou –FIOCRUZ Belo Horizonte

Enfim agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte da minha conquista até aqui.

"O valor das metas futuras não reside na imagem do futuro que se cria na mente, mas sim na mudança que elas provocam no presente" *David Allen*

RESUMO: Os eosinófilos são células multifuncionais que possuem atividades pró-inflamatórias citotóxicas e estimulam as células T CD4 + em modelos experimentais de alergia e infecções parasitárias. Os eosinófilos, quando expostos a antígenos são ativados e expressam as moléculas CD38/CD69 e exibiram uma expressão aumentada do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC-II), CD80 e CD86, sugerindo seu papel como células atípicas na Apresentação de Antígenos. No presente estudo, avaliamos a hipótese que, além das APC profissionais (macrófagos monócitos, células dendríticas e células B), os eosinófilos são ativados por antígenos *Toxocara canis* e expressam uma gama de marcadores de superfície celular característicos das células apresentadoras de antígenos. E desse modo, contribuindo para as respostas imunes induzidas no modelo experimental pela síndrome da Larva Migrans Visceral associada a infecção com *T. canis* (VLMS). Por meio dos ensaios utilizando citometria de fluxo foram avaliados os perfis celulares das células que apresentam antígeno durante a infecção experimental pelo *T. canis*. A análise dos dados demonstrou que, durante a infecção murina de *T. canis*, os eosinófilos do sangue periférico, do baço e da medula óssea apresentaram a expressão regulada de CD69 / MHC-II / CD80 / CD86, assumindo um papel como APC em comparação com as células apresentadoras de antígenos profissionais. Ao contrário dos eosinófilos do baço e da medula óssea, os eosinófilos circulantes apresentaram aumento da expressão de marcadores de ativação juntamente com moléculas relacionadas à APC após a infecção por *T. canis*. A mesma ativação não foi observada para APCs profissionais nos mesmos compartimentos. A conectividade aprimorada entre eosinófilos e células T em camundongos infectados por *T. canis* em todos os três compartimentos (sangue periférico, baço e medula óssea) também suporta a hipótese de que os eosinófilos podem adotar um papel como APC durante a infecção por *T. canis*. Além disso, a estimulação *in vitro* de antígeno de *T. canis* resultou em ativação e elevação da regulação de moléculas relacionadas à APC por eosinófilos derivados da medula óssea. Essas descobertas sugerem fortemente que a infecção por *T. canis* remodela os eosinófilos para atuar como APCs nessa infecção e não somente como uma célula efetora no controle da infecção parasitária.

Palavras chaves: Eosinófilos, células apresentadoras de antígenos (APC), *Toxocara canis*, SLMV, moléculas co-estimulatórias

ABSTRACT: Eosinophils are multifunctional cells that have pro-inflammatory cytotoxic activities and stimulate CD4 + T cells in experimental models of allergy and parasitic infections. Eosinophils, when exposed to antigens are activated and express CD38 / CD69 molecules and exhibit increased expression of the Major Histocompatibility Complex (MHC-II), CD80 and CD86, suggesting their role as atypical cells in the Presentation of Antigens. In the present study, we evaluated the hypothesis that, in addition to professional APCs (monocyte, dendritic and B cell), eosinophils are activated by *Toxocara canis* antigens and express a range of cell surface markers characteristic of antigen presenting cells. Thus, contributing to the immune responses induced in the experimental model by Visceral Migrans Larva syndrome associated with *T. canis* infection (VLMS). By means of flow cytometric assays the cell profiles of antigen-presenting cells were evaluated during *T. canis* experimental infection. Data analysis demonstrated that, during murine *T. canis* infection, peripheral blood, spleen and bone marrow eosinophils showed regulated expression of CD69 / MHC-II / CD80 / CD86, assuming a role as APC in comparison with the antigen presenting cells. Unlike eosinophils of the spleen and bone marrow, circulating eosinophils showed increased expression of activation markers along with APC-related molecules after *T. canis* infection. The same activation was not observed for professional APCs in the same compartments. Improved connectivity between eosinophils and T cells in *T. canis* infected mice in all three compartments (peripheral blood, spleen and bone marrow) also supports the hypothesis that eosinophils may play a role as PCA during *T. canis* infection. In addition, in vitro stimulation of *T. canis* antigen resulted in activation and elevation of regulation of APC-related molecules by eosinophils derived from bone marrow. These findings strongly suggest that *T. canis* infection reshapes eosinophils to act as APCs in this infection and not only as an effector cell in the control of parasitic infection.

Keywords: Eosinophil, Antigen-presenting cell (APC), *Toxocara canis*, SLMV, costimulatory molecules

SÚMARIO

1-INTRODUÇÃO	16
1.1 Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV)	17
1.2 Ciclo Biológico	19
1.3 Formas Sintomáticas da SLMV e a resposta Imunológica	23
1.4 Células T, TCR e MHC-II	25
1.5 Células Apresentadoras de Antígeno e Moléculas coestimulatórias	29
1.5.1 Moléculas coestimatórias (CD80, CD86)	30
1.6 Eosinófilos	31
1.6.1 Eosinófilos e suas estruturas	32
1.6.2 Trafego dos Eosinófilos	34
1.7 Citometria	37
2- OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos Específicos	39
3- Material e Métodos	40
3.1 Animais	40
3.2 Obtenção de Ovos larvados (L3) de <i>T. canis</i>	40
3.3 Extração do Antígeno da Larva de <i>T. canis</i>	40
3.4 Concentração do Antígeno	41
3.5 Experimento <i>ex vivo</i>	42
3.5.1 Delineamento experimental <i>ex vivo</i>	42
3.5.2 Infecção	42
3.5.3 Obtenção das células do sangue	43
3.5.4 Obtenção do Baço	43
3.5.5 Obtenção da Medula Óssea	43
3.5.6 Viabilidade celular	44
3.5.7 Anticorpos Monoclonais	44
3.5.8 Protocolo experimental para a análise da expressão de moléculas coestimulatórias por citometria de fluxo	45
3.5.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	46
3.6 Experimento <i>in vitro</i>	47
3.6.1 Delineamento experimental <i>in vitro</i>	47
3.6.2 Isolamento e cultura de eosinófilos derivados da Medula Óssea de murinos (Bmeos)	47
3.6.3 Cultura de Eosinófilos	48
3.6.4 Citometria de Fluxo	48
3.7 Análises de dados	48

3.7.1	Análise estatística convencional	48
3.7.2	Análise não convencional entre biomarcadores.....	49
3.7.3	Rede de interação entre os Biomarcadores	49
4.	RESULTADOS	50
4.1	Perfil fenotípico dos eosinófilos, monócitos, células B e células T após a infecção experimental com <i>T. canis</i> em camundongos	50
4.2	Sistema de Assinatura de Biomarcadores na análise por infecção de <i>T. Canis</i>	53
4.3	Análise de correlações entre biomarcadores imunológicos: abordagem de biologia de sistemas.....	57
4.4	Impacto da estimulação do antígeno de <i>T. canis</i> in vitro na expressão da molécula da superfície celular por eosinófilos derivados da medula óssea	59
4.5	Avaliando os níveis de citocinas em soros de camundongos não infectados e infectados por <i>T. canis</i> por ELISA	63
5.	DISCUSSÃO	64
6-	CONCLUSÃO	68
7-	Anexo I Comitê de Ética	69
	Anexo II- Artigo Publicado.....	70
	REFERENCIAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – (do inglês - *Antigen-Presenting Cells*),
- CEEA - (Comissão de Ética em Experimentação Animal),
- CLC - (Charcot – Leyden),
- CDs - (Células Dendríticas),
- ECP - (do inglês - *Eosinophil Cationic Protein*),
- EDN - (do inglês - *eosinophil-derived neurotoxina*),
- ELISA - (do inglês - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- EPO - (do inglês - *Eosinophil Peroxidase*),
- FACS - (do inglês - *fluorescence activated cell sorting*),
- GM- CSF (do inglês - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*),
- HLA-DR (do inglês – *Human Leukocyte Antigen D Related*)
- IMF (Intensidade da Mediana de Fluorescencia),
- LBA - (Lavado Broncoalveolar),
- LMO - (Larva Migrans Ocular),
- LMV - (Larva Migrans Visceral),
- LTs - (Leucotrienos),
- MBP - (do inglês - *Major Basic Protein*),
- MHC - (do inglês - *Major Histocompatibility Complex*),
- OVA - (Ovalbumina),
- PAF - (Fator de Agregação Plaquetária),
- SBCAL - (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório),
- SLMV - (Síndrome da Larva Migrans Visceral),
- SNC - (Sistema Nervoso Central),
- SPF - (do inglês - *Specified Pathogen Free*),
- TES - (do inglês - *Toxocara Excretotory-Secretory antigens*),

Toxocara canis (*T. canis*),

TCR - (do inglês - *T Cell Receptor*),

TGF- β - (do inglês - *Transforming Growth Factor*),

LISTA DE TABELA

Tabela1: Anticorpos utilizados	45
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Foto de ovos larvados de <i>Toxocara canis</i> mantidos no de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) da Universidade Federal de São Carlos, com aumento de 40 X em microscópio óptico comum	19
Figura2: Macho e da fêmea do <i>Toxocara canis</i> , sendo o macho de menor tamanho e com a característica de possuir extremidade posterior enrolada	20
Figura 3- Esquema representativo do desenvolvimento do ciclo biológico do <i>Toxocara canis</i> nos hospedeiros definitivos (cães)	22
Figura 4: Hematopoiese do Linfócito T	26
Figura 5: Interação entre CEL T e APC	29
Figura 6 – Esquema representativo da interação das moléculas coestimulatórias presentes nas APC (CD80 e CD86) na ativação e inibição das células T ligando aos seus receptores	31
Figura 7: Esquema representativo dos principais receptores, moléculas de superfície e das principais moléculas constituintes dos grânulos citoplasmático do Eosinófilo.....	32
Figura 8: Representação esquemática do tráfico de eosinófilos	35
Figura 9: Estratégias de gating para análise fenotípica de células apresentadoras de antígenos por citometria de fluxo	51
Figura 10: Expressão de moléculas relacionadas à ativação por células apresentadoras de antígeno desencadeadas pela infecção por <i>T. Canis</i>	52
Figura 11: Proporção de camundongos com expressão de biomarcadores por células apresentadoras de antígenos acima do limite médio global	54
Figura 12: Assinaturas de biomarcadores de células apresentadoras de antígenos desencadeada por infecção por <i>T. Canis</i>	56
Figura 13: As redes de interação entre biomarcadores imunológicos são alteradas durante a infecção por <i>Toxocara canis</i>	58
Figura 14: Resultados citométricos de fluxo para o perfil de ativação de eosinófilos derivados da medula óssea após remoção induzida por antígeno de <i>T. canis</i> in vitro.....	60
Figura 15: Impacto da estimulação in vitro do antígeno de <i>T. canis</i> na expressão da molécula da superfície celular por eosinófilos derivados da medula óssea	61
Figura 16: Impacto da estimulação in vitro com antígenos de <i>T. canis</i> em eosinófilos derivados da medula óssea.....	62

Figura 17: Níveis de citocinas em amostras de soro de ratos infectados e não infectados por <i>Toxocara canis</i>	63
--	----

1.INTRODUÇÃO

A eosinofilia caracterizada pelo aumento do número de eosinófilos na corrente sanguínea tem sido associada à doenças parasitárias, particularmente quando o parasito invade os tecidos ou promove danos na superfície das mucosas (NUTMAN et al., 1989; CHAUFFAILLE, 2010). Em humanos adultos, em condições normais, as células hematopoiéticas da medula óssea da linhagem mieloide dão origem às células precursoras de eosinófilos, sendo a diferenciação e proliferação reguladas por GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Fator*) e interleucinas como IL-3 e IL-5 (SANDERSON et al., 1985; METCALFE, 1986). No entanto, a IL-5 sozinha parece ser suficiente para a diferenciação final dos eosinófilos a partir da medula óssea (DENT et al., 1990; FACCIOLI et al., 1996; SCHOLLAERT et al., 2014). Ao ocorrer à maturação completa dos eosinófilos, a IL-5 sinergicamente com eotaxina, uma importante quimiocina, promove a liberação dessas células da medula para sítios inflamatórios (ROTHERBERG, 2009).

O aumento no número de eosinófilos é uma característica importante visto em diversas doenças severas como alergias (OKUBO et al., 1998, CHAUFFAILLE, 2010), asma (KOTSIMBO, HAMID, 1997; SILVA; DIAS, 2013; MC-BRIEN, MENZIES-GOW, 2017), infecções parasitárias como exemplo a S.L.M.V causada pelo *Toxocara canis* (SABIN et al., 1996; RAINBIRD et al., 1998; BEHM, OVINGTON, 2000; FLERLAGE et al., 2017, ROURE et al., 2017) e câncer (colorretal) (WON et al., 2015; PRIZMENT et al., 2017).

O *T. canis*, um parasito intestinal de cães é o mais comum agente etiológico da Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) em humanos. BEAVER e colaboradores, quando descreveram esta síndrome em 1952, observaram uma intensa eosinofilia sanguínea e tecidual, o que foi confirmado por outros autores em modelos experimentais estimulados pela infecção com *T. canis* (KAYES, OAKS, 1976; FACCIOLI et al., 1996, ANIBAL et al., 2007; ROGERIO & ANIBAL 2012, OLIVEIRA et al., 2014). Outras características observadas neste modelo foram o aumento de mastócitos na parede do intestino delgado de camundongos infectados e o aumento da hiperreatividade intestinal destes animais, sugerindo um papel ativo destas células na SLMV (CARLOS et al., 2011).

Na SLMV, a resposta imunológica do hospedeiro inicia-se com a infecção através da ingestão de ovos larvados contendo larvas filarioides de 3º estágio L3. Após a ingestão desses ovos, as larvas são liberadas no trato gastrointestinal e alcançam a circulação. Durante a migração tecidual, as larvas liberam produtos antigênicos de secreção-excreção (TES - do

inglês *Toxocara Excretory-Secretory (Antigens)*, uma mistura de proteínas glicosiladas com proteases, que contribuem para que as larvas sejam recobertas pela cutícula da larva protegendo-as contra a reação do hospedeiro (MEGHJI; MAIZELS, 1986; CAROCCIA et al., 2013).

À medida que a infecção progride, as larvas tendem a formar granulomas no fígado, pulmão e outros. As células inflamatórias recrutadas para esses tecidos se organizam em torno das larvas e de seus metabólitos, formando uma reação granulomatosa, caracterizada por um centro necrótico onde é possível encontrar restos de larvas. Circundando-as há um acúmulo de células multinucleadas, neutrófilos, monócitos e um grande aumento no número de eosinófilos (CARLOS et al., 2011, CAMILLO et al., 2014). Assim, as manifestações clínicas e patológicas da SLMV são resultantes do dano tecidual direto, causado pela migração das larvas, pela ação de seus metabólitos e pela reação inflamatória do hospedeiro, principalmente com formação de granulomas em vários tecidos e pela eosinofilia disseminada (BEAVER et al., 1952, ECEVIT et al., 2013).

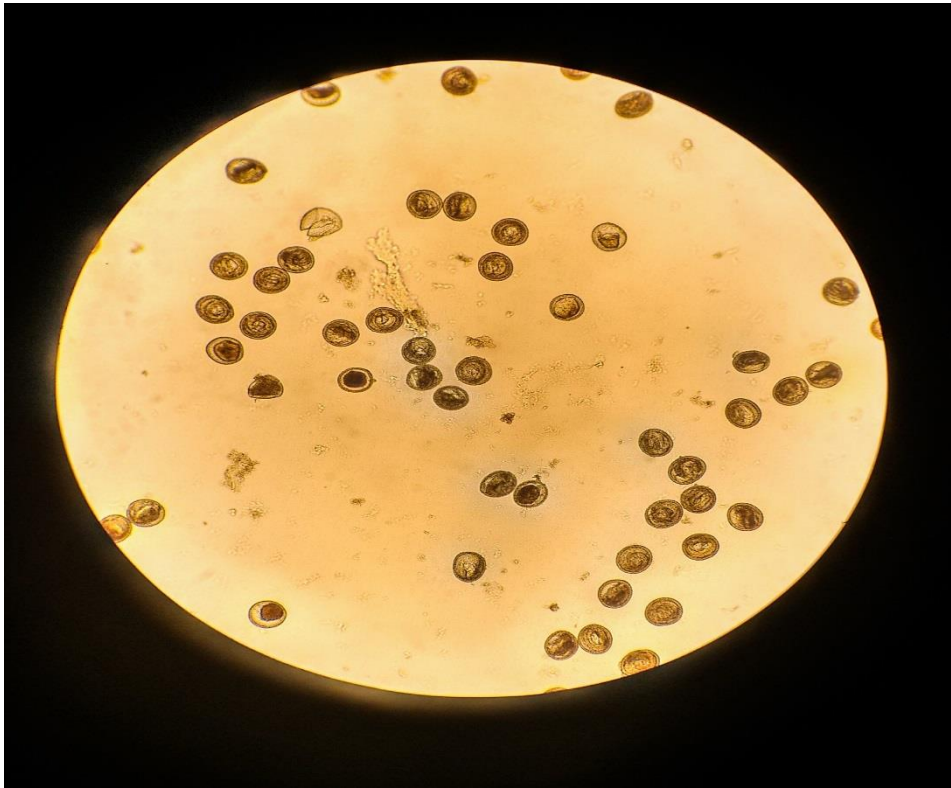
1.1 Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV)

As parasitoses são problemas de saúde pública e cada vez mais a prevalência das helmintíases aumentam, apesar dos consideráveis avanços do saneamento básico e melhor acesso à terapia anti-helmíntica (FINSTERER, 2007; CUNHA, 2016). A SLMV é transmitida ao ser humano pela ingestão de ovos de *T. canis*. Descrita por Beaver em meados do século XIX, esta síndrome era considerada como um conjunto de sinais e sintomas observáveis em vários processos patológicos como febre, hipersensibilidade e a migração e persistência de larvas vivas por período prolongado nos tecidos de hospedeiros considerados intermediários ou paratênicos, sendo esse o conceito aceito até os dias de hoje. (BEAVER, 1969; CARVALHO; ROCHA, 2011; MOTA, 2016). Em 1952, Beaver identificou larvas de *Toxocara canis* em fragmentos hepáticos obtidos por biópsia de crianças com síndrome febril, caracterizada por hepatomegalia, infiltrado pulmonar, hipergamaglobulinemia e eosinofilia, considerando estes helmintos como possíveis causadores da SLMV (BEAVER, 1952). O *Toxocara canis* é encontrado em países tropicais e em desenvolvimento, sendo a helmintíase mais comum, afetando milhões de pessoas que vivem em área de pobreza (HOTEZ, WILKINS, 2009; LOTSCH et al. 2017).

Estima-se que a soroprevalência dessa infecção no Brasil seja cerca de 39% em crianças de 6 meses a 6 anos de idade (SALVADOR, 2010; SOUZA et al., 2011).

Os vermes adultos vivem nos canídeos em média quatro meses, sendo que, por volta de seis meses quase todos são eliminados espontaneamente pelo hospedeiro natural. Produzindo cerca de 200.000 ovos/dia que saem nas fezes, os ovos conseguem sobreviver por vários meses, e até anos, em areia úmida e alta temperatura, levando algumas semanas para maturação. Os cães jovens infectados são potenciais disseminadores no ambiente, podendo liberar milhares de ovos por dia (GILLESPIE, 1988; SANTAREM et al., 2009; MOTA, 2016), sendo essas extremamente resistentes alterações climáticas. Os ovos eliminados nas fezes são embrionados e são necessárias condições adequadas de temperatura (15° a 35°C) e umidade para que estes se tornem larvados. Nessas condições, 85% dos ovos tornam-se infectantes até a 5ª semana (SANTAREM et al., 2009; ZAJAC, CONBOY, 2012). A forma do parasito é contida com larvas de 3º estágio (L3) (HALLACK, CUNHA, 1996; MAGNAVAL et al., 2001; CUNHA, 2005, FERREIRA et al., 2015), como demonstrado na figura 1.

Figura 1: Foto de ovos larvados de *Toxocara canis* mantidos no Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) da Universidade Federal de São Carlos, com aumento de 40 X em microscópio óptico comum.



Fonte: RODOLPHO, 2017 (Arquivo pessoal)

1.2Ciclo biológico

O *T. canis* é um nematódeo com aproximadamente 4 á 10 cm de tamanho (machos) e de 9 á 18cm (fêmeas) (Figura2). De acordo com Santarém; Ferreira (2009, 2016), o *T. canis* pertence ao filo: dos nematóda; ordem: Ascaridiodea; família: Toxocaridae. O hospedeiro definitivo é o cão e o homem é o hospedeiro acidental ou paratênico.

Figura2: Macho (4 a 10cm) e fêmea (9 a 18cm) de *Toxocara canis* com a característica de possuir extremidade posterior recurvada dorso ventralmente.

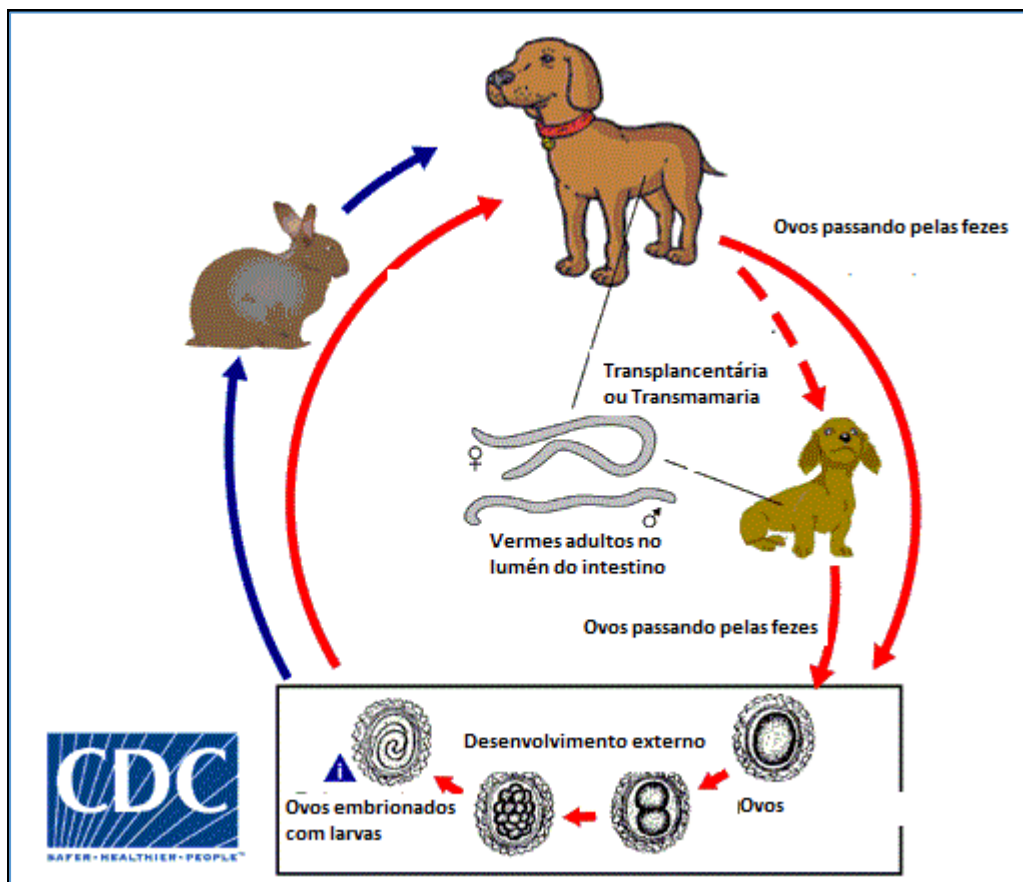


FONTE: OLIVEIRA; CORREIA,2012 (Arquivo Pessoal)

O ciclo de vida deste parasito só se completa no tubo digestivo dos cães e é neste local que as formas L3 atingem o seu estado adulto e a maturidade sexual, com a capacidade de reprodução. Após um período de incubação no solo por cerca de 21 dias, os ovos, em condições adequadas, adquirem capacidade de infecção (SANTOS, 2012). É durante este período que os ovos se tornam embrionados podendo manter-se viáveis no solo durante vários anos, estima-se 8 anos de viabilidade. Após a deglutição dos ovos por cães, estes atingem o tubo digestivo onde são liberadas as formas larvares. As larvas penetram na mucosa intestinal e atingem a corrente sanguínea, distribuindo-se por toda a circulação sistêmica – migração somática. A forma pulmonar ocorre quando as larvas L3 migram por meio do sistema sanguíneo e linfático da veia porta para o pulmão e tranqueia onde elas podem ou não ser deglutidas, quando deglutidas elas

retornam ao intestino delgado tornando em larvas adultas e completando o ciclo. As larvas podem ser encontradas em todos os órgãos dos animais que servem de hospedeiros para este parasito, podendo permanecer num estado quiescente durante anos, sem sofrerem qualquer desenvolvimento – hipobiose (CASTELO, DINIS, ROCHA, 2008; FERREIRA, 2016). De acordo com a Figura 3 podemos observar o desenvolvimento biológico do ciclo de *Toxocara canis*.

Figura 3- Esquema representativo do desenvolvimento do ciclo biológico do *Toxocara canis* nos hospedeiros definitivos (cães).



Legenda: ciclo biológico nos cães: os ovos saem nas fezes nos animais e são depositados no meio ambiente no qual o mesmo com suas favoráveis condições climáticas favorecem os desenvolvimentos de ovos embrionados com larvas L3, esses ovos são ingeridos pelo cão e atinge seu intestino e as larvas são liberadas na mucosa intestinal, penetrando nos vasos linfáticos e sanguíneos atingindo o fígado. Do fígado essas larvas caem na circulação sanguínea atingindo o coração e chegando aos pulmões e seguindo para traqueia e faringe sendo ou não deglutidas. Quando deglutidas essas larvas chegam novamente ao intestino delgado atingindo sua forma adulta. Outra forma de infecção é quando a fêmea está prenha e as larvas L3 são estimuladas pela alteração hormonal além de atingir a migração traqueal as larvas podem atingir a via transplacentária atingindo os filhotes.

Fonte: CDC, 2010. (Imagem adaptada).

O homem pode participar do ciclo deste parasito de forma acidental. Após a ingestão de ovos contendo larvas de estágio L3, estes chegam ao intestino delgado e liberam estas formas larvárias capazes de penetrar ativamente a mucosa intestinal. Por via linfática ou sanguínea, as larvas atingem a circulação porta e, por seguinte, o fígado, chegando aos pulmões, onde atravessam os capilares pulmonares e caem na artéria pulmonar e no coração, disseminando-se para todo o organismo pela circulação sistêmica. Quando o tamanho das larvas do *T. canis* excede os capilares sanguíneos, ocorre uma migração ativa e errática através da barreira celular e dos tecidos do hospedeiro, até as larvas se encistarem em algum tecido e/ou morrerem (SANTARÉM, 2009). A fase de migração larvária ocasiona uma reação inflamatória aguda com presença de eosinófilos, neutrófilos e, algumas vezes, de monócitos. Este processo característico da migração das larvas no estágio L3 de *T. canis* no hospedeiro é o que caracteriza a SLMV (BEAVER et al., 1952; RAYES, LAMBERTUCCI et al., 1999, CAMILLO et al., 2014). A eosinofilia sistêmica presente neste tipo de infecção é um excelente modelo de estudo para migração e formas atuantes de células no sistema imune, principalmente processos relacionados aos eosinófilos (CARVALHO; ROCHA,2011).

1.3 FORMAS CLÍNICAS DA SLMV E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

No homem alguns fatores contribuem para a patogênese da SLMV como: reações inflamatórias ocasionadas pela presença da larva no tecido; condições imunológicas do hospedeiro; frequência da ingestão de ovos larvados; número de larvas ingeridas; sensibilização do hospedeiro por antígenos próprios da larva; e sensibilização do hospedeiro por produtos secretados e/ou excretados pela larva ocasionando três tipos: a Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Ocular (LMO) e a Larva Migrans Oculta ou Inespecíficas (CARVALHO, ROCHA, 2011).

Quando um indivíduo é infectado por um elevado número de larvas de *Toxocara canis* ou sofre infecções repetidas, as larvas podem migrar através de vários órgãos tais como fígado, pulmões ou sistema nervoso central (SNC) e causar sintomas como febre, tosse, aumento do tamanho do fígado ou pneumonia. Esta forma de Toxocaríase é denominada de SLMV (DISEASE, 2010, CAMILLO et al 2014).

A LMO inicialmente reconhecida em olhos enucleados por suspeita de retinoblastoma, nos quais foram detectadas larvas de *Toxocara canis*, acomete principalmente crianças maiores de seis anos (QUEIROZ; CHIEFFI, 2005).

A LMO caracteriza-se por sintomas e sinais inespecíficos, que não se associam às categorias da larva migrans clássica e larva migrans incompleta. Mais frequentes em pacientes adultos, as manifestações clínicas são inespecíficas como dor abdominal recorrente, cefaléia, astenia e hepatomegalia. A eosinofilia pode estar ausente, apesar de altos títulos sorológicos para *T. canis*. São frequentemente confirmadas devido ao alívio ou ao desaparecimento de sintomas e sinais após tratamento anti-*Toxocara* (CARVALHO, ROCHA, 2011).

A resposta imunológica do hospedeiro ao parasito pode englobar tanto os fatores humorais quanto os celulares. No primeiro contato, ocorre uma reação tecidual inespecífica. O aumento da especificidade pode estar fortemente relacionado à re-exposição ao parasito, sendo caracterizado pela formação de granuloma (JACOB, OSELKA, 1991; RUBINSK-ELEFANT, 2011). A larva de *Toxocara* sp apresenta certa habilidade em sobreviver em seu hospedeiro por muitos meses, estimulando os linfócitos (Th2) com conseqüente produção de imunoglobulina E (IgE) e eosinofilia por longos períodos (BUIJS et al., 1997, RODOLPHO et al., 2014).

A infecção na etapa inicial ocorre por inflamação aguda que é caracterizada por agregados de eosinófilos, neutrófilos e alguns monócitos. Já nas infecções crônicas, as larvas são geralmente encapsuladas por granulomas maduros com centro de células mononucleadas e leucócitos. A presença das larvas não é essencial para a formação do granuloma maduro. É a liberação de antígenos *Toxocara* excreção e secreção (TES) que inicia a resposta inflamatória (CHANG, et al., 2006).

Dessa forma a infecção por *Toxocara canis* se torna um modelo excelente de estudo para processos inflamatórios eosinofílicos e que caracterizam uma resposta com perfil Th2.

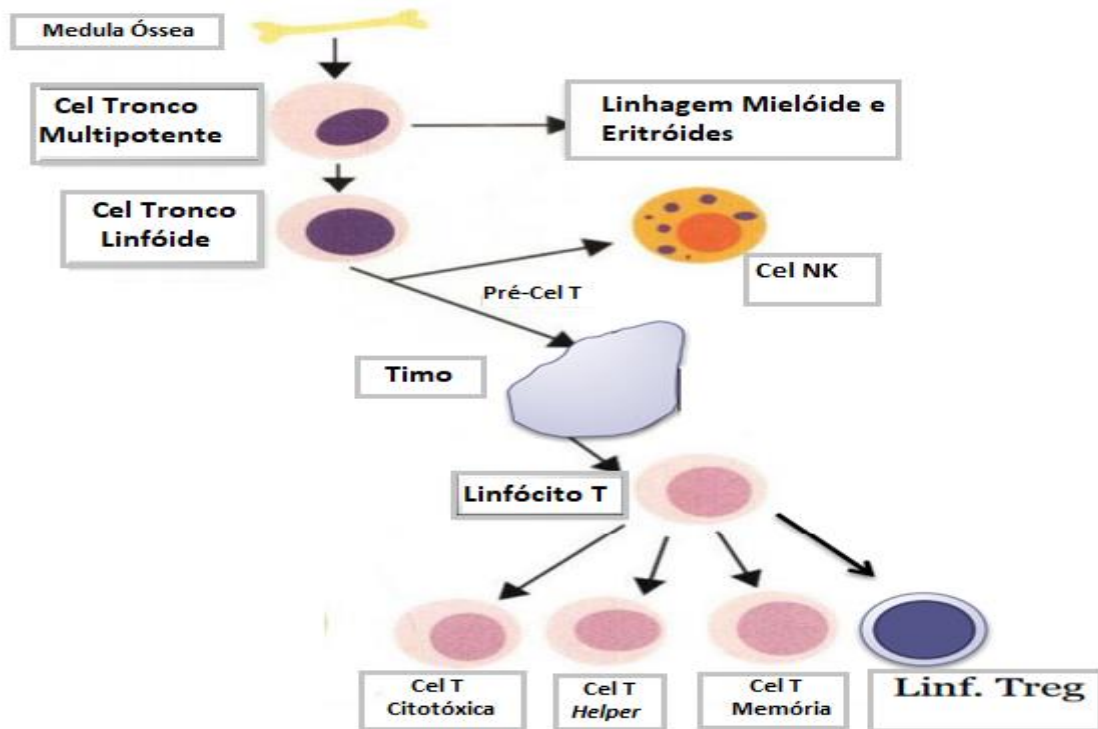
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

1.4.1 LINFÓCITOS T, TCR e MHC II

Cada indivíduo adulto possui em média no seu sangue entre 5.000 a 10.000 leucócitos por mm^3 de sangue, sendo que, ao nascimento, este valor é de aproximadamente 20.000 leucócitos/ mm^3 de sangue, decrescendo até aos doze anos de idade, em que atinge os valores de adulto. Este decréscimo verifica-se porque as barreiras naturais do organismo ainda não se encontram completamente desenvolvidas, havendo uma maior possibilidade de contrair infecções de diversas naturezas (COELHO, 2009).

Célula tronco hematopoiética pluripotente da medula óssea dão origem às células progenitoras mielóides e linfóides. Os progenitores linfóides, por sua vez, dão origem aos Linfócitos T (LT), Linfócito B (LB) e células NK (Natural Killer). As células que vão se diferenciar em LT deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre todo o processo de seleção e maturação. Apenas os LT maduros deixam o timo e migram para a circulação, figura 4 (JUNIOR et al., 2010). A nomenclatura desta célula vem desta maturação realizada no timo, sendo assim, também denominados de timócitos.

Figura 4: Hematopoiese do Linfócito T



Legenda: Hematopoese: Os linfócitos T são originados da medula óssea, onde sua maturação ocorre no Timo e logo em seguida nos órgãos linfoides são transformados em Cel. T citotóxica, Cel. T Helper, Cel. T de memória e Treg.

Fonte:VIADANA, 2013 (adaptado)

O linfócito normalmente tem entre 10-12 micrômetros de diâmetro, um núcleo redondo com cromatina condensada e citoplasma escasso pouco basofílico. Os LT possuem um receptor, designado por TCR (do inglês *T Cell Receptor*), que é específico e que, funcionalmente, serve para reconhecer o antígeno que lhe é apresentado e a ativar o linfócito. (ABBAS, LICHTMAN, 2003; MARTINHO, 2004).

O TCR é uma glicoproteína heterodimérica gerada por quatro diferentes grupos, ligada por pontes dissulfídicas que permitem o reconhecimento de uma ampla variedade de antígenos pelos Linfócitos T (ROITT et al., 2001, ABBAS, LICHTMAN, 2003; GOLDENBERG, RIZZO 2014).

Existem diversos subtipos conhecidos de linfócitos T auxiliares (ou linfócitos T *helper*): Th1, Th2, Th17; Linfócitos T supressores; Linfócitos T reguladores. Os Linfócitos T formam clones de linfócitos específicos para combater os agentes portadores dos antígenos detectados a cada ataque e os lançam na circulação. Suas células precursoras, primitivas, teriam

sido processadas, durante a vida fetal, no timo (ROITT et al 2001; COELHO,2009; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As células Th1 mediam a resposta imunológica contra agentes patogênicos intracelulares, na sua maioria. São essenciais na resistência a infecções micobacterianas, e muitas vezes responsáveis pela indução de algumas doenças autoimunes. As principais citocinas liberadas por este tipo de LT são: o Interferon- γ (IFN- γ), Linfotóxina alfa (LT- α) e Interleucina-2 (IL-2) (DAMSKER et al., 2010).

As células Th2 mediam a defesa do hospedeiro contra parasitas extracelulares, onde se incluem os helmintos. Elas são importantes também na indução e na persistência da asma e de outras doenças. São responsáveis pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 (podendo ser também encontrada na resposta reguladora), IL-13 e IL-25 (ROMAGNANI, 2000).

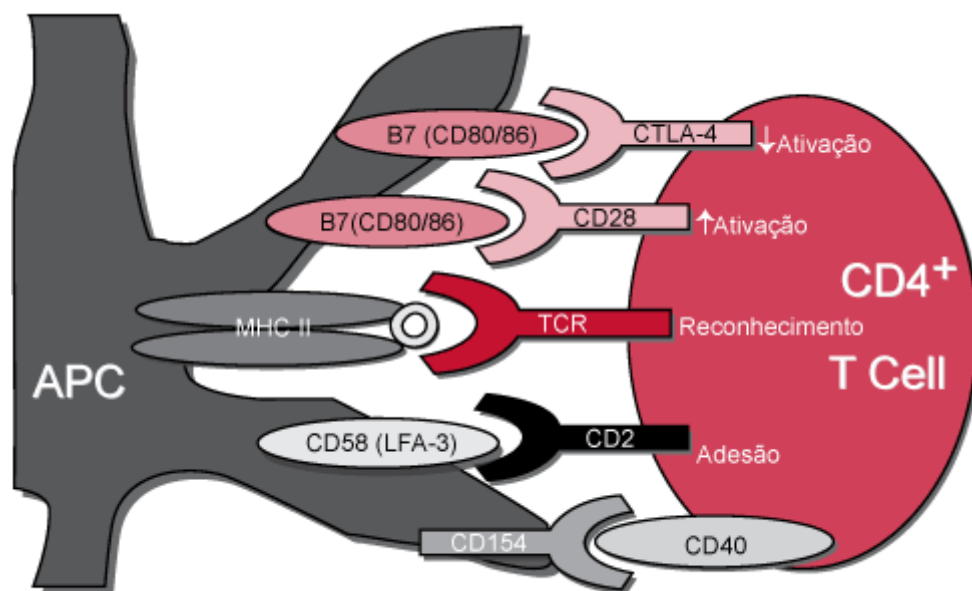
As células Th17 mediam a resposta imunológica contra fungos e bactérias extracelulares. São responsáveis também pela indução de muitas doenças autoimunes. São responsáveis pela produção IL-17a, IL-17f, IL-21 e IL-22 (EYERICH et al.,2009).

As células Treg têm uma importância vital na manutenção da tolerância, bem como na regulação das respostas do sistema imunitário. Exercem as funções supressivas através de diversos mecanismos, em que alguns deles requerem um direto contato celular. A supressão molecular é conseguida, em alguns casos, pela produção de citocinas como o Fator de Transformação do Crescimento *beta* (TGF- β , do inglês “*Transforming Growth Factor*”), IL-10 e IL-35 (RUDENSKY et al.,2011).

Quando uma célula entra em contato com algum antígeno, elas vão expressar o MHC-classe I (do inglês *Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade) na superfície, cuja expressão é ampliada por estímulos como o IFN- γ ou MHC-classe II expressos por macrófagos e LB. Esses têm a função de ligá-los aos linfócitos Th para lhe apresentar o antígeno, através da interação CD4-MHC-II e TCR dos Linfócitos T (NIKOLICH-ŽUGICH et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Ou seja, o reconhecimento das células se dá pelo MHC (*Major Histocompatibility Complex*) que se divide em dois conjuntos de moléculas de superfície celular altamente polimórficas: o MHC-Classe I e o MHC-Classe II. O MHC-I, presente na membrana celular de quase todas as células do organismo é receptor para antígenos endógenos (intracelulares) estando presente na maior parte das células nucleadas. Geralmente as moléculas de classe I são reconhecidas por Linfócitos T citotóxicos (LTc) ou CD8+ (ROITT et al., 2001; GRAÇA & KOUYOUMDJIAN 2015). Os

MHC-II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) encontram-se apenas em células que apresentam antígenos (APC – *Antigen-Presenting Cells*) como os LB, os macrófagos/monócito e as células dendríticas. Pensa-se que os MHC de classe II são os que desempenham o papel predominante na resposta imunitária específica a antígenos. Ao entrarem em contato com um antígeno, a APC apresenta o antígeno por meio do MHCII ao TCR do Linfócito T dando início a sua ativação (Figura 5) (ABBAS & LICHTMAN, 2003, NIKOLICH-ŽUGICH et al., 2004, COELHO, 2009; GOLDENBERG & RIZZO 2014).

Figura 5: Interação entre Cel T e APC.



Legenda: Apresentação de uma célula apresentadora de antígeno aos linfócitos T e suas principais interações: interação entre o MHCII apresentando o antígeno ao TCR do linfócito T, a interação entre CD80/CD86 ao CD28/CTLA4, interação das moléculas de adesão e a interação CD40 ao CD154.

Fonte: SILVA et al, 2008 (Adaptado).

1.4.2 Células apresentadoras de antígenos (APC) e moléculas coestimulatórias

As APCs são definidas por serem capazes de ingerir, processar e apresentar o antígeno. São exemplos de APCs as Células Dendríticas (CDs), macrófagos, linfócitos B e possivelmente os eosinófilos (PADIGEL, et al.; 2006, CONTI, SANTIAGO, SFORCIN, 2014), contudo, os eosinófilos possuem diferentes funções imunológicas na resposta imune efetora (PALUCKA et al., 1998).

As células dendríticas (CDs) apresentam aspecto de forma dendrítica, projeções membranosas e expressam altos níveis de moléculas de MHC de classe II em sua superfície. Elas são responsáveis por reconhecer, reter e transportar os antígenos até os sítios imunorreativos, apresentando-os aos linfócitos T *naive* (HEADINGTON; CERIO, 1990).

As CDs apresentam uma distribuição única nos órgãos linfóides secundários, acumulando-se em regiões onde, geralmente, não existem macrófagos e LB. As áreas onde os LT *naive* (inativos) são ativados são ricas em CDs, uma posição ótima para que um grande número de LT possa explorar continuamente essas APCs em busca de complexos peptídeo MHC específicos (ITANO & JENKINS, 2003; MEMPEL et al., 2004, TERRA, 2012). São consideradas APCs por serem as únicas capazes de iniciar uma resposta imune primária, contribuindo para o estabelecimento da memória imunológica e a indução da resposta imune específica (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CUTLER; JOTWANI, 2004; CONTI, SANTIAGO, SFORCIN 2014).

Os macrófagos fazem parte da resposta imune inata, fagocitam suas próprias proteínas e restos celulares durante o reparo tissular normal. Todas estas proteínas são degradadas e apresentadas pelo MHC de classe II. Proteínas próprias do organismo, contudo, não ativam LT porque na ausência de infecção, os macrófagos expressam baixos níveis de MHC de classe II e praticamente não expressam as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (JANEWAY Jr et al., 2001). São importantes células fagocíticas que capturam microrganismos invasores e participam da sua eliminação tanto por citólise direta, quanto pela apresentação de peptídeos a LT e indução de imunidade específica (AL- DARMAKI, et al, 2003).

Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares (incluindo os que se encontram na superfície celular) e se diferenciam em plasmócitos que são células secretoras de anticorpos, funcionando assim, como mediadores da imunidade humoral. Além disso, os LB expressam constitutivamente moléculas MHC classe II, mas precisam de ser ativados antes de expressar a molécula B7 coestimulatória. (ABBAS, 2008).

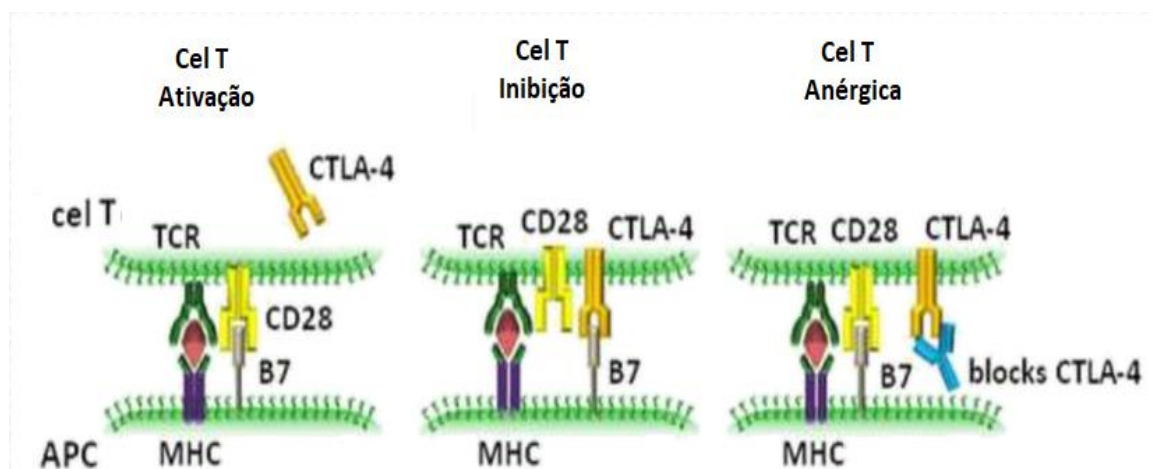
A investigação clínica e experimental tem mostrado que o eosinófilo pode funcionar como APC, sendo capaz de processar e apresentar uma variedade de antígenos em alguns modelos de doença como: na Esquistossomose, Strongyloídiase e Toxocaríase (SHI, 2004; RODOLPHO et al., 2014).

1.4.3 Moléculas Coestimulatórias (CD 80 e CD86)

Para que ocorra a ativação das células LT, são necessários duas interações e não apenas apresentação do antígeno pelo MHC-II ao TCR da Linfócito T. Outra interação fundamental é a que ocorre entre as moléculas coestimulatórias CD80 – CD86 (B71- B72) com o CD28, permitindo a ativação e proliferação das LT.

As moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são as moléculas coestimulatórias mais bem caracterizadas, sendo expressas predominantemente na superfície das APCs (HATHCOCK et al., 1994; CONTI, SANTIAGO, SFORCIN 2014). Apesar das moléculas CD80 e CD86 possuírem funções semelhantes, existem diferenças quanto a expressão dessas nas APCs e sua afinidade pelos receptores CD28 (estímulo) e CTLA-4 (inibição) presentes nos linfócitos T. A molécula CD86 possui expressão em monócitos em baixos níveis, células dendríticas e linfócitos B em repouso, que aumenta após a ligação do MHC-II ao TCR do linfócito T. A expressão de CD80 é induzida e ocorre posteriormente ao aumento de expressão de CD86. Existem evidências de que as moléculas CD80 e CD86 possuem maior afinidade pelo receptor CTLA-4 do que para CD28 presentes nos linfócitos T (HATHCOCK et al., 1994, LARSEN et al., 1994; SCARPA et al., 2015), e também que CD80 se ligue a ambos os receptores com mais avidéz que CD86 (LINSLEY et al., 1994), como pode-se observar na figura 6.

Figura 6 – Esquema representativo da interação das moléculas coestimulatórias presentes nas APC (CD80 e CD86) na ativação (CD28-B7) e inibição (CTLA-4-B7) das células T ligando aos seus receptores.



FONTE: AMER, 2014 (Adaptado).

1.4.4 EOSINÓFILOS

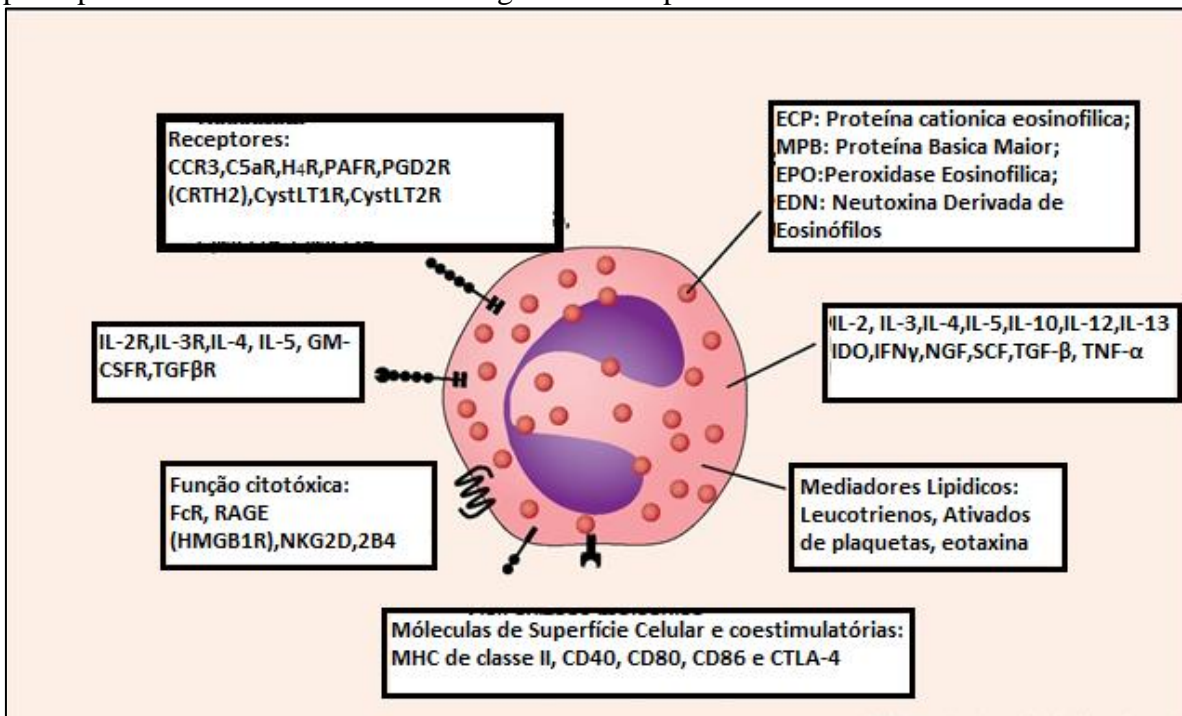
Descoberto por Paul Ehrlich no século XIX, os eosinófilos tiveram seu achado através de diferentes metodologias de fixação e coloração de leucócitos derivados do sangue e tecidos. Foi diferenciado através da quantidade de grânulos em seu citoplasma e a sua afinidade bioquímica pelo corante eosina utilizado no momento da descoberta que originou esse nome (FERNANDES, 2010).

De acordo com Chauffaile, (2010), os eosinófilos são células que possuem de 8 a 15 µm de diâmetro, geralmente com núcleo bilobulado, caracterizado pela presença de grânulos com alta afinidade por eosina. Esses grânulos contêm 4 tipos de proteínas: Peroxidase Eosinofílica (EPO, do inglês *-Eosinophil Peroxidase*), Proteínas Catiônicas Eosinofílicas (ECP, do inglês *-Eosinophil Cationic Protein*), Proteína Básica Maior (MPB, do inglês *-Major Basic Protein*) e Neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN, do inglês *-Eosinophil-Derived Neurotoxina EDN*) (COUISSINIER-PARIS, 2006; LINS et al., 2008). Além disso, possuem enzimas como colagenases e cristais de Charcot - Leyden (CLC), que possuem atividade de lisofosfolipase (SHURIN, 1995; GLEICH, ADHOLPHSON, 1986; BERRY et al., 2014). Esta célula apresenta uma série de receptores em sua membrana citoplasmática, como receptores de baixa afinidade para a porção Fc de imunoglobulinas das classes IgE, IgG e IgA e para fragmentos do complemento como C3b (WARDLAW et al., 1994; AOUBA, AMIR-MOAZAMI 2014).

1.4.4.1 Eosinófilos e suas estruturas

Os eosinófilos se distinguem de outros granulócitos como: basófilos e neutrófilos, pela presença de grânulos específicos ou secundários. Seu núcleo possui grânulos específicos que são capazes de mediar/induzir inflamação ou danos nos tecidos, incluindo proteínas básicas, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas como visto na Figura 7. (MC BRIEN, MENZIES-GOW, 2017).

Figura 7: Esquema representativo dos principais receptores, moléculas de superfície e das principais moléculas constituintes dos grânulos citoplasmáticos do Eosinófilo.



Fonte: DAVIS; ROTHEMBERG, 2014 (Adaptado)

As substâncias predominantes são proteínas: a proteína básica principal (MBP) no núcleo, a proteína catiônica de eosinófilos (ECP) na matriz celular, os eosinófilos peroxidase (EPO) e a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (GIEMBYCZ, LINDSAY, 1999).

A EPO é um membro da grande família de peroxidases de mamíferos, com atividade microbicida contra bactérias, vírus, fungos e helmintos. A EPO é o componente central na geração de espécies reativas de oxigênio por eosinófilos ativados (MITRA et al., 2000), que produz uma reação em cascata de radicais livres levando à apoptose celular.

A ECP possui atividade RNase e propriedade antiviral, antihelmíntica e antitumoral (LEUTSCHER et al., 2008; GLIMELIUS et al., 2011). Interessante destacar que a atividade RNase da EDN é 100 vezes mais potente do que a da ECP (KITA, 2011).

A MBP tem efeito tóxico para células tumorais e outras células de mamíferos, devido a sua capacidade de romper a camada lipídica, carregando negativamente a membrana celular por seu caráter altamente básico e aumentando a permeabilidade celular. A MBP também atua sobre parasitos gerando poros nas células, o que facilita a morte celular e é capaz de ativar a degranulação de basófilos, mastócitos e plaquetas (SPECTH et al., 2006).

A EDN pode atuar como alarmina, ativando e induzindo a diferenciação de células dendríticas (DOMACHOWSKE et al., 1998; YANG et al., 2008). Foi demonstrado que a EDN

produzida por eosinófilos de camundongos imunizados com Ovalbumina (OVA) é capaz de ativar células dendríticas promovendo a resposta Th2. A EDN tem a capacidade de formar poros nas células alvo, o que possibilita a entrada das moléculas citotóxicas (YANG et al.,2008).

Considerado como o mais importante receptor de citocinas e expresso em eosinófilos o receptor de IL-5 é identificado como alvo terapêutico para eosinofília grave e outras condições mediadas por eosinófilos. Os eosinófilos também expressam receptores para múltiplas outras citocinas e fatores de crescimento, incluindo IL-4, IL-13, IL-33, linfopoietina estromal tímica e fator de crescimento transformante- β (TGF- β).

Fatores quimiotáticos dos eosinófilos CCR3 ligam-se a todos os três subtipos de eotaxina (uma variedade de quimiocinas CC que funciona como um quimiotático seletivo de eosinófilos). CCR3 também se liga a várias outras quimiocinas, incluindo monócitos proteína quimioatraente-3 (MCP-3) e MCP-4. CCR1 é outro receptor de quimiocinas chave em eosinófilos, que é ativado pelo ligante-3 de citocinas quimioatraentes (CCL-3) e CCL-5 (também conhecido como RANTES-regulado na ativação, célula T normal expressa e segregada) (MURAKI, GLEICH, 2011).

As moléculas de adesão nos eosinófilos permitem que se faça á adesão a matriz extracelular, respondendo de acordo com o ambiente. Integrinas e selectinas são as principais formas de receptores de adesão expressos em membranas celulares de eosinófilos (JOHANSSON et al., 2008).

A interação ocorre no sistema imunológico os eosinófilos em sua superfície, expressam receptores pra IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Dando mais enfoque ao IgE que está relacionado ao fator alérgico estes têm um papel como células apresentadoras de antígenos, com a interação entre moléculas de MHC-II e moléculas coestimulatórias, como: CD80 e CD86 visto em pacientes avaliados com alergia (MC BRIEN, MENZES-GOW, 2017).

1.4.4.2 Tráfego dos eosinófilos

Os eosinófilos originam-se na medula óssea a partir de células precursoras hematopoiéticas CD34+ após estímulo por citocinas como: IL-3, IL-5 e Fator Estimulador de Crescimento Granulocítico-Macrofágico (GM-CSF, do inglês – *Granulocyte – Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Dentre essas, a IL-5 é a mais específica, sendo responsável pela regulação da proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos, além de estimular a sua liberação da medula óssea para a circulação periférica ou para os sítios

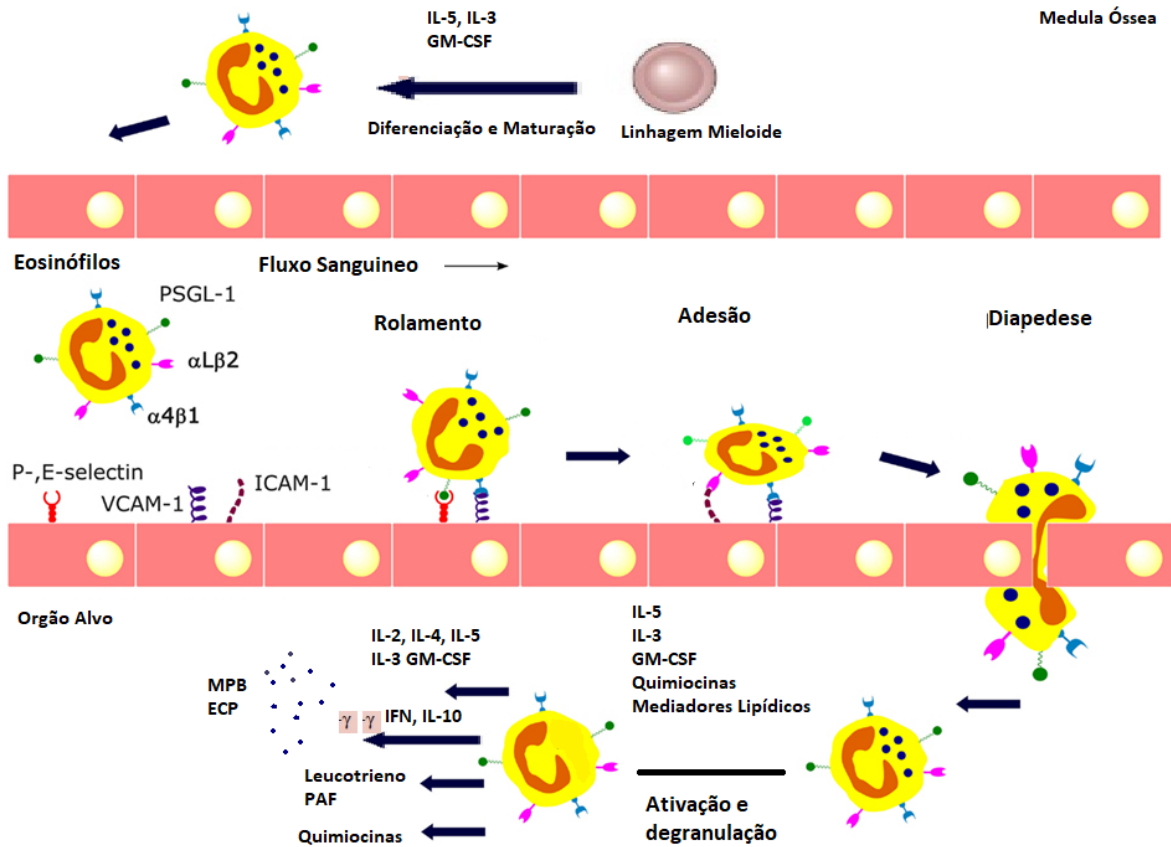
inflamatórios após exposição ao antígeno (SANDERSON, 1992). Durante sua maturação, os eosinófilos são liberados na corrente sanguínea, constituindo apenas 1-3% das células nucleadas do sangue periférico. Uma vez na corrente sanguínea, os eosinófilos são recrutados para os tecidos, onde podem ser encontrados como células residentes (MENDES et al., 2000; ORTÍZ-RIVERA, 2013).

O aumento no número de eosinófilos é uma característica importante em diversas doenças como: alergia (HUBSCHER, 1975; OKUBO et al., 1998; MONTEIRO et al., 2014), asma (PREISER et al., 1969; KOTSIMBOS; HAMID, 1997; SAKAE et al., 2014) e as infecções parasitárias (SABIN et al., 1996; RAINBIRD et al., 1998; BEHM; OVINGTON, 2000; ORTÍZ-RIVERA, 2013). Em certas doenças, os eosinófilos podem apresentar um acúmulo seletivo no sangue periférico ou em qualquer tecido do organismo, causando prejuízos ao indivíduo (ROTHENBERG, 1998; RODOLPHO et al., 2012).

A migração dos eosinófilos da circulação sanguínea para os tecidos envolve uma sequência de eventos: marginalização, rolamento, adesão ao endotélio e diapedese. Após a marginalização do eosinófilo no vaso sanguíneo, ocorre interação inicial da célula ao endotélio, por ligações fracas mediadas por moléculas de adesão da família das selectinas. A ligação fraca entre essas moléculas permite o seu rolamento. A adesão ao endotélio ocorre por ligações fortes mediadas por moléculas da família das integrinas como VLA-4 (β 1 integrina) e CD18 (β 2 integrina) (RESNIK, WELLER, 1993; FRANCISCHETTI, et al., 2010).

O recrutamento dos eosinófilos e as interações das células com as moléculas de adesão estão representadas na figura 8.

Figura 8: Representação esquemática do tráfego de eosinófilos.



Legenda: Recrutamento do eosinófilo para local da inflamação: os eosinófilos derivados da medula óssea são diferenciado e maturado através de fatores como GM-CSF, IL3 e IL5. Após ocorre a marginalização dos eosinófilos, seguindo do rolagem através das moléculas de adesão e a diapedese onde o eosinófilo chega ao local da inflamação e faz sua degranulação e ativação.

Fonte: Adaptada de (HOGAN et al, 2006)

Os eosinófilos e seus produtos (grânulos e substâncias tóxicas liberadas) têm sido implicados na gênese da lesão tecidual e hiper-reatividade pulmonar. Estudos *in vitro* demonstraram que proteínas derivadas dos eosinófilos são citotóxicas para as células do epitélio brônquico (GLEICH et al, 1979). Além disso, mediadores derivados dos eosinófilos, como Leucotrienos (LTs) e Fator de Agregação Plaquetária (PAF) são potentes indutores de broncoconstrição, hiperreatividade brônquica e aumento da permeabilidade vascular (VARGAFTIG, BRAQUET, 1987; LAROCCA et al., 2004). Em doenças alérgicas como a asma, alguns pesquisadores demonstraram que a intensidade da inflamação eosinofílica se correlaciona com a severidade clínica, hiperreatividade brônquica e grau de obstrução das vias aéreas (WARDLAW et al, 1989; KAY et al, 1999, BETALI et al, 2013).

Sabe-se que eosinofilia na SLMV é dependente de IL-5, a qual também direciona os eosinófilos da medula óssea para o sangue (FACCIOLI et al., 1996).

1.4.4.2 Eosinófilos como Células apresentadoras de Antígeno

Além disso, o eosinófilo tem sido investigado como Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), sugerindo que um dos melhores papéis imunorregulatórios dessas células seja o de funcionar como APC em alguns modelos de helmintíases (KNOPF, et. al., 1993; GALIOTO et al., 2006; RODOLPHO et al., 2014). Alguns autores mostraram que o eosinófilo estimulado com GM-CSF sob condições experimentais foram capazes de expressar MHC II, e moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (PADIGEL, 2006, DUARTE et al., 2012; RODOLPHO et. al.; 2014), sugerindo que, os eosinófilos apresentam fenótipo e podem atuar como APC *in vivo* em algumas doenças, possivelmente na asma, pneumonias eosinofílicas crônicas e diversas doenças parasitárias dentre elas a S.L.M.V.

Os eosinófilos são conhecidos por expressar MHC II na sua membrana celular em vários processos patológicos, quando se encontram ativados, por exemplo, durante quadros de asma não tratados, os eosinófilos podem expressar HLA-DR (HANSEL et al, 1991, NOAL, 2009). Observações similares foram feitas em eosinófilos do lavado broncoalveolar (LBA) e do sangue periférico de indivíduos com pneumonia eosinofílica crônica (BENINATI et al, 1993). Por outro lado, indivíduos com rinite alérgica que foram desafiados com alérgenos pulmonares apresentavam alta expressão de HLA-DR nos eosinófilos presentes tanto no LBA como no sangue periférico (SEDGWICK et al,1993).

Eosinófilos recuperados do peritônio de camundongos infectados com filária *Brugia malayi*, apresentaram alta expressão de HLA-DR na sua superfície (MAWHORTER et al, 1993). As diferenças observadas em diversos modelos experimentais sugerem que os eosinófilos podem ser diferentemente induzidos pelo microambiente do compartimento onde ele se encontra e passa a apresentar um fenótipo que permita a apresentação de antígeno numa resposta imune específica nesses processos.

Van Rijt e colaboradores (2003) demonstraram que eosinófilos isolados do lavado broncoalveolar de camundongos desafiados com OVA (Ovoalbumina) foram incapazes de ativar células T *naïve in vivo* e *in vitro*. Entretanto, nesse mesmo estudo, após serem expostos ao cloreto de amônio, um inibidor da acidificação lisossomal, tiveram inibição desse processo (LOSS et al, 1993; ZIEGLER et al, 1982), promovendo lise de eritrócitos. Adiante,

investigações têm mostrado que quando os eosinófilos são purificados com métodos alternativos para lise de eritrócitos, usando salina hipotônica, eles são capazes de funcionar como verdadeiras APCs (WANG et al, 2007).

Pesquisas realizadas em nosso laboratório demonstraram que os eosinófilos têm a capacidade de expressar moléculas coestimulatórias (CD80, CD86) e molécula de MHC-II, quando essas são recuperadas de camundongos no 18º dia de infecção com *T. canis* (RODOLPHO, et al., 2014). Neste contexto, os eosinófilos migrariam via linfonodos regionais, onde seriam capazes de encontrar células T CD4+, promovendo proliferação e produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (AKUTHOTA et al., 2008). Contudo, KOEFFLER e colaboradores em 1980, demonstraram a expressão do antígeno Ia, (MHC II/HLA-DR) em eosinófilos humanos inativos, mas não em eosinófilos maduros. Alguns anos depois, a importância de HLA-DR no processamento e apresentação de antígeno fora reconhecida através de demonstração que eosinófilos maduros estimulados com GM-CSF expressavam MHC-II (LUCEY et al., 1989). No entanto, podemos sugerir, em estudos anteriores, que os eosinófilos poderiam atuar como APC, apresentando antígenos protéicos via MHC II (RODOLPHO, 2012).

Neste contexto, as evidências sobre esse importante papel e o pouco conhecimento sobre como os eosinófilos atuam como APC são pouco compreendidos, e nos levaram a investigar se, além desse fenótipo por nós evidenciado, os eosinófilos são capazes de se comportar com APC e ativar células T *naive* estimuladas por antígenos de *T. canis*.

Comparações com outras células consideradas APCs “profissionais” *in vitro* e *in vivo*, como células dendríticas e macrófagos, nos permite compreender como e quando essas células apresentariam esse fenótipo para atuar como APC. Dessa forma, foi avaliado o perfil das populações de macrófagos, linfócitos, células dendríticas e eosinófilos como APCs na infecção com *Toxocara canis*, no 18º após infecção, onde ocorre o pico da eosinofilia. Além disso, utilizamos antígenos de *T. canis* para avaliar o fenótipo das células do baço após o estímulo ou não com os antígenos de *T. canis ex vivo*.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos eosinófilos como células apresentadoras de antígenos (APCs) *in vitro* e *ex vivo* em camundongos infectados com *Toxocara canis*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão *in vitro* das moléculas associadas à apresentação de antígenos e ativação celular (MHC II, CD80, CD86 e CD69) em eosinófilos.
- Avaliar e comparar a expressão no modelo *ex vivo* de moléculas associadas à apresentação de antígeno e/ou ativação celular por eosinófilos (MHC II, CD80, CD86, F4/80, CD19 e CD69), monócitos (MHC II, CD80, CD86, CD69, CD19 e F4/80), linfócito B (MHC II, CD80, CD86, CD69, CD19 e F4/80) e linfócito T (MHC II, CD28 e CD3);
- Correlacionar a frequência e aspectos fenotípicos (MHC II, CD80, CD86, F4/80, CD19 e CD69) de eosinófilos com expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos/ativação celular por monócito (MHC II, CD80, CD86, CD69, CD19 e F4/80), linfócito B (MHC II, CD80, CD86, CD69, CD19 e F4/80), linfócitos T (MHC II, CD28 e CD3) no contexto *ex vivo* no sangue, baço e medula óssea, durante a infecção experimental murina por *T. canis*;
- Avaliar a produção de citocinas IL-5, IFN- γ e IL-4 no plasma dos animais infectados ou não com *T. canis* no 18º dia após infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, pesando entre 15 e 18 gramas, provenientes do Biotério Unidade II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

Esses animais apresentam o certificado SPF (do inglês- *Specific Pathogen Free*), o que garante serem livres de patógenos, e foram mantidos no Biotério do DMP-UFSCar com livre acesso à água e alimento. O delineamento experimental deste projeto se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) dessa Universidade Protocolo nº. 058/2013. Foi realizado apenas 1 experimento com análises individuais de cada camundongo sendo 9 animais do grupo controle e 10 animais do grupo infectado com *T. canis*.

3.2 OBTENÇÃO DE OVOS LARVADOS (L3) DE *T. canis*

Os vermes, provenientes de cães jovens, foram doados pelo Prof^o Dr. Fabio Ribeiro Braga, do Laboratório de Parasitologia Experimental da Universidade de Vila Velha – ES. As fêmeas foram dissecadas e mantidas em estufa no Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI - UFSCar) em placas de Petri, contendo formalina 2%, com temperatura de 32°C em atmosfera úmida, para atingir seu estágio Larvário (L3). Os ovos foram recuperados de vermes adultos de *T. canis* (fêmeas) e mantidos nas mesmas condições, sendo observados semanalmente, até atingirem o desenvolvimento da larva no estágio L3. O desenvolvimento completo destes ovos foi observado, em média, em 4 semanas (entre 21 a 28 dias).

3.3 EXTRAÇÃO DO ANTÍGENO DA LARVA DE *T. canis*

Para obtenção do antígeno excretório: os ovos foram transferidos da placa de Petri para tubos cônicos de 50 mL. Posteriormente foram lavados três vezes e centrifugados com água destilada estéril a 978xg por 5 minutos. Após a lavagem os ovos foram observados em

microscópio óptico para determinar a viabilidade, utilizando azul de tripan. Após a verificação da viabilidade os ovos foram ressuspensos em hipoclorito de sódio a 5% por no máximo 5 min e lavados com salina de três a quatro vezes, nas mesmas condições anteriormente descritas, para retirada do hipoclorito. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 978xg por 5 minutos em meio RPMI completo (Soro Bovino Fetal - SBF 10%; Streptomicina e ampicilina (100 uL/mL) a 37°C. Os ovos foram transferidos para Erlemeyers contendo perolas de vidro (estéreis), sendo realizados movimentos circulares no vortex por 1min a cada dois dias para rompimento da membrana e liberação das larvas.

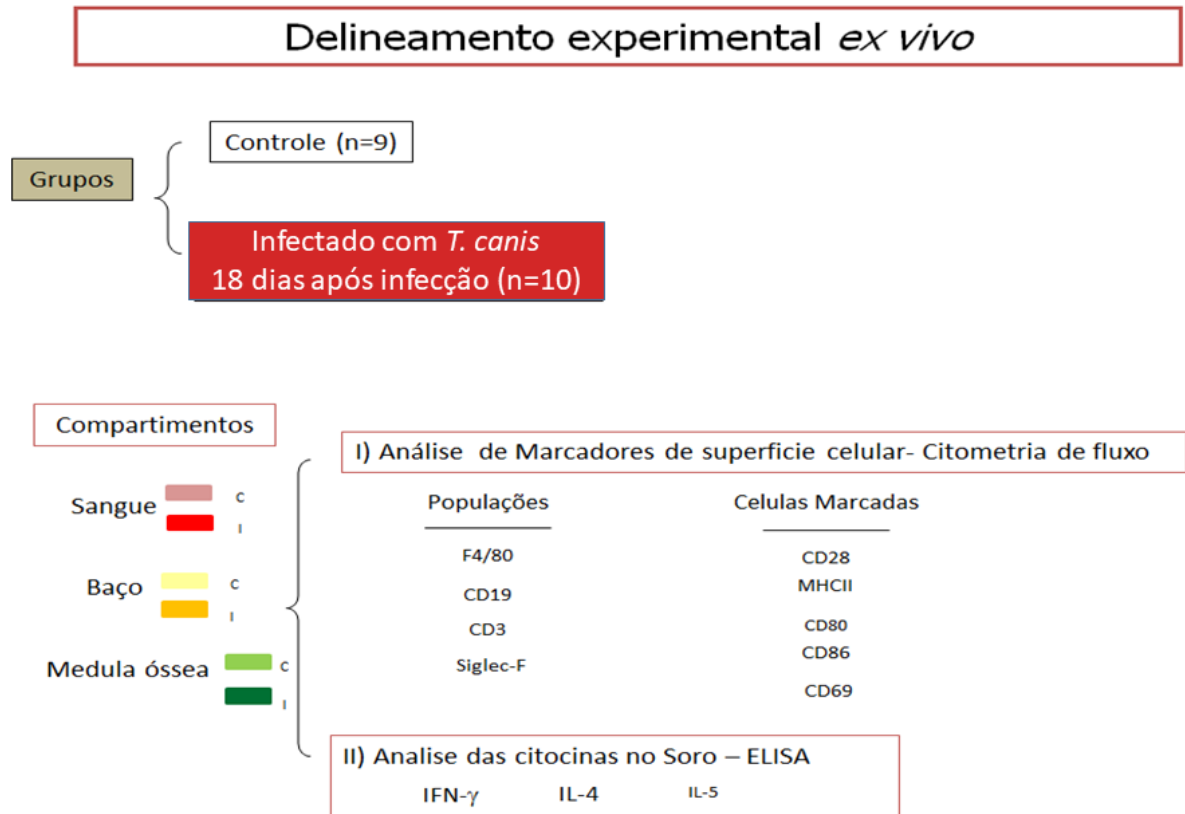
Para extração dos antígenos excretório e secretório das larvas, as mesmas foram incubadas em meio de RPMI completo (50 mL) em estufa a 37°C com atmosfera úmida e com 5% de CO². O sobrenadante do cultivo foi coletado semanalmente e centrifugado 2000 xg/5 min e congelado -20°C até o uso. Após a retirada do sobrenadante, o cultivo foi preenchido novamente para 50 mL com meio RPMI completo.

3.4 CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO

Os tubos contendo antígenos de excreção e secreção das larvas foram descongelados e a solução foi filtrada com filtro (0,22 µm), para remoção de ovos e larvas que possam ter permanecido na solução, restando apenas o antígeno. Foi utilizado Vivaspin 20 MWCO 3kDa – GE, para concentração dos antígenos, onde foram colocados 14 mL da cultura por vez e centrifugado a 8.000x g/ 3h. Após a centrifugação o antígeno foi quantificado pelo método de Bradford. O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie Brilliant Blue*” BG-250 (BRADFORD,1976). Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm, possibilitando a verificação da concentração utilizando um espectrofotômetro (CAMPTON,1985).

3.5 EXPERIMENTO *ex vivo*

3.5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *ex vivo*



3.5.2 INFECCÃO

Os camundongos foram infectados com ovos de *T. canis*. A infecção dos camundongos foi realizada oralmente com 1.000 ovos/0,3mL salina, empregando-se cânulas apropriadas (SUGANE & OSHIMA, 1982).

3.5.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO SANGUE

O sangue foi obtido através de sangria total dos animais após 18 dias de infecção por meio do seio venoso orbital com ajuda de micropipetas de vidro juntamente com EDTA, para evitar a coagulação em experimento *ex vivo*. As células sanguíneas foram preparadas para análise da expressão das moléculas (MHC II, CD80, CD86, CD28, CD69, CD3, CD19, F4/80 e Siglec F) na superfície das células por meio de citometria de fluxo.

3.5.4 OBTENÇÃO DO BAÇO

Os baços dos camundongos foram retirados, após eutanásia em câmara de CO₂ no 18º dia após infecção, com auxílio de pinças e tesouras. A suspensão celular do baço foi obtida com a maceração, realizada com auxílio de um êmbolo de uma seringa de 5 mL e filtrada para retirada do resto tecidual da amostra.

Em tubos cônicos de 15 mL foi adicionada a suspensão celular obtida e completada com meio RPMI até 10 mL, deixando decantando em banho de gelo por 15 a 20 min. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, desprezou o “pellet”, adicionou-se RPMI até completar 6mL e, em seguida, foi centrifugado por 7 min, 1200rpm a 18°C.

Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e realizado a lise das hemácias com 9 mL de água ultrapura (MiliQ) sob agitação leve no vortex. Imediatamente após isso, foi adicionado 1mL de PBS10x e centrifugou-se por 7 min, 1200rpm a 18°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o “*pellet*” foi ressuscitado em 1 mL com meio RPMI completo e contou-se a viabilidade celular. Após a contagem da viabilidade celular, as células foram distribuídas nos tubos e a citometria de fluxo foi realizada.

3.5.5 OBTENÇÃO DA MEDULA ÓSSEA

Foi realizada a dissecação dos fêmures e das tíbias dos camundongos infectados e não infectados, com a retirada cuidadosa da musculatura dos animais evitando a perfuração dos ossos. Após a retirada da musculatura os fêmures e as tíbias foram colocados em PBS e mantidos resfriados até obtenção dos fêmures e tíbias de todos os camundongos. Em seguida, em uma capela com fluxo de ar para manter a esterilidade, os fêmures e tíbias foram colocados em placa de Petri com álcool 70%. Com auxílio de uma pinça e uma tesoura, ambas as

extremidades dos ossos foram cortadas e com ajuda de uma agulha de insulina e uma seringa de 5 mL, os ossos foram lavados com PBS 1x dentro de um tubo cônico de 15 mL para retirada da medula óssea. Após a retirada da medula óssea de todos os ossos, os mesmos tubos foram homogeneizados, adicionou-se 10 mL de PBS 1x e centrifugou-se por 10 min a 1500 rpm. Esta amostra foi utilizada para pesquisar a população de eosinófilos (CD80, CD86, MHC II e Siglec F) também o marcador CD69 para avaliar ativação das populações através da citometria de fluxo.

3.5.6 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade do baço e da medula óssea foram realizados em uma diluição 1:2 (10uL de amostra + 10 uL de corante azul de tripan), homogeneizado e colocado na lâmina. A leitura foi realizada no contador Countess, no qual foram observadas as células vivas e a viabilidade celular. O azul de tripan tem a função de corar células mortas.

3.5.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS

A análise da expressão das moléculas (CD80, CD86, MHC II, CD28, CD19, F4/80, CD69, CD3 e Siglec F) foi realizada por citometria de fluxo, no aparelho BD FACS FORTESSA, situado na plataforma de citometria de fluxo da Fiocruz (Centro de Pesquisas Rene Rachou -Belo Horizonte), com auxílio durante a aquisição e análise dos resultados, sob a responsabilidade do Dr. Olindo Assis Martins Filho.

Os anticorpos monoclonais (Tabela 1) foram utilizados para análise das moléculas envolvidas nas funções de APC dos eosinófilos. Para isso, foi realizada a técnica de citometria de fluxo (*Fluorescence-Activated Cell Sorting* - FACS) das amostras estudadas (cultura, sangue, baço e medula óssea). Para esta técnica foram utilizados marcadores que apresentam fluorescência específica para cada anticorpo. Cada marcador emite um determinado comprimento de onda após a excitação por luz (laser) no citômetro.

Tabela1: Anticorpos utilizados

Anticorpo	Fluorocromo	Fenótipo Alvo de Estudo
CD80	FITC	Ativa célula T, ligante de CD28.
MHC II/ IAb	FITC	Expressa na superfície de células humanas. Linfócito T ativado, monócito pró- inflamatório
CD86	APC	Ativa célula T, ligante de CD28.
CD19	PerCP-Cy	Linfocitos B
Siglec- F	PE	Eosinófilos
F4/80	BV421	Monócitos
CD28	Pecy.5	Ativa linfócitos T
CD69	FITC	Molécula importante na ativação inicial de linfócitos.
CD3	PE	Identificação de linfócitos T, NKT.

FITC = Isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; BV421=Violeta Brilhante 421; PerCP-Cy= Peridinin Chlorophyll Protein; Pcy.5= ficoeritrina cianina 5, APC= Allophycocyanin

3.5.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados foram expressos na forma de histograma que são representados em mediana da intensidade de fluorescência, que reflete a expressão das moléculas (CD80, CD86, MHC II, CD28, CD19, F4/80, CD69, CD3 e Siglec F) na superfície das células para experimento *ex vivo*. As medianas das intensidades de fluorescência das moléculas foram determinadas em populações selecionadas, que representadas por complexidade e granulosidade celular, dividindo em populações de linfócitos, monócitos/macrófago ou eosinófilos. Os resultados da citometria de fluxo se dão por IMF (Intensidade da Mediana de Fluorescência) ou porcentagem de células positivas para cada subconjunto celular.

3.5.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

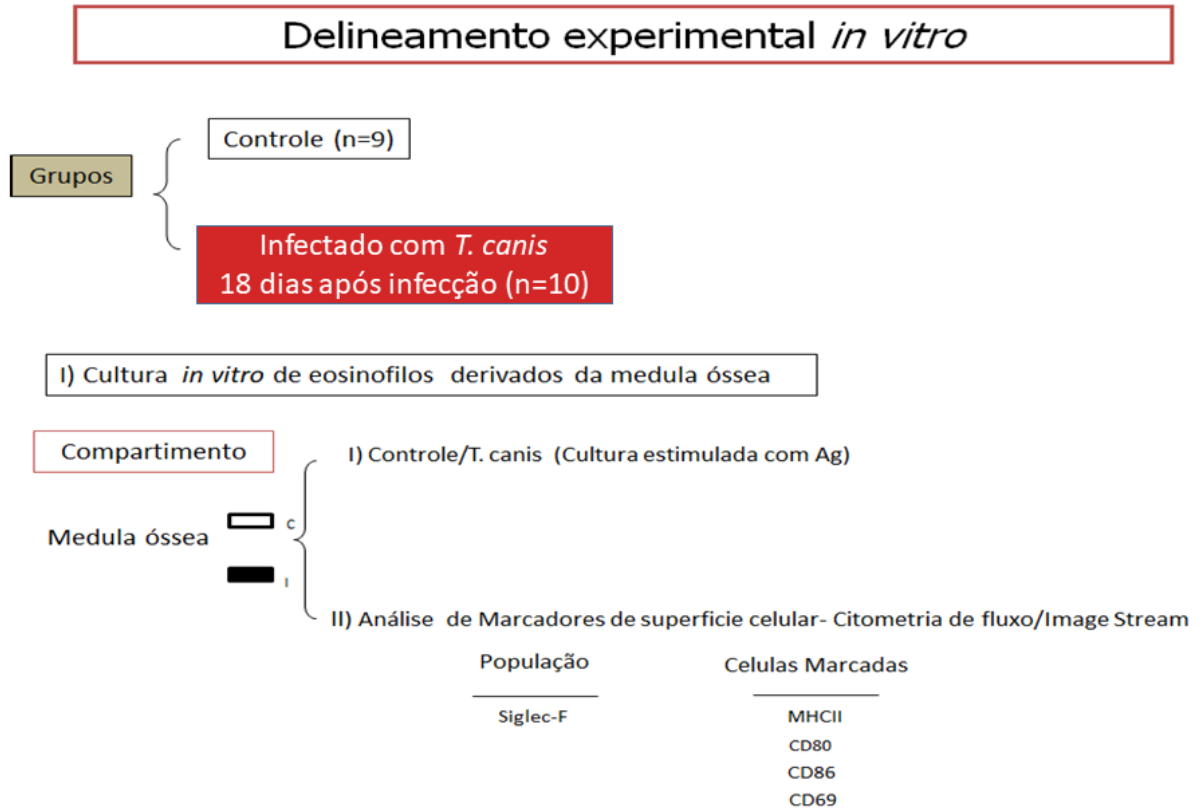
Para a quantificação das citocinas IFN- γ , IL-15 e IL-4 foram utilizados os antígenos de *Toxocara canis*. O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante (BD Biosciences®).

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de uma solução contendo o tampão e o anticorpo primário específicos para cada citocina. As placas foram incubadas por até 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e foi adicionado 200 μ L da solução de bloqueio (PBS com 5% de albumina de soro bovino-BSA). Novamente, as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e depois lavadas. Após, foram adicionadas as diferentes diluições da citocina recombinante padrão e as amostras em estudo (100 μ L/poço) diluídas 1:2 (plasma) em PBS. A primeira concentração da curva de IFN- γ , IL-15 e IL-4 das citocinas recombinante padrão foi de 5000 pg/mL, a qual foi sucessivamente diluída na base 2 até 9,76 pg/mL. Após incubação por 2 horas, foi feito novo ciclo de lavagem e adicionado 100 μ L/poço do anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 0.125 μ g/mL). Após nova incubação de 1 hora a temperatura ambiente e novo ciclo de lavagem, foram adicionados (100 μ L/poço) da enzima estreptoavidina (1:1000) diluída em PBS e soro bovino fetal 10%. Depois de 30 minutos a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100 μ L/poço do substrato. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, a reação foi bloqueada adicionando-se 50 μ L/poço de H₂SO₄ 1M.

O ensaio foi realizado em duplicata. A leitura da absorbância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro de placa (TPReader NM-ThermoPlate). As soluções e o fator das diluições foram realizados de acordo com o kit de cada citocina. A análise foi feita a partir da curva de titulação dos padrões das citocinas e as concentrações finais foram determinadas em pg/mL.

3.6 EXPERIMENTO *in vitro*

3.6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *in vitro*



3.6.2 CULTURA DE EOSINÓFILOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE MURINOS (BMEOS)

Os eosinófilos provenientes da medula óssea de camundongos Balb/c foram obtidos, de maneira estéril, para isso a medula óssea foi extraída como descrito no item 3.5.5. Posteriormente a extração da medula óssea o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspendidas em 3 mL de meio RPMI completo (20% de SBF, 2 mM de L-Glutamina, 1 mM de Piruvato de sódio, ampicilina 100 µl/mL) homogeneizados e transferidos para garrafas de cultura. As garrafas foram preenchidas com meio de cultura até completar 5-6 mL e mantido em cultura (LUTZ et al 1999).

3.6.3 CULTURA DE EOSINÓFILOS

As células foram cultivadas em condições estéreis com meio RPMI completo, até o 4º dia de cultura o meio utilizado foi suplementado com 100ng/mL de GM-CSF. A partir do 4º dia o meio contendo GM-CSF foi completamente substituído por meio fresco contendo 10ng/mL de IL-5 murina recombinante. No 8º dia de cultura, as células do sobrenadante foram centrifugadas e transferidas para garrafas médias e mantidas em meio fresco suplementado com IL-5 murina recombinante. Sendo realizada a substituição da metade do meio por meio fresco a cada dois dias até atingir 14 dias.

3.6.3.1 Co-cultura

Ao completar 14 dias da cultura de eosinófilos, foram adicionados no grupo controle e no grupo infectado com *T. canis* 100ug/mL de Ag de *T. canis*, resultando em grupo controle, Controle/Ag, infectado e Infectado/Ag estimulado com *T. canis* por 24horas as células foram contadas em câmara de Neubauer e reajustadas para o fator de 1×10^6 células /mL, foi realizada citometria de fluxo.

3.6.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Para o experimento *in vitro* utilizamos o mesmo protocolo *ex vivo* 3.5.8. As moléculas (CD80, CD86, CD69 e MHC II) e as populações foram divididas em Siglec F+ (FCS^{low}) e Siglec F+ (FSC^{high}). Os resultados da citometria de fluxo se dá por IMF (Intensidade da Mediana de Fluorescencia) ou porcentagem de células positivas para cada subconjunto celular. Para o experimento *in vitro*, as células foram submetidas ao aparelho “Image Stream” que permite mostrar as imagens instantâneas e a fluorescência de cada molécula relacionada.

3.7 ANÁLISES DOS DADOS

Neste estudo foram aplicadas abordagens de análise de dados para investigação observacional do perfil imunológico dos camundongos infectados ou não com *T. canis* como detalhado abaixo: (1) Análise estatística convencional; (2) Análise não convencional entre os biomarcadores; (3) Rede de interação entre os biomarcadores.

3.7.1 (1) Análise estatística convencional

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram normalizados pelo score Z, interpretado de acordo com o teste T, e expresso com média \pm SEM. Para as diferenças significativas utilizamos o teste *Mann-Whitney*. Para significância estatística consideramos $p < 0.05$. O *software* utilizado foi o *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, USA).

3.7.2 (2) Análise de assinatura de biomarcadores

Nesta análise todo o conjunto de dados de cada biomarcadores foi utilizado para calcular o valor da mediana global, usada como o ponto de corte para classificar camundongos com *baixos* ou *altos* produtores de um determinado biomarcador, para gerar diagramas de grupo controle (cores claras) e grupo infectado (cores escuras). Os diagramas foram utilizados para calcular a frequência individual de cada biomarcador relacionado aos camundongos individualmente para cada grupo. Os dados relevantes (sendo frequência $>50\%$) foram destacados em negrito. Os gráficos de radares foram construídos para caracterizar a frequência global de cada população (Siglec F+, CD19+, CD3+, F4/80+) dos diferentes compartimentos.

3.7.3 (3) Rede de interação entre os Biomarcadores

Para avaliar a associação entre os biomarcadores, o coeficiente de correlação Spearman's foram calculados para o grupo controle e grupo infectado com *T. canis*. Foram considerados significativo $p < 0.05$. Os testes de correlação foram realizados no *GraphPad Prism* versão 5.0 (San Diego, CA, EUA). Cada correlação foi representada por uma interação entre dois biomarcadores usando o *software Cytoscape* (versão 2.8; <http://www.cytoscape.org>), conforme relatado (SHANNON *et al.*, 2003). As redes de biomarcadores foram construídas para grupo controle e grupo infectado com *T. canis* usando layouts circulares e conexões entre os biomarcadores designados como linhas, com espessura de acordo com o índice de correlação (r). A correlação é demonstrada como negativa ($r < 0$), moderada ($R < 0.68$) ou positiva ($r \geq 0.68$) de acordo com estudos prévios (TAYLOR, 1990). A correlação negativa indica que o crescimento de uma das variáveis implica, em geral, no decréscimo da outra. A correlação positiva indica, em geral, o crescimento ou decréscimo concomitante das duas variáveis consideradas.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil fenotípico dos eosinófilos, monócitos, linfócito B e linfócito T após a infecção experimental com *T. canis* em camundongos.

Para caracterizar o papel dos eosinófilos durante a infecção experimental de *T. canis* em camundongos, o perfil fenotípico de diferentes subconjuntos de leucócitos foi avaliado. As estratégias de seleção para definir monócitos/macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e nossa população alvo eosinófilos estão descritas na Figura 9. As populações foram analisadas no grupo controle e infectado de acordo com sua hierarquia F4/80+, CD19+, CD3+ e Siglec F+ (Figura 9).

A análise de dados indicou que o perfil da infecção por *T. canis* na população dos monócitos/macrófagos induziu uma diminuição significativa no grupo infectado CD86 (sangue), CD80 e CD86 (baço), quando comparado com o grupo controle e um aumento significativo MHCII no baço grupo infectado quando comparado com o grupo controle (figura10 A).

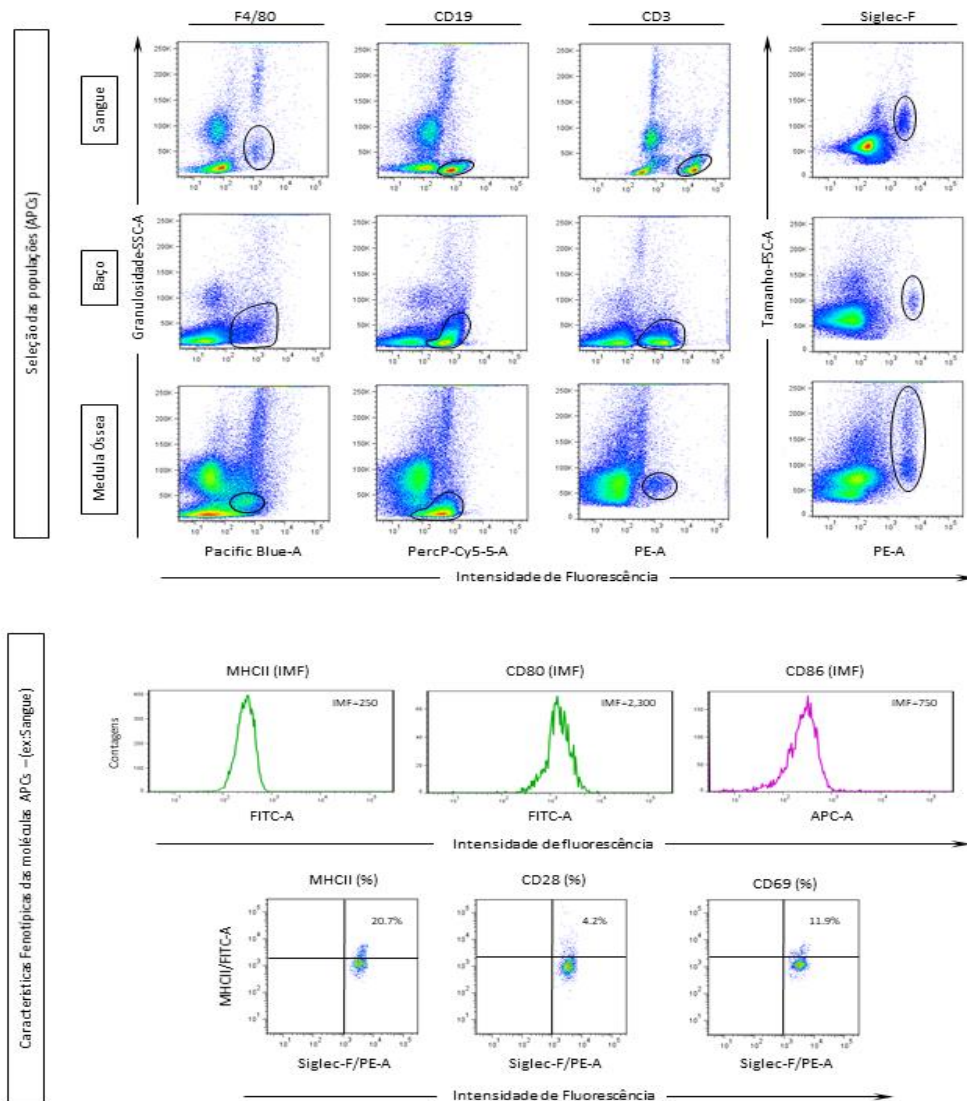
Nas populações de linfócitos B (CD19 +), a infecção por *T. canis* teve um perfil que promove uma diminuição significativa da expressão de CD80 (sangue periférico), MHC-II (medula óssea), no grupo controle quando comparado ao grupo infectado e um aumento significativo CD86 da medula quando comparamos o grupo infectado com o grupo controle (Figura 10B).

Na população de linfócitos T CD3 +, teve um perfil de infecção com uma expressão de MHC-II aumentada no baço quando comparamos o grupo infectado com o grupo controle e uma diminuição do MHCII do sangue e da medula quando comparamos o grupo controle com o grupo infectado.. Além disso, a expressão de CD28 é aumentada em células T de CD3 + esplênicas após infecção por *T. canis* como mostrado na (Figura 10C) .

Na população alvo, os eosinófilos (Siglec-F +) demonstraram várias alterações significativas após o perfil da infecção com *T. canis* como se segue: as expressões CD28, MHC-II, CD69 são reguladas positivamente, enquanto o CD86 é *downregulated* (menos expressa) no sangue. As moléculas CD80 e CD69 são expressa significamente com uma diminuição no baço do grupo infectado quando comparado com o grupo controle; as

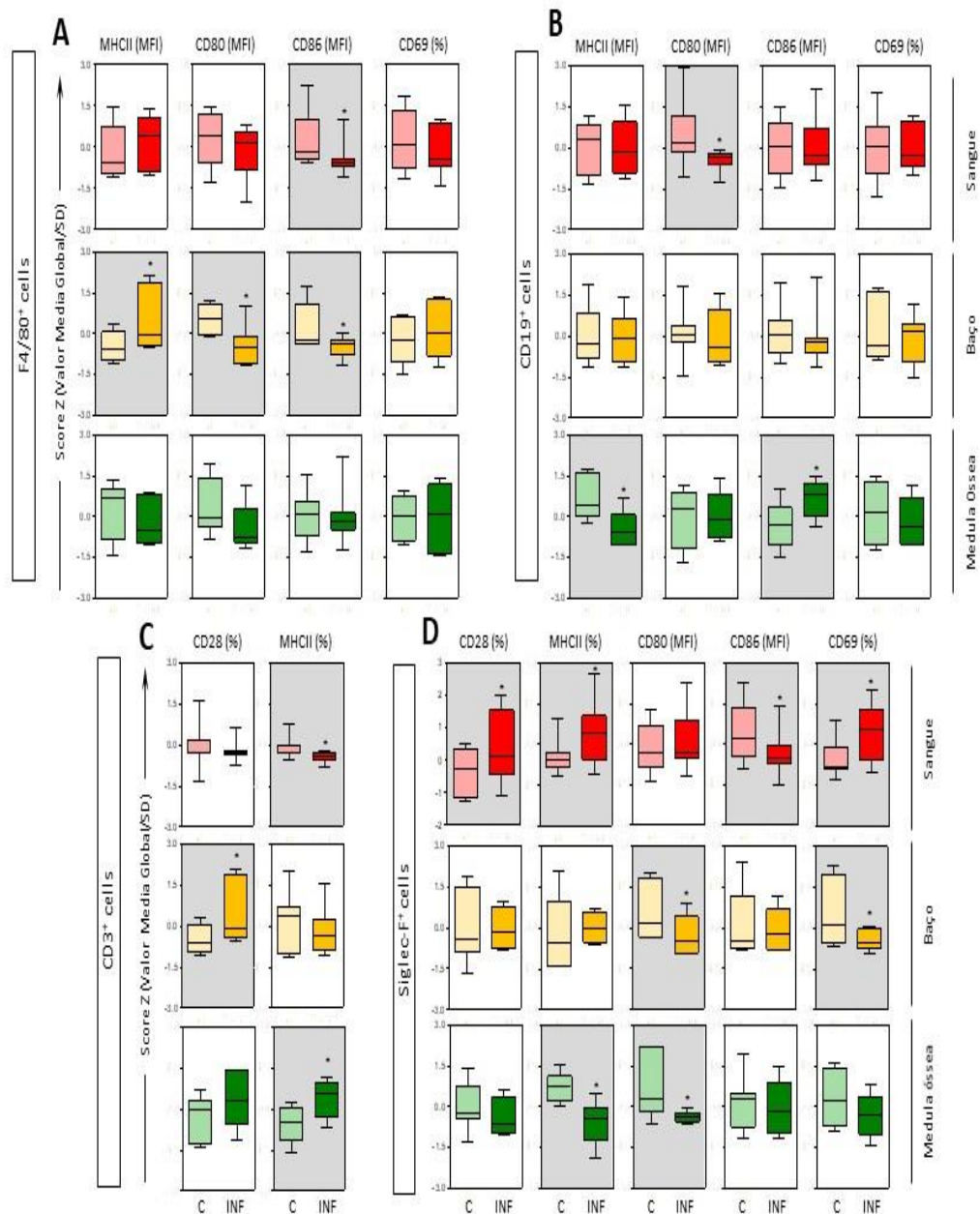
moléculas MHC-II e CD80 são significativamente diminuídas na medula óssea de camundongos infectados com o *T. canis*, em comparação com o grupo controle (Figura 10D).

Figura 9: Estratégias da seleção da população para análise fenotípica de células apresentadoras de antígenos por citometria de fluxo.



Legenda: As populações foram selecionadas de acordo com sua expressão fenotípica de marcadores de superfície para identificar: monócitos/macrófagos (F4 / 80), linfócitos B (CD19), linfócitos T (CD3) e a população alvo, eosinófilos (Siglec-F), nos diferentes compartimentos analisados: sangue, baço e medula óssea. As moléculas relacionadas à ativação e à apresentação de antígenos foram avaliadas em cada população por Intensidade da Mediana de Fluorescência e por histogramas ou porcentagem de células positivas .

Figura 10: Expressão de moléculas relacionadas à ativação por células apresentadoras de antígeno desencadeadas pela infecção por *T. canis*.



Legenda: Perfil de ativação global de monócitos/macrófagos F4 / 80 + (A), linfócitos B CD19 +(B), linfócitos T CD3 + (C) e Siglec-F (eosinófilos) (D) foi avaliado no grupo controle (C) e grupo infectado por *T. canis* (INF). A expressão das moléculas de superfície CD28, MHC-II, CD80, CD86 e CD69 foi medida nestas populações de três compartimentos: sangue (vermelho), baço (amarelo) e medula óssea (verde). Os resultados são expressos por score-Z (valor global da mediana / SD) da IMF ou porcentagem de células positivas para cada população. As diferenças estatísticas entre grupo controle e grupo infectado com *T. canis* foram destacadas como * p < 0,05.

4.2 Assinaturas de Biomarcadores na análise por infecção de *T. canis*.

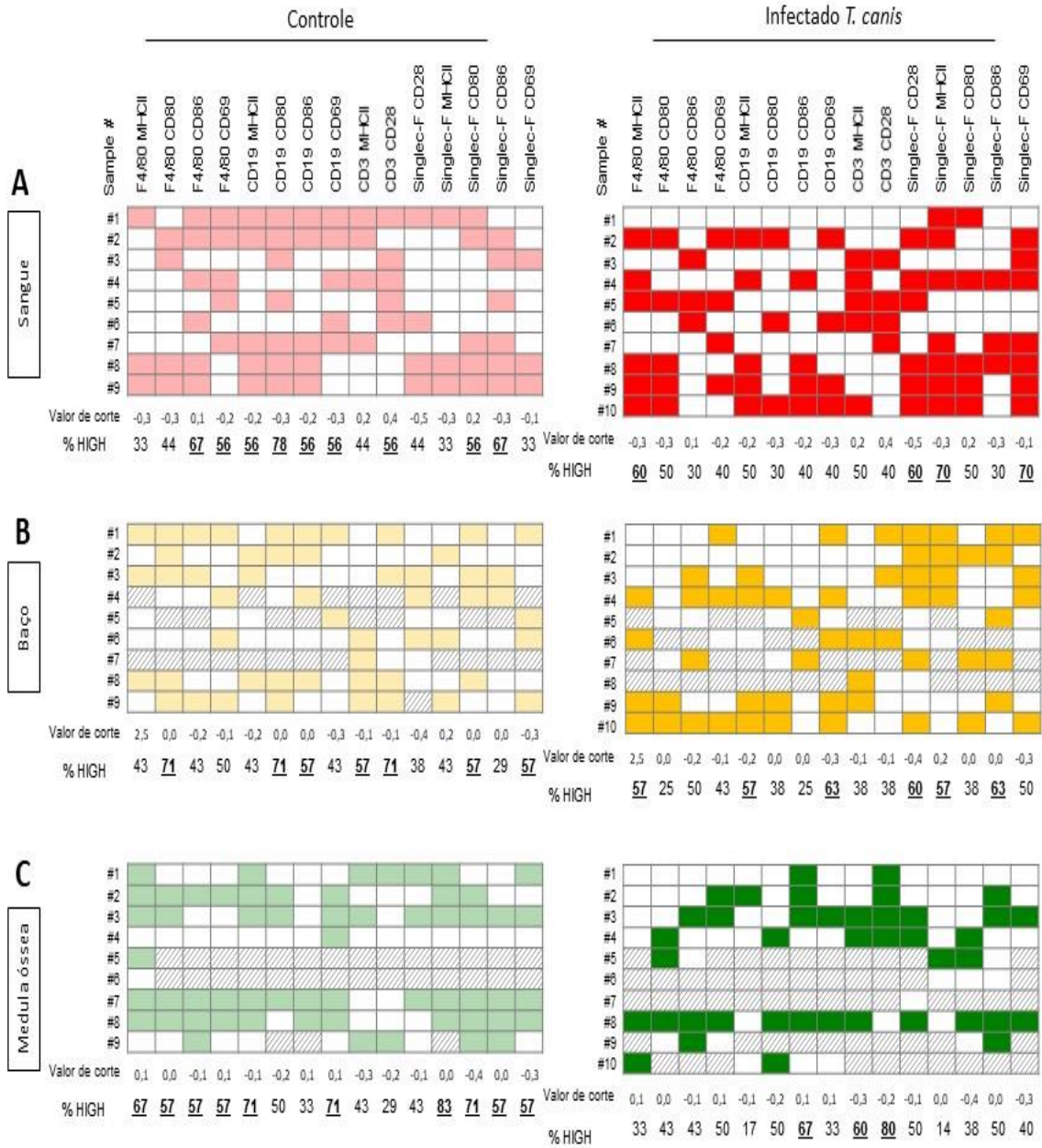
Para compreender a função dos eosinófilos e sua relação com eventos sistêmicos ocorrendo em tecidos específicos durante a infecção por *T. canis*, um diagrama contendo a proporção (%) de camundongos com cada expressão de biomarcador acima da mediana global (ponto de corte) foi montado para sangue periférico, baço e medula óssea de camundongos de grupo infectados por *T. canis* e grupo controle figura 11.

Observamos que na população dos eosinófilos (Siglec F+) no grupo infectado com *T. canis* no sangue possui uma alta expressão (frequência >50) nos biomarcadores CD28 (60%), MHC-II (70%) e CD69 (70%) quando comparado com grupo controle. Por outro lado, o grupo controle houve uma alta expressão de CD80 (56%) e CD86 (67%) contrastando com camundongos do grupo infectado com *T. canis* (Figura 11A).

No compartimento do baço observamos que para os eosinófilos esplênicos no grupo infectado houve uma alta expressão (frequência >50), CD28(60%), MHCII(57), CD86(63%) quando comparado com o grupo controle. No grupo controle do baço observamos um aumento CD80 (57%) e CD69 (57%) na população dos eosinófilos (Figura 11B).

Para os eosinófilos da medula óssea, os camundongos do grupo infectado com *T. canis* mostraram uma proporção diminuída de camundongos com alta ativação e expressão de moléculas relacionadas à APC que não foram observadas em camundongos do grupo controle (Figura 11C).

Figura 11: Diagrama para cálculo da frequência (%) de cada biomarcador em relação aos camundongos individualmente.

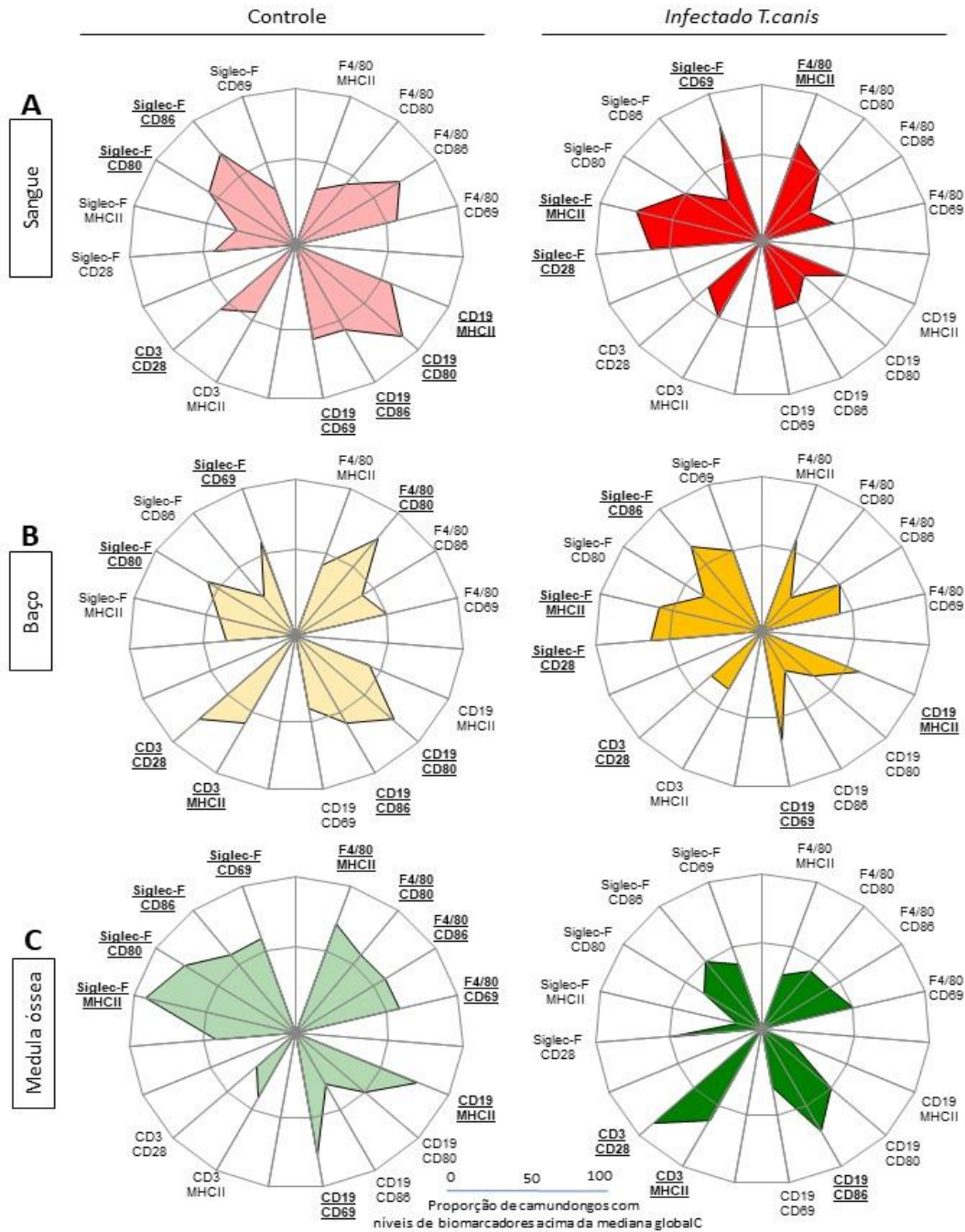


Legenda: Os grupos controles e infectados por *T. canis* foram categorizados individualmente em "alta" ou "baixa" expressão, de acordo com a mediana global (ponto de corte) para cada expressão de moléculas de ativação e co-estimulação em monócitos/macrófagos F4 / 80 +, linfócitos B CD19 + e Siglec-F + (MHC-II, CD80, CD86 e CD69), bem como linfócitos T CD3 + (CD28 e MHC-II) nos diferentes compartimentos: sangue A (vermelho), baço B (amarelo) e medula óssea C (verde). Os quadrados coloridos nos diagramas representam os camundongos de expressão "alta", enquanto os quadrados em branco representam camundongos com "baixos" expressão, e para os quadrados em listra representa que o biomarcador não foi determinado. Os números abaixo de cada coluna representam o ponto de corte e a frequência de cada camundongo "expressivo" (%) de cada molécula avaliada em cada população.

A Figura 12 mostra as assinaturas de biomarcadores das células apresentadoras de antígeno, bem como os linfócitos T desencadeadas pela infecção por *T. canis*. Um biomarcador é creditado como importante quando a frequência de camundongos com alta expressão desse parâmetro dado era maior que 50% (GUIMARÃES et al., 2015). Os gráficos de radar confirmam esses achados que mostram uma inversão na assinatura do biomarcador quanto à ativação e as expressões de moléculas relacionadas à APC em grupo controle/ grupo infectado com *T. canis* em todas as amostras analisadas. No sangue periférico e no baço, os eosinófilos Siglec-F + exibem uma expansão da área do gráfico de radar (Figura 12A) em grupo infectado com *T. canis* sobre grupo controle, indicando biomarcadores com mais de 50%, especialmente na expressão de MHC-II. Por outro lado, houve um encolhimento da área do gráfico de radar do grupo infectado com *T. canis* sobre grupo controle para todas as moléculas de superfície testadas (CD69, CD80, CD86 e MHC-II) no sangue periférico e células B esplênicas. O efeito oposto foi observado para eosinófilos (Siglec-F +), monócitos/macrófagos (F4/80 +) e a população da medula óssea, com encolhimento da área do gráfico do radar, indicando a modulação descendente da expressão da molécula especialmente relacionada ao MHC-II no grupo infectado com *T. canis* quando comparada ao grupo controle.

No baço, observou-se também um aumento significativo em Siglec-F + CD86 + e Siglec-F + CD28 +, bem como CD19 MHC-II + / CD69 + no grupo infectado com *T. canis* em comparação com o grupo controle (Figura 12B). Na medula óssea, observamos um aumento na área do gráfico relacionado ao CD3 + em grupo infectado com *T. canis* quando comparado ao grupo controle (Figura 12C).

Figura 12: Assinaturas de biomarcadores de células apresentadoras de antígenos desencadeada por infecção por *T. canis*.



Legenda: A assinatura imunológica da ativação e da expressão das moléculas coestimulatórias (CD28, CD69, MHC-II, CD80 e CD86) nos monócitos/macrófagos F4 / 80 +, linfócitos B CD19 +, linfócitos T CD3 + e Siglec-F (eosinófilos) foram avaliados em grupos controles e infectados por *T. canis* nas diferentes compartimentos: sangue A (vermelho), baço B (amarelo) e medula óssea C (verde). Os gráficos de radar resumem a freqüência de camundongos de expressão "alta" (%) em cada grupo. Quando a freqüência de camundongos de alta expressão foi superior a 50% (em uma escala de 0 a 100%), os quadrantes foram sublinhados e destacados por um formato em negro.

4.3 Análise de correlações entre biomarcadores imunológicos: abordagem de biologia de sistemas

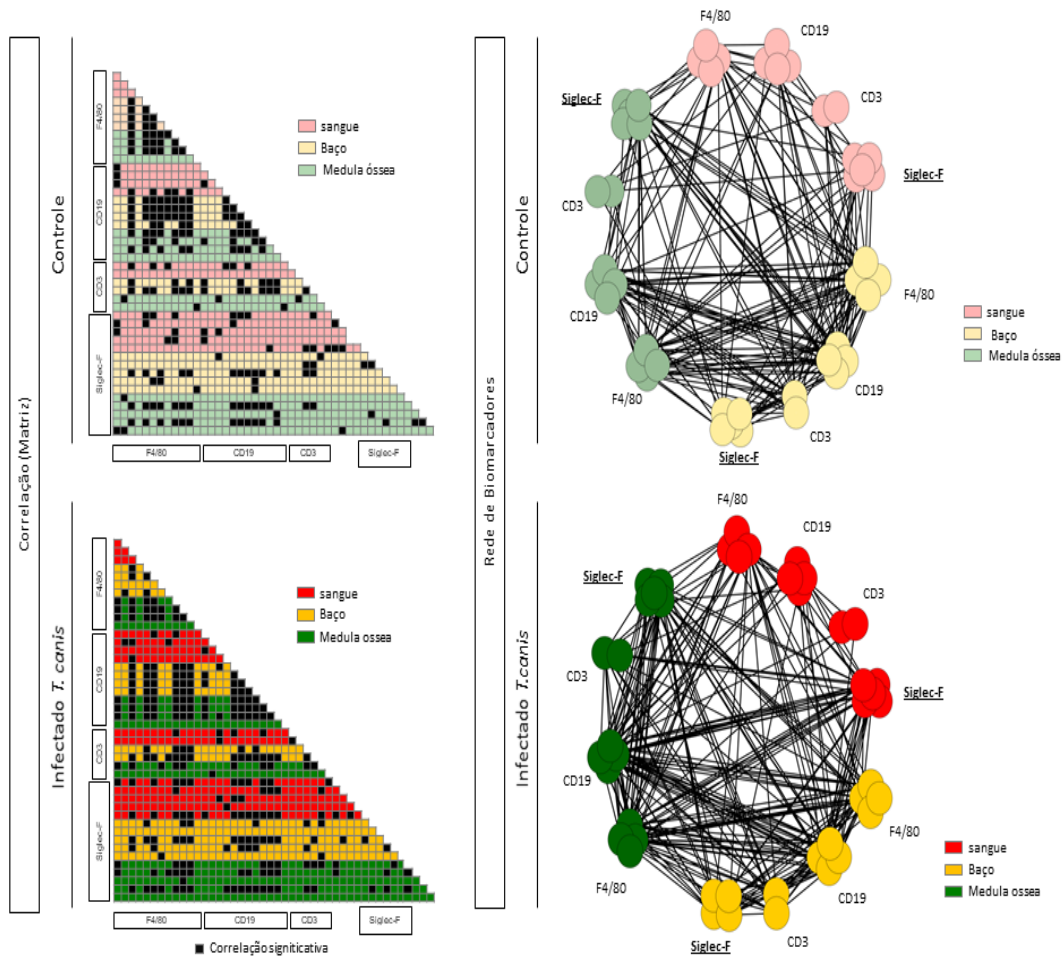
Para realizar uma ampla análise exploratória multifacetada e compreender a conectividade do biomarcador com a infecção por *T. canis*, foi montada uma matriz de correlação, bem como redes de correlações de biomarcadores para grupo controle e grupo infectado com *T. canis*, como mostrado na figura 13. Correlações entre Siglec-F + eosinófilos, F4 / 80 + monócitos, linfócitos CD19 + e linfócitos T CD3 + do sangue periférico, baço e medula óssea foram realizadas e apresentadas como matriz codificada por cores (painéis esquerdos) e como redes de biomarcadores (painéis direitos). Cada nó na rede representa um biomarcador. As correlações positivas ou negativas foram subcategorizadas de acordo com a "força" da correlação relacionada ao valor-r, calculada usando a análise de Spearman's.

Observamos apenas a interatividade das populações nos diferentes compartimentos (sangue, baço e medula óssea). Uma rede ricamente conectada com interações forte caracterizou os grupos controle e grupos infectados com *T. canis*.

Quando comparamos o grupo infectado com o grupo controle observamos que o grupo infectado possui muito mais interações fortes entre as populações Siglec F+, CD19+, F4/80+ e CD3+ com suas contrapartes nos diferentes compartimentos do que o grupo controle.

Observou-se que no sangue periférico, no baço e a medula óssea Siglec-F + eosinófilos do grupo infectado com *T. canis* apresentaram conexões mais fortes, quando comparados ao grupo controle (Figura 13 - painel direito). Usando este tipo de análise, que considera todo o universo de dados, é possível destacar os biomarcadores mais relevantes e sua relação no grupo infectado com *T. canis* quando comparado ao grupo controle. Assim, a análise de dados sugere que Siglec-F + eosinófilos podem estar envolvidos nos eventos imunológicos desencadeados para induzir respostas de células T específicas de *T. canis* após infecção.

Figura 13: As redes de interações entre biomarcadores imunológicos são alteradas durante a infecção por *Toxocara canis*.



Legenda: Cada nó na rede representa um biomarcador, incluindo os eosinófilos Siglec-F +, monócitos/macrófagos F4 / 80 +, linfócitos B CD19 + e linfócitos T CD3 + do sangue, baço e medula óssea que expressam ativação e moléculas coestimulatórias (CD28, CD69, MHC -II, CD80 e CD86). Foram realizadas correlações entre biomarcadores nos diferentes compartimentos: sangue (vermelho), baço (amarelo) e medula óssea (verde) e exibidas como matrizes codificadas por cores (painéis esquerdos) e como redes de biomarcadores (painéis direitos). Apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) para os grupos controle e infectados com *T. canis* foram incluídas nas redes.

4.4 Impacto da estimulação do antígeno de *T. canis in vitro* na expressão da molécula da superfície celular por eosinófilos derivados da medula óssea.

A cultura final dos eosinófilos nos proporcionou em 4 grupos: controle, controle/Ag, infectado e infectado/Ag. Ao analisar por citometria de fluxo e considerando duas populações para análise Siglec F^{low} (FSC^{low}) e Siglec F^{High} (FSC^{High}) como ilustrado na figura 14.

O gráfico 15 no painel da esquerda nos mostra a IMF para cada grupo relacionado com cada marcador. O 1º gráfico da esquerda nos mostra o controle e controle/Ag das populações Siglec F^{low} e Siglec F^{high}. O 2º gráfico da esquerda nos mostra os grupos infectado e infectado/Ag das populações Siglec F^{low} e Siglec F^{high}.

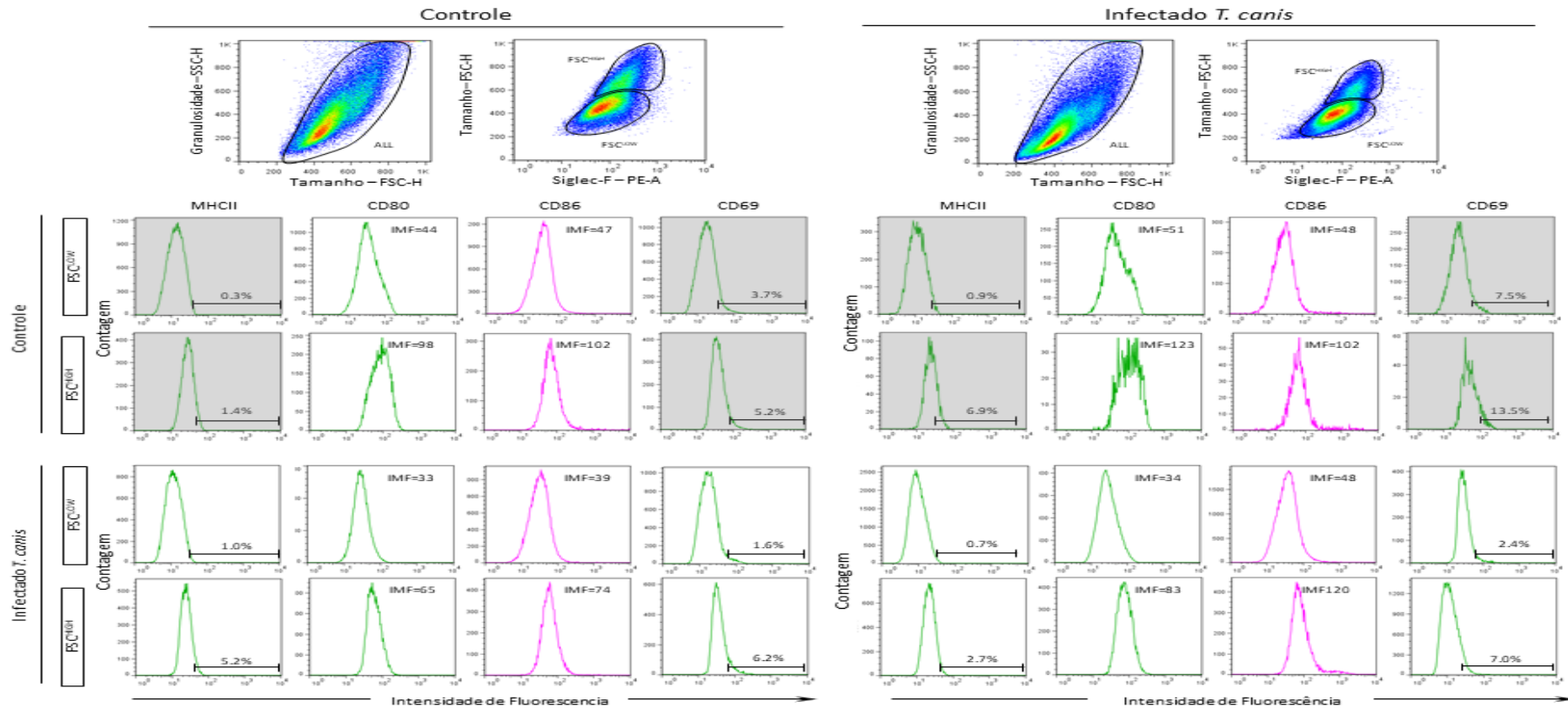
Do lado direito ambos os gráficos nos mostram o impacto dos grupos estimulado (controle/infectado) sobre os grupos controle e infectado.

A estimulação de *T. canis* induziu aumento da porcentagem de MHC-II + Siglec-F + FSC^{high} e CD69 + Siglec-F + FSC^{high} em camundongos do grupo controle. Não foram observadas diferenças nos camundongos infectados por *T. canis* (Figura 15).

Corroborando esses resultados, obtivemos as imagens das células com suas marcações da citometria de fluxo. Obtivemos as imagens das populações Siglec F^{low} e Siglec F^{high} tanto do grupo controle, controle/Ag quanto do grupo infectado, infectado/Ag.

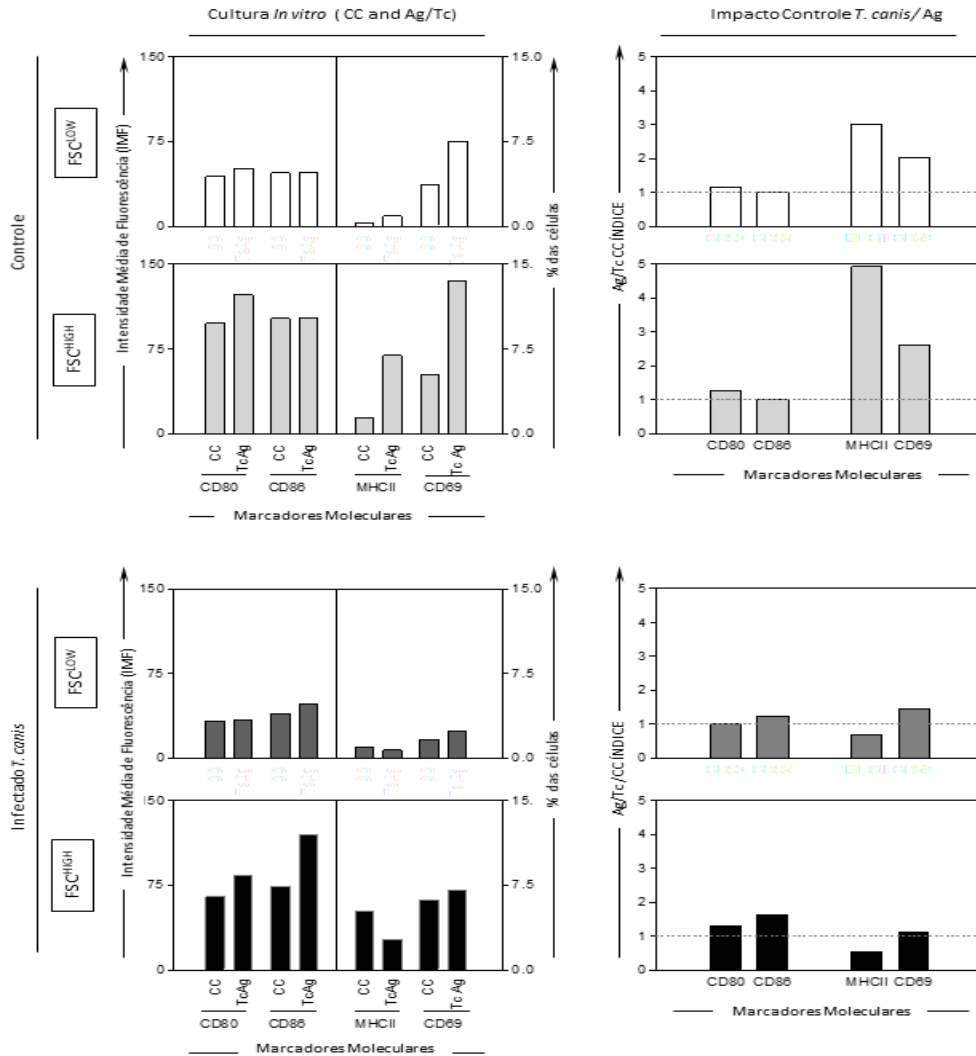
As imagens demonstraram que os eosinófilos (Siglec F+) aumentaram o MHC-II e CD69 sobre os estímulos de antígenos de *T. canis* de eosinófilos derivados da medula óssea do grupo controle mais evidentemente do que nos eosinófilos derivados de medula óssea de camundongos infectados com *T. canis* (Figura 16).

Figura 14: Perfil de ativação de eosinófilos derivados da medula óssea após a indução por antígeno de *T. canis* *in vitro*.



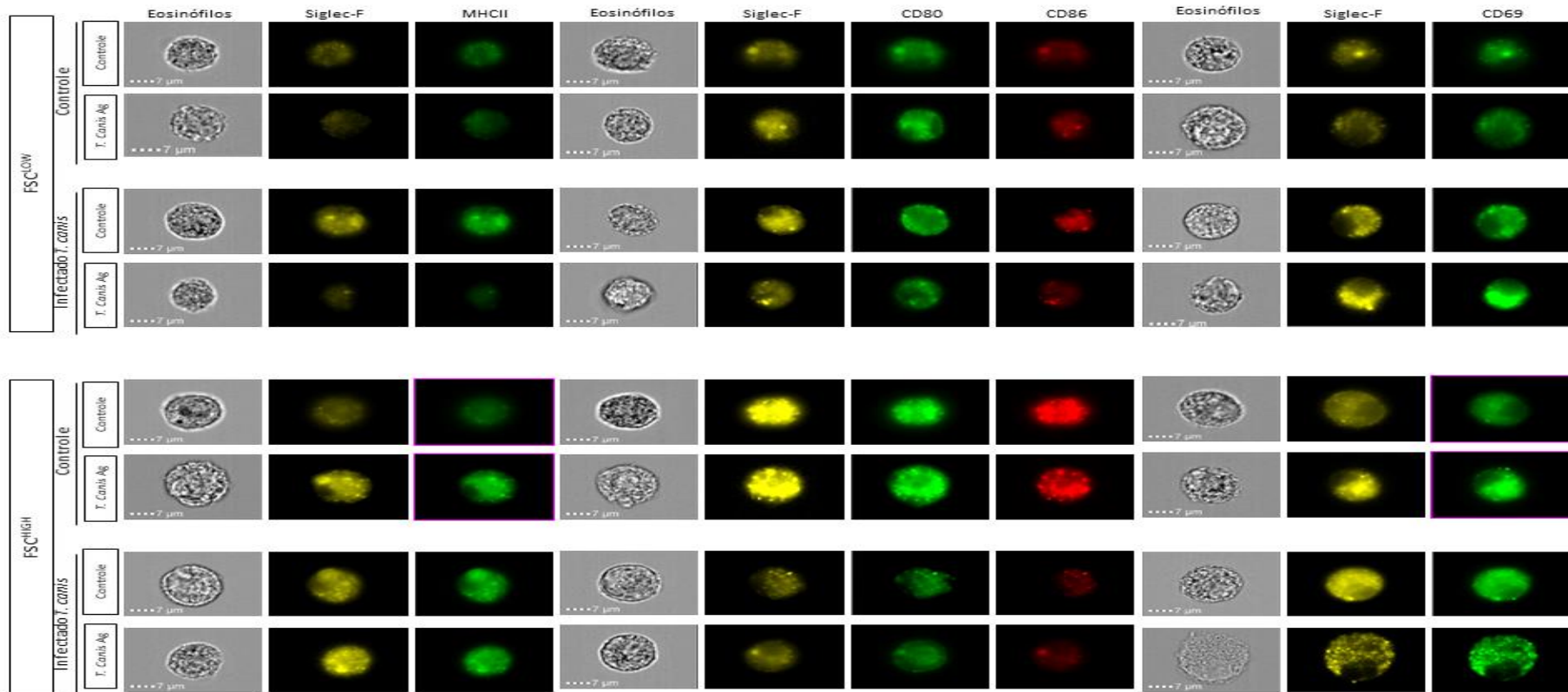
Legenda: A estimulação de antígeno de *T. canis* *in vitro* foi realizada em eosinófilos derivados da medula óssea de grupo de Controle (não infectado) e grupo infectados com *T. canis*. Avaliação citométrica de fluxo de CD69, MHC-II, CD80 e CD86 dentro de Siglec-F + eosinófilos exibindo fenótipo FSC^{high} ou FSC^{low}. As moléculas relacionadas com a ativação e a apresentação de antígenos foram avaliadas em Siglec-F + eosinófilos por Intensidade da Mediana de Fluorescência ou porcentagem de células positivas conforme verificado por histogramas.

Figura 15: Impacto da estimulação in vitro do antígeno de *T. canis* na expressão da molécula de superfície celular por eosinófilos derivados da medula óssea.



Legenda: A estimulação de antígeno de *T. canis*. *in vitro* foi realizada em eosinófilos derivados da medula óssea de grupos Controle (não infectado) e grupos infectados com *T. canis*. As culturas de controle (CC) e as estimuladas por antígeno (Ag/Tc) foram incubadas como descrito em material e métodos e examinadas por avaliação citométrica de fluxo de CD69, MHC-II, CD80 e CD86 dentro de Siglec-F + (eosinófilos) exibindo FSC^{HIGH} (sombras escuras) ou FSC^{LOW} (sombras claras) fenótipo. A ativação e as moléculas relacionadas à apresentação de antígenos também foram avaliadas em Siglec-F + (eosinófilos) por Intensidade da mediana de Fluorescência (IMF) ou porcentagem de células positivas e plotadas como gráficos de barras. Além disso, as mudanças Ag/Tc versus CC foram calculadas para avaliar o impacto dos estímulos de Ag *T. canis* expressos como índice de estimulação (Ag/Tc / CC INDÍCE), que foi plotado como gráficos de barras.

Figura 16: Impacto da estimulação *in vitro* com antígenos de *T. canis* em eosinófilos derivados da medula óssea.

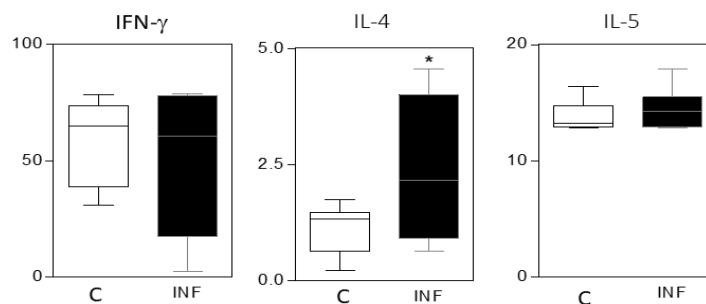


Legenda: A estimulação de antígeno de *T. canis in vitro* foi realizada em eosinófilos derivados de medula óssea de grupos de Controle (não infectados) e grupo infectados com *T. canis*. A avaliação citométrica de fluxo de MHC-II, CD80, CD86 e CD69 nos Singlec-F + eosinófilos foi realizada pelo fluxo de imagem e analisada pelo software Ideas. As moléculas relacionadas à apresentação de ativação e antígeno foram avaliadas em Siglec-F + eosinófilos pela Intensidade da mediana de Fluorescência ou porcentagem de células positivas conforme verificado por histogramas.

4.5 Avaliando os níveis de citocinas em soros de camundongos não infectados e infectados por *T. canis* por ELISA

Depois de examinar o perfil fenotípico de Siglec-F + eosinófilos após a infecção por *T. canis*, avaliamos a produção de citocinas no 18º dia após a infecção por *T. canis*. O pico de eosinofilia é observado no dia 18, portanto, a hipótese de que as citocinas circulantes pudessem influenciar e, portanto, estar associada à função e atividade de Siglec-F + eosinófilos. Entre as citocinas principais produzidas no pico da eosinofilia (18º dia), a IL-4 mostrou um aumento significativo no grupo infectado com *T. canis* quando comparado ao grupo controle. A produção de IFN- γ e IL-5 foi aumentada, mas não foram observadas diferenças significativas (Figura 17).

Figura 17: Níveis de citocinas em amostras de soro de camundongos infectados e não infectados por *Toxocara canis* após 18 dias de infecção.



Legenda: Os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-5 foram avaliados no soro de camundongos do grupo de controle (branco) e do grupo infectado (preto). Os resultados são expressos na Mediana. O significado estatístico é indicado como * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos que envolvem uma resposta imune específica são coordenados por células e moléculas específicas diante de patógenos e outros problemas que favoreça alterações na fisiologia do sistema imune. Esses eventos promovem o aparecimento de respostas imunes específicas e seletivas, e induzem uma memória imunológica. No entanto, para que seja desenvolvida a resposta imune específica os linfócitos T precisam responder a antígenos peptídeos que são expostos e apresentados por células específicas, conhecidas por Células Apresentadoras de Antígenos (APCs). Essa ativação da resposta específica é dependente do início do reconhecimento onde os TCRs das APCs interagem com as moléculas de MHC II e o CD28 do LT com CD80 ou CD86 da APC, dessa forma ocorre a transdução de sinais ativadores dessa resposta que irá gerar a memória imune. As células imunológicas consideradas APCs são os macrófagos, as células dendríticas e os linfócitos B. Neste estudo objetivou analisar se ocorre a ativação dos eosinófilos após a exposição aos antígenos de *T. canis* e se o mesmo atua como células apresentadoras de antígenos, assim como os macrófagos / monócitos, células dendríticas e linfócito B.

Além disso, foi avaliado se eosinófilos Siglec F+ da medula óssea poderiam potencialmente iniciar uma ativação específica como APC atípica e, portanto, contribuir para estimular as respostas imunes às infecções por *T. canis*. Para isso, as alterações nos marcadores de superfície relacionados à ativação de APCs foram determinadas em eosinófilos Siglec-F + durante a infecção experimental de *T. canis*, juntamente com células F4 / 80 +, linfócitos B, CD19 + e células T CD3 +. Os resultados demonstraram mudanças na hierarquia da APC durante a infecção experimental de *T. canis*, em que os eosinófilos adotaram um perfil fenotípico e funcional de APC neste modelo.

Os eosinófilos têm grande importância para a direção da resposta imune, especialmente pela produção de citocinas e como mediadores diretamente envolvidos no processo inflamatório durante infecções causadas por helmintos e doenças alérgicas (SETTERBLAD et al., 2004; MACHADO et al., 2004; ANIBAL et al., 2007; ZHANG et al., 2017). A ativação de respostas imunes mediadas por subconjuntos dos linfocíticos a antígenos específicos precisa do sinal resultante da interação de MHC carregada com antígeno ao seu receptor de linfócitos T (TCR). Além disso, um segundo sinal fornecido por interações com moléculas co-estimuladoras é necessário durante a sinapse

imunológica. Além da expressão de MHC-II, a capacidade de interagir e poder transmitir sinais de ativação co-estimulantes secundários são que definem células apresentadoras de antígenos profissionais ou convencionais (APCs) (TAMIR et al 2000; SETTERBLAD et al 2004).

No contexto da Toxocaríase, os ensaios foram realizados para selecionar populações por populações especialmente a população alvo (eosinófilos) e as células que já são consideradas APC, como monócitos/macrófago (F4 / 80+) e linfócitos B (CD19+) durante o pico da eosinofilia que ocorre no 18º dia (figura 9). Analisando as diferenças de expressão do MHC-II, os dados permitem avaliar o fenótipo dos eosinófilos relacionados com as APC. Observou-se que o perfil da infecção por *T. canis* na população dos eosinófilos Siglec-F + demonstraram várias alterações significativas após o perfil da infecção com *T. canis* como se segue: as expressões CD28, MHC-II, CD69 são reguladas positivamente, enquanto o CD86 é *downregulated* (menos expressa) no sangue. As moléculas CD80 e CD69 são expressa significativamente com uma diminuição no baço do grupo infectado quando comparado com o grupo controle; as moléculas MHC-II e CD80 são significativamente diminuídas na medula óssea de camundongos infectados com o *T. canis*, em comparação com o grupo controle (Figura 10D). Esses dados sugerem que a estimulação antigênica do parasita resultou na ativação desses eosinófilos, modificando o papel deste subconjunto celular de célula efetora, para atuar como possível APC no modelo murino da infecção por *T. canis*.

A análise de dados indicou que o perfil da infecção por *T. canis* na população dos monócitos/macrófagos induziu uma diminuição significativa no grupo infectado CD86 (sangue), CD80 e CD86 (baço), quando comparado com o grupo controle e um aumento significativo MHCII no baço grupo infectado quando comparado com o grupo controle (figura10 A).

Nas populações de linfócitos B (CD19 +), a infecção por *T. canis* teve um perfil que promove uma diminuição significativa da expressão de CD80 (sangue periférico), MHC-II (medula óssea), no grupo controle quando comparado ao grupo infectado e um aumento significativo CD86 da medula quando comparamos o grupo infectado com o grupo controle (Figura 10B).

Na população de linfócitos T CD3 +, teve um perfil de infecção com uma expressão de MHC-II aumentada no baço quando comparamos o grupo infectado com o grupo controle e uma diminuição do MHCII do sangue e da medula quando comparamos o grupo controle com o grupo infecato.. Além disso, a expressão de CD28 é aumentada

em células T de CD3 + esplênicas após infecção por *T. canis* como mostrado na (Figura 10C) .

Na população alvo, os eosinófilos (Siglec-F +) demonstraram várias alterações significativas após o perfil da infecção com *T. canis* como se segue: as expressões CD28, MHC-II, CD69 são reguladas positivamente, enquanto o CD86 é *downregulated* (menos expressa) no sangue. As moléculas CD80 e CD69 são expressa significamente com uma diminuição no baço do grupo infectado quando comparado com o grupo controle; as moléculas MHC-II e CD80 são significamente diminuídas na medula óssea de camundongos infectados com o *T. canis*, em comparação com o grupo controle (Figura 10D).

Para uma ativação específica da resposta imune ocorrer, moléculas coestimatória além do MHC-II na superfície da APC são necessárias (IBERG et al., 2017). As moléculas coestimatórias como CD80 e CD86 (B7.1, B7.2) irão interagir com o CD28 completando o primeiro estágio da apresentação do antígeno, a fim de alcançar uma resposta imune específica (JUNIOR et al., 2010). Estes dados atuais mostram um aumento significativo de CD80 e MHCII em eosinófilos nas amostras analisadas (sangue) dos camundongos infectados quando comparados ao grupo controle (figura 10). Resultados semelhantes, quando relatados no contexto do modelo de infecção por *S. stercoralis* mostrou um aumento expressivo da molécula de CD80, juntamente com o MHC-II em eosinófilos após a infecção (PADIGEL et al., 2006). A expressão aumentada da molécula de CD80 e MHCII em eosinófilos sugere uma ativação eficiente da resposta imune induzida pelo antígeno de *T. canis*, considerando o potencial de CD80 para ligar CD28 em superfícies de linfócitos T com alta avidéz (PADIGEL et al., 2006; RODOLPHO et al., 2014).

No que diz respeito à ativação, o aumento da expressão de CD69 ocorreu especificamente no sangue periférico na população dos eosinófilos em animais infectados por *T. canis* (Figura 10 D), corroborando com Titz (XIANG et al., 2008), que demonstraram um aumento da expressão de CD69 em eosinófilos de sangue periférico de pacientes com dermatite atópica. Mendes (2011) no seu trabalho com infecção por *Plasmodium chabaudia AS* também observou um aumento expressivo CD69 no sangue e linfócitos B em animais infectados. Sugerindo mais uma vez que o papel efetor dos eosinófilos pode ser suprimido para que ele possa atuar em papel, como APC, o que parece prevalecer nos diferentes modelos estudados.

Um aumento sensível em CD28 em eosinófilos de sangue periférico de indivíduos com hipereosinofilia em comparação com indivíduos saudáveis, sugerem que esses eosinófilos podem atuar como APC atípicos não apenas em infecções helmínticas, mas também em outros distúrbios associados a alergias, quando essas células estão geralmente aumentadas. E ainda, esses dados podem sugerir a participação e ativação de eosinófilos na determinação da polarização de Th2 durante patologias infecciosas e não infecciosas (SHAMRI et al., 2011).

Ao analisar a população de linfócitos T, nossos resultados demonstram que a expressão de CD28 é aumentada no baço e que a expressão do MHC-II regulada positivamente na medula óssea após a infecção por *T. canis* (figura10 C), indicando a ativação produtiva desta população durante o pico da eosinofilia. Além disso, nossos resultados demonstraram que, o eosinófilo foi ativado de maneira similar aos monócitos/macrófagos F4 /80+ (figura10A), sendo esta uma célula APC clássica, sugerindo assim papéis análogos para essas duas populações nesse modelo. Para tornar esses parâmetros mais claros e visíveis, gráficos de radar individualizados de cada camundongo foram plotados. E foram avaliadas produção de citocinas de IL-5, IL-4 e IFN- γ no sangue periférico no 18º dia após a infecção, durante o pico da eosinofilia. A importância desses dados é reforçar a participação dos eosinófilos atuando significativamente nas respostas do perfil Th2 de forma sistêmica e contribuindo com ativação específica no modelo de infecção com o *T. canis*. Os dados atuais estão de acordo com outros estudos que demonstraram que, durante a infecção por *T. canis*, a eosinofilia é acompanhada por um aumento significativo nos níveis de IL-4 plasmáticos (figura17). Esses achados sugerem que, os eosinófilos Siglec-F + provavelmente requerem IL-4 não apenas na defesa contra helmintos, mas também para exercer funções de apresentação de antígenos (VAN-BERKEL et al.,2006; ROGERIO, ANIBAL, 2012).

Os estudos *in vitro* mostraram que a exposição de eosinófilos derivados da medula óssea e expostos a antígenos de *T. canis* aumentaram significativamente a porcentagem de MHC-II positivos, bem como os eosinófilos CD69 + em camundongos não infectados. Este achado corrobora com outros modelos como demonstrado anteriormente (FACCIOLI et al.,1996), sugerindo um papel das células apresentadoras de antígenos para eosinófilos. Zielinski (2017), também demonstrou que a ativação por upregulação CD69 em eosinófilos de camundongos infectados por *S. Stercoralis*, podem ser considerados possíveis APCs, corroborando assim com os nossos resultados.

Outros trabalhos com diferentes modelos de infecção por patógenos não helmintos também suportam esta hipótese (DENT et al., 1990; ANIBAL et al., 2007). Além disso, outros estudos que avaliam a cultura de eosinófilos *in vitro* estimulados com toxina tetânica e GM-CSF apresentaram um aumento expressivo da molécula MHC-II no grupo estimulado quando comparado ao grupo não estimulado (SHI et al., 2000). Porém, em nossos resultados é possível observar que, os eosinófilos da medula óssea de camundongos infectados com *T. canis* não apresentaram alterações na expressão de MHC-II, mesmo após estimulação *in vitro* de *T. canis*. Esse efeito paradoxal pode ser explicado pela sobreativação de eosinófilos durante a infecção *in vivo* que pode ter induzido um estado anérgico para essas células.

Contudo, as abordagens de biologia de sistemas baseadas em redes de biomarcadores e matrizes de correlação indicaram que uma maior conectividade entre eosinófilos e linfócitos T em camundongos infectados por *T. canis* em todas as amostras analisadas (sangue periférico, baço e medula óssea) (figura 13) também suportam a hipótese de que os eosinófilos podem adotar um papel como APC durante a infecção por *T. canis*. Além disso, a estimulação *in vitro* por Ag de *T. canis* resultou em ativação e elevação da regulação de moléculas relacionadas à APC por eosinófilos derivados da medula óssea (figura 15). Dessa forma, essas descobertas sugerem fortemente que a infecção por *T. canis* remodela os eosinófilos para atuarem como APCs e não somente como célula efetora durante a infecção.

6-CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados observamos que as análises principalmente do sangue têm um perfil fenotípico e de interação dos eosinófilos com as demais células apresentadoras de antígeno para apresentação de antígeno aos linfócitos T.

Avaliando o perfil da infecção, nossos dados sugerem que a eosinopoiese durante a infecção com *T. canis* parece ser parcialmente independente da IL-5.

Durante as análises, nossos resultados demonstraram que dentre os parâmetros, de APCs como (monócito/macrófago e linfócitos B), os eosinófilos demonstraram resultados relevantes como uma possível célula apresentadora de antígeno, uma vez que o seu comportamento das suas moléculas MHC II e moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 são mais expressivos que as APCs convencionais (monócito/macrófago e linfócitos B), sugerindo fortemente que seja os eosinófilos os responsáveis por iniciar a resposta imune específica nesse modelo

O aumento expressivo do MHC II das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, juntamente com CD28 (linfócito T) faz com que nosso trabalho sugira um perfil de APC para os eosinófilos no modelo murino de infecção pelo *T. canis*.

ANEXO

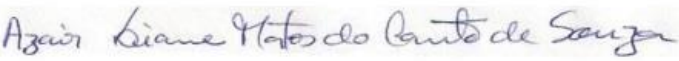
I- COMITÊ DE ÉTICA

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
n° 2-058/2013

Protocolo n°. 058/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado **Avaliação do papel dos eosinófilos como células apresentadoras de antígenos in vitro e ex vivo**, submetido pelo pesquisadora JOICE MARGARETH DE ALMEIDA RODOLPHO.

São Carlos, 17 de fevereiro de 2014

Dra.  Profa.
Azair

Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais



Robust Phenotypic Activation of Eosinophils during Experimental *Toxocara canis* Infection

Joico Margaroth de Almeida Rodolpho^{1*}, Luciana Camillo¹, Márcio Sobrera Silve Araújo², Elaine Spetzal², Jordana Grazzola Coelho-dos-Reis², Ricardo de Oliveira Cordeiro², Déora Moita Noris¹, Olívio Assis Martins-Rêto², Andréia Takara-Cavvalho² and Fernanda de Freitas Aribal¹

¹Laboratory of Inflammation and Infectious Diseases, Department of Morphology and Pathology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil, ²Integrated Research Group in Biomarkers, René Rachou Institute (FCCRLZ) Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Paige Aron,
Albert Einstein College of Medicine,
United States

Reviewed by:

Aravinda Cil Castro,
University of Minho, Portugal
Andrés Barón,
Universidad de Antioquia, Colombia

*Correspondence:

Joico Margaroth de
Almeida Rodolpho
j.rodolpho@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Antigen Presenting Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 September 2017

Accepted: 10 January 2018

Published: 21 January 2018

Citation:

Rodolpho JM, Camillo L,
Araújo MS, Spetzal E,
Coelho-dos-Reis JC, Cordeiro RC,
Noris DM, Martins-Rêto OA,
Takara-Cavvalho A and Aribal F (2018) Robust Phenotypic Activation of Eosinophils during Experimental *Toxocara canis* Infection.
Front. Immunol. 9:64.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00064

Eosinophils are multifunctional cells that have cytotoxic/proinflammatory activities and stimulate CD4⁺ T-cells in experimental models of allergy and parasitic infections. Eosinophils, when exposed to antigens, are activated, expressing the CD38/CD69 molecules and exhibited increased expression of major histocompatibility complex (MHC-II), CD80 and CD86, suggesting they play a role upon *Toxocara canis* antigen stimulation. In the present study, we evaluated the profile of eosinophils using conventional and image flow cytometry upon experimental *T. canis* infection. *T. canis* antigens induced a robust activation on this subset, contributing to the immune responses elicited in the experimental model for *T. canis*-associated visceral larva migrans syndrome. Data analysis demonstrated that, during murine *T. canis* infection, eosinophils from peripheral blood, spleen, and bone marrow presented upregulated expression of CD38/MHC-II/CD80/CD86. As opposed to splenic and bone marrow eosinophils, circulating eosinophils had increased expression of activation markers upon *T. canis* infection. The enhanced connectivity between eosinophils and T-cells in *T. canis*-infected mice in all three compartments (peripheral blood, spleen, and bone marrow) also supports the hypothesis that eosinophils may adopt a role during *T. canis* infection. Moreover, *in vitro T. canis* antigen stimulation resulted in activation and upregulation of co-stimulatory-related molecules by bone marrow-derived eosinophils. Our findings are evidence of activation and upregulation of important activation and co-stimulatory-related molecules in eosinophils and suggest a reshaping of activation hierarchy toward eosinophils during experimental *T. canis* infection.

Keywords: eosinophils, *Toxocara canis*, T-cell activation, co-stimulatory molecules

INTRODUCTION

Eosinophils are multifunctional cells that have both cytotoxic and proinflammatory activities. When activated, these cells migrate to lymph nodes and activate CD4⁺ T-cells at paracortical zones (1, 2). Upon antigen exposure, eosinophils are apparently activated and express increased levels of CD38, CD69, and major histocompatibility complex (MHC-II) molecules (3–5). In addition, antigen-loaded eosinophils may activate T-cells and increase the production of Th2-type cytokines in several experimental models (7, 6).

Regarding helminthic infections, eosinophils have a protective role, acting as defenders against parasites. In the initial phase of infection, eosinophils are able to capture helminthic antigens and

REFERENCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cellular and Molecular Immunology, 5 ed, Rio de Janeiro, 2003.
2. ABBAS, A. K.; PILAI, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
3. AKUTHOTA P, *et al.* Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38:1254–1263.
4. ALEGRETE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-Cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews**, Londres, v. 1, p. 220-228, 2001.
5. ANIBAL, F.F, *et al.* Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.65, n°4, 344-352, 2007.
6. AMER, M.H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Amer Molecular and Cellular Therapies* 2014, 2:27.
7. BEAVER, P. C. *et al.* Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. **Pediatrics**, v.9, p.7-19, 1952.
8. BEHM, C.A, OVINGTON, K.S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitol Today**. May, v.16, n°5, p.202-9, 2000.
9. BENINATI, W, *et al.* Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, 92, 442–449, 1993.
10. BETALLI, P. *et al.*, Autism and esophageal achalasia in childhood: a possible correlation? Report on three cases. *Dis Esophagus*, v.26, 237-240, 2013.
11. BUIJS, J.; *et al.* Relationship between allergic manifestations and Toxocara seropositivity: A cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J.*, v. 10, n°7, p.1467-75, 1997.
12. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
13. BRAGA, K.M.S. *et al.*, CITOMETRIA DE FLUXO: HISTÓRICO, PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM PESQUISA. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 2016.
14. BRIEN, C. N.; MENZIEES-GOW, A. The biology of eosinophil and their role in Asthma. *Frontiers in medicine*, v.4, jun, 2017.

15. CARLOS, D. et al. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. **Braz. J. Med. Bio. Res.** April, 44(4), 319-326,2011.
16. CAMILLO, L., et al. Efeito de bioterápico na eosinofilia durante a SLMV experimental Rev Ciênc Farm Básica Apl.35(4):701-708,2014.
17. CARVALHO, E. A. A., ROCHA, R. L. **Toxocariasis: visceral larva migrans in children.** Jornal de Pediatria - Vol. 87, Nº 2, 2011
18. CASTELO, T., DINIS, A. & ROCHA, G. Toxocarose. Protocolo de Atuação. Secção de Infeciologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria. Sociedade Portuguesa de Pediatria – Consensos e Recomendações. *Acta Pediátrica Portuguesa* 39 (4), 171-5,2008.
19. CHANG S, et al. Hepatic visceral larva migrans of *Toxocara canis*: CT and sonographic findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187:W622-9
20. COELHO, N. E. et al. Linfócitos. Rev. Cient. Medicina Vet. N12, Jan 2009.
21. COMPTOM, S. J. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Rev. Analytical biochemistry*, v. 151, December 1985, p. 369-374.
22. CONTI, B. J; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Células dendríticas: mini-revisão *Bio saúde*, Londrina, v. 16, n. 1, 2014.
23. COUISSINIER-PARIS P. [Activated eosinophils: techniques to characterize them]. *Presse Med.* 2006;35(1 Pt 2):125-34. Review. French.
24. CUNHA, R. M. C. Larva Migrans Visceral. Rotina de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. São Paulo: Atheneu, p. 688- 693, 2005.
25. CUNHA, J.C. Ocorrência de parasitoses intestinais no centro de aprendizagem pró-menor de passos capp Rev. Bras. de Iniciação Científica, Itapetininga, v. 3, n. 4, 2016.
26. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Publish Health Concern. Parasites and Health. Toxocariasis 2010. Acessado: 19 de maio de 2011. Acesso: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxocariasis.htm>.
27. CHAUFFAILLE, M. L. L.F. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica Idiopática *Rev Bras Hematol Hemoter.* 32(5):395-40, 2010.
28. DAVIS,B.P, ROTHEMBER, M.E. Eosinophils and Cancer. *Cancer Immunol Res*;2:1-8,2014.
29. DAMSKER, J.M., et al.,Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.*1183:211-21,2010..
30. DENT, L.A, etal, .Eosinophilia intransgenic mice expressing interleukin 5.**TheJournalofExperimentalMedicine**, 172 (5), 1425-1431, 1990.

31. DESPOMINER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Rev. Clin. Microbio.*v.16, n2,2003.
32. DISEASE (2010).*Toxocariasis: Treatment. In* Centers for Disease Control and Prevention (CDC), <http://www.cdc.gov>. Acedido de: <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/treatment.html>
33. DOMACHOWSKE JB, et al. Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1998; 177 (6): 1458-64. 43.
34. ECEVIT, C. et al. Visceral larva migrans presenting with hypereosinophilia.**Turkige Parasitol. Derg.**, 37,58-60,2013.
35. EYERICH S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3573-85.
36. FACCIOLI,L.H,etal.IL-5driveseosinophilsfrombonemarrowtobloodandtissuesina Visceral Larva Migrans Syndrome. **Mediators of Inflammation**, v.5, p. 24-29, 1996.
37. GAROCCIA, G. H. G. et al. ATIVIDADE DOS COMPOSTOS CURCUMINA E ALBENDAZOL CONTRA O NEMATÓDEO *Toxocara canis* in Vitro *Rev.* v.7, n.1-2, 2013.
38. GLIMELIUS I, RUBIN J, FISCHER M, MOLIN D, AMINI RM, VENGE P et al. Effect of eosinophil cationic protein (ECP) on Hodgkin lymphoma cell lines. *Exp Hematol.* 2011; 39 (8): 850-8. 46.
39. FERLANGE, T. et al. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis in na Infant, Tennessee; USA. *Emerging infectious diseases*, v.23, n10, out,2017.
40. FERREIRA, A. V. T. Contribuição do médico veterinário na educação dos proprietários de cães e gatos sobre o tratamento e controlo das parasitoses. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa 2016.
41. FERREIRA. A. W.; AVILA, S. L. M. de. *Diagnostico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e AutoImunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003.
42. FINSTERER, J. et al., NEUROTOXOCAROSIS. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 49(5):279-287, September-October, 2007
43. FRANCISCHETTI, I. et al., Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010; 25(4): 575-584.

44. GIEMBYCZ, M.A., LINDSAY, M.A. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* 51(2):213–340,1999.
45. GILLESPIE, S.The epidemiology of *Toxocara canis*.*Parasitol Today*. 1988 Jun; v.4, n°6, p.180-2.
46. GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V Estrutura do MHC e função –apresentação de antígenos. Parte 2.
47. GLEICH, G. J.et al. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. **J Exp. Med.** v.150, n°6, p.1456-71, 1979.
48. GRAÇA, C.R.; Kouyoumdjian, J.A. MHC class I antigens, CD4 and CD8 expressions in polymyositis and dermatomyositis. *rev bras reumatol* . 2015;55(3):203–208.
49. HALLACK, K.A.; CUNHA, R.M.C. Larva *migrans* visceralis. In: Veronesi R; Focaccia, R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu, p. 1429-32, 1996.
50. HANSEL, T.T.; de VRIES, I.J.; CARBALLIDO, J.M.; et al. Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. **J Immunol**, v.149, p.2130-2136, 1991.
51. HATHCOCK, K.S., G. LASZLO, C. PUCILLO, P. LINSLEY, AND R.J. HODES. 1994. Comparative analysis of B7.1 and B7.2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180:631–640.
52. HEADINGTON, J.T.; CERIO, R. Dendritic cells and the dermis:1990. *Am J Dermatopathol*, v.12, p.217-220, 1990.
53. HOGARTH-SCOTT, R.S, FEERY, B.J.The specificity of nematode allergens in the diagnosis of human visceral larva migrans. **Aust J Exp Biol Med Sci**. v.54, n°4, p.317-27, 1976.
54. HUBSCHER, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI-an eosinophil derived inhibitor of histamine release. **The Journal of Immunology**, v.114, n°4, 1379-1388, 1975.
55. IBERG, C. A. Dendritic Cells As Inducers of Peripheral Tolerance. *Trends in Immunology*, November 2017, Vol. 38, No. 11
56. ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology*, v. 4; p. 733-739, 2003.

57. JUNIOR, D. M. et al. Sistema imunitario Parte II fundamentos da resposta imunologica mediada por linfocitos T e B. *Rev. Bras.Reumtol.*50, 552-80,2010
58. KAY, A.B. Asthma and inflammation.**Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.87, p.893-899, 1999.
59. KAYES, S.G; OAKS, J.A. *Toxocara canis*: T lymphocyte function in murine visceral larva migrans and eosinophilia onset. **Experimental Parasitology**,v. 49,p. 47-52, 1976.
60. KALKOFEN, U.P. Hookworms of dogs and cats.**Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.17, n.6, p.1341-1354, 1987.
61. KITA H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev.* 2011; 242 (1): 161-77.
62. KOEFFLER, H.P,et al,. La antigen is a differentiation marker on human eosinophils. **Blood**, 56:11–14, 1980.
63. KOTSIMBO, A.T, HAMID, Q. IL-5 and IL-5 receptor in asthma.**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n°2, p. 75-91, 1997.
64. KNOPF, P, M; PETZKE, M. M.; McLAREN, D. J. Immobilization of *Shistosoma mansoni* miracidia by activation of the alternate complement pathway at unually high serum dilutiom.**Rev. Parasite Immunology**, v15, 1993.
65. JOHANSSON M.W. et al., Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol* 180(11):7622–35,2008.
66. LAMBERTUCCI, J.R.; RAYES, A.; SERUFO, J.C. et al. - Visceral larva migrans and tropical pyomyositis: a case report. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 40: 383-385, 1999.
67. LAROCCA, et al., Avaliação do recrutamento celular no modelo experimental da Esquistossomose mansônica. **Rev.Uniara**, n15, 2004.
68. LEUTSCHER PD, VAN DAM GT, REIMERT CM, RAMARAKOTO CE, DEELDER AM, ORNBJERG N. Eosinophil cationic protein, soluble egg antigen, circulating anodic antigen, and egg excretion in male urogenital schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79 (3): 422-6. 47.
69. LINS, R.A. B. et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma em camundongos infectados pelo *Shostosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* ,41(2),173-178, mar-abr,2008.
70. LOSS, G.E Jr, et al,. Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. **The Journal of Immunology**, 150, 3187–3197, 1993.

71. LOTSCH, F. et al. Toxocariasis in humans in Africa- a systematic review. *Travel medicine and infectious diseases*, out,2017.
72. LUCEY, D.R, et al.,. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 86, 1348–1351, .1989.
73. LUTZ, M.B., et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods*. v.223, n1, p77-92, 1999.
74. MACHADO, P.R.L. et al., Mecanismo da resposta imune as infecções. *Na.bras. dermatol. Rio de Janeiro* 79(6):647-664,nov/dez,2004.
75. MC-BRIEN, C. N; MENZES-GOW,A.M. The Biology of eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*,v.4,2017.
76. MAGNAVAL, J.; GLICKMAN, L.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. v. 39, nº1, p.1-11, 2001.
77. MARTINHO, A.; BARROS, P.; BARROS, P. A diversidade de linfócitos T e sua importância na resposta imunitária celular específica. Évora: Departamento de Biologia e Imunologia, 2004. 36p.
78. MARTINS, D.M. IMPORTÂNCIA DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 5, n. 8, jan./jun. 2008
79. MEGHJI, M; MAIZELS, R. M. Biochemical properties of larval excretory-secretory (ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, p.155-170, 1986.
80. MENDES, D. M. et al. Eosinophilia. *Rev. Alergia e Imunopatologia*,2000.
81. MENDES, S.I.C. Estudos dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B durante a fase aguda da infecção por *Plasmodium chabaudia* AS. Tese apresentada ao departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo. São Paulo,2011.
82. MEMPEL, T. R.; HENRICKSON, S. E.; VON ANDRIAN, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, v. 427, p. 154-159, 2004.
83. METCALFE DD, BARAM D; MEKORI YA. Mast cells. *Revista Physiol* (1997) 77:1033-1079, PMID: 9354811.
84. MITRA SN, SLUNGAARD A, HAZEN SL. Role of eosinophil peroxidase in the origins of protein oxidation in asthma. *Redox Rep*. 2000; 5 (4): 215-24. 51.

85. MOTA, A. F. et al. *Toxocara canis*, o passageiro clandestino de um voo. *Nascer e Crescer*, 25 (2), 113-117, 2016.
86. MONTEIRO, M. I. Esofagite eosinofílica e alergia alimentar: há ou não relação estabelecida? *Caso clínico GE J Port Gastrenterol*. 21 (2):75-79, 2014.
87. MURAKI M, GLEICH GJ, KITA H. Antigen-specific IgG and IgA, but not IgE, activate the effector functions of eosinophils in the presence of antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 154(2):119–27, 2011.
88. NAKAGE, A. P. M. et al., Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Ciência Rural*, Santa Maria, v35, n.4, p.966-973, jul-ago, 2005.
89. NIKOLICH, J., SLIFKA, M. K., MESSAOUDI, I., 2004. **The many important facets of T-cell repertoire diversity.** *Nature Reviews Immunology*, 4: 123-132.
90. NOAL, V. et a., Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4+ T cell activation in vitro. *Clinical and Experimental Immunology*, 156: 117–125, 2009.
91. NUTMAN, T.B, HUSSAIN, R.; OTTESEN, E.A. IgE production *in vitro* by peripheral blood mononuclear cells of patients with parasitic helminth infections. **Clinical and Experimental Immunology**, 56, 174-182, 1989.
92. OKUBO, Y, et al., Predominant implication of IL-5 in acute eosinophilic pneumonia: comparison with chronic eosinophilic pneumonia. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.116, p.76-80, 1998.
93. OLIVEIRA, S. R. P. Harpagophytum procumbens modulates eosinophilic response during infection by toxocara canis *International Journal of Recent Scientific Research* Vol. 5, Issue, 11, pp.2008-2013, November, 2014.
94. OLIVEIRA, R. A. G.; NETO, A. P. *Anemias e Leucemias*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004.
95. ORTIZ-RIVERA, C. J. EOSINOFILIA Y PARASITISMO *Revista Gastrohnutp* Volumen 15 Número 1 (enero-abril): 41-48, 2013.
96. PADIGEL, U.M, et al., Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infection and Immunity**, v.74, p. 3232–3238, 2006.
97. PALUCKA, K et al. Generation of Dendritic Cells from Peripheral Blood Adherent Cells in Medium with Human Serum. *Scand. J. Immunol.* 47, 116–121, 1998.

98. PREISER, F.M, et al., Comparison of mid plane, full-chest tomograms, diffusing capacities, sputum eosinophil content, and other parameters in patients with asthma and emphysema. **Journal of Allergy**.v.44, n°3, p. 154-164, 1969.
99. PRIZMENT, A. E. et al. Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa women's health study. *Mod. Pathol.*29 (5), 516-527, Maio, 2016.
100. QUEIROZ, M. L.; CHIEFFI, P.P. Síndrome da larva migrans visceral e *Toxocara canis*. *Arq. Med. Hop. Fac.Cienc. Santa Casa de São Paulo*,50(3):117-120,2005.
101. RAINBIRD, M.A, MACMILLAN, D., MEEUSEN, E.N. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. **Parasite Immunol**.v.20, n°2, p.93-103, Feb. 1998.
102. RODOLPHO, J.M. de A. Avaliação da expressão das moléculas CD80, CD86 e MHC II em eosinófilos durante a Síndrome da Larva Migrans visceral. **Dissertação de Mestrado –Programa de PG em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos- UFSCar**,2012.
103. RODOLPHO JMA. et al. Expression of the costimulatory molecules CD80, C86 and MHC II in Eosinophil, during the peak of eosinophilia in the syndrome larvas migrans. *Elixir Bio Technology* (2014) **66**:2016-2021.
104. ROGERIO, A. P., ANIBAL, F. F. Role of leukotrienes on protozoan and helminthic infection. **Mediators of Inflammation** (Print), 2012.
105. ROITT, I., Brostoff, J. & MALE, D., 2001, **Immunology**, Mosby, 6th edition, London, 480p.
106. ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 85(1):9-18; 21,2000.
107. ROTHENBERG ME, HOGAN SP. The eosinophil. *Annual Review of Immunology* (2006) **24**:147–174 doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720.
108. ROURE, S. et al. Epidemiological clinical diagnostic and economic features of na immigrant population of chronic shistosomiasis sufleres with long term residence in a non endemic country (North metropolitan área of Barcelona,2002-2016). *Plos one*; sep.2017.
109. RUBINSKY-ELEFANT, A. et al., Potential immunological markerse for diagnosis and therapeutic assessment of Toxocariasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*,53(2),61-65,2011.

110. RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.*241(1):260-8,2011.
111. SABIN, E.A., KOPF, M.A., PEARCE, E.J. Schistosoma mansoni egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. **J Exp Med.** v.184, n°5, p.1871-8, Nov.1996.
112. SADEGHI MH, MORICE AH. The Emerging Role of The Eosinophil and Its Measurement in Chronic Cough. *Open Respir Med J.* (2017) **30**:11:17-30 doi: 10.2174/1874306401711010017.
113. SALVADOR, S. Pediatric neurotoxocariasis with concomitant cerebral, cerebellar, and peripheral nervous system involvement: case report and review of the literature. *Jornal de Pediatria - Vol. 86, No. 6, 2010*
114. SANDERSON CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood.* 1992; 79 (12): 3101-9
115. SANTAREM, V. A. et al. Toxocariase canina humana. *Vet. Zootec.* p.437-447, v.16, n3, set 2009.
116. SANTOS, D. F. C. dos. Toxocarose: um problema para a saude humana nas zonas urbanas. Dissertação apresentada ao curso de Ciencias Farmaceuticas da Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologicas, Lisboa, 2012.
117. SETTERBLAD, N. et al. B Cell Lipid Rafts Regulate Both Peptide-Dependent and Peptide-Independent APC-T Cell Interaction. *The Journal of Immunology*, 2004; 173:1876-1886.
118. SHAMRI, R. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 2011 January ; 343(1): 57–83.
119. SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* v.76, p.520–527, 2004
120. SCARPA, M. et al., CD80-CD28 signaling controls the progression of inflammatory colorectal carcinogenesis *Oncotarget*, Vol. 6, No. 24.2014.
121. SOUZA, R. F. et al. Prevalencia e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador da Bahia. *Rev. Bras. De Med. Trop.*, 44(4), 516-519, jul-ago,2011.
122. SUGANE K, OSHIMA T. Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. *Parasite immunology* (1982) **4**:307-318, PMID:6983050

123. SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGANS, WANG JT, RAMAGED, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
124. SCHOLLAERT, K. et al. Generation of eosinophils from cryopreserved murine bone marrow cells. **Plos one**, December 2014.
125. SPECHT S, SAEFTEL M, ARNDT M, ENDL E, DUBBEN B, LEE NA et al. Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun*. 2006; 74 (9): 5236-43.
126. TAMIR, A. Age-Dependent Alterations in the Assembly of Signal Transduction Complexes at the Site of T Cell/APC Interaction. *J Immunol* 2000; 165:1243-1251.
127. TAYLOR R. Interpretation Of the correlation coefficient: a basic review. *Journal Of Diagnostic Medical Sonography*. 1990;6(n.1):35---9.
128. TERRA, R. et al. Effect of exercise on immune system: response adaptation and cell signaling. *Rev. Bras. Esp.*, v18, n3, mai-jun, 2012.
129. TURNER, K.J, et al, Regulation of asthma by intestinal parasites. Investigation of possible mechanisms. **Immunology**, v. 35, n°2, p. 281-288, 1979.
130. VAN BERKEL W, et al., Requirement of the *Caenorhabditis elegans* RapGEF pxf-1 and rap-1 for epithelial integrity. *Mol Biol Cell* 16: 106–116, 2006
131. VAN RIJT, L.S, et al., Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. **The Journal of Immunology**, 171, 3372– 3378, 2003.
132. VARGAFTIG, B. B., BRAQUET, P.G. PAF-acether today--relevance for acute experimental anaphylaxis. **Br Med Bull**. v.43, n°2, p.312-35, April, 1987.
133. XIANG, J. et al., Graded function of Cd80 and CD86 in initiation of T Cell immune response and cardiac allograft survival. *European Society for Organ Transplantation* 21 (2008) 163–168.
134. WANG, Y. C.; SASHIDHAMURTHY, R.; NAGARAJAN, S. S. B7-1 HAS (CD80- CD24) a recombinant hybrid costimulatory molecule retains ligand and costimulatory functions. **ImmLett**, 2007.
135. WARDLAW, A.J, et al., Leukotrienes, LTC4 e LTB4 in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v. 84, p. 19-26, 1989.
136. WON EJ, KIM J, SHIN MG, SHIN JH, SUH SP, RYANG DW. Seroepidemiology of Toxocariasis and Its Clinical Implications in Gwangju and

Jeonnam-province, Korea. *Clinical Microbiology* (2015) **35**:449-453, doi: 10.3343/alm.2015.35.4.449.

137. YANG D, CHEN Q, SU SB, ZHANG P, KUROSAKA K, CASPI RR et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med.* 2008; 205 (1): 79- 90. 44.

138. ZAGO, M. A. et al. *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu, 2001.

139. ZAJAC, A.M. & CONBOY, G.A., 2012. *Veterinary Clinical Parasitology* 8th ed., Oxford: Blackwell Publishis.

140. ZIEGLER, H.K; UNANUE, E.R. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. **Proceedings of the National.**

141. ZIELINSKI, A et al. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.* 42: 2215–2220,2017.
ZHANG, R. Eotaxin and IL-4 levels are increased in induced sputum and correlate with sputum eosinophils in patients with nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *Medicine* (2017) 96:13.