

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Harpagophytum  
procumbens* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxocara canis***

SANDRA REGINA P. DE OLIVEIRA

São Carlos – SP

2012

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Harpagophytum procumbens* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxocara canis***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

.

SANDRA REGINA P. DE OLIVEIRA

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof.<sup>a</sup> Dr. Claudio A. Torres Suazo

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48is

Oliveira, Sandra Regina Pereira de.  
Avaliação do efeito do extrato etanólico bruto de  
*Harpagophytum procumbens* em camundongos infectados  
com *Toxocara canis* / Sandra Regina Pereira de Oliveira. --  
São Carlos : UFSCar, 2013.  
83 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Eosinófilos. 3. Imunologia. 4.  
Parasitologia. 5. Tratamento. I. Título.

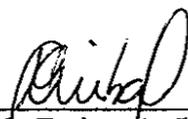
CDD: 660.6 (20ª)

**Sandra Regina Pereira de Oliveira**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

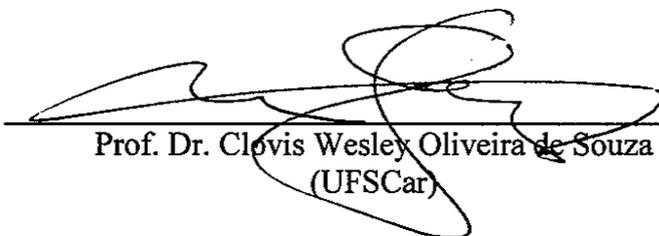
**Aprovado em: 29/02/2012**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof.ª Dr.ª. Fernanda de Freitas Aníbal (Orientadora)  
(UFSCar)



---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
(UFSCar)



---

Prof.ª Dr.ª. Odila Rigolin de Sá  
(FESP/UEMG)

**Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional,  
Por me apresentarem princípios,  
que hoje norteiam minha vida!  
Por me ensinarem a lutar por meus ideais.  
Aos meus irmãos, que tanto me incentivam.  
Ao meu namorado Clayton, pelo amor,  
pela cumplicidade, tolerância e incentivo  
constante. A todos os amigos cuja presença me  
faz tão feliz!**

## **Agradecimentos**

Com amor e carinho, agradeço minha família, em especial meus queridos e amados pais, que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas. A vocês devo tudo que conquistei até então, pois sem a educação que me deram nada seria possível.

Agradeço meus queridos irmãos pelos momentos de descontração vividos em família. E ainda, por estarem presentes e me ajudarem nos momentos mais difíceis nestes dois anos.

Clayton, obrigada a você pelo apoio, incentivo, carinho, amor e principalmente pela paciência e compreensão. Obrigada por me ajudar a superar todas as dificuldades e barreiras às quais passei durante este período. Sei que deixou de realizar muitos planos em sua vida para me apoiar e ajudar, mas sei também que nos conhecemos no momento certo e muitas coisas ainda vamos conquistar juntos. Obrigada simplesmente por estar ao meu lado, te amo!

Agradeço meu querido tio Zé e meu lindo sobrinho Lucas pelos momentos de diversão e descontração!

Agradeço também minha querida sogra Beni , um exemplo de força e perseverança!

Ao meu querido e amado cãozinho Nino Henrique, minha riqueza, aos momentos de alegria e eterna fidelidade!

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia da UFSCar, Ricardo, Laís, Naiara, Débora e Joice, obrigada pela dedicação em todos os experimentos, pelos momentos de estudos e discussão de protocolos que foram primordiais para realização deste trabalho!

Aos amigos que moram no fundo do meu coração! Danilo, obrigado por me ouvir em momentos em que me senti sozinha, agradeço o apoio e palavras de incentivo, amizade, além dos momentos divertidos. Ricardo agradeço a toda sua amizade e dedicação. E vocês Helmínticas... Laís, Naiara, Débora e Joice, aquelas que com quem fiz uma eterna amizade, no qual dividimos confiança, brigamos, rimos, estudamos (nossa e como!). Espero que tornemos esse final de curso, o início de uma nova etapa de nossa grande e infinita amizade,

pois tenho certeza que de tudo que vivemos, temos diversos momentos de superação, força, união e muita alegria a lembrar!

À professora e amiga Dra. Patrícia Pinheiro, da UNESP de Botucatu, pelo incentivo desde a graduação, mesmo estando distante, sempre me conforta com palavras de carinho, admiração e incentivo!

Agradeço minha querida orientadora e amiga, Dra Fernanda de Freitas Aníbal, por quem tenho imensa admiração e respeito. Você sabe, sou fã incondicional, desde o dia em que assisti pela primeira vez a sua aula na graduação! Obrigada por sempre me incluir em seus projetos e ainda, por todas as oportunidades e experiências inéditas que você me proporcionou. Obrigada por sua amizade verdadeira e pelos conselhos que tanto me confortaram e direcionaram-me a seguir o melhor caminho!

Agradeço aos colaboradores: Dra Lucia Helena Facioli, Dr. Auro Nomizo, Dr. Edson Soares e UFscar Dr. Paulo César Vieira, Dr. Claudio A. T. Soares, Ana Soares, Aline Galvão e Fabiana Moraes pelas contribuições que viabilizaram a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Claudio A. T. Suazo por aceitar ser meu orientador e por todas as contribuições.

Meus sinceros agradecimentos ao Prefeito de Bebedouro e a toda atual equipe do Departamento Municipal de educação (DMEC) deste município e também ao Prof. Fabiano Botamedi , pela credibilidade e apoio a este estudo.

Enfim, agradeço a Deus por ter colocado tantas pessoas maravilhosas em minha vida e por ter me dado saúde e força para mais esta conquista!

**“Não importa onde você vai parar...  
Em que momento da vida você cansou  
O que importa que sempre é possível  
e necessário recomeçar.  
Recomeçar é dar chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e,  
o mais importante...  
Acreditar em você de novo!”**

**Carlos Drummond de Andrade**

## Resumo

A Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) é uma parasitose, causada pelo *Toxocara canis*, um dos helmintos mais frequente em cães. Nos hospedeiros definitivos, se apresentam em diferentes formas morfológicas, ovos embrionados, adultos machos e fêmeas. Entretanto, nos hospedeiros não habituais (ex.: homem e roedores), apresentam-se apenas no estágio de larvas infectantes (L3) e não completam seu ciclo biológico. A infecção no homem ocorre pela ingestão acidental de ovos larvados, que no intestino delgado liberam as larvas infectantes (L3), as quais atravessam a mucosa intestinal e pela via linfática atingem a circulação porta e o fígado chegando aos pulmões. As larvas podem ainda atravessar ativamente a parede do intestino, iniciar um processo de migração errática através dos diferentes tecidos do hospedeiro. As principais características dessa doença na fase crônica são as eosinofilias sanguínea e tecidual e altos níveis de IgE sérica. A resposta imunológica do hospedeiro as larvas, ocorre durante a migração tecidual, onde as larvas liberam produtos antigênicos de secreção-excreção (TES) que as protegem contra a reação do hospedeiro. Os TES apresentam uma fração alergênica responsável pela estimulação da produção e liberação de eosinófilos. Neste contexto, a busca por novas ferramentas terapêuticas que promovam menos danos aos indivíduos acometidos pelo aumento sistêmico dos eosinófilos torna-se importante. Assim, neste estudo, avaliamos a atividade modulatória e anti-inflamatória da *Harpagophytum procumbens* contra eosinofilia utilizando o modelo de infecção experimental com *T. canis* SLMV. Nossos resultados demonstraram que o extrato da *Harpagophytum procumbens* possui efeitos anti-inflamatório diminuindo no infiltrado eosinofílico no sangue e lavados da peritoneal e broncoalveolar, nos diferentes períodos analisados. O efeito anti-inflamatório pode ser decorrente da capacidade do extrato de *Harpagophytum procumbens* diminuir a produção de fatores que favorecem a proliferação e ativação de eosinófilos (IL-5, IL-4 e IL-13) no período 18<sup>o</sup>, estabelecido como o pico da eosinofilia. Além disso, nosso tratamento diminui a expressão das moléculas de adesão CD11b, CD11c no pico da eosinofilia durante a infecção por *T. canis*. A expressão da molécula CD40 por eosinófilos parece favorecer a sobrevivência deste leucócito, todavia, serão necessárias outras investigações que contribuam para o entendimento dos mecanismos pelos quais o extrato de *H. procumbens* pode interferir na migração dos eosinófilos para o sítio inflamatório neste modelo, uma vez que este evento é caracterizado como sendo ordem complexa e multifatorial.

**Palavra - chaves:** Eosinófilos, *Harpagophytum procumbens*, *Toxocara canis*, SLMV

## Abstract

The Syndrome of Visceral Larva Migrans (VLMS) is a parasitic disease caused by *Toxocara canis*, one of the most common helminthes in dogs. In the definitive hosts are present in different morphological forms, embryonated eggs, adult males and females. However, in unusual hosts (humans and rodents), present only in stage infective larvae (L3) and do not complete their life cycle. The infection in man occurs by ingestion of embryonated eggs which release in the small intestine infective larvae (L3), which cross the intestinal mucosa and the lymphatic vessels reach the circulation port reaching the lungs and liver. Larvae can still cross the gut wall actively start a process of erratic migration through different host tissues. The main characteristics of this disease in the chronic phase are eosinophilia blood and tissue and high levels of serum IgE. The immune response of host larvae occurs during tissue migration, where the larvae release antigenic products of excretion-secretion (TES) that protect against host reactions. The TES have a fraction of the allergen responsible for stimulating production and release of eosinophils. In this context, the search for new therapeutic tools that promote less damage to individuals affected by increased systemic eosinophil becomes important. In this study, we evaluated the modulatory activity and anti-inflammatory eosinophilia *Harpagophytum procumbens* against using the model of experimental infection with T. VLMS kennels. Our results showed that the extract of *Harpagophytum procumbens* has anti-inflammatory effects in reducing eosinophil infiltration in the blood and washed from the peritoneal and bronchoalveolar at different periods analyzed. The anti-inflammatory may be due to the ability of the extract *Harpagophytum procumbens* decrease the production of factors that favor the proliferation and activation of eosinophils (IL-5, IL-4 and IL-13) during 18, established as the peak of eosinophilia. Furthermore, our treatment decreases the expression adhesion molecules, CD11b, CD11c peak of eosinophilia during infection by T. kennels. The CD40 molecule expression by eosinophils seems to favor the survival of leukocytes, however, would require further investigations that contributed to the understanding of the mechanisms by which the extract of H. *procumbens* can interfere with the migration of eosinophils into the inflammatory site in this model, since this event is characterized as being complex order.

Keywords: Eosinophils, *Harpagophytum procumbens*, *Toxocara canis*, VLMS.

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV).....	15
1.3 Resposta imune à <i>T. canis</i> .....	22
1.4 Eosinófilos .....	25
1.4 <i>Harpagophytum procumbens</i> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Animais.....	33
3.2 Obtenção de ovos larvados de <i>T. canis</i> .....	33
3.3 Infecção dos camundongos com ovos de <i>T. canis</i> .....	33
3.4 Protocolo para preparação do extrato etanólico da <i>Harpagophytum procumbens</i> (extrato etanólico bruto) .....	33
3.5 Tratamento dos camundongos .....	34
3.6 Obtenções das células do lavado broncoalveolar (BAL), peritoneal (LCP) e do sangue .....	34
3.7 Contagem diferencial e total de células do lavado broncoalveolar (BAL), peritoneal (LCP) e do sangue .....	35
3.8 Cultura de células do Baço e quantificação dos níveis de citocinas e imunoglobulinas dos sobrenadantes. ....	35
3.9 Extração do antígeno total de <i>T. canis</i> .....	36
3.10 Homogenato do pulmão.....	36
3.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	36
3.11.1 Citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$ .....	36
3.11.2 Para detecção de Imunoglobulinas .....	37
3.12 Anticorpos Monoclonais para Citometria de Fluxo .....	38
3.12.1 Protocolo Experimental para a Análise da Expressão de Moléculas na superfície dos Eosinófilos por Citometria de Fluxo (FACSort).....	38
3.13 Histopatológico .....	39
3.14 Análise Estatística.....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
4.1 Avaliação do perfil celular durante a infecção por <i>T. canis</i> após o tratamento com <i>Harpagophytum procumbens</i> . ....	41

4.1.2 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos infectados ou não por <i>T. canis</i> e tratados ou não com <i>Harpagophytum procumbens</i>	41
4.1.3 Avaliação da migração celular para cavidade peritoneal (LCP) de camundongos infectados ou não por <i>T. canis</i> e tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	44
4.1.4 Avaliação da migração celular para espaço broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados ou não por <i>T. canis</i> e tratados ou não com <i>Harpagophytum procumbens</i>	46
4.2 Avaliação da expressão de moléculas na superfície em eosinófilos no sangue e lavado da cavidade peritoneal (LCP)	48
4.2.1 Expressão das integrinas CD11c, CD18, CD11b na superfície de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal (LCP) durante a infecção por <i>T. canis</i>	48
4.2.2 Expressão da molécula coestimulatória CD40 na superfície de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal (LCP) durante a infecção por <i>T. canis</i>	50
4.3 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no plasma de animais infectados ou não com <i>T. canis</i> e tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	52
4.3.1 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no pulmão de animais infectados ou não com <i>T. canis</i> e tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	54
4.3.2 Avaliação da produção das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no em cultura <i>ex vivo</i> de células do baço	56
4.4 Avaliação dos anticorpos circulantes	58
4.4.1 Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a no plasma	58
4.5 Histologia pulmonar no 18 <sup>o</sup> dia após a infecção	60
<b>5. DISCUSSÃO</b>	62
<b>6. CONCLUSÃO</b>	71
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	72
<b>8. Anexo 1</b>	83

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Morfologia externa do parasito adulto (macho e fêmea).....	17
FIGURA 2- Ovos larvados de <i>T. canis</i> .....	18
FIGURA 3- Larva infectante de <i>T. canis</i> (L3).....	18
FIGURA 4- Ciclo biológico do <i>Toxocara canis</i> no cão.....	20
FIGURA 5 - Ciclo de vida do <i>T. canis</i> em humanos .....	21
FIGURA 6- <i>Harpagophytum procumbens</i> .....	29
FIGURA 7- Contagem total e diferencial de leucócitos 5°, 18° e 36° dia após a infecção .....	43
FIGURA 8- Representativo da migração de células totais, eosinófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal (LCP).....	45
FIGURA 9- Representativo da migração de células totais, eosinófilos e células mononucleares para o espaço broncoalveola.....	47
FIGURA 10- Mediana de intensidade de fluorescência das integrinas CD11b, CD11c e CD18 (sangue e LCP) .....	49
FIGURA 11-Representativo da média da mediana de intensidade de fluorescência da molécula CD40 em eosinófilos do sangue e LCP.....	51
FIGURA 12- Avaliação da citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no plasma 18° dia após a infecção .....	53
FIGURA 13- Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no homogenato do pulmão no 18° dia após a infecção .....	55
FIGURA 14- Representativo concentrações das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no 18° dia após a infecção no sobrenadante de cultura de células do baço .....	57
FIGURA 15- Níveis anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti- <i>T. canis</i> presentes no plasma no 5°, 18° e 36° dia após a infecção .....	59
FIGURA 16- Fotomicrografia do parênquima pulmonar de camundongos infectados com <i>T. canis</i> tratados ou não com <i>H. procumbens</i> .....	61

## LISTA DE TABELA

Sumário da frequência da infecção humana pelo <i>Toxocara spp.</i> no Brasil e outros países.....	17
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

AA – Ácido Aracádônico

Balb/c- Camundongo albino de linhagem isogênica

C5a – Fragmento do complemento

C57BL/6- Camundongo 57 Black 6

ECP- Proteína eosinofílica catiônica

EDN- Neurotoxina derivada de eosinófilo

ELISA- Ensaio imunoenzimático

EPO- Peroxidase eosinofílica

EPM- Erro Padrão da Média

FACS- Seleção de células por fluorescência (análise por citometria de fluxo)

Fc<sub>γ</sub>R- Receptor para região cristalizável de anticorpo IgE

FITC- *Fluorescein Isothiocyanate*

GM-CSF - fator estimulador de colônia

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IFN- $\alpha$  – Interferon gama

Ig- Imunoglobulina

IL-1, 2, 3, 4, 5, ...13 Interleucina (citocina)

L3 – Larva infectante de 3<sup>o</sup> estágio

L4- larvas de estágio tardio

L5- adultos imaturos

LBA – Lavado broncoalveolar

LCP- Lavado da cavidade peritoneal

LFA- Antígeno associado à função linfocitária

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB<sub>4</sub> – Leucotrienos B<sub>4</sub>

LTC<sub>4</sub> – Leucotrieno C<sub>4</sub>

LTD<sub>4</sub> . Leucotrieno D<sub>4</sub>

LTE<sub>4</sub> . Leucotrieno E<sub>4</sub>

MBP- Proteína básica principal

MCP- Proteína quimioatraente de monócitos

MHC- Complexo de histocompatibilidade principal

MIF- Fator inibitório de migração de macrófago

MIP- Proteína inflamatória de macrófago  
MMK-886 – Inibidor da síntese de leucotrieno  
NF- $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear  
NO- Óxido nítrico  
PAF – Fator Ativador de Plaquetas  
PE - *Phycoerythrin*  
PGE2 – Prostaglandina E1 e E2  
PGD2 – Prostaglandinas D1 e D2  
PBS- Solução salina tamponada com fosfato  
PBS-SFB- Solução salina tamponada com fosfato suplementada com soro bovino fetal  
RANTES – quimiocina CXL-5  
RPMI 1640- Roswell Park Memorial Institute – série 1640  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SLMV – Síndrome da Larva Migrans Visceral  
*T. canis* – *Toxocara canis*  
*Tc* – animais infectados com *T. canis*  
*Tc+Hp* – animais infectados e tratados com *H. procumbens*  
TES – antígeno de secreção e excreção de *Toxocara canis*  
Th- Linfócito T helper ou auxiliar  
TGF-( $\alpha,\beta$ ) – fator transformador do crescimento alfa e beta  
TMB - Tetrametilbenzidina  
TNF- Fator de necrose tumoral  
TxB<sub>2</sub> – Tromboxano B<sub>2</sub>  
TES – antígeno de secreção e excreção  
VCAM- Molécula de adesão celular vascular 8  
VIP – polipeptídeo intestinal vasoativo  
VLA- Antígeno muito tardio

## **1.INTRODUÇÃO**

O notável crescimento urbano desencadeou problemas em relação à saúde pública, sendo alguns mais acentuados. Nessa perspectiva, é importante ressaltar o controle de animais nas cidades brasileiras que, quando ausente, pode ser um fator impactante em relação ao adoecimento da população humana, uma vez que representam reservatórios de importantes agentes zoonóticos (MATOS et. al., 2002).

Diversos parasitos que utilizam cães e gatos, respectivamente, como hospedeiros definitivos ou intermediários podem ser transmitidos ao homem e causar doenças (ANDRESIUK et. al., 2003). Neste contexto, a Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) tem importante destaque, uma vez que, em sua cadeia de transmissão, tem esses como principais hospedeiros. Além disso, existe um forte envolvimento, desses animais, com a contaminação do solo, pois frequentam áreas públicas de lazer destinadas à população humana e, rotineiramente, defecam nesses locais.

Embora muitos estudos sobre a frequência da doença em grupos específicos e fatores de risco para infecção tenham sido realizados no Brasil, a SLMV ainda é pouco conhecida pela população e até mesmo por alguns profissionais de saúde. Atualmente, sabe-se que esta síndrome constitui um sério problema para a saúde pública e que embora não seja causa freqüente de mortalidade pode levar o paciente à diminuição na sua produtividade e perdas econômicas com tratamento e diagnóstico (HOTEZ & WILKINS, 2009).

### **1.1Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV)**

O termo Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV), também denominada por alguns autores de Toxocaríase humana (QUEIROZ, CHIEFFI, 2005), foi introduzido pela primeira vez por BEAVER (1952), em analogia à Síndrome da Larva Migrans Cutânea, para definir uma situação clínica que acometia crianças com sintomas pulmonares, hepatomegalia e eosinofilia persistente. Em 1969, o autor restringiu a denominação da SLMV, mais propriamente para situações decorrentes à infecção parasitária, desencadeada pela migração e persistências de larvas de nematódeos por período prolongado em tecidos de humanos, onde as mesmas permanecem imaturas e não completam seu ciclo biológico (BEAVER et. al., 1969).

Em estudo publicado recentemente observa-se a importância desta parasitose em âmbito mundial (HOTEZ & WILKINS, 2009). Além disso, pesquisadores afirmam que se trata de uma zoonose presente em países tropicais e em desenvolvimento (MAGNAVAL et. al., 2001), e ainda, uma helmintíase comum nos Estados Unidos da América, afetando milhões de americanos que vivem na pobreza (HOTEZ & WILKINS, 2009). Contudo, a prevalência em humanos tem sido subestimada e a doença negligenciada como problema de saúde pública (ALTCHEH et. al., 2003).

Neste contexto, estudos têm sido realizados em vários países, inclusive no Brasil, com o objetivo de avaliar a frequência de soropositividade à *Toxocara canis* em diferentes áreas (rurais e urbanas) e analisar as possíveis variáveis epidemiológicas que possam ter relação com a infecção (tabela 1).

#### Sumário da frequência da infecção humana pelo *Toxocara spp* no Brasil e outros países

Cidade/País	Faixa etária	Frequência%	Referência
Brasília	1-12	(N° 302) 21,8	Campos Jr et. al. 2003
Campinas	1-80	(N° 138) 23,9	Anaruma Filho et. al. 2002
São Paulo	1-1	(N° 208) 54,8	Figueiredo et. al., 2005
Vitória	<1	(N° 100) 39	Moreira-Silva et. al. 1998
Fernandópolis	-	(N°39 ) 15,4%	Cassenote, 2010
Sorocaba	Escolares	(N° 180) 38,3	Coelho et. al. 2004
Pernambuco	-	(N° 180) 40	Virginia et. al. 1991
Espanha	1-12	(N°1009) 62.2	Rawlins et. al., 2002
África do Sul	3-12	(N° 92) 44,6	Liao et al., 2010
EUA	1-11 (brancos)	(N° 1122) 7,3	Hermann et al. 1985
EUA	1 -11 (negros)	(N° 268) 30	Hermann et al. 1985
Canadá	-	(N° 4652) 5,4	Marmor et. al. 1987
Argentina	1-14	(N° 81) 46.9	Radman et. al. (2000
Venezuela	1-15	(N° 368) 30	Lynch et. al. (1993)

## 1.2 Agente etiológico

Apesar de diversos helmintos serem implicados na etiologia da SLMV, os ascarídeos do gênero *Toxocara* são os mais comumente envolvidos, e dentre essas a espécie *Toxocara canis* é identificada com maior frequência (CHIEFFI E CASEIRO, 2002), devido às peculiaridades que abrangem seu ciclo biológico e pelo padrão de migração larvária (ALDERETTE, 2001).

*Toxocara canis* é um ascarídeo que parasita o intestino de canídeos, frequentemente encontrado em cães domésticos (LESCANO et. al., 2005). A fêmea adulta mede cerca de 6-18 cm, o macho de 4-10 cm com extremidade posterior recurvada no sentido ventral (figura 1). Quando adulta, a fêmea de *Toxocara* é capaz de produzir até 200.000 ovos por dia (BARRIGA, 1991) e, como a carga parasitária no animal infectado pode alcançar até várias centenas de parasitas, esses hospedeiros podem contaminar o ambiente com milhões de ovos diariamente (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981).



**Figura 1:** Forma adulta do *Toxocara canis* mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos. Na figura B, as setas indicam que a extremidade posterior é recurvada apenas no macho.

Fonte: CORREIA & OLIVEIRA, 2012

Os ovos são extremamente resistentes a fatores hostis, podendo manter-se viáveis por longos períodos no solo. Para tanto, possuem três camadas: a mais externa (mamilonada); a central, composta de proteína e quitina, e a camada interna, predominantemente lipídica. Sendo esta última, a principal barreira de permeabilidade do ovo (figura 2). Nas fezes, os ovos, não são larvados e, portanto, não são infectantes

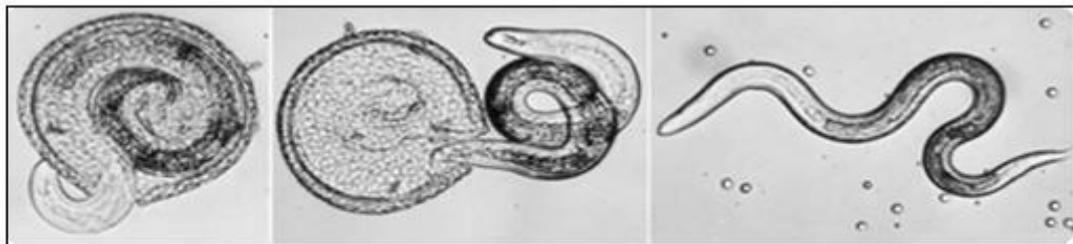
(JACOB & OSELKA, 1991). Para que adquiram esta caracterização são necessárias condições adequadas de temperatura (15° C a 35° C) e umidade, sendo que, nessas situações, em torno de 85% dos ovos tornam-se infectantes no período de duas a cinco semanas (ARAÚJO, 1972) (Figura 2).



**Figura 2** - Ovos larvados de *T. canis* mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos, no aumento de 40 X em Microscópio Óptico.

**Fonte:** OLIVEIRA & RODOLPHO, 2010

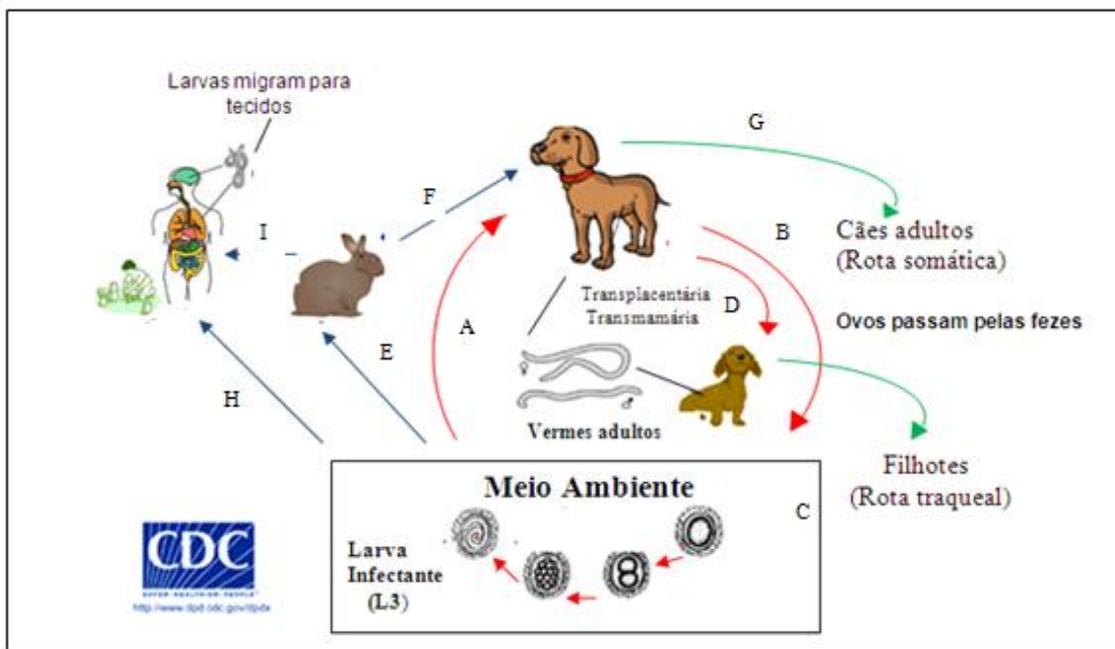
A forma infectante do parasito é a larva de 3° estágio (L3) (MAGNAVAL et. al., 2001; CUNHA, 2005) (Figura 3). Após o embrionamento e sob condições ambientais adequadas, os cães podem se infectar pela ingestão de ovos larvados por diferentes vias dadas pela: ingestão de ovos infectantes, ingestão da larva e tecidos de hospedeiros paratênicos, migração transplacentária, passagem da larva pelo leite da cadela que amamenta seus filhotes; ingestão pela cadela de larvas de estágio tardio (L4) ou adultos imaturos (L5) presentes nas fezes ou vômitos de filhotes contaminados (JACOB & OSELKA, 1991).



**Figura 3** - Larva infectante (L3) de *T. canis*. Fonte imagem adaptada CDC, 2011

O ciclo biológico do *T. canis* na população canina é dependente da idade e sexo do animal (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981). Em cães com idade superior a cinco semanas e cadelas não prenhas, o ciclo do parasito não se completa, as larvas migram do pulmão para o coração e daí para os tecidos (fígado, rins, pulmões e músculos), onde permanecem encistadas, sem desenvolvimento, podendo sobreviver por vários anos (rota somática) (SPRENT, 1958). Entretanto, em casos em que há comprometimento na resposta imune nesses animais, o ciclo hepato-traqueal se completa e as larvas chegam à sua forma adulta, após 21 dias da infecção (BARRIGA, 1988). Em cães jovens, após ingestão dos ovos embrionados, as larvas são liberadas no estômago e intestino delgado. Estas penetram na mucosa intestinal, invadem a corrente linfática ou sanguínea e alcançam o fígado do animal em 24 horas. De três a cinco dias após infecção, atingem o coração e os pulmões, através do sistema vascular. Dos pulmões, algumas larvas passam dos brônquios para a traquéia e faringe, sendo então deglutidas novamente (rota traqueal). A seguir, essas larvas, tornam-se vermes adultos na luz intestinal, iniciando, assim, a postura de ovos após 14 dias de infecção (BARRIGA, 1991).

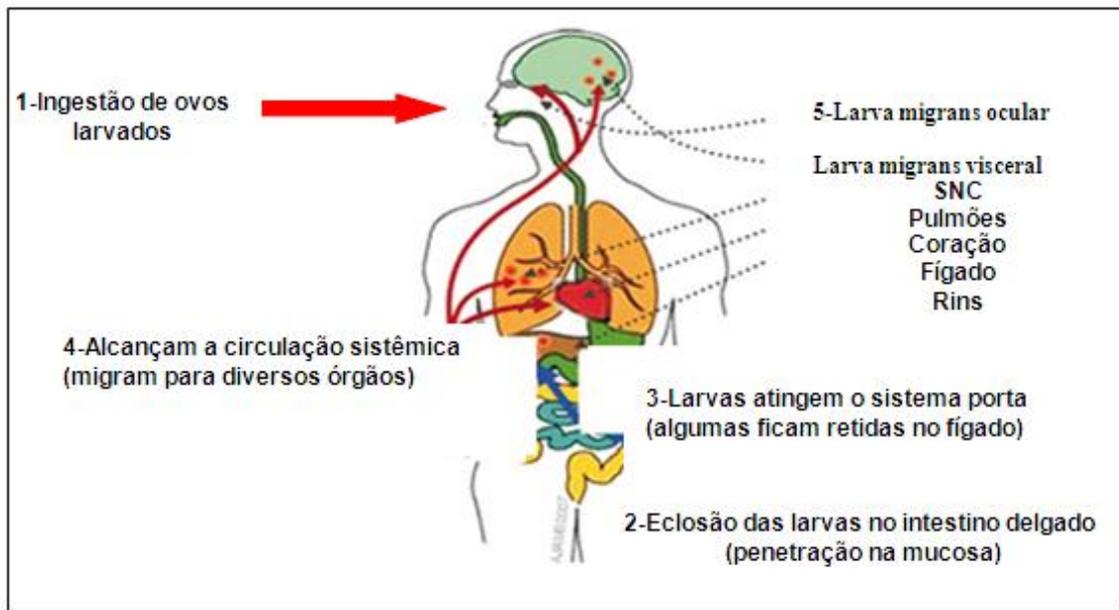
A transmissão transplacentária, característica do *T. canis*, é bastante importante do ponto de vista de contaminação ambiental, uma vez que grande parte dos cães nasce com alto grau de parasitismo, podendo promover a disseminação da infecção (JACOB & OSELKA, 1991). Em cadelas prenhas, as larvas latentes são reativadas e infectam os filhotes por via transplacentária permanecendo no fígado desses animais, até o nascimento; quando passam para os pulmões, continuam a rota traqueal e, ao chegarem ao intestino delgado, tornam-se vermes adultos. O ciclo também pode completar nessas cadelas. Assim, por meio da amamentação a transmissão aos filhotes é efetiva, uma vez que logo após o parto é constatada a presença de larva no colostro (ELEFANT et. al., 2001). Além destas rotas de transmissão mais frequentes, existe a possibilidade de ingestão de tecidos de hospedeiro paratênicos, com larvas quiescentes, (BISSERU et. al., 1996; DESPOMMIER, 2003). A larva do *T. canis*, que permanece no tecido, mantém sua infectividade por longos períodos, tendo sido demonstrado que, pelo menos em camundongos, ratos, e coelhos, esta capacidade persiste por dois anos (BEAVER, 1956).



**Figura 4** - Ciclo biológico do *Toxocara canis* em hospedeiros definitivos (cães). Em cães infectados, as fêmeas ovipõem milhares de ovos por dia, estes são eliminados pelas fezes (A) contaminando assim o meio ambiente. Em condições ambientais favoráveis estes ovos se desenvolvem até alcançarem o estágio infectante L3 (C). Em animais adultos e cadelas não prenhas o ciclo não se completa (G - Rota somática). Além do ambiente, cães jovens se podem se contaminar pelas vias transmamária e/ou transplacentária (D) completando assim o ciclo biológico (rota traqueal). O homem e outros hospedeiros paratênicos podem se infectar através da ingestão acidental de ovos larvados (L3) de *T. canis* provenientes do ambiente contaminado (E, F, H, I), ocorrendo neste sentido uma migração errática para vários órgão e tecidos. Fonte: Imagem adaptada CDC, 2011.

Seres humanos, principalmente crianças, se infectam acidentalmente ao ingerir ovos contendo a larva infectante (L3) de *T. canis* (SCHANTZ, 1989; MAGNAVAL, et. al., 2001), embora, vários estudos relatem o aumento de acometimentos em indivíduos adultos (CHIATTONE et. al., 1983; SCHANTZ, 1989; CAMPOS JUNIOR et. al., 2003). A principal forma de infecção humana é pela ingestão acidental de ovos embrionados do parasito (BEAVER, 1952; HOFFMEISTER et. al., 2007). Contudo alguns estudos relatam que a infecção pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos, como carne mal passada de frango, coelho, porco e/ou de boi, ovinos), patos contaminados pelos ovos de *T. canis* (ITO et. al., 1986; NAGAKURA et. al., 1989; (SALEM & SCHANTZ, 1992; HOFFMEISTER et. al., 2007). A infecção ainda pode ocorrer através da inalação ou contato do individuo com ovos de *T. canis* presentes nas fezes de cães (STURCHLER et. al., 1990). Assim, os ovos ao chegarem ao intestino delgado do homem eclodem e liberam as formas larvárias L3, que são capazes de atravessar a mucosa intestinal e, por via linfática, atingirem a circulação porta e, por

consequente, o fígado. Essas, após saírem do fígado ganham à circulação sangüínea chegando aos pulmões. Atravessam os capilares pulmonares e caem na circulação pulmonar, coração, invadindo todo o organismo pela circulação sistêmica. Quando o tamanho das larvas excede o diâmetro dos capilares sangüíneos, ocorre uma migração ativa e errática através dos tecidos do hospedeiro, até se encistar e/ou morrer (Figura 4).



**Figura 5-** Ciclo de vida do *Toxocara canis* em seres humanos. Fonte: Imagem adaptada Delgado & Rodriguez-Morales 2009.

A fase de migração larvária ocasiona uma reação inflamatória aguda, tendo como principais características as eosinofilia sangüínea e tecidual e altos níveis de IgE sérica (KAYES & OAKS, 1976; TURNER et. al., 1979; NUTMAN et. al., 1984; TAYLOR et. al., 1988; FACCIOLI et. al., 1996, ANIBAL et. al., 2007). Outra característica observada neste modelo foi o aumento de mastócitos na parede do intestino delgado de camundongos infectados e aumento da hiperreatividade intestinal destes animais, sugerindo um papel ativo destas células na SLMV (SÁ-NUNES et. al., 2003).

Nas manifestações clínicas da SLMV humana, consideram-se alguns fatores predisponentes, como: o grau de infecção parasitária; estado nutricional do hospedeiro; intensidade da resposta inflamatória; localização tecidual das larvas e sensibilização do hospedeiro por antígenos das larvas (JACOB et. al., 1994). Estes fatores podem ou não estar associados, os quais levam os indivíduos a apresentarem a forma assintomática

(*covert ou* forma oculta), as manifestações clássicas da síndrome (SLMV) ou ainda a forma ocular (SLMO) (JACOB, 2000; DESPOMMIER, 2003; FIGUEREDO et. al., 2005). Ainda nesta fase, há liberação de produtos metabolicamente ativos e antigênicos denominados antígenos de secreção-excreção (TES), que são proteínas glicosiladas e proteases. Foi demonstrado que esses antígenos localizam-se na epicutícula das larvas e são receptores importantes para anticorpos (LAMBERTUCCI et. al., 1996; ALTCHER et. al., 2003).

Contudo, a infecção no ser humano ainda pode ser assintomática, com sintomas variados ou podem ter evolução fatal. A grande variabilidade de manifestações clínicas relaciona-se com a carga parasitária, a frequência de infecção, a distribuição das larvas nos tecidos e a intensidade da resposta inflamatória do indivíduo (SCHANTZ, 1989). Raramente, o homem pode albergar o verme adulto de *T. canis* ao ingerir acidentalmente larvas de 5º estágio (L5), liberadas por cães com hiperinfecção. Fato este, que pode acometer principalmente crianças, devido à ocorrência da geofagia (BISSERU et.al., 1966; SCHANTZ, 1989). Segundo Barriga, (1988) a geofagia, é um relato frequente em pacientes com SLMV, sugerindo que a contaminação ambiental pode ser um forte indicador para o risco de a população humana ser acometida pela infecção por *T. canis*.

### **1.3 RESPOSTA IMUNE à *T. canis***

Infecções helmínticas envolvem diversos mecanismos de defesa devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitos, que são antigenicamente complexos (MACHADO et. al., 2004). A elevada prevalência relatada na população mundial demonstra que os helmintos estão envolvidos com sofisticados mecanismos moleculares, de escape, invasão e supressão do sistema imune do hospedeiro (MAIZELS et. al., 2004).

O estudo dos subgrupos Th1 e Th2 de células T auxiliares facilitou o entendimento da resposta imune do hospedeiro aos helmintos e outros parasitos. Na resposta imune tipo Th1 ocorre liberação de citocinas IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  que participam da reação de hipersensibilidade tipo tardia e ativam macrófagos. Na resposta imune tipo Th2, ocorre a liberação citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que, entre outras funções, induzem a produção de IgE pelas células B e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, que atuam como componentes fundamentais na defesa contra

helminhos (ELSE & FINKELMAN, 1998), pois modulam o sistema imune do hospedeiro e têm papel protetor contra o parasito em algumas infecções (DESPOMMIER, 2003).

A larva de *Toxocara canis* apresenta certa habilidade em sobreviver em seu hospedeiro por muitos meses, ocasionando a estimulação de linfócitos T helper 2 (Th2) e conseqüentemente a produção de IgE e eosinofilia por longos períodos (BUIJS et. al., 1997). Estudos têm demonstrado que os antígenos liberados pelas larvas de *T. canis*, parecem ser importantes na evasão do sistema imune pelo parasito (HALLACK, CUNHA, 1996; ALTCHER et. al., 2003).

Na fase de migração as larvas liberam produtos metabolicamente ativos e antigênicos denominados antígenos de secreção-excreção (TES), estes constituem uma mistura de proteínas glicolisadas com proteases. Estas por sua vez, contribuem para que as larvas sejam recobertas por uma espécie de cápsula de colágeno, favorecendo um elaborado mecanismo de escape contra a reação do hospedeiro (HALLACK, CUNHA, 1996; ALTCHER et. al., 2003, DESPOMMIER, 2003). Verifica-se também, a presença de uma fração alergênica responsável pela estimulação de eosinófilos, o que explica a eosinofilia característica da infecção (PELLOUX et. al., 2004). Além disto, antígenos TES presentes nas asas cefálicas e espícula da larva, funcionam como receptor para os anticorpos, desprendendo-se continuamente, o que vem a dificultar a eliminação da larva, uma vez que é necessária a formação do complexo antígeno TES-anticorpo para que os eosinófilos IgE dependentes possam destruí-la via citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (BADLEY et. al., 1987; CUNHA, 2005). Contudo, à medida que a infecção evolui, ocorre a organização das células inflamatórias ao redor das larvas e seus metabólitos, constituindo assim, uma reação granulomatosa, caracterizada por centro necrótico contendo a larva, e circundado por células multinucleadas, neutrófilos, monócitos e por grande número de eosinófilos. (HALLACK e CUNHA, 2005).

A eosinofilia encontrada em pacientes com SLMV pode estar envolvida tanto no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasita, como na reação inflamatória tecidual. O mecanismo pelo qual os eosinófilos lesam ou matam nematódeos, pode depender da deposição de grânulos na superfície larvária. Nesse mecanismo, os antígenos de secreção e excreção (TES) podem representar fatores importantes na aderência de eosinófilos à superfície larvária (ABE JACOB & JACOB, 1991).

Eosinófilos estão presentes em cortes histológicos nas infecções parasitárias, sendo encontrados em diferentes respostas inflamatória, como na resposta periovular (granuloma) no modelo da esquistossomose murina (SOUZA, 2011). Evidências experimentais em animais infectados com *Trichinella spiralis* sugerem que a eosinofilia é dependente do linfócito T. (ABE JACOB & JACOB, 1991), e ainda que, hemopoetinas para eosinófilos, interleucina 3 (IL-3), interleucina 5 (IL-5) e fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) são fatores produzidos por linfócito T implicados na patogênese das infecções parasitárias, no qual o antígeno parasitário pode ativar o linfócito T (ABE JACOB & JACOB, 1991; BADLEY *et. al.*, 1987; CUNHA, 2005).

A superfície do *T. canis* é reconhecida como uma estrutura dinâmica que se modifica completa e rapidamente, funcionando como nova fonte para altas concentrações de antígenos. Com isto, a maior resposta do hospedeiro aos antígenos inclui eosinofilia marcante e hiperglobulinemia (KAYES, 1997; RAYES & LAMBERTUCCI, 1999). Existem evidências de que a produção crônica de antígenos parasitários, estimulação contínua do sistema imune do hospedeiro e uma concomitante produção de eosinófilos podendo deixar complicações sistêmicas. Sendo assim, as manifestações clínicas e patológicas da SLMV são resultantes do dano tecidual direto causado pela migração larvária ou pela ação de seus metabólitos somados à resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro (BEAVER *et. al.*, 1952).

Os sintomas mais frequente são hepatomegalia, dor abdominal, febre, diminuição do apetite, agitação, manifestações pulmonares diversas como tosse e chiado no peito (JACOB *et. al.*, 1994; MAGNAVAL *et. al.*, 2001; FIGUEIREDO *et. al.*, 2005), e ainda, quadros de anemia, asma e rinite (FIGUEIREDO *et. al.*, 2005). Alterações cutâneas mais comumente associadas à SLMV são os quadros urticariformes e exantema nodular, podendo ser encontrado também quadro purpúrico (JACOB & OSELKA, 1991). Ainda, em casos mais graves como miocardite, nefrite e acometimento do sistema nervoso central (SNC) têm sido descritos e são decorrentes, muitas vezes, da resposta imunológica exarcebada do hospedeiro ao parasito (SCHANTZ, 1989; MAGNAVAL *et. al.*, 2001; ALTCHER *et. al.*, 2003).

## 1.4 EOSINÓFILOS

O termo eosinófilo foi inicialmente introduzido por Paul Ehrlich em 1879, quando observou células com numerosos grânulos citoplasmáticos com afinidade por corantes ácidos como a eosina (GOLDSMITH et. al., 1992). Eosinófilos são granulócitos que, quando ativados são capazes de fagocitar pequenas partículas e bactérias, porém sua principal forma de atuação no processo inflamatório consiste na liberação de mediadores químicos, citocinas, mediadores lipídicos e produtos reativos de oxigênio. Em indivíduos hígidos são encontrados em números baixos na circulação. Seu número normalmente aumenta em pacientes alérgicos ou que apresentam infestações por helmintos (JONES, 1993; SHURIN, 1995; SANDERSON, 1992; CALHOUN et. al., 1991).

Além da medula óssea, os eosinófilos também são encontrados nos tecidos, principalmente em locais que apresentam interface com o ambiente externo, como os tratos respiratório, gastrointestinal, genitourinário e pele e em pequenas quantidades no sangue periférico variando de 0 a 4% do total dos leucócitos (WELLER, 1991).

Morfologicamente, eosinófilos apresentam núcleo bilobulado, podendo ser observados dois ou mais núcleos (WARDLAW & MOQBEL, 1995). Seu citoplasma é rico em grânulos, no qual se observa um centro cristóide envolvido por uma matriz vista somente por microscopia eletrônica. Neste verifica-se a presença da Proteína Básica Principal (MBP) (WARDLAW & MOQBEL, 1995; WELLER, 1994), enquanto, que a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP), a Peroxidase Eosinofílica (EPO) e a Neurotoxina Derivada dos eosinófilos (EDN ou EPX) são encontradas na matriz (WARDLAW, 1994; WELLER, 1991). Estas proteínas são capazes de se ligar à superfície de vários tipos de células e componentes da matriz extracelular (JONES, 1993; SANDERSON, 1992; CALHOUN et. al., 1991). Além disto, eosinófilos possuem também outras enzimas como a collagenase e cristais de Charcot-Leyden (CLC), que é uma proteína com atividade de lisofosfolipase (ARCHER & HIRSCH, 1973; GLEICH & ADHOLPHSON, 1986).

Acredita-se que, a liberação do conteúdo granular de eosinófilos envolva mecanismos de necrose, pela qual os grânulos fundem-se com a membrana celular e liberam seu conteúdo para o meio extracelular e degranulação em etapas, resultando em um esvaziamento gradual do conteúdo dos grânulos específicos. Neste último, observa-se mudanças morfológicas consideradas desde a perda parcial ou completa da matriz,

perda do centro cristalóide, até o esvaziamento completo dos grânulos (WARDLAN & MOQBEL, 1995).

Os eosinófilos têm capacidade de sintetizar os produtos do metabolismo do ácido araquidônico utilizando-se da via da cicloxigenase e principalmente da via da 5-lipoxigenase (McEWEN, 1992; WELLER, 1994). O tromboxano B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>) é o principal produto da via da cicloxigenase, embora, pequenas quantidades de prostaglandina E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) e prostaglandina D<sub>2</sub>(PGD<sub>2</sub>) também sejam sintetizadas (McEWEN, 1992). O metabolismo pela via da 5-lipoxigenase forma predominantemente leucotrieno C<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>) (SILBERSTEIN, 1995; WELLER, 1991), que por sua vez é metabolizado em LTD<sub>4</sub> e este, subseqüentemente, em LTE<sub>4</sub>.

Dentre os leucócitos encontrados nos locais de inflamação, os eosinófilos apresentam a maior capacidade de síntese de LTC<sub>4</sub> (SILBERSTEIN, 1995), um potente mediador que causa broncoconstrição e aumento na permeabilidade vascular (GLEICH *et. al.*, 1993). Ao contrário dos neutrófilos que produzem grandes quantidades de LTB<sub>4</sub> e quantidades mínimas de LTC<sub>4</sub>, os eosinófilos produzem pequenas quantidades de LTB<sub>4</sub> e podem gerar quantidades consideráveis de 15-HETE (15-ácido hidroieicosatetraenóico) via 5-lipoxigenase (WARDLAW, 1994).

Além destes mediadores inflamatórios, os eosinófilos ativados liberam quantidades consideráveis do fator ativador de plaqueta (PAF) (BIGNOLD, 1995; McEWEN, 1992; SILBERSTEIN, 1995) e ainda, geram peróxido de hidrogênio e ânion superóxido em associação com a explosão respiratória (SILBERSTEIN, 1995).

Além disso, eosinófilos também tem a capacidade de secretar, citocinas, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF (Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), TGF- $\beta$  e TGF- $\alpha$  (Fator Transformador de Crescimento), TNF- $\alpha$  (WARDLAW *et.al.*, 1994; YANG & WEST, 2003).

Um fator quimiotático importante para eosinófilos é a eotaxina, uma citocina com ação exclusiva sobre estas células, tanto no seu recrutamento, como na sua ativação. A eotaxina parece atuar em cooperação com a IL-5, ligando-se aos eosinófilos por meio unicamente do receptor CCR3 (COOK *et. al.*, 1998). Outras quimiocinas com a função de atrair eosinófilos são a proteína inflamatória do macrófago-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) (WARDLAN & MOQBEL, 1995; GLEICH *et. al.*, 1992), a CXCL-8 (IL-8) e a proteína quimiotática para monócitos-3 (MCP-3) (WARDLAN & MOQBEL, 1995).

Os eosinófilos expressam vários receptores de membrana através dos quais se comunicam com o ambiente extracelular (WARDLAN, 1994). Desta forma sua adesão inicial pode ocorrer por meio da selectina-L, expressa em sua superfície (WARDLAN & MOQBEL, 1995), pela selectina-E (RESNICK & WELLER; SILBERSTEIN, 1995) ou ainda pela selectina-P (WARDLAN & MOQBEL, 1995; WELLER, 1994) presentes no endotélio, sendo esta última, por promover uma ligação intensa com o endotélio, considerada como a mais importante na adesão inicial (WARDLAN & MOQBEL).

Conseqüentemente, os eventos seguintes, à adesão e migração dos eosinófilos incluem expressão de integrinas em sua superfície, sendo as principais a VLA-4, LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) (WARDLAW, 1994; BIGNOLD, 1995) e p150,95 (CD11c/CD18). A adesão da integrina  $\beta_1$  VLA-4 ocorre principalmente com a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1). Além disso, a expressão da VCAM-1 pode ser regulada pela IL-4, uma citocina associada a linfócitos Th2 e que, portanto, aumentaria a transmigração dos eosinófilos através do endotélio via VLA-4/VCAM-1 (GLEICH et. al., 1993; REINICK & WELLER, 1993; WARDLAW, 1994). Já a adesão das  $\beta_2$  integrinas LFA-1 e Mac-1 ocorre principalmente com ICAM-1 (WARDLAW, 1994). As citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF – são particularmente importantes na regulação e desenvolvimento dos eosinófilos. Assim, a produção autócrina de IL-3, IL-5 e GM-CSF modulam sua viabilidade retardando a apoptose nos tecidos inflamados (MOQBEL, et.al., 1994; VALENT, 1994; WALKER et. al., 1994; ROTHERBERG, 1998).

Tanto a IL-3 como o GM-CSF atuam sobre os progenitores medulares imaturas e promovem expansão de células que se diferenciam em vários tipos celulares, incluindo eosinófilos (ABBAS & LICHTMAN, 1998). No entanto, a IL-5 parece ser a principal interleucina envolvida no aumento da produção de eosinófilos, caracterizando-se, também, por estimular o crescimento e diferenciação, quimiotaxia, além de prolongar a sobrevivência desta célula (OKUIDARA et. al., 1997; OKUIDARA, 1998).

A IL-5 é o um potente modulador do acúmulo de eosinófilo em diversas doenças (LALANI et. al., 1999) e vem sendo encontrada no sangue de pacientes com infecções parasitárias, síndrome hipereosinofílica, entre outras (WELLER, 1991). A produção autócrina de IL-5 pelos eosinófilos vem sendo implicada no recrutamento, ativação e permanência deste tipo celular no sítio da inflamação. (LALANI et. al., 1999; YANG & WEST, 2003). Esta citocina aumenta o recrutamento através do aumento da adesão, da migração transendotelial e infiltração pela mucosa. O aumento de IL-5 é

crucial para a inibição da apoptose do eosinófilo, pois induz a expressão de Bcl-2, (LALANI *et. al.*, 1999; YANG & WEST, 2003), sendo um importante mecanismo para o acúmulo de eosinófilos nos tecidos (YANG & WEST, 2003).

A produção de IL-4 parece ser importante na produção local de IgE e também pode ser um fator na expressão da célula Th2 (WARDLAW, 1995). Eosinófilos apresentam também, uma série de receptores para imunoglobulinas em sua membrana, incluindo, imunoglobulinas IgG, IgA e IgE (BIGNOLD, 1995) e para fragmentos do complemento como C3b (WARDLAW *et. al.*, 1994).

Outros mediadores e citocinas liberados por estas células são VIP (Polipeptídeo Intestinal Vasoativo); TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Fator transformador do Crescimento alfa e beta), TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral) interleucinas IL-2, IL-9, IL-13; IL-10, IL-12, IL-16 ; RANTES e IFN- $\gamma$  (Interferon gama) ((DEL POZO *et. al.*, 1990; KADIN *et. al.*, 1993; ELOVIC, *et. al.*, 1994; SCHRODER *et. al.*, 1994; FUJISAWA *et. al.*, 1994; WEG *et. al.*, 1995; LAMKHIOUED *et. al.*, 1996; NAKAJIMA *et. al.*, 1996; PEALMAN *et. al.*, 1997; LAMPINEM *et. al.*, 2004; FERLAND *et. al.*, 2004 ).

Importantes desordens como doenças alérgicas e infecções parasitárias podem proporcionar o acúmulo marcante de eosinófilos. No entanto, nos locais de inflamação, os eosinófilos geralmente estão presentes com outras células inflamatórias, incluindo neutrófilos, linfócitos e monócitos. Contudo, permanecem ainda inúmeras controvérsias quanto ao comportamento biológico destas células, visto que podem desempenhar funções diversificadas dependendo do local e as circunstâncias em que ocorre seu recrutamento (BIGNOLD, 1995).

Assim, a SLMV no modelo murino favorece um excelente modelo experimental para o estudo da resposta inflamatória com hipereosinofilia sanguínea e tecidual, possibilitando a busca por novas ferramentas terapêuticas que promovam menos danos aos indivíduos acometidos pelo aumento sistêmico dos eosinófilos.

### **1.5 *Harpagophytum procumbens* DC**

Embora vários anti-helmínticos como a dietilcarbamazina, a ivermectina, o tiabendazol, o mebendazol e o albendazol já tenham sido utilizados, não existe nenhum esquema terapêutico comprovadamente eficaz no tratamento da SLMV. Contudo a administração de anti-helmínticos é feita em associação com um anti-histamínico, visto que a remissão do quadro clínicos e/ou eosinófilos periféricos torna-se importante

devido à relação deste leucócito com as conseqüências danosas no indivíduo afetado (SHIELDS, 1984).

O uso de plantas medicinais é uma prática secular baseada no conhecimento popular e transmitida oralmente na maior parte das situações (NASCIMENTO et. al., 2000; CASTRO et. al., 2000. Neste sentido agregar evidências científicas a esta prática traria variadas vantagens, como baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos e evitar ou diminuir os riscos de intoxicação por uso inadequado (FURLAN, 1998). Além disso, a investigação de compostos naturais como fontes de novos agentes terapêuticos têm aumentado potencialmente nos últimos vinte anos, onde diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido avaliados e estudados (NASCIMENTO et. al., 2000; CASTRO et. al., 2000).

Popularmente conhecidos como "garra do diabo", *Harpagophytum procumbens* é uma planta de origem africana, especificamente, a partir do deserto Kalahari e nos estifes da Namíbia, Bostswana e África do Sul (BRIEN et. al., 2006). Sua denominação popular ocorre devido à morfologia dos frutos, que se apresentam cobertos com farpas espinhosas e curvadas. Apesar do nome da planta vir da aparência dos frutos, as propriedades medicinais são derivadas do tubérculo que contém uma mistura heterogênea de substâncias. Suas raízes tuberosas são comumente usadas pelos nativos africanos na forma de infuso para tratamento de doenças reumáticas, diabetes, arteriosclerose, malária, indigestão, febre entre outras (CLAKSON et al., 2003). Seu chá é recomendado para diabetes, alergias, como estimulante de apetite, analgésico, sedativo, diurético e principalmente contra artrite (LANHERS et al., 1992; ANDERSEN et al., 2004; CHRUBASIK et al., 2000).



**Figura 6** – (A) *Harpagophytum procumbens*, (B) Frutos, apresentam-se morfologicamente cobertos com farpas espinhosas e curvadas.

Fonte: Adaptado [www.reviversaudeholistica.blogspot.com](http://www.reviversaudeholistica.blogspot.com), 2008

Embora, conhecida desde o século XIX, somente após a primeira guerra mundial começaram os estudos sobre suas propriedades farmacológicas (CLARKSON et. al., 2003). Quimicamente, essa planta possui componentes potencialmente ativos como glicosídeos iridóides 0,5 a 3%, principalmente o harpagosídeo, os compostos fenóis derivados do ácido cinâmico, caféico e clorogênico, flavóides e  $\beta$ -sitosterol. Pela ação dos principais componentes, harpagosídeo e  $\beta$ -sitosterol, *H. procumbens* desempenha atividade anti-inflamatória (LANHERS et. al., 1992) que incluem mecanismos relacionados a inibição na síntese de TNF- $\alpha$ , da cicloxigenase 2 e da óxido nítrico sintase induzível via inibição de NF- $\kappa$ B (FIEBICH et. al., 2001; KASZKIN et. al., 2004; KUNDU et. al., 2005). Por consequência inibe a produção de prostaglandinas o que confere a propriedade analgésica. O efeito terapêutico desta planta pode estar associado com a biotransformação e formação *in vivo* de harpagogenina, por meio da hidrólise ácida ou enzimática do harpagosídeo (FONTAINE et al., 1981). Estudos em modelos experimentais de inflamação com extrato seco aquoso das raízes secundárias de *H. procumbens* (LANHERS et. al., 1992) demonstraram o efeito anti-inflamatório e analgésico do extrato (ANDERSEN et al., 2004). Estudos *in vitro* foram realizados para confirmação da ação dos extratos secos de *H. procumbens* ou do seu principal composto ativo, iridóide glicosilado harpagosídeo na síntese de eicosanóides e na produção de NO. Em cultura de condrócitos de coelhos, foi observado efeito protetor do harpagosídeo pela inibição de MMP 2 – (gelatinase A) (CHRUBASIK et. al., 2006). Outros estudos demonstraram que a síntese de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) foi inibida pelo extrato hidro alcoólico de *H. procumbens*. Porém os componentes iridóides – harpagosídeo e harpagosídeo não tiveram efeito sobre a liberação de TNF- $\alpha$  em doses baixas (FIEBICH et. al., 2001).

Jang et. al., (2003) mostraram que os mesmos extratos com concentrações maiores que 100 $\mu$ g/ml inibiram a liberação de citocinas IL-6 IL-1B e PGE-2. O extrato aquoso da planta suprimiu a síntese de PGE2 e a produção de NO pela inibição da expressão de RNA-m em fibroblastos de ratos estimulados por LPS.

Low et. al., 2001, avaliaram as propriedades farmacocinéticas da *H. procumbens* e seus efeitos sobre a síntese de eicosanóides (TxB-2 e LT) em voluntários saudáveis e os resultados indicaram que não houve alteração nos níveis de TXB-2, havendo correlação entre os níveis séricos de harpagosídeos e a inibição na síntese de LT.

A melhora no conhecimento, aplicação, mecanismo de ação dos princípios ativos de fitoterápicos como o extrato de *H. procumbens* pode preencher lacunas entre a

utilização popular e prescrições médicas. Assim, os estudos dos efeitos anti-inflamatórios da *H. procumbens* nos proporcionarão conhecer melhor seu possível potencial terapêutico e também suas interações com o organismo, principalmente durante síndromes com importante acúmulo de eosinófilos em diferentes compartimentos.

Há muito tempo a *H. procumbens* tem sido usada pela população africana para tratamentos que envolvem doenças inflamatórias, diabetes entre outras. No entanto nenhum relato sobre seus efeitos anti-inflamatório relacionados a parasitoses não foram descrito. Desta forma, avaliamos o potencial anti-inflamatório do extrato etanólico bruto da *H. procumbens* na modulação e recrutamento de eosinófilos, que ocasionam a eosinofilia, umas das principais características patogênicas ocasionada durante SLMV, nosso modelo experimental.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato etanólico bruto da *Harpagophytum procumbens* durante a infecção pelo *T. canis* em modelo animal.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar através da migração leucocitária o perfil inflamatório no pulmão, na cavidade peritoneal e no sangue dos animais infectados com *T. canis*, tratados e não tratados com extrato de *H. procumbens*;
- Avaliar a produção das citocinas, IL-4, IL-5, IL-13 e INF- $\gamma$  nos animais infectados com *T. canis*, tratados ou não com extrato de *H. procumbens*;
- Analisar a secreção de imunoglobulinas IgE, IgG1, IgG2a durante a infecção *in vivo*.
- Avaliar a expressão das moléculas de adesão CD11b, CD18, CD11c em eosinófilos do peritônio e sangue periférico nos animais infectados com *T. canis*, tratados ou não com extrato de *H. procumbens*;
- Analisar a expressão da molécula coestimulatória CD40 na superfície de eosinófilos *ex vivo* no 18º dia da infecção pelo *T. canis*;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, pesando entre 15 e 18 gramas (aproximadamente 4 semanas de idade), provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), livres de patógenos (*Specific Pathogen Free* - SPF). Os animais foram divididos em 3 grupos: Controle não infectados e não tratados, infectado com *T. canis* (Tc) e infectados e tratados com 100mg/kg com extrato etanólico bruto de *H. procumbens* (Tc+Hp). Os animais foram mantidos no Biotério do DMP- UFSCar, com livre acesso à água e alimento.

#### **3.2 Obtenção de ovos larvados de *T. canis***

Os ovos foram obtidos de fêmeas do parasito recuperadas de cães jovens através da administração de óleo mineral (4mL) com cloridrato de piperazina (100 mg/kg). Os cães doadores foram oriundos do recolhimento rotineiro do Centro de Zoonoses de Municipal Ribeirão Preto, SP. As fêmeas dos parasitos recuperadas foram dissecadas para extração de seus úteros, os quais foram divulsionados em placas de Petri, contendo formalina 2%. O material foi filtrado em gaze para obtenção dos ovos e armazenado em solução de formalina em placas de Petri, deixados à temperatura ambiente até alcançarem o estágio infectante (L3) (GOMES DE MORAES, 1971).

#### **3.3 Infecção dos camundongos com ovos de *T. canis***

Os camundongos foram infectados com ovos contendo larvas (L3) de *T. canis* por via oral (gavagem) com 500 ovos/0,5 mL salina, empregando-se cânulas apropriadas (SUGANE & OSHIMA, 1982). Os animais foram eutanasiados nos tempos previamente por nós estabelecidos, ou seja, no 5°, 18° e 36° dia após a infecção, para realização dos procedimentos descritos a seguir.

#### **3.4 Protocolo para preparação do extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* (extrato bruto)**

O extrato etanólico bruto comercial de *H. procumbens* foi preparado pelo aluno Ricardo Oliveira Correa (LAP-DMP-UFSCar) no laboratório de Produtos Naturais no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar), sob

orientação do Prof. Dr. Paulo César Vieira. Para a preparação do extrato, as raízes secundárias de *H. procumbens*, foram secas em estufa a 37°C durante três dias, sendo posteriormente maceradas até a obtenção do pó, o qual pesado, a cada 100 gramas foi acrescentado 1000 mL de etanol absoluto. O béquer contendo esta solução foi mantido em temperatura ambiente durante 72 horas com agitações a cada 24 horas, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro. Após o tempo descrito, o filtrado foi concentrado utilizando rota-vapor (BUCHI) com temperatura entre 40° a 45°C. Este processo de extração foi repetido duas vezes, obtendo o extrato bruto das raízes de *H. procumbens*. A secagem total do extrato foi realizada na capela, logo após o extrato seco foi armazenado a -20° C.

### **3.5 Tratamento dos camundongos**

Os camundongos foram pesados e a partir da média de peso do grupo determinou-se a preparação do tratamento, o extrato pesado foi diluído em água filtrada. A administração foi realizada por via oral (gavagem) utilizando cânula apropriada, contendo um volume de 0,3 mL por animal diariamente. Após esse período os animais foram eutanasiados nos tempos preestabelecidos e as células obtidas do lavado da cavidade peritoneal (LCP), lavado broncoalveolar (LBA) e sangue total foram analisadas. Alíquotas do extrato foram mantidas sob refrigeração a - 20°C, o tratamento foi preparado diariamente sendo o extrato diluído em água filtrada minutos antes da administração nos animais. O tratamento com extrato de *H. procumbens* na dose de 100 mg/Kg por animal iniciou-se após a infecção e manteve-se durante os 36 dias.

### **3.6 Obtenções das células do lavado broncoalveolar (LBA), peritoneal (LCP) e do sangue**

Nos tempos de 5, 18 e 36 dias após de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, realizou-se 2 experimentos independentes que totalizaram no seguinte número de animais em cada período distinto da infecção analisado: Controle: (14 animais); Tc: (16 animais); Tc+Hp: (16 animais). As técnicas de lavagem broncoalveolar e peritoneal foram utilizadas para recuperação de células da cavidade pulmonar (LBA) e peritoneal (LCP). Para obtenção do LBA utilizou-se 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS), contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato) empregando cânulas de polietileno introduzidas na parte superior da traquéia, o procedimento foi repetido duas vezes, totalizando um volume final de 2 mL e para o

lavado da cavidade peritoneal (LCP) foi utilizado 2 mL de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando uma agulha intraperitonealmente. O sangue foi obtido após sangria total dos animais por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa contendo Heparina. Realizou-se as contagens global e diferencial de células do sangue e lavados (LBA e LCP). As células sanguíneas e do lavado peritoneal foram ainda preparadas para análise da expressão das moléculas CD11b, CD18, CD11c e CD40 na superfície de eosinófilos através de citometria de fluxo (FACS).

### **3.7 Contagem diferencial e total de células do lavado broncoalveolar (LBA), peritoneal (LCP) e do sangue**

A contagem diferencial foi feita nos esfregaços sanguíneos e naqueles preparados em citocentrífuga (LBA e LCP) (Serocito Mod. 2400-Fanem) e corados com corante Panótico-Laborclin. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000 x. O número total de células/mm<sup>3</sup> nos diferentes compartimentos foi determinado empregando solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) para a lise das hemáceas (STIBBE *et al.*, 1985), na diluição 1:20 e posterior contagem em câmara de Neubauer.

### **3.8 Cultura de células do Baço e quantificação dos níveis de citocinas e imunoglobulinas dos sobrenadantes.**

Após a eutanásia, nos tempos pré-estabelecidos e realização da coleta dos lavados e sangue total foi realizada a retirada do baço dos animais. Os órgãos foram macerados e as suspensões celulares individuais foram lavadas com meio de RPMI – 1640 (SIGMA). A cultura foi feita com *pool* de células de cada 3 animais referentes aos diferentes grupos analisados. O sedimento celular foi coletado através da centrifugação a 1500 rpm durante cinco minutos e o número de células foi ajustado para  $5 \times 10^6$ /ml em meio RPMI 1640 completo (40µg de gentamicina, 5% de soro bovino fetal e 20 mM HEPES). Nestes ensaios, foram utilizadas preparações de células totais do baço. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços e os seguintes estímulos foram adicionados ou não: Concanavalina A (Con-A) (tipo IV-S, Sigma) e antígeno total de *T. canis*. As células permaneceram em cultura por 72 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e após este período os sobrenadantes foram congelados à -20°C, para posterior dosagem das citocinas: (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN-γ).

### **3.9 Extração do antígeno total de *T. canis***

Os ovos mantidos em formalina, conforme item 3.2, foram retirados das placas de Petri, recolhidos em tubos de 50 mL contendo pérolas de vidro, até o volume de 30 mL, e adicionado 20 mL da solução de Hipoclorito 1%. Estes tubos foram agitados vigorosamente durante 30 minutos, alternando banhos nitrogênio (N) líquido e água quente para que ocorra a eclosão dos ovos, liberando as larvas. Posteriormente, estes tubos foram centrifugados a 3000 g por 5 minutos, repetindo esta centrifugação 3 vezes com PBS 1x. Posteriormente, o “*pellet*” foi recuperado e quantificado a proteína através do método de “*Bradford*” (BRADFORD, 1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. 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 em 595 nm. (COMPTON, 1985).

### **3.10 Homogenato do pulmão**

O pulmão esquerdo de cada animal foi removido, lavado em salina 1x, pesado, mantido em tubo criogênico e congelado inicialmente em freezer – 20°C e posteriormente em – 80°C até a análise das amostras. Para a detecção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$ ) e imunoglobulinas (IgE, IgG1 e IgG2a), por meio da realização da técnica de ELISA, os pulmões foram descongelados e para cada 100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de PBS 1x. Os tecidos foram submetidos à homogeneização em equipamento apropriado (Homogenizer Workcenter - IKA T10), em seguida, os tubos com os tecidos homogeneizados foram centrifugados em centrífuga (Eppendorf 5804R) refrigerada 4°C, durante 20 minutos a velocidade de 4000 rpm, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e mantido a – 20°C.

### **3.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

#### **3.11.1 Citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$**

Para o ELISA (Kit BD-R&D) utilizamos placas de microtitulação com 96 poços. Inicialmente foi feita a sensibilização da placa com 100  $\mu$ L/poço de solução contendo o

anticorpo de captura (0.5 µg/mL) diluído em PBS. As placas foram incubadas por 18h a 4°C. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado, as placas foram lavadas e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas foi feito, sendo adicionando 200 µL de PBS 10% de soro bovino fetal. Novamente, as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida lavadas. A seguir foram adicionadas as diferentes diluições da citocina recombinante padrão, e as amostras em estudo (100 µL/poço) diluídas 1:10 (homogenato pulmonar) e 1:2 (plasma) em PBS 1x. A primeira concentração da citocina 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 µL/poço do anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 0.125 µg/mL). Após nova incubação de 1 hora à temperatura ambiente e novo ciclo de lavagem, foram adicionados (100 µL/poço) da enzima estrepto-avidina (1:1000) diluída em PBS e soro bovino fetal 10%, depois de 30 minutos as placas foram novamente lavadas e 100 µL/poço do substrato foi adicionado. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, a reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 450nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

### 3.11.2 Detecção de Imunoglobulinas – IgE, IgG1, IgG2a

Para detecção das imunoglobulinas (Kit BD) foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços recobertas com 200ng de proteínas da antígeno total de *T. canis* (diluídos em tampão carbonato e aplicados 100µl/poço). Posteriormente, lavamos com PBS-Tween 20 0,05% e posteriormente acrescentamos 200 µL de tampão bloqueio (PBS-BSA 1%), logo após as placas permaneceram por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem, foi adicionado 50 µL das amostras diluídas (diluição plasma 1:2 /homogenato do pulmão puro) em tampão carbonato, as placas permaneceram 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas e 100 µL de Ac secundário conjugado com biotina (4 µL Ac + 10 mL de tampão carbonato)foi adicionado . Após 1h, as placas foram lavadas, sendo a seguir adicionado 100 µL da enzima estreptoavidina (diluição 1:200). Após 30 minutos, as placas foram lavadas e 100 µL do substrato, uma mistura 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina (TMB) (BD-OpTEIA), foi adicionado. Logo após, a reação foi bloqueada com 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1M. A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

### **3.12 Anticorpos Monoclonais para Citometria de Fluxo**

Os anticorpos monoclonais para os ensaios de citometria de fluxo (FACS) foram cedidos pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, do Laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais para análise das moléculas envolvidas na função efetora dos eosinófilos: anticorpo anti-CD40 de camundongo (IgG2 de rato) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC); anti-CD11b de camundongo (IgG2b de rato) marcado com Phicoeritrina (PE); anti-CD11c (IgG2 de camundongo) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD 18 de camundongo (IgG2a de rato) marcado com Phicoeritrina (PE) e anticorpo de bloqueio (“Fc Block”). Como isotipos controles, foram utilizados IgG2b de rato, anticorpos irrelevantes (especificidades desconhecidas) e marcados com FITC e PE. Todos os anticorpos foram adquiridos da Pharmingen (SAN DIEGO, CA, USA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

#### **3.12.1 Protocolo Experimental para a Análise da Expressão de Moléculas na superfície dos Eosinófilos por Citometria de Fluxo**

Após a eutanásia dos animais, nos tempos pré-estabelecidos, foram coletados o lavado da cavidade peritoneal (LCP) e sangue total, sendo feito “pool” das células de cada três animais. Em seguida foi realizada a lise das hemácias do sangue e LCP. Para tanto, foram adicionados 5 mL do tampão de lise (8,02g NH<sub>4</sub>Cl, 0,84g NaHCO<sub>3</sub>, 0,370g EDTA), em cada um dos tubos de coleta (15 mL), deixando 5 minutos no gelo e no escuro. Após esse procedimento o sangue e o LCP foram centrifugados e as células ressuspensas em 1 mL de PBS-FBS 2% (Tampão FACS). Posteriormente foi feita a contagem das células e as suspensões acertadas para 1 x 10<sup>7</sup> células/mL. Em seguida foram pipetados 100 µL de cada amostra em um tubo apropriado (1 x 10<sup>6</sup> células), as células foram incubadas com anticorpo bloqueador de ligação inespecífica (“*Fc block*”), durante 40 minutos, no escuro. Após esse tempo, as células foram incubadas com anticorpos marcados com compostos fluorescentes durante 30 minutos a 4°C. Logo após essa incubação, as células foram lavadas com tampão FACS e ressuspensas em

300 µL de tampão de Fixação (PBS-Formol 1%). A análise da expressão dessas moléculas foi realizada por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto no Laboratório de Citometria de Fluxo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto FCFRP-USP, com auxílio durante a aquisição e análise, da biomédica Fabiana Rossetto de Moraes, técnica responsável. Os resultados foram expressos na forma de histograma e representam a mediana da intensidade de fluorescência, que reflete a expressão das moléculas CD11b, CD18, CD11c e CD40 na superfície dos eosinófilos do sangue e do LCP. A mediana da intensidade de fluorescência das moléculas foi determinada em populações selecionadas que representam por tamanho e granulosidade celular.

### **3.13 Histopatológico**

Os pulmões foram removidos dos camundongos no 18º dia após a infecção, e foram imediatamente fixados em formol tamponado 10%. Em seguida, esses tecidos foram fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 24 horas. Posteriormente submetidos ao processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol e na sequência incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm, e então dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Posteriormente, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto aos 80%). As lâminas foram coradas com H.E. (Hematoxilina/Eosina), para a avaliação qualitativa do infiltrado celular. lâminas foram gentilmente confeccionadas no laboratório de Anatomia Patológica, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Garcia Soares do Departamento de Patologia da FMRP-USP. As lâminas foram fotografadas no Laboratório de Parasitologia da UFScar, com o auxílio de microscópio (NIKON) em aumento de 100X e 400X contendo máquina fotográfica adaptada (SONY – CYBER - SHOT DSC-).

### **3.14 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos com média  $\pm$  EPM. Os resultados dos diferentes experimentos foram analisados por meio da análise de variância ANOVA. Para análise estatística foi utilizado o programa PRISMA- (Two-ANOVA) (San Diego, Califórnia, USA). O nível de significância adotado foi de 5%, onde  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do perfil celular durante a infecção por *T. canis* após o tratamento com *Harpagophytum procumbens*.

A contagem total e diferencial de células por mm<sup>3</sup> foi determinada em períodos distintos: 5<sup>o</sup>, 18<sup>o</sup> e 36<sup>o</sup> dias após a infecção por *T. canis* no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP). O objetivo foi avaliar a resposta celular à infecção, nos diferentes períodos e compartimentos, em animais tratados ou não com extrato bruto *Harpagophytum procumbens*, analisando o recrutamento celular e classificando os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, em células mononucleares e eosinófilos após o tratamento ou não.

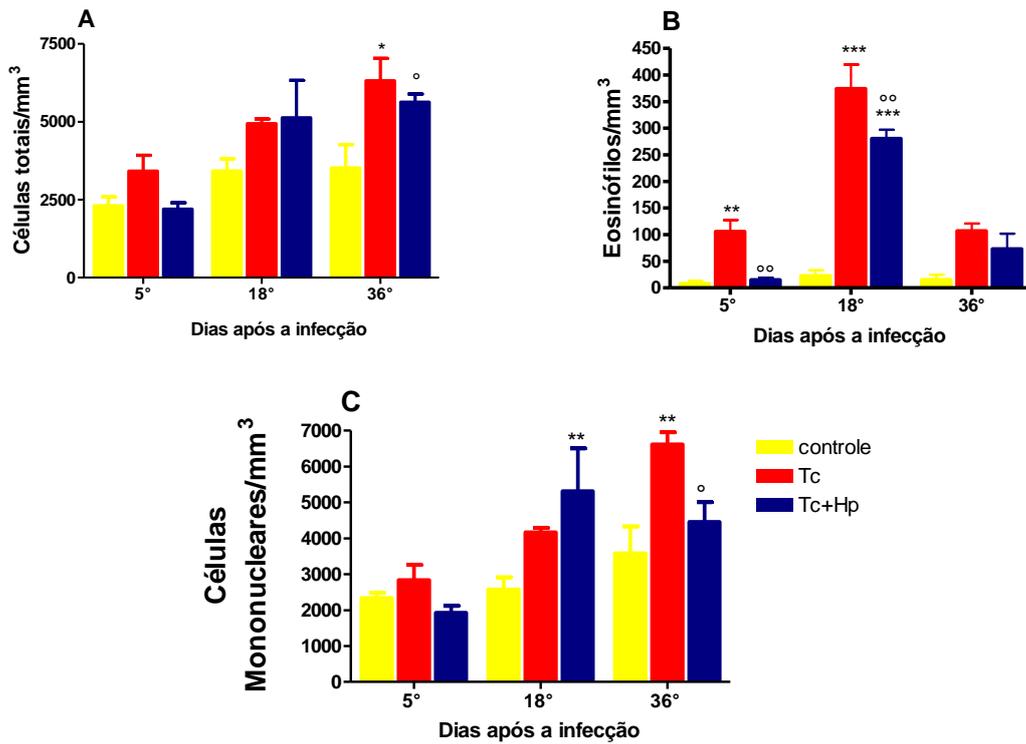
#### 4.1.2 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos infectados ou não por *T. canis* e tratados ou não com *Harpagophytum procumbens*

A figura 7 representa a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos dos grupos controle, infectado (Tc), infectado tratado com *H. procumbens* (Tc+ Hp).

Não foram observadas diferenças significativas, no 5<sup>o</sup> dia após a infecção, no número de leucócitos totais e mononucleares entre os diferentes grupos experimentais (Fig.7A, 7C). Verificamos que a diminuição de eosinófilos foi significativa neste mesmo período em animais tratados quando comparados com aqueles que não receberam tratamento com *H. procumbens* (Fig. 7B).

O aumento de leucócitos totais em animais infectados tratados ou não com *H. procumbens* no 18<sup>o</sup> dia após a infecção não foi significativo em relação ao grupo controle (Fig. 7A). Na figura 7B, observa-se um aumento significativo de eosinófilos nos grupos infectados tratados ou não com *H. procumbens*, quando comparado ao grupo controle 18 dias após a infecção. Verificamos também, que a diminuição de eosinófilos em animais infectados e tratados em relação a animais apenas infectados foi significativa neste mesmo período (Fig.7B). Células mononucleares aumentaram significativamente no grupo infectado tratado em comparação ao controle no 18<sup>o</sup> dia após a infecção (Fig. 7C).

Observamos que 36 ° dias após a infecção, o número de células totais aumentou significativamente no grupo de animais infectado quando comparado a animais controle (Fig. 7A). Neste mesmo período, verificamos uma redução significativa de células totais no grupo infectado e tratado com *H. procumbens* quando comparado ao grupo apenas infectado (Fig. 7A). A figura 7B demonstra que no 36° dia após a infecção, a diminuição de eosinófilos não foi significativa entre os grupos de animais infectados e tratados quando relacionados ao grupo de animais somente infectado. Camundongos pertencentes ao grupo infectado mantiveram um aumento significativo de mononucleares, no 36° dia após a infecção em relação ao grupo controle (Fig. 7C). A redução no número de células mononucleares 36 dias após a infecção, foi significativa no grupo infectado e tratado em comparação ao grupo infectado com *T. canis* (Fig.7C).



**Figura 7.** Contagem total e diferencial de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (7A); eosinófilos/mm<sup>3</sup> (7B); células mononucleares/mm<sup>3</sup> (7C) no sangue, no 5°, 18°, 36° dia após a infecção. Os dados representam a média ±EPM (n = 9-14 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com o grupo controle. ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste two-ANOVA.

### 1.3 Avaliação da migração celular para cavidade peritoneal (LCP) de camundongos infectados ou não por *T. canis* e tratados ou não com *H. procumbens*

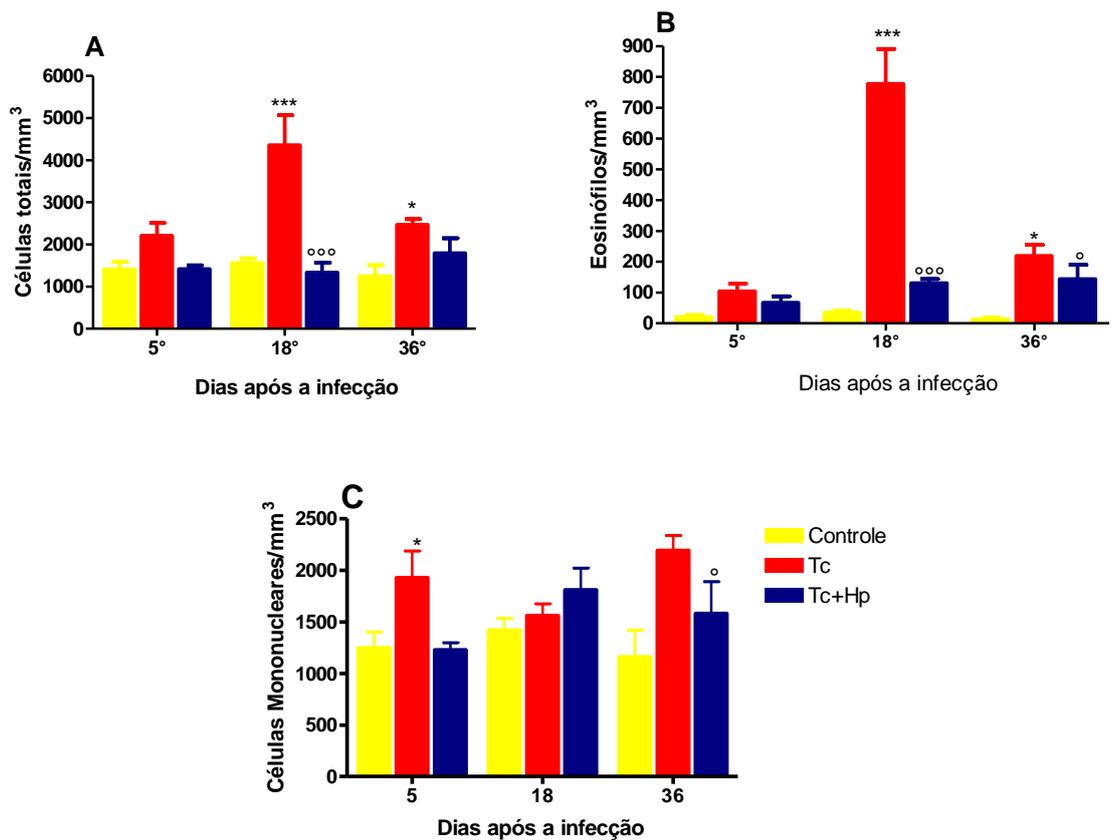
A figura 8 representa o perfil das células inflamatórias recuperadas do lavado da cavidade peritoneal (LCP) de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais no 5º, 18º e 36º dias após a infecção.

No 5º dia após a infecção não foram observadas diferenças significativas nas contagens de células totais (Fig. 8A) e eosinófilos (Fig. 8B) entre os animais dos grupos analisados. O aumento de células mononucleares foi significativo, neste mesmo período, em animais infectados com *T. canis* em relação animais controle (Fig.8C).

Camundongos pertencentes ao grupo apenas infectado com *T. canis* apresentaram aumento significativo de células totais (Fig. 8A) e eosinófilos (Fig. 8B), em relação aos pertencentes ao grupo controle no 18º dia após a infecção. Neste mesmo período a redução de células totais em animais infectados e tratados com *H. procumbens* foi significativa em comparação aos animais infectado com *T. canis*. Não foram observadas diferenças significativas, no 18º dia no número de células mononucleares entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 8C).

No período de 36 dia após a infecção, animais infectados com *T. canis* apresentaram um aumento significativo de leucócitos totais (Fig.8A) e eosinófilos (Fig. 8B) em comparação ao grupo controle.

A redução de células totais (Fig. 8A) no 36º dia após a infecção não foi significativa em animais tratados com *H. procumbens* em comparação a animais infectados. Neste mesmo período, eosinófilos (Fig. 8B) e células mononucleares (Fig. 8C) mantiveram uma redução significativa em animais tratados com *H. procumbens* em relação aos pertencentes ao grupo infectado.



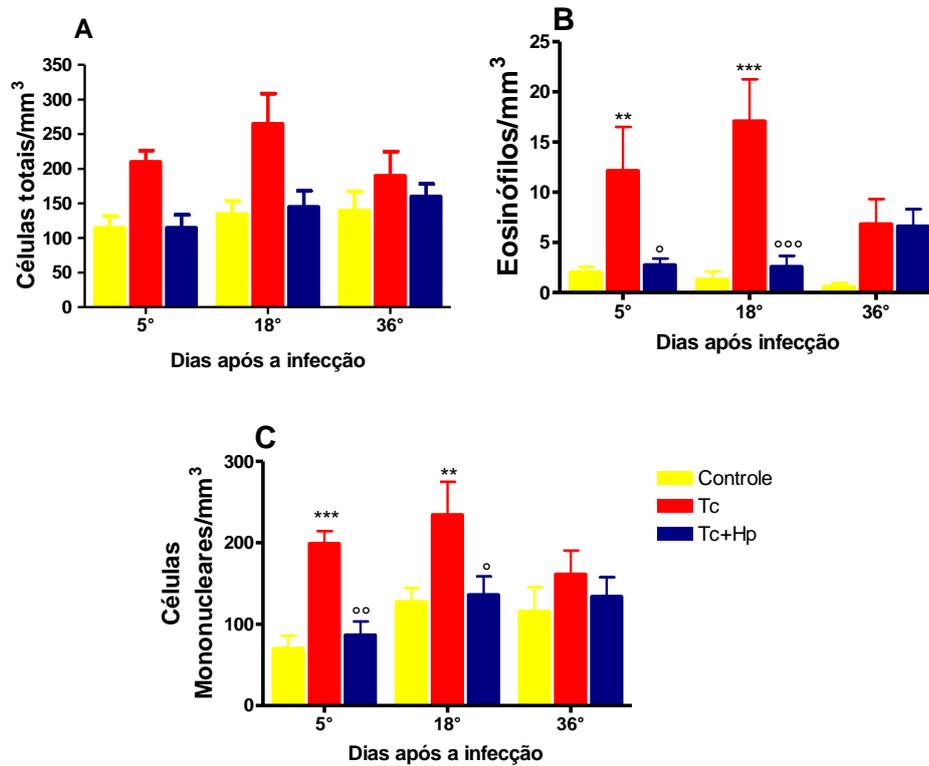
**Figura 8.** Representativo da migração de células totais (A), eosinófilos (B); células mononucleares (C) para a cavidade peritoneal no 5°, 18°, 36° dia após a infecção. Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n = 9 – 14 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com o grupo controle. ° p < 0,05 °° p < 0,001 °°° p < 0,001 representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste Two-ANOVA.

#### **4.1.4 Avaliação da migração celular para espaço broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados ou não por *T. canis* e tratados ou não com *Harpagophytum procumbens***

No período referente ao 5º dia após a infecção, não foram observadas diferenças significativas no número de leucócitos totais entre os grupos experimentais (Fig. 9A). Neste mesmo período animais infectados com *T. canis* apresentaram aumento significativo de eosinófilos (Fig. 9B) e células mononucleares (Fig. 9C) em relação ao grupo controle. Enquanto que, em animais tratados com *H. procumbens*, o número eosinófilos (Fig. 9B) e células mononucleares (Fig. 9B) foi reduzido significativamente neste mesmo período.

Não foram observadas diferenças nos diferentes grupos experimentais de células totais, no 18º dia após a infecção (Fig. 9A). As figuras 9B e 9C representam o aumento significativo de eosinófilos e células mononucleares referente ao período do 18º dia após a infecção, nos grupos somente infectados em comparação ao controle. Eosinófilos (Fig. 9B) e células mononucleares (Fig. 9C) de camundongos tratados com *H. procumbens* mantiveram reduções significativas em relação ao grupo apenas infectado com *T. canis* neste mesmo período.

No 36º dia após a infecção não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentes em relação aos tipos celulares analisados.



**Figura 9.** Representativo da migração de células totais (A), eosinófilos (B); células mononucleares (C) para o espaço broncoalveolar no 5°, 18°, 36° dias após a infecção. Os dados representam a média  $\pm$ EPM ( $n = 9-14$  animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com o grupo controle. °  $p < 0,05$ , °°  $p < 0,01$ , °°°  $p < 0,001$  representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste Two-ANOVA.

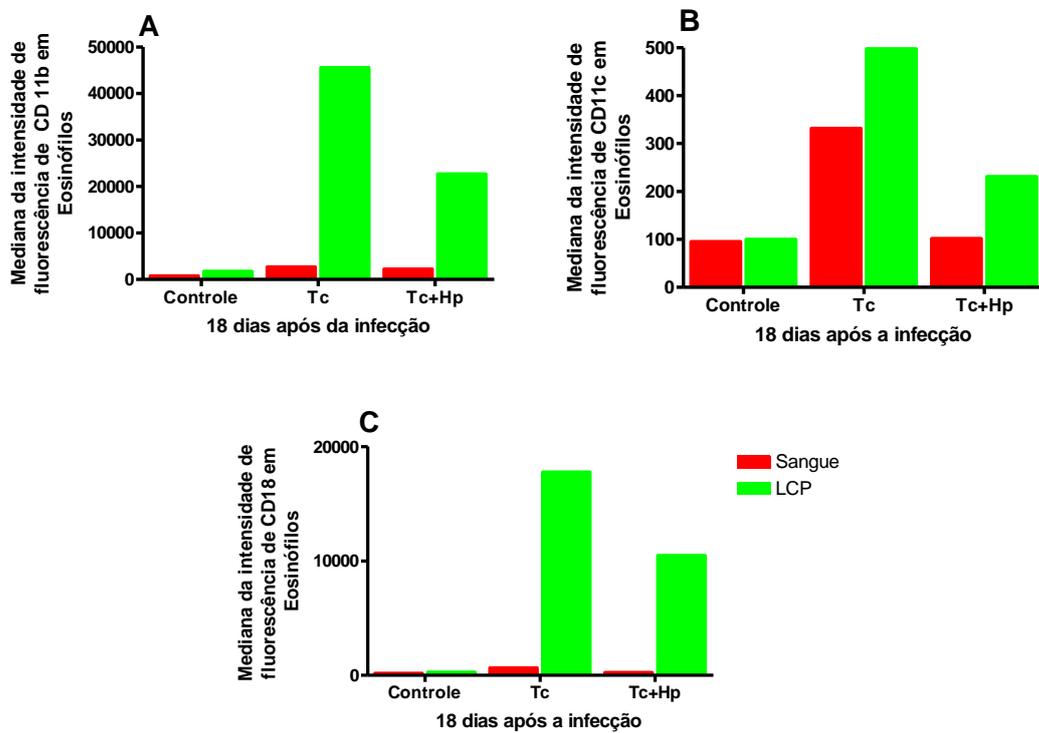
## **4.2 Avaliação da expressão de moléculas na superfície em eosinófilos no sangue e lavado da cavidade peritoneal (LCP)**

Nesta parte do trabalho tivemos como objetivo analisar a expressão das integrinas CD11c, CD18, CD11b na superfície destas dos eosinófilos, quando estes deixam o sangue e migram para a cavidade peritoneal (LCP), assim como o papel da *H. procumbens* na expressão destas moléculas em eosinófilos. Os resultados estão apresentados de modo a comparar a expressão das moléculas em eosinófilos do sangue e no lavado da cavidade peritoneal (LCP), em animais infectados ou não com *T. canis* tratados ou não com *H. procumbens*, após 18 dias de infecção. A população de eosinófilos foi definida por fluorescência inespecífica com “*forward scatter*” (FSC) e o “*side scatter*” (SSC) com parâmetros de tamanho e granulosidade celular. A análise da expressão das moléculas na superfície de eosinófilos foi realizada através do valor da mediana de intensidade de fluorescência. Os dados foram apresentados como média e erro da mediana da intensidade de fluorescência das moléculas obtida por citometria de fluxo.

### **4.2.1 Expressão das integrinas CD11c, CD18, CD11b na superfície de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal (LCP) durante a infecção por *T. canis***

Avaliando a mediana da intensidade de fluorescência da marcação das moléculas CD11a (Fig. 10A) e CD18 (Fig 10C) em eosinófilos do sangue verificamos que, a expressão destas integrinas mostrou-se reduzida nos diferentes grupos analisados quando comparados à eosinófilos no LCP.

A Figura 10B, representa a expressão da molécula CD11c no sangue e LCP, assim, observamos que, em animais controle a saída fisiológica das células do sangue para a cavidade peritoneal não induziu alterações na expressão desta molécula, no período por nós analisado (18° após a infecção). Em animais infectados tratados ou não com *Hp procumbens*, ocorreu uma diminuição na expressão da molécula CD11c em eosinófilos do sangue, quando comparados à estas células no LCP (Fig.10B).



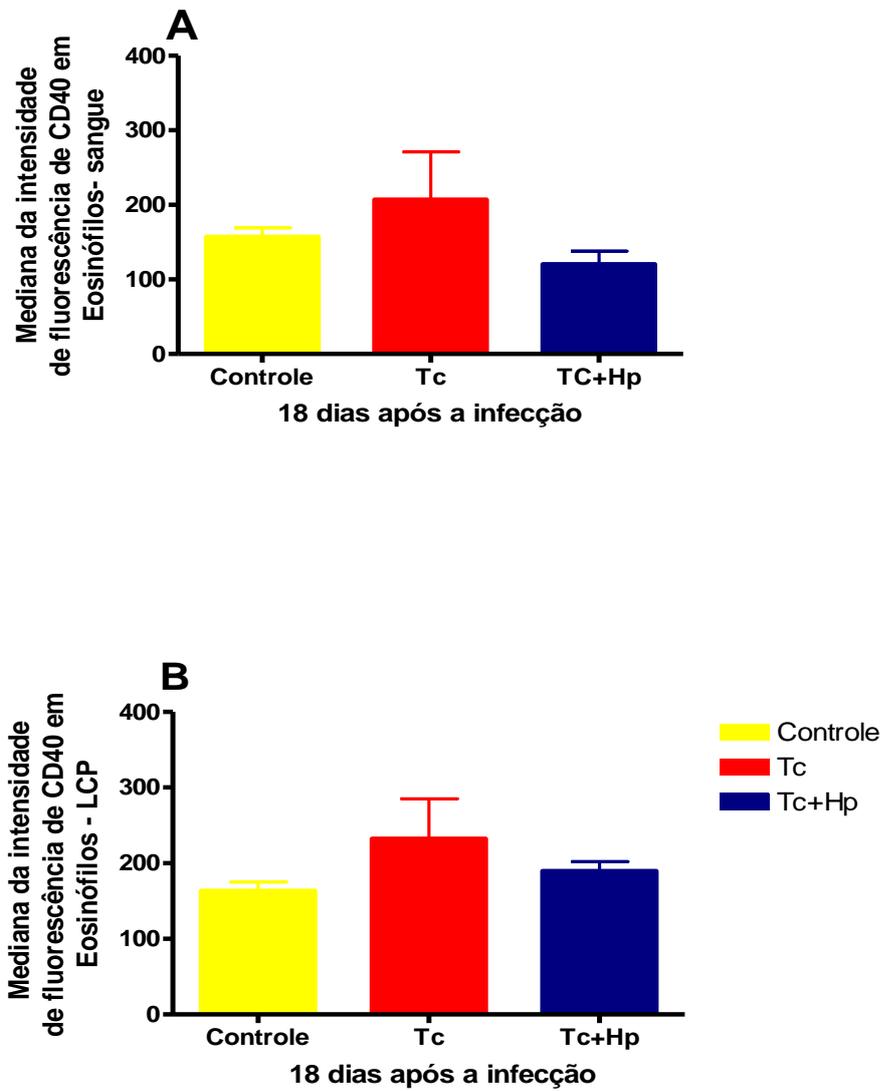
**Figura 10.** Representativo da mediana de intensidade de fluorescência das integrinas CD11b (Fig. 10A), CD11c (Fig.10B), CD18 (Fig.10C) na superfície dos eosinófilos. Sangue (vermelho) e LCP (amarelo) de animais infectados ou não com *T. canis* tratados ou não com *H. procumbens* 18 dias após a infecção.

#### **4.2.2 Expressão da molécula coestimulatória CD40 na superfície de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal (LCP) durante a infecção por *T. canis***

Com o objetivo de avaliar o perfil fenotípico dos eosinófilos e sua capacidade de contribuir com resposta imune durante a infecção pelo *T. canis*, bem como avaliar a interferência do tratamento com *H. procumbens* na ação efetora desta célula, avaliamos a expressão da molécula coestimulatória CD40 na superfície dos eosinófilos 18º dia após a infecção no sangue e no LPC.

Os resultados estão apresentados de modo a avaliar a expressão desta molécula em eosinófilos do sangue e no lavado da cavidade peritoneal (LCP), em animais infectados ou não com *T. canis* tratados ou não com *H. procumbens*, após 18 dias de infecção. A população de eosinófilos foi definida por fluorescência inespecífica com “*foward scatter*” (FSC) e o “*side scatter*” (SSC) com parâmetros de tamanho e granulosidade celular. A análise da expressão das moléculas na superfície de eosinófilos foi realizada através do valor da mediana de intensidade de fluorescência. Os dados foram apresentados como média e erro da mediana da intensidade de fluorescência das moléculas obtida por citometria de fluxo.

Os resultados apresentados na figura 11A demonstram que animais infectados não apresentaram diferença na expressão desta molécula nos compartimentos analisados (Fig. 11). Já em animais infectados e tratados com *H. procumbens*, verificamos alterações consideráveis na expressão da molécula CD40 em comparação aos encontrados no LCP na superfície dos eosinófilos (Fig. 11A).



**Figura 11.** Representativo da média da mediana de intensidade de fluorescência da molécula CD40 em eosinófilos no sangue (Fig. 11A) e LCP (Fig. 11B) em animais controle (amarelo), infectado (vermelho) e infectado e tratado *H. procumbens* (azul) 18 dias após a infecção

### **4.3 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no plasma de animais infectados ou não com *T.canis* e tratados ou não com *H. procumbens***

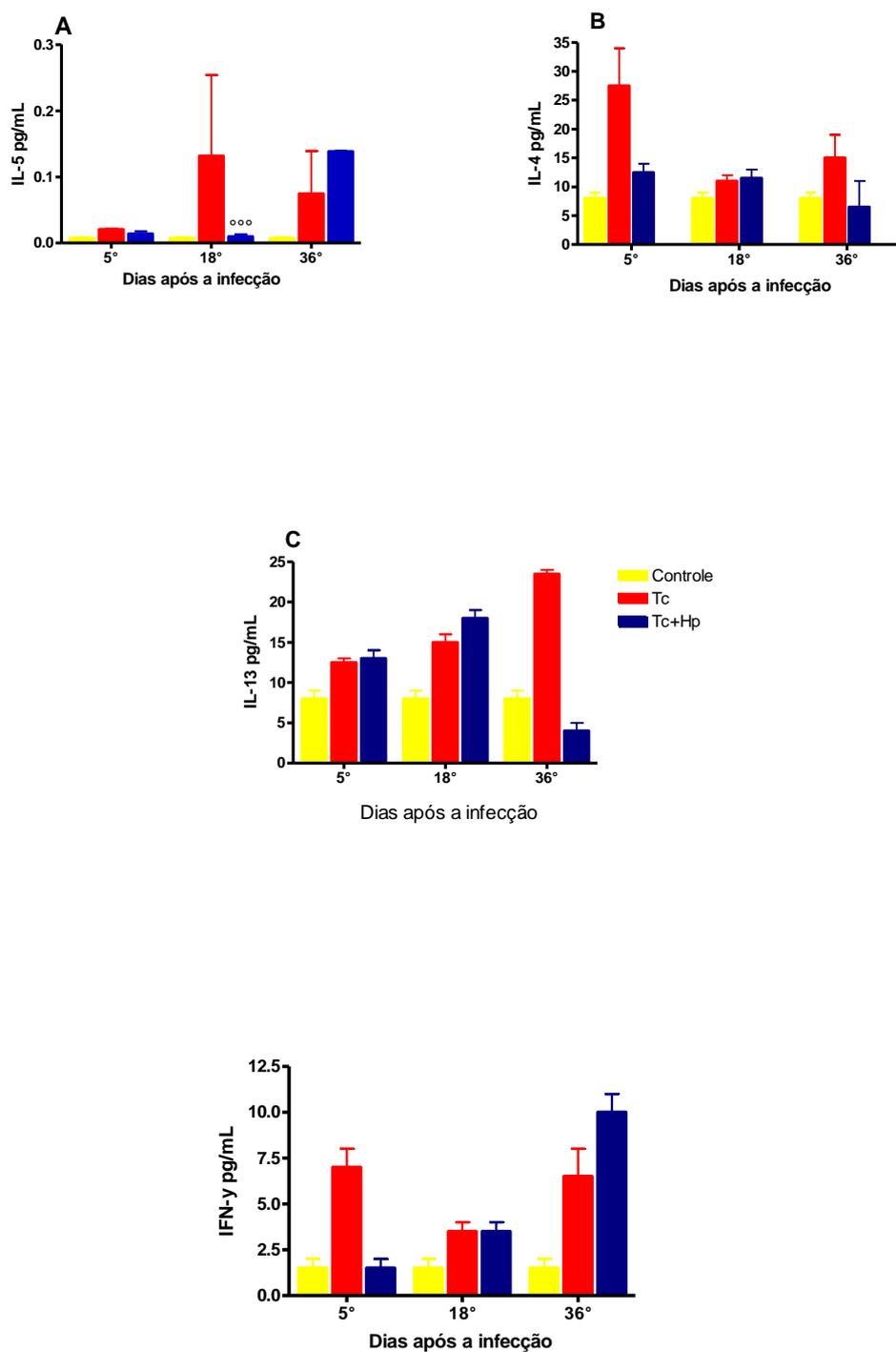
A concentração das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  foi determinada no plasma dos camundongos infectados ou não com *T. canis* e tratados ou não com *H. procumbens* nos tempos descritos: 5°, 18° e 36° dia após a infecção. O valor em pg/mL das citocinas dos diferentes grupos estão representados na figura 12.

Os dados expressos na figura 12A indicam que animais pertencentes ao grupo somente infectados apresentaram maior concentração de IL-5 nos diferentes períodos analisados quando comparados com animais controle (Fig. 12A). 18 dias após a infecção observamos uma diminuição significativa de IL-5 no grupo tratado com *H. procumbens* quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (12A). A concentração de IL-5 aumentou no 36° dia em animais infectados e tratados quando comparados com animais controle e apenas infectados (Fig.12 A).

Nossos resultados mostram diminuição na concentração de IL-4, em animais infectados e tratados com *H. procumbens*, nos tempos de 5 e 36 dias após infecção, quando comparados com animais apenas infectados neste mesmo período (fig. 12B).

Verificamos que o tratamento com *H. procumbens* induziu uma redução na concentração da citocina IL-13 após 36 dias de infecção (Fig. 12C).

No 5° dia após a infecção, animais infectados e tratados com *H. procumbens*, apresentaram uma redução considerável nos níveis de IFN- $\gamma$  (Fig. 12D). Os níveis de IFN- $\gamma$  no plasma, aumentaram no grupo infectado e tratado com *H. procumbens*, após 18 e 36 de infecção (Fig. 12D).



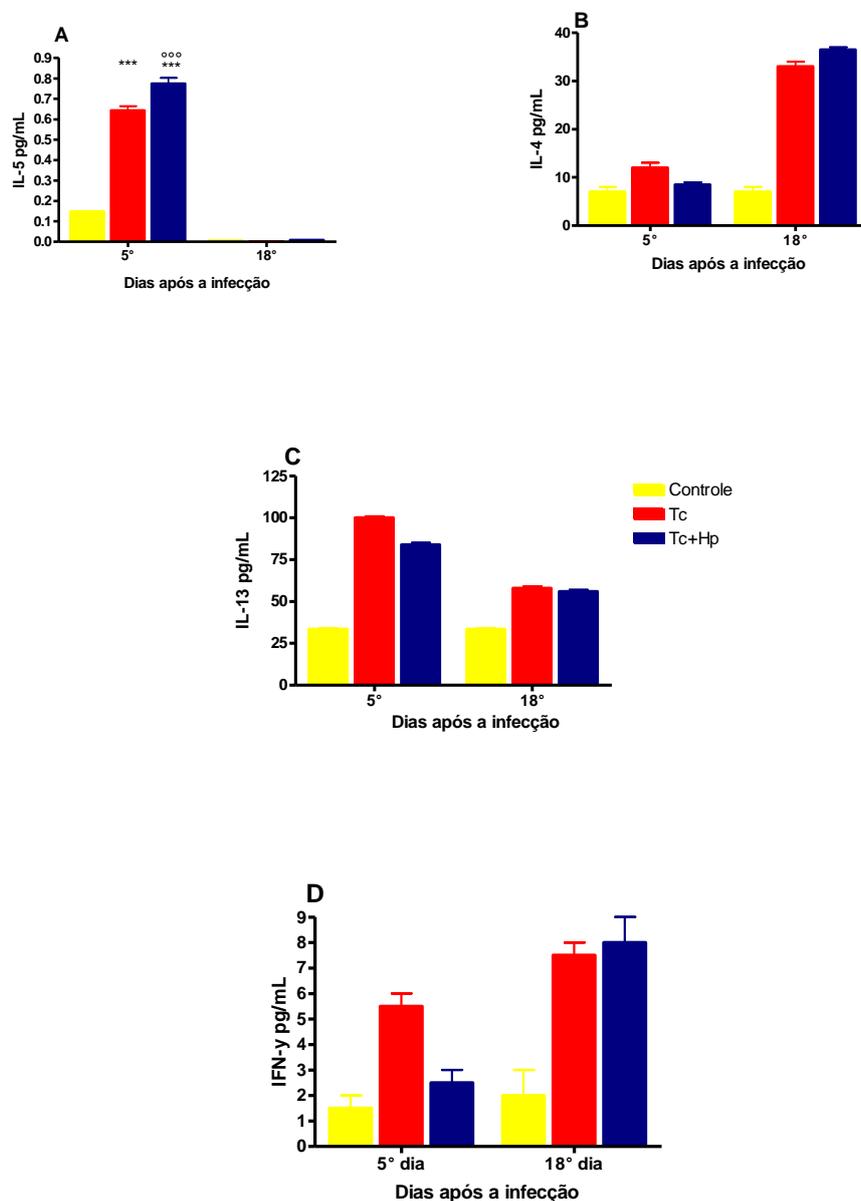
**Figura 12.** Avaliação das citocinas IL-5 (A), IL-4 (B); IL-13 (C) e IFN- $\gamma$  pg/mL no plasma no 5°, 18°, 36° dias após a infecção. Os dados representam a média  $\pm$ EPM de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com o grupo controle. °  $p < 0,05$ , °°  $p < 0,01$ , °°°  $p < 0,001$  representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste two-ANOVA.

#### 4.3.1 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no pulmão de animais infectados ou não com *T.canis* e tratados ou não com *H. procumbens*

A concentração das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  foi determinada no sobrenadante do homogenato do pulmão nos animais controle e infectados tratados ou não, 5 e 18 dias após a infecção. No 5º dia após a infecção, o grupo infectado tratado com *H. procumbens* apresentou aumento significativo na concentração da IL-5 no pulmão, quando comparado com os grupos controle e apenas infectado (Fig. 13 A).

Animais apenas infectados apresentaram aumento não significativo nas concentrações de IL-4 em relação ao grupo controle e infectado e tratado com *H. procumbens*, 5 dias após a infecção (fig. 13B). O aumento nas concentrações da interleucina IL-4 em animais tratados com *H. procumbens* em comparação ao grupos controle e infectado não foi significativo (Fig. 13B).

Nossos dados demonstraram que animais infectados com *T. canis* tratados ou não com *H. procumbens* apresentaram aumento, embora não significativo nas concentrações de IL-13 nos distintos períodos analisados em relação a animais controle (Fig. 13C). Verificamos que os níveis de IFN- $\gamma$  no pulmão de animais infectados e tratados apresentam-se reduzidos quando comparados a animais somente infectados, no período de 5 dias após a infecção (Fig. 13D). Observamos também que, 18 dias após a infecção ocorreu um aumento nos níveis desta citocina em animais infectados tratados ou não com *H. procumbens* em relação ao grupo controle (Fig. 13D).



**Figura 13.** Avaliação das citocinas IL-5 (A), IL-4 (B); IL-13 (C) e IFN- $\gamma$  pg/mL no pulmão no 5°, 18°, 36° dias após a infecção. Os dados representam a média  $\pm$ EPM de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com grupo controle. °  $p < 0,05$  °°  $p < 0,01$  °°°  $p < 0,001$  representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste Two-ANOVA.

### 4.3.2 Avaliação da produção das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ no em cultura *ex vivo* de células do baço

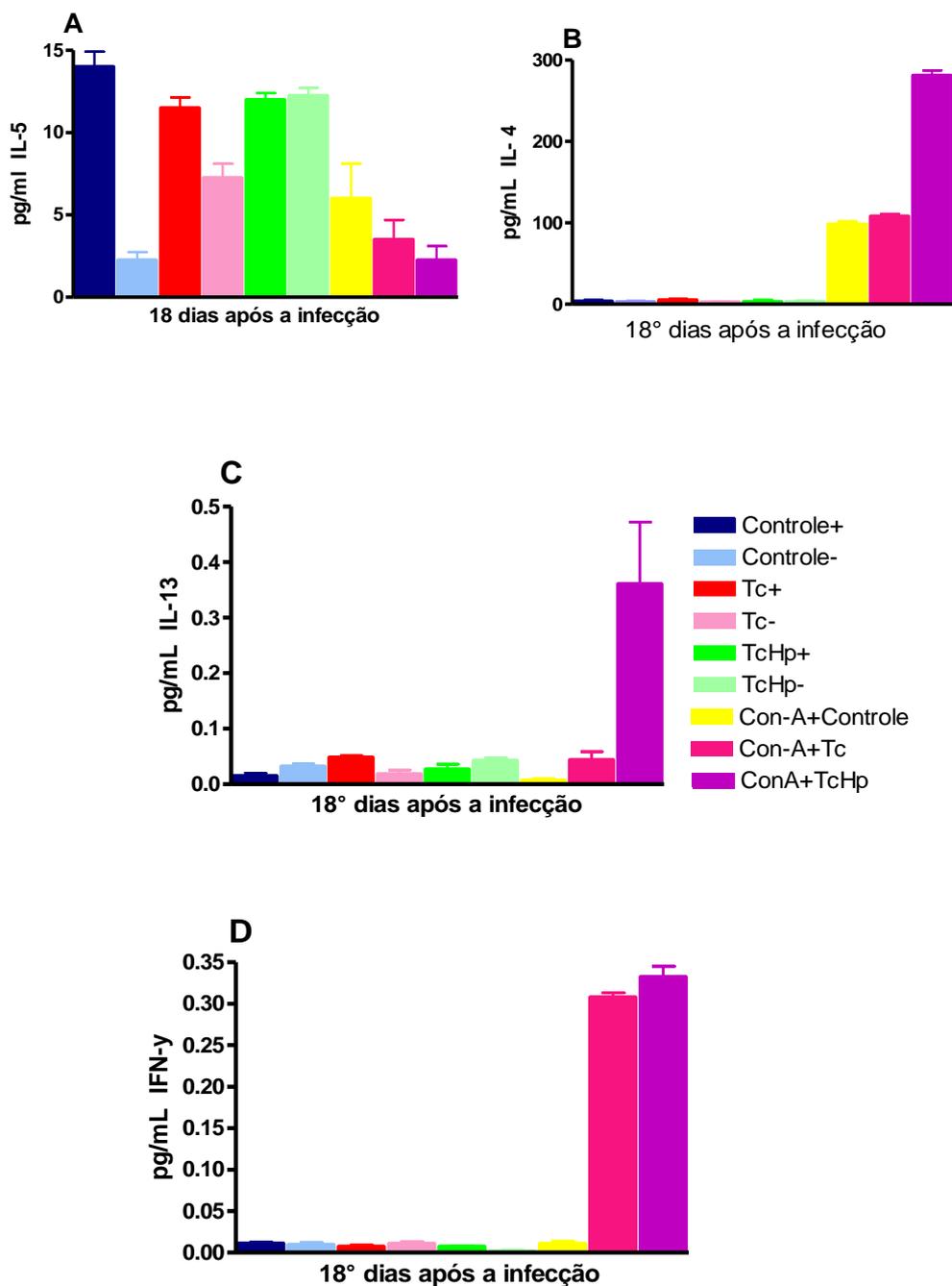
Para avaliar a resposta imune de animais infectados ou não com *T. canis* e tratados ou não com *H. procumbens*, células do baço foram coletas no 18° dia após a infecção e os níveis das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  foram dosados no sobrenadante do cultivo celular após 48 horas de estimulação ou não por antígeno total de *T. canis* e estimulação ou não com concanavalina-A (Con-A) (Fig. 14).

Os níveis de IL-5 foram detectados no sobrenadante de cultura submetido aos diferentes estímulos por 48 horas nos diversos grupos analisados. Assim, observamos que, a produção de IL-5 manteve-se aumentada nos grupos Controle+ e Tc+ quando comparada com seus respectivos grupos sem estímulos do antígeno total de *T. canis* (Fig. 16A). Nos grupos HpTc+ e HpTc- as concentrações de IL-5 manteve-se equivalente. Enquanto que a detecção de IL-5 no HpTc+ Con-A apresentou-se reduzida quando comparado aos grupos Controle e Tc estimulado com Con-A (Fig. 14A)

Verificamos que níveis de IL-4 produzidos por células do baço nos grupos Controle+, Controle-, Tc+, Tc-, HpTc+ e HpTc-, foi relativamente baixo (Fig. 14B). Contudo as concentrações desta citocina apresentaram um aumento nos diferentes grupos estimulados por Con-A, sendo que a maior concentração foi estabelecida no grupo HpTc+ Con-A (Fig 14B).

Quando células do baço foram estimuladas por Con-A, verificamos que a produção de IL-13 foi elevada nos grupo HpTc+ConA, enquanto que nos demais grupos o nível de produção desta citocinas foi semelhante (fig. 14C).

Verificamos que os níveis de IFN- $\gamma$  aumentou acentuadamente nos grupos Tc+ConA e HpTc+Con-A, enquanto que nos demais grupos estimulados ou não com antígeno total de *T. canis* as concentrações de IFN- $\gamma$  diminuíram acentuadamente (Fig. 14D).



**Figura 14:** Representativo das concentrações das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  18 dias após a infecção no sobrenadante de cultura *ex vivo* de células do baço. Após 72 horas de incubação a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações da citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$ EPM de modo avaliar a produção das citocinas nos grupos Controle, Tc e TcHp com adição (+) e/ou não (-) de estímulo de antígeno total de *T. canis* e dos grupos Controle, Tc, TcHp estimulados ou não por Con-A.

#### 4.4 Avaliação dos Anticorpos Circulantes

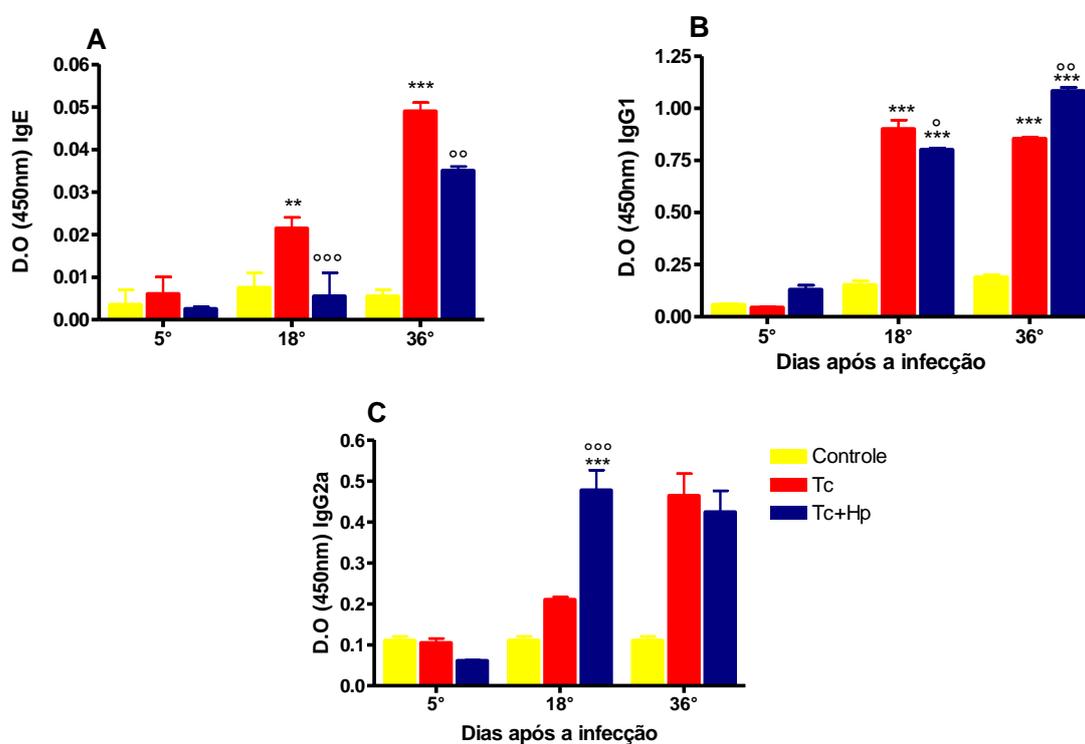
Com o objetivo de avaliar se *H. procumbens* pode interferir na modulação da liberação de imunoglobulinas circulantes, avaliamos os níveis das imunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a no plasma e homogenato do pulmão dos diferentes grupos experimentais, em diferentes períodos da infecção.

##### 4.4.1 Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a no plasma

Nossos resultados indicam que os níveis de IgE diminuíram significativamente, nos diferentes períodos analisados, em animais tratados com *H. procumbens* quando comparados ao grupo apenas infectado, sendo esta redução significativa no 18 e 36 dias após a infecção. No tempo descrito por 36 dias após a infecção, observamos um aumento significativo de IgE em animais infectados e tratados quando comparados ao grupo controle (Fig. 15A). Verificamos, nos diferentes dias de infecção o aumento de IgE em animais infectados quando comparados ao grupo controle, sendo este significativo no 18° e 36° dias após a infecção (Fig. 15A).

A figura 15B indica aumento significativo nos níveis do anticorpo IgG1 no plasma de animais infectados e tratados ou não com *H. procumbens* em relação ao grupo controle no 18° e 36° dias após a infecção. Observamos ainda que, 18 dias após a infecção houve uma redução significativa de IgG1 em animais que receberam o tratamento em relação ao grupo infectado. 36 dias após a infecção verificamos aumento desta imunoglobulina no grupo que recebeu tratamento em comparação aos apenas infectados (Fig. 15B).

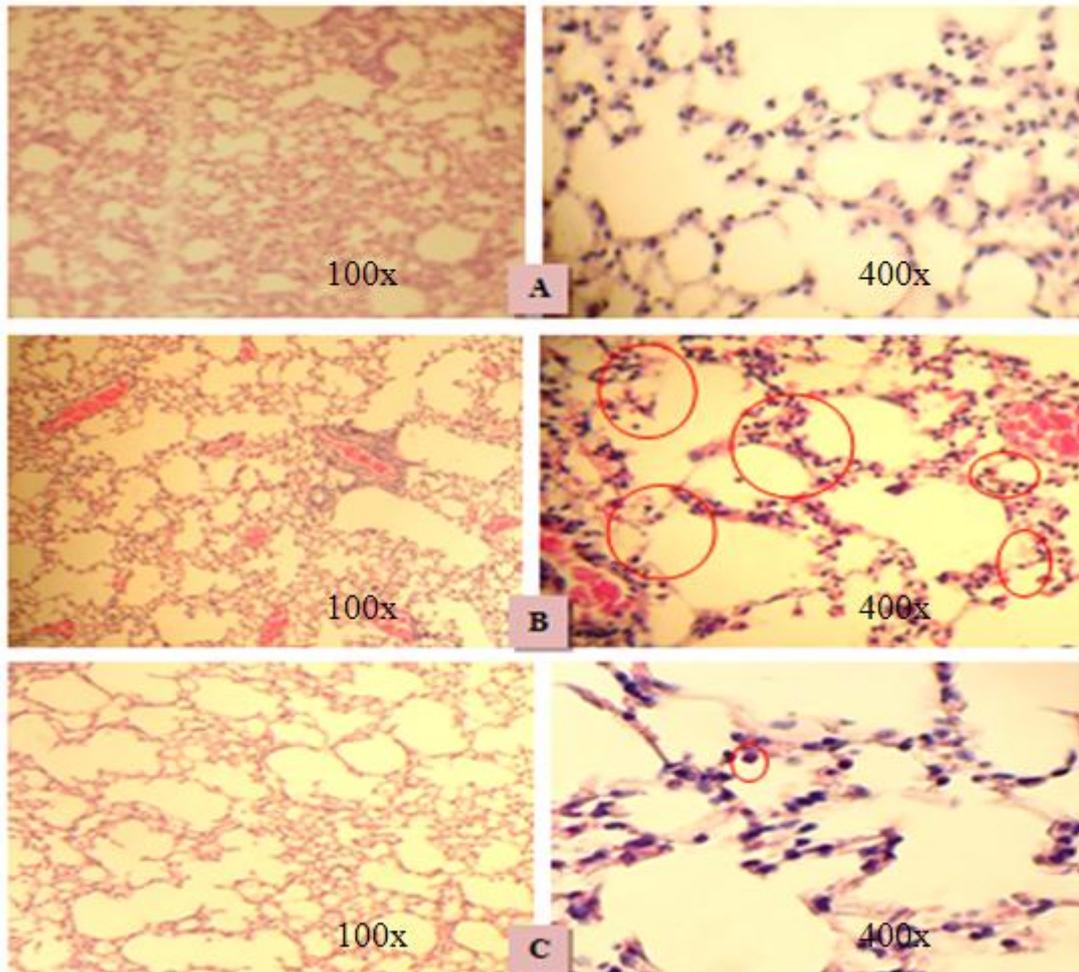
No 18° e 36° dias após a infecção os níveis de IgG2a aumentou significativamente nos grupos infectados tratados ou não com *H. procumbens* em relação ao grupo controle (Fig. 15C). Verificamos também um aumento significativo nos níveis de IgG2a no grupo infectado e tratado com *H. procumbens* quando comparados com o grupo apenas infectado 18 dias após a infecção (Fig. 15C).



**Figura 15.** Níveis de IgE (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti- *T. canis* presentes no plasma no 5°, 18° e 36° dia após a infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos Tc e Tc+Hp quando comparados com o grupo controle. °  $p < 0,05$ , °°  $p < 0,01$ , °°°  $p < 0,001$  representam a diferença significativa do grupo Tc+Hp quando comparado com o grupo Tc, usando o teste Two-ANOVA.

#### **4.5 Estudos Histologia Pulmonar no 18° dia após a infecção**

Na Figura 16, podemos observar as lâminas coradas com H.E. (Hematoxilina/Eosina), para a observação do infiltrado celular no 18° após a infecção nos grupos de animais infectados (Tc), tratados ou não com *H. procumbens*. Verificamos que a infecção pelo *T. canis* induziu a formação de um foco inflamatório, com a presença de eosinófilos, mononucleares no parênquima pulmonar em animais infectados pelo *T. canis*. Observamos também, a diminuição deste infiltrado em animais que receberam o tratamento com *H. procumbens*.



**Figura 15:** Fotomicrografia do parênquima pulmonar de camundongos infectados com *T. canis* tratados ou não com *H. procumbens*. Análise morfológica de cortes histológicos no 18º dia após a infecção nos animais dos grupos: Controle (A), Tc (B), Tc+Hp (C). Coloração: H.E. Aumento: 100 e 400X

## 5. DISCUSSÃO

Infecções parasitárias representam um sério problema na saúde humana (SCOLARI et. al., 2000), principalmente as causadas por helmintos, que se caracterizam por causar infecções de longa duração, podendo levar o indivíduo a um característico estado de morbidade ou até mesmo a morte (MURRAY et. al., 2000).

As respostas imunológicas durante infecções helmínticas incluem o principalmente o padrão de resposta do tipo Th2, com desenvolvimento de uma resposta caracterizada pela produção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-13 e também citocinas reguladoras como a IL-10, resultando na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos secretores de altos níveis de anticorpos. (STENVENS, et. al., SILVEIRA, et. al., 2002; LAWRENCE, 2003).

Uma grande variedade de distúrbios está associada com eosinofilia (MENDES et. al., 2000; WARDLAW, 1994), no entanto, em nosso meio esse aumento encontra-se relacionado principalmente com as helmintíases intestinais, bem como, com os processos alérgicos e a asma. A participação dos eosinófilos como células efetoras na destruição do parasita é dada principalmente pela ação tóxica de seus grânulos citoplasmáticos (GLEICH, 1990; MOQBEL & LACY2, 1999), sendo esta função importante para danificar organismos não fagocitáveis, como por exemplo, os helmintos em fase de migração tecidual (SMITH, 1982; JACOB, 1999). Na eosinofilia provocada por helmintos é importante levar em consideração fatores como, por exemplo, a espécie do parasita, a sua localização, o tempo de infecção, o número de parasitas, além do estado imunitário do hospedeiro (NAVEIRA, 1960).

A Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) é uma importante infecção helmíntica que acomete indivíduos em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (TRAUB R.J. et. al., 2005). A infecção por *T. canis*, em diferentes organismos, promove uma reação inflamatória sistêmica, caracterizada por intenso infiltrado de eosinófilos e eosinofilia marcante e disseminada (BEAVER et., al., 1952; FACCIOLI et. al., 1996; ANIBAL et. al., 2007). Não existe nenhum esquema terapêutico comprovadamente eficaz, embora Anti-helmínticos como a dietilcarbamazina, a ivermectina, o tiabendazol, o mebendazol e o albendazol já tenham sido utilizados no tratamento da SLMV, sendo algumas vezes estes, associados um anti-histamínico (CUNHA, 2005). Compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes anti-inflamatórios. Desta forma, a busca por novas drogas que interfiram

efetivamente nos processos inflamatórios é de grande importância (CALIXTO et. al. 2004). E o modelo da SLMV favorece um quadro muito interessante para entendermos a fisiopatogênese da eosinofilia.

Historicamente, as plantas, seus produtos de extração e seus metabólitos secundários vêm sendo utilizados pela humanidade como remédio desde o início de nossa civilização (MCCURDY; SCULLY, 2005). O uso popular de plantas na medicina tradicional é uma grande fonte para descoberta de novos agentes terapêuticos. Mas o conhecimento popular deve estar associado à bioensaios para comprovar a eficácia e a toxicidade destas plantas para o uso terapêutico (JUNIOR; VIZZOTTO, 1996; BOLDI, 2004; CLARDY; WALSH, 2004; KOEHN; CARTER, 2005).

Estudos revelam o efeito anti-inflamatório de *Harpagophytum procumbens* (*H. procumbens*) em diversas desordens como as doenças reumáticas, diabetes, arteriosclerose, malária, indigestão, febre entre outras (LANHERS et. al., 1992; CLAKSON et. al., 2003; ANDERSEN et. al., 2004). Existem evidências demonstrando que os diferentes extratos de *H. procumbens* possuem diferentes mecanismos de ação e que são comparáveis aos dos AINH (anti-inflamatório não hormonal), pela interação da mediação nas vias metabólicas do AA (Ácido Aracdônico), da COX (cicloxigenase) e da LOX (5-lipoxigenase) e também atuando na liberação das citocinas e na produção de NO (CASTARDO, 2007).

Ensaio em modelos experimentais de inflamação com extrato seco aquoso das raízes secundárias de *H. procumbens* demonstraram o efeito antiinflamatório do extrato (ANDERSEN et. al., 2004), inibindo a síntese de eicosanóides principalmente dos cisteinil – LT (leucotrienos) (CASTARDO, 2007). Contudo não há relatos dos efeitos do extrato de *H. procumbens* em modelo da inflamação causado por nematóides. Neste contexto, este estudo investigou o efeito anti-inflamatório do extrato de *H. procumbens* durante a Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV), analisando a modulação da resposta imune e do recrutamento de eosinófilos durante esta infecção em modelo experimental.

O processo inflamatório característico na infecção por *T. canis*, demonstra, aumento de leucócitos totais e células mononucleares no sangue (Fig. 7A e 7C), no LCP (8A e 8C) e LBA (Fig. 9A e 9C) em animais infectados, quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Carlos et. al. (2011), que demonstraram que no 18º após infecção com *Toxocara canis* há um aumento significativo das células de mononucleares na cavidade peritoneal. Contudo, os

resultados apresentados mostraram também aumento significativo de células mononucleares no sangue e LCP em animais tratados com *H. procumbens* quando comparados a animais controle (Fig. 7A e 7C). Neste contexto, sugerimos que, nosso tratamento poderia influenciar nas variações observadas nas diferentes populações de células residentes neste modelo, e ainda, na liberação de diferentes mediadores e/ou na participação de diferentes moléculas de adesão envolvidas no recrutamento celular durante a infecção. Dessa forma outros autores também demonstraram que *T. canis* proporciona um importante estímulo para a eosinofilia sistêmica, desde a sanguínea, peritoneal, pulmonar, bem como, a tecidual (rins, coração, olhos, baço e coração) (BEAVER et. al., 1968, FACCIOLI et. al., 1996).

Os dados referentes ao número de eosinófilos mostraram aumento deste tipo celular, em animais infectados e sem tratamento quando comparados a animais controles, no sangue, LCP e LBA, nos diferentes períodos analisados (Fig. 7B, 8B e 9B). Vários autores demonstraram o aumento de eosinófilos durante a SLMV em diferentes modelos como em humanos (BEAVER e col., 1952), cobaias (FACCIOLI e col., 1996) em camundongos da linhagem C57BL/6 (TAKAMOTO et. al., 1998) e da linhagem Balb/c (ANIBAL et. al. 2007). Porém, verificamos também, que este aumento ocorre significativamente no 18º dia após a infecção nos diferentes compartimentos (sangue, LCP e LBA). Estes dados estão de acordo com alguns estudos, os quais demonstraram que durante a SLMV o aumento do número significativo de eosinófilos atinge seu ápice no 18º dia após infecção independente do modelo experimental (FACCIOLI et. al., 1996; ANIBAL et. al., 2007, CARLOS et. al., 2011). Dessa forma, sugerimos que o tratamento com *H. procumbens* em camundongos da linhagem Balb/c parece interferir na ativação da resposta celular, como na ativação de eosinófilos, uma vez que nossos resultados demonstraram que animais infectados com *T. canis* e tratados com *H. procumbens* apresentaram redução no número deste tipo celular, sendo a ordem significância dada no 5º e 18º, no LCP (Fig. 8B,) e BAL (Fig. 9B).

Trabalhos anteriores demonstraram que linfócitos T modulam a eosinofilia na SLMV (KAYES, 1984; SUGANE & OSHIMA; 1982). Assim como Anibal, (2001), podemos sugerir que, existem diferentes populações de células residentes ou recrutadas para o espaço broncoalveolar e para a cavidade peritoneal que liberaram diferentes mediadores e citocinas que caracterizam a eosinofilia existente nesse modelo. Os eosinófilos podem produzir prostaglandinas, leucotrienos e diferentes citocinas, que amplificam a resposta inflamatória, recrutando e ativando mais eosinófilos e outras

células (CAPRON & DESREUMAUX, 1997). Todavia, a SLMV é uma doença sistêmica, com aumento do infiltrado celular em diferentes compartimentos. No entanto, os fatores responsáveis pelo acúmulo de eosinófilos em sítios inflamatórios parecem ser de ordem multifatorial e ainda causam muitas controversas entre diferentes autores.

Vários estudos têm demonstrado que as interações entre moléculas de adesão são primordiais para a evolução da resposta imunológica (MAKGOBA et. al., 1989; SPRINGER, 1990). Pesquisadores demonstraram que células mononucleares residentes na cavidade peritoneal e no espaço broncoalveolar de camundongos, exibem uma variação na expressão de moléculas de superfície da família das integrinas, (SILVA, et. al. 2001). As  $\beta 2$  integrinas são heterodímeros com uma cadeia  $\beta$ -2 comum (CD18) ligada a uma das três cadeias alfa (CD11a, CD11b e CD11c) formando LFA-1, Mac-1 e p150/95 respectivamente. Estudos mostraram a alta expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular hepático e mesmo nas células que compõem o granuloma na esquistossomose mansônica (JACOBS et. al., 1997; RATHORE et. al., 1996).

Os eosinófilos têm sido implicados ao principal papel na resposta imune contra as infecções helmínticas (BUTTERWORTH et. al., 1979; HAMANNET et. al., 1987), sendo, o processo de migração essencial para o recrutamento de eosinófilos do sangue para os sítios inflamatórios, este fenômeno depende da alta regulação de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas (TACHIMOTO et. al., 2000). Nossos resultados demonstraram que a expressão das integrinas CD11b, CD11c e CD18 no LCP, foi maior que em eosinófilos do no sangue, nos diferentes grupos analisados (Fig. 10A, 10B e 10C). Observamos ainda, que em relação à estas moléculas não foram observadas diferenças na expressão destas, entre eosinófilos do sangue de animais controle em comparação a aqueles encontrados no LCP. Neste contexto, podemos sugerir que exista uma interligação entre a transmigração de eosinófilo e estas integrinas na infecção por *T. canis*. Contudo, dados da literatura revelam que outras moléculas estão envolvidas na adesão de eosinófilos. Anibal e colaboradores (2007), demonstraram alta expressão da molécula de adesão VLA-4 em eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. canis* após 12 dias de infecção, sugerindo que, apesar de vários receptores estarem relacionados aos eventos de adesão de eosinófilos, este processo dependeria mais da expressão da molécula de adesão VLA-4 do que de outras moléculas de adesão.

Ao compararmos a expressão de CD11b, CD11c e CD18 em eosinófilos de animais infectados e tratados com *H. procumbens*, observamos que a expressão destas

integrinas apresentou-se reduzida em relação aos animais controles e somente infectados (Fig.10A), sugerindo que o tratamento com *H. procumbens*, pode estar modulando a expressão das mesmas em eosinófilos durante a infecção por *T. canis*, o que poderia favorecer a diminuição destas células nos compartimentos estudados.

Assim, nossos achados estão de acordo com os estudos de Anibal e col. (2001), no qual, a expressão de CD11b na superfície de eosinófilos manteve-se reduzida em animais tratados com o composto MK-886, quando estes migram do sangue para a cavidade peritoneal, nos períodos dados por 3, 18 e 24 dias após a infecção por *T. canis*. Assim, podemos sugerir que *H. procumbens* também poderia modular a liberação de leucotrienos nesse modelo. Apesar dos eosinófilos produzirem algumas moléculas, incluindo as prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, que amplificam a resposta inflamatória, recrutando e ativando mais eosinófilos e outros leucócitos (CAPRON & DESREUMAUX, 1997), os fatores implicados no acúmulo destas células nos sítios inflamatórios parecem ser de ordem multifatorial. Alguns autores demonstraram que, componentes do próprio parasito como a quitinase (ZHU et. al., 2004) e cistinas (HARTMAN & LUCIUS, 2003) levariam células do sistema imune como mastócitos a secretar mediadores quimiotáticos para eosinófilos entre eles leucotrienos.

Com objetivo de analisar se a molécula CD40 é expressa por eosinófilos, avaliamos a expressão desta molécula coestimulatória em sua superfície. Em situações fisiológicas, a interação de CD40 com o seu ligante, CD40L tem um papel fundamental no sistema imune, induzindo sobrevivência, proliferação, diferenciação celular, além de induzirem troca isotópica nos linfócitos B para produção de anticorpos (WINGETT et.al., 1998). Achava-se, inicialmente, que a expressão da molécula CD40 era restrita às células de origem hematopoiética especializadas como linfócitos B, macrófagos, e células dendríticas. Atualmente, sabe-se que CD40 também é expressa em células de origem não hematopoiética, como células endoteliais, tímicas epiteliais, onde sua expressão está majoritariamente associada à amplificação e regulação de respostas inflamatórias (VOSTRS et. al., 2004). Nesse sentido, vários trabalhos sugerem que a interação CD40-CD40L não só contribui com as respostas fisiológicas celulares previamente enumeradas, mas também levando ao aparecimento de eventos inflamatórios crônicos, como psoríase, aterosclerose, fibrose cística (FALCO et. al.,2004), bem como em modelos da inflamação das vias e a asma (OHKAWARA et. al., 1996).

Assim, de acordo com os dados obtidos verificamos que animais infectados com

*T. canis* apresentaram maior expressão da molécula CD40 na superfície de eosinófilos, quando comparado com os animais controle tanto no sangue como no LCP (Fig. 11A e 11B). Esses dados corroboram com ensaios *in vitro*, os quais demonstraram a expressão da molécula CD40 em eosinófilos do sangue humano, (OHKAWARA et. al., 1996), indicando ainda, que a expressão de CD40 em eosinófilos proporciona o aumento da sobrevivência deste tipo celular através da indução e produção de fatores que aumentam a sobrevivência de eosinófilos no sítio inflamatório como o GM-CSF ((OHKAWARA et. al., 1996; BUREAV et. al., 2002 ).

Em relação ao tratamento com *H. procumbens*, verificamos uma redução na expressão de CD40 na superfície de eosinófilos em animais que receberam tratamento quando comparados com animais somente infectados com *T. canis*. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Ohkawara e col. (1996), que demonstraram em ensaios *in vitro*, que eosinófilos quando cultivados na presença de Budesonida (glicocorticoide com elevada ação anti-inflamatória), apresentaram redução na expressão de CD40, promovendo assim “*downregulation*” por este composto. Dessa forma, nossos dados sugerem que o tratamento com *H. procumbens* pode modular negativamente a expressão de CD40 nos eosinófilos durante a SLMV.

As respostas imunológicas durante infecções helmínticas incluem o um padrão de resposta do tipo Th2, com desenvolvimento de uma resposta caracterizada pela produção de citocinas, IL-4, IL-5 e a IL-13, resultando na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos secretores de altos níveis de anticorpos. (STENVENS, et. al., SILVEIRA, et. al., 2002; LAWRENCE, 2003). Os mecanismos pelos quais a infecção por *T. canis* modula a resposta imune ainda é pouco compreendido, especialmente o perfil de citocinas produzidas, visto que estas variam conforme o tecido parasitado e o tempo de infecção (PINELLI et. al., 2007; HAMILTON et. al., 2008). Todavia, o papel da IL-5 na eosinofilia tem sido demonstrado em vários modelos parasitários e alérgicos. Experimentos utilizando anticorpos anti-IL-5 ou camundongos sem o gene de IL-5 demonstraram que a eosinofilia é dependente da citocina IL-5 (NAKAJIMA et. al., 1992; FOSTER et. al., 1996; HAMELMANN et. al., 1997; HAMELMANN et. al., 2000). Nossos resultados demonstraram que o extrato de *H. procumbens* reduziu os níveis de IL-5 no plasma (Fig.12A), 18º dia após a infecção. Assim sugerimos, que a redução da eosinofilia nos compartimentos LBA, LCP e sangue (Fig.7B, 8B e 9B) por nosso tratamento, poderia ser explicado porque a IL-5, uma citocina produzida por células T CD4<sup>+</sup>, tem um importante papel na resposta inflamatória observada durante a

resposta imune do tipo Th2 (SANDERSON, 1992; FACCIOLI et. al., 1996 e 1998; ANIBAL et. al. 2005). Porém observamos um aumento desta citocina no pulmão de animais infectados tratados ou não com *H. procumbens* (Fig. 13A), o que poderia sugerir que esses eosinófilos sejam parcialmente dependentes de IL-5 nesse modelo. Nosso estudo esta de acordo com os dados obtidos por Anibal e col. (2005), o qual foi observado recrutamento de eosinófilo parcialmente depende da IL-5, uma vez que nosso tratamento reduziu o infiltrado eosinófilo no LBA (Fig. 9B). Assim sugerimos, que o tratamento com *H. procumbens* pode inibir a eosinofilia no espaço broncoalveolar possivelmente por uma via independente da IL-5.

A IL-4 é uma citocina essencial para desenvolvimento da resposta Th2 (NELMS et. al., 1999). Estudos com camundongos deficiente da IL-4 demonstram que esta citocina é crítica para a produção de IgE e manutenção eosinofilia (NAKAJIMA et. al., 1992; COYLE et. al., 1996; KIPS et al., 1995; HAMELMANN et. al., 1997). A IL-13 atua na regulação da resposta imune, induz a síntese de CD23 nos linfócitos B, agindo como a IL-4 na síntese de IgE. A administração de IL-13 em camundongos não imunizados provoca acúmulo de muco no pulmão e eosinofilia (WILLS-KARP et. al., 1998). A neutralização de IL-13, diminui a migração de eosinófilos e a produção de muco nos pulmões de camundongos imunizados e desafiados com ovalbumina (GRUNIG et. al., 1998). Verificamos, contudo, que o tratamento com *H. procumbens* proporcionou a redução de IL-4 no plasma, no 5º e 36º dia da infecção por *T. canis*, em camundongos Balb/c infectados tratados com *H. procumbens* (Fig. 12B) quando relacionados a camundongos somente infectados.

Citocinas do perfil Th1, geralmente, se opõem à resposta do tipo Th2 e incluem IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  inibe a síntese de IgE dependente de IL-4 *in vitro*, e sua produção é induzida por IL-12 e/ou IL-18 (GELFAND, 2001). Neste contexto sugerimos que no 36º dia de infecção, nosso tratamento pode ter proporcionado a ocorrência de polarização do perfil de resposta Th2 para Th1, uma vez que observamos que as concentrações de IFN- $\gamma$  foram marcantes em animais tratados com *H. procumbens* em relação as concentrações das citocinas IL-4 e IL-13 neste mesmo período, sugerindo que “*upregulation*” de IFN- $\gamma$  pode contribuir indiretamente na redução dos níveis de IL-4 e IL-13 nesse modelo modulando o perfil da resposta inflamatória.

Assim como na asma, a SLMV tem como principais características a eosinofilia, aumento da hiperreatividade das vias aéreas, liberação de citocinas do perfil

Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), aumento de IgE no soro e hipersecreção de muco (BOCHNER *et. al.*, 1995; WILLS-KARP, 1999; HAMELMANN; GELFAND, 2001). Outros estudos, além da associação com a asma, também relatam a relacionam a infecção pelo *T. canis* com algumas variáveis, como tosse, pneumonia de repetição, hepatomegalia e eosinofilia (BUIJS *et.al.*, 1994; JACOB, 2000; FIGUEIREDO *et. al.*, 2005). Em nosso estudo com tratamento com *H. procumbens*, verificamos um aumento nas concentrações das citocinas IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  no 5º dia após a infecção em animais somente infectados quando comparados ao grupo controle. No entanto, animais infectados e tratados com *H. procumbens*, apresentaram as concentrações destas citocinas reduzidas neste mesmo período (Fig. 13B, 13C e 13D).

Estes achados estão de acordo com outros estudos, os quais relatam a prevalência destas citocinas neste modelo e que especificam o padrão de resposta do tipo Th2 como característico na SLMV (BUIJS *et. al.*, 1997; HALLACK, CUNHA, 1996; ALTCHER *et. al.*, 2003). Sugerimos ainda, que o extrato de *H. procumbens* apresentou atividade anti-inflamatória reduzindo o recrutamento de eosinófilos no LBA (Fig.9B) e os níveis desta citocinas presente no homogenato do pulmão (Fig. 13B, 13C). Ao analisarmos o perfil das citocinas produzidas a partir da cultura de células totais do baço, verificamos aumento da expressão interleucina IL-5 (Fig. 14A), IL-4 (Fig. 14B) e IL-13 (Fig. 14C), contudo, é notório, que o aumento nos níveis de IL-5 foram consideravelmente mais expressivo em relação à demais citocinas analisadas nos grupos que receberam estímulo com *T. canis*. Além disso, os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram próximos independentes dos estímulos dados, sugerindo uma possível supressão dependente não somente da IL-4. Este resultado sugere que a indução da expressão de IL-5 pode estar relacionada à secreção de antígenos presentes na larva.

Ao analisar o padrão de anticorpos específicos no plasma de animais infectados com *T. canis*, verificamos o aumento do anticorpo IgE nos diferentes períodos da infecção em animais infectados (Fig. 15A). No entanto, verificamos uma redução nos níveis de IgE no plasma de animais tratados com *H. procumbens* quando comparados a animais infectados com *T. canis* e controles, sendo esta, significativa no 36º após a infecção (Fig. 15A). A imunoglobulina IgE tem um papel central na patogênese das reações de hipersensibilidade imediata devido a sua capacidade de se ligar especificamente a receptores de alta (FceRI) e baixa atividade (FceRII-CD23) presentes em diversas células como mastócitos, basófilos, linfócitos B e T ativados e eosinófilos (TUNER & KENET, 1999), para ampliar as respostas imunes celulares e humorais na

doença alérgica (DELESSESSE et. al., 1992). Um mecanismo proposto para explicar o aumento nos níveis totais de IgE é a secreção, por parasitas, de fatores que estimulam a produção de IL-4 levando ao aumento dos níveis de IgE (DESSAINT, 1975 et. al., 1975; YAMAOKA et. al., 1994) nesses modelos.

Dentre outros, *Toxocara canis* é um dos mais comumente parasitos associados ao aumento dos níveis de IgE (SORENSEN & SKALI, 2006). Assim, nossos resultados corroboram com outros estudos, os quais, relatam que a IL-4 atua na regulação da resposta imune, agindo juntamente com a IL-13 na indução da síntese de IgE, uma vez que em nosso estudo as concentrações destas interleucinas encontraram-se reduzidas nos mesmos períodos em que verificamos a redução nos níveis plasmáticos de IgE em animais que foram tratados com *H. procumbens* (Fig. 15A). Desse modo, sugerimos que o tratamento com *H. procumbens* modula a produção de IgE dependente de IL-4 e IL-13.

A mudança do isótipo IgG1 e IgG2a está na dependência da resposta induzida pelo agente infeccioso. Assim, um perfil de resposta Th2 induz a produção de IL-4 que por sua vez estimula as células B a produzirem IgG1. A mudança para o isótipo IgG2a depende por sua vez da produção de IFN- $\gamma$ , que é induzida por um perfil de resposta Th1 (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Em nossas análises, quando verificamos os níveis de IgG1 e IgG2a no plasma, observamos produção significativa das mesmas em animais infectados quando relacionados aos pertencentes ao grupo controle. No entanto, em animais que receberam tratamento, verificamos diminuição na produção de IgG1, enquanto a produção de IgG2a prevalecem aumentada (Fig.15C). Assim sugerimos que o tratamento com extrato de *H. procumbens*, possa intervir no perfil da resposta neste modelo, uma vez que estes resultados estão relacionados com os achados referentes às concentrações das interleucinas IL-4 e IFN- $\gamma$  no plasma de animais que receberam tratamento (Fig. 12), sugerindo assim a modulação na produção de IgG1 no plasma de animais tratados com *H. procumbens*.

Diante do exposto, podemos sugerir, que o extrato de *H. procumbens* apresentou um efeito anti-inflamatório no modelo da SLMV. Entretanto, serão necessárias outras investigações que contribuam para o entendimento dos mecanismos pelos quais o extrato de *H. procumbens* pode interferir na migração dos eosinófilos produção de citocinas e de anticorpos neste modelo, uma vez que este evento é caracterizado por fatores multifatoriais e de ordem complexa.

## 6. CONCLUSÃO

- O extrato da *H. procumbens* apresentou efeito antiinflamatório no modelo da SLMV experimental;
- O efeito antiinflamatório pode ser decorrente da capacidade do extrato de *H. procumbens* modular negativamente a produção de fatores que favorecem a proliferação e ativação de eosinófilos (IL-5, IL-4 e IL-13) no período 18°, estabelecido como o pico da eosinofilia;
- Os eventos relacionados na adesão de eosinófilos implicam fatores multifatoriais, porém sugerimos nosso tratamento modulou negativamente a expressão das moléculas: CD11b, CD11c no pico da eosinofilia no modelo da SLMV;
- Sugerimos que nosso tratamento com *H. procumbens* possa interferir na modulação da produção de IgE dependente de IL-4 e IL-13;
- Eosinófilos expressam a molécula de superfície CD40, podendo neste contexto, aumentar sua sobrevivência por fatores que precisam ser avaliados neste modelo. Porém o tratamento como *H. procumbens* induziu uma discreta redução na expressão desta molécula na superfície de eosinófilos no período de 18 dias após a infecção, o que pode ter contribuído para o efeito antiinflamatório do extrato no modelo da SLMV.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.. **Cellular and Molecular Immunology**, 5 ed, 2003.

ABE JACOB, CM; OSELKA, G.W. Toxocaríase na infância. **Pediatr.** v. 13, p. 48-55,1991.

ALDERETE, JUSSARA MARIETA SANTOS, Prevalência de infecção por *Toxocara sp* em escolares na regional do Butantã, São Paulo. 2001. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina da Universidade de SP.

ALTCHEH, J.; NALLAR, M.; CONCA, M.; BIANCARDI, M.; FREILIJ, H. Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio em 54 pacientes. **Anais de Pediatria**, v.58, p.425-431, 2003.

ANDERSEN M.L., SANTOS E.H.R, SEABRA M.L.V, SILVA A.A.B, TUFIK S. Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 2004; 91:325-30.

ANDRESIUK, M. V.; DENEGRI, G. M.; ESARDELLA, N. H; HOLLMANN, P. Encuesta coproparasitológico canina realizado en plazas publicas de la ciudad de Mar Del Plata, Buenos Aires, Argentina. *Parasitología Latino americana*, Santiago de Chile, v.58, n.1-2, p.17-22, 2003.

ANIBAL, F.F,et al. Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.65, nº4, 344-352, 2007.

ARAÚJO, P. Observações pertinentes à primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.14, 1972.

BADLEY J.E, GRIEVE R.B, ROCKEY JH, GLICKMAN L.T. Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara-canis* infective larvae - the role of excretory secretory antigens. **Parasite Immunol.** 1987;9(1):133-43.

BARRIGA, O.O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis of immunological control. **Vet parasitol.** v. 29, n. 2, p.195-234, 1988.

BEAVER PC, SNYDER CH, CARRERA GM, DENT JH, LAFFERTY JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva *migrans* - report of 3 cases. *Pediatrics*. 1952; 9(1):7-19.

BEAVER, PC. Parasitological Review-Larva *Migrans*. **Exp Parasitol**. 1956; v. 5, p. 587,1956.

BEAVER PC. Nature of visceral larva *migrans*. **J Parasitol**. 1969; 55(1): 3-&.

BIGNOLD, L.P. The eosinophil leukocyte: controversies of recruitment and function. *Experientia (Basel)*, v.51, n.4, p.317-27, Apr. 1995.

BUIJS J, EGBERS M, LOKHORST W.H., SAVELKOUL H.F.J, NIJKAMP FP. Toxocara-induced eosinophilic inflammation - airway function and effect of anti-IL-5. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151(3):873-8.

BUIJS J., BORSBOOM G., RENTIG M., HILGERSOM W.J.A, VANWIERINGEN J.C., JANSEN G, *et al*. Relationship between allergic manifestations and Toxocara seropositivity: A cross-sectional study among elementary school children. **Eur Respir J**. 1997; 10(7): 1467-75.

BISSERU, B.; WOODRUFF, AW; HUTCHINSON, RI. Infection with adult *Toxocara canis*. **Brit Med J**. v.1, p. 1583, 1966.

BUREAU F., VENDERPLASSCHEN A., JASPAR F., MINNER F, PASTORET P.P., MERVILLE M.P., *et al*. Constitutive nuclear factor- $\kappa$ B activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood* 2002; 99:3683-91.

BRIENS, GEORGE T, LEWITH MA , MACGREGOR G Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for Osteoarthritis : a review of efficacy and safety. **The journal of alternative and complementary medicine**.2006; 12 (10): 981-93.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93 – 103, 2004.

CALHOUN W.J., SEDGWICK J, BUSSE W.W. The role of eosinophils in the pathophysiology of asthma. **Ann N Y Acad Sci.**, 629, 62-72. 1991.

CAMPOS JUNIOR D, ELEFANT G, de MELO e SILVA E, GANDOLFI L, JACOB C, TOFETI. Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in children of different socioeconomic strata. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2003; 36(4): 509-13.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Parasites and Health. *Toxocariasis*. Assessment Statement [Internet]. 2011 novembro. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxocariasis.htm>.

D. CARLOS, E.R. MACHADO, L. DE PAULA, A. SÁ-NUNES, C.A. SORGI, M.C. JAMUR, C. OLIVER, W.T. LIMA and L.H. FACCIOLI. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. **Braz J Med Biol Res**, April 2011, Volume 44(4) 319-326

CASTRO, D. M. *et al.* **Plantas Mediciniais**. Viçosa, ed. UFV, p. 220, 2000.

CHIATTONE C.S., CHIEFFI P.P., PAES R.A.P. **Síndrome de larva *migrans* visceral em adulto**. Apresentação de um caso. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1983; 43:85-88.

CHIEFFI, P. P.; CASEIRO, M. M. Toxocaríase (Síndrome de larva migrans visceral). In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

CHRUBASIK J.E., NEUMANN E, MUL ER-LADNER U, *et al.* Potential molecular basis of Chondroprotective of *Harpagophytum procumbens*. Letter to the editor. **Phytomedicine** 2006; 13:598-600.

CHRUBASIK J.E., SPORER F., DILLMANN-MARSCHNER R., FRIEDMANN A., WINK 2000. Physicochemical properties of harpagoside and its *in vitro* release from *Harpagophytum procumbens* extracts tablets. **Phytomedicine**. 6: 469-473.

CLARKSON C, STAERK D, HANSEN S.H, SMITH PJ, JAROSZESKI J.W. Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/ APCIMS. **Journal of Natural Products** 2006; 69: 1280-8.

COOK, E.B.; STAHL, J.L.; GRAZIANO, F.M. **Eotaxin: what we know, and what we would like to know**. Allergy Asthma Proc., v.19, n.5, p.253-5, Sept./Oct. 1998.

DEL POZO, V., B. DE ANDRES, E. MARTIN, B. CARDABA, J. C. FERNANDEZ, S. GALLARDO, P. TRAMON, F. LEYVA-COBIAN, P. PALOMINO; C. LAHOZ. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. Eur. **J. Immunol.** v. 22, p. 1919–1925, 1992.

DESPOMMIER D. **Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects**. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16 (2):265-72.

CUNHA R.M.C. Larva *Migrans* Visceral. In: Tavares W, Marinho, L. A. C. *Rotina de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 688- 693.

DESSY, E. *et al.* **Reazione stromale, eosinofilia tessutale e mastocitosi nel carcinoma della laringe**. Acta Otorhinolaring. ital., v.6, n.4, p.357-66, giugl. 1986.

ELEFANT G.R., JACOB C.M.A, Kanashiro EHY, PERES B.A. Toxocaríase. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 323-32.

FACCIOLI, L. H, et al., The accumulation of <sup>111</sup>In-eosinophils induced by inflammation mediators, *in vivo*. **Immunology**, v.73,p. 222-230, 1991.

FACCIOLI, L.H, et al., IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a Visceral Larva Migrans Syndrome. **Mediators of Inflammation**, v.5,p. 24-29, 1996.

FIGBICH B.L, HEINRICH M , HILLER KO , KAMMERER N. Inhibition of TNF- $\alpha$  synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69.**Phytomedicine** 2001; 8(1):28-30.

FIGUEIREDO S, TADDEI J, MENEZES J, NOVO N, SILVA E, CRISTOVÃO H, *et al.* [Clinical-epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population]. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81(2):126-32.

FUJISAWA, T.; KATO Y.; NAGASE H.; ATSUDA J.; TERADA A.; IGUCHI K.; *et al.* Chemokines induced eosinophil degranulation through CCR-3; *J Allergy Immunol.*, v.106,p. 507-513, 2000.

FURLAN, M. R. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá: SEBRAE, **Coleção Agroindústria**, v.13, p.137, 1998.

GIEMBYCZ, M.A.; LINDSAY, M.A. **Pharmacology of the eosinophil**. *Pharmacol. Rev.*, v.51, n.2, p.213-40, June 1999.

GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R.; LEIFERMAN, K.M. **The biology of the eosinophil leukocyte**. *Ann. Rev. Med.*, v.44, p.85-101, 1993.

GLICKMAN, LT; SCHANTZ, PM. **Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis**. *Epidemiol Rev.*v. 3, p. 230-50, 1981.

GOLDSMITH, M. M. *et al.* **The importance of eosinophil in head and neck cancer**. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v.106, n.1, p.27-33, Jan. 1992.

HALLACK K.A, CUNHA, R.M.C. **Larva migrans visceralis**. In: Veronesi R; Focaccia, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1429-32.

HIRATSUKA, H. *et al.* **Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *Cancer (Philad.)*, v.80, n.3, p.351-6, Aug. 1997.

HOTEZ PJ, WILKINS PP. **Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance?** *Plos Negl Trop Dis.* 2009;3(3): 1-11.

BUTTERWORTH, A.E. *et al.* Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. **Journal of Immunology**, v.122, p. 221-229, 1979.

JACOB C.M.A, OSELKA G.W. **Toxocaríase na infância.** *Pediatria (São Paulo)*. 1991; 13(2):48-55.

JACOB C.M.A. **Síndrome da larva migrans visceral por *Toxocara canis* (Toxocaríase).** In: Tonelli E, Freire LMS. *Doenças infecciosas da infância e da adolescência.* 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p. 1421-31.

JACOBS, W. *et al.* Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation *in vivo*. **American Journal of Pathology.**, v. 150, n. 6, 1997.

JANG MH, LIM S, SEUNG-M. H., *et al.* , *Harpagophytum procumbens* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929. **Journal Pharmacology Science** 2003; 93:367-71.

JONES D.G. The eosinophil. **J. Comp. Path.**, 108, 317-335. 1993.

KASZKIN M., BECK K.F., KOCH E. *et al.* Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside dependent and independent effects. *Phytomedicine* 2004; 11:585-95.

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.

KAYES, S.G. Spleen cell response in experimental murine toxocariasis. **J. Parasitol** 1984. V.70, pp. 522.

LALANI, T.; SIMONS, R.; AHMED, A. R. Biology of IL-5 in health and disease. **American College of Allergy, Asthma & Immunology**, 82(4): 317-333,1999.

LAMBERTUCCI, JR; RAYES, AA; SERUFO, JC et al. Pyogenic abscesses and parasitic diseases. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. v. 43, n. 2, p. 67-74, 2001.

LAMKHIUED, B, et al.,.Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. **Annals of the New York Academic Science**,v.796,p. 203-208, 1996.

LANHERS M.C., FLEURENTIN J, MORTIER F, VINCHE A, YOUNOS C. Anti-inflammatory and analgesics effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. **Planta Medica** 1992; 58:117-22.

LESCANO, S,Z., CHIEFFI, P.P., AMATO N., Anti-helmínticos na toxocaríase experimental: efeito na recuperação de larvas de *Toxocara canis* e na resposta humoral. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Feb. 2005, vol.41,no.1, p.21-24. ISSN 1676-2444.

LOEW D, MOLLERFELD J, SCHRODTER A, PUTTKAMMER S, KASZKIN M. Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis *in vitro* and *ex vivo*. **Clinical pharmacology & therapeutics** 2001; 69(5):356-64.

MACHADO A.B, ACHKAR M.E. Visceral larva *migrans*: case report. **An Bras Dermatol**. 2003; 78(2): 215-19.

MAGNAVAL, J.; GLICKMAN, L. T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **Korean Journal of Parasitology**, v.39, p.1-11, 2001.

MAIZELS, R.M.; DE SAVIGNY, D; OGILVIE, B.M. Characterization of surface and excretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunol.** v. 6, p. 23-37, 1984.

MATOS M, A. M, REICHMANN ML, DOMINGUEZ M. São Paulo Pasteur Institute  
Technique for estimating a canine population. **Cad Saude Publica.** 2002; 18(5):1423-8.

MENDES, D. M.; DE CAMARGO, M. F.; AUN, V. V.; FERNANDES, M. F. M.;  
AUN, W. T.; DE MELLO, J. F. Eosinofilia. Rev. Bras. **Alerg Immunopatol.** v. 23, p. 84  
– 91, 2000.

McEWEN, B.J. Eosinophils: a review. **Veter. Res. Commun.**, v.16, n.1, p.11-44,  
1992.

MOQBEL, R.; LEVI-SCHAFFER, F.; KAY, A. B. Cytokine generation by eosinophil.  
**J Allergy Clin Immunol**, 94: 1183-8, 1994.

MOQBEL, R.; LACY, P. Exocytotic events in eosinophils and mast cells. **Clin. Exp.  
Allergy.**, v. 29, p. 1017-1022, 1999.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. ; PFALLER, M. A.  
Microbiologia Médica 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

NAKAJIMA, A. N.; WATANABE, S.; YOSHINO, H.; YAGITA, K. OKUMA M.  
Requirement of CD28 – CD86 co-stimulation in the interaction between antigen  
primed T helper type 2 and B cells. **Inter Immunol.**v.9, p.637-644, 1996.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and  
phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**,  
v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NAVEIRA, J. B. Aspectos da biologia dos eosinófilos. **Rev. Bras. Maraliolog.  
Doenças Trop.**, v. 12, p. 103, 1960.

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.

OKUIDARA H, MORI A, SUKO M, ITO K. Selective suppression of IL-5 synthesis by OM-01. *Int Arch Allergy Immunol*, v.113, p.331-334, 1997

OHKAWARA Y, LIM KG, XING Z, GLIBETIC M, NAKANO K, DOLOVICH J, et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. **J Clin Invest** 1996; 97:1761-6.

RATHORE, A. *et al.* In situ analysis of B7-2 costimulatory, major histocompatibility complex class II, and adhesion molecule expression in schistosomal egg granulomas. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 187-194, 1996.

RAYES A.A, LAMBERTUCCI JR. The association of human toxocariasis and pyogenic abscesses. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1999; 32(4):425-38.

RESNICK, M. B., WELLER, P.F. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Respir. Cell. mol. Biol.**, v.8, n.4, p.349-55, Apr. 1993.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5.ed. Mosby, London, 1998.

SANDERSON, C.J. **Interleukin-5, eosinophils and disease**. **Blood**, v.79, n.12, p.3101-9, June 1992.

SCOLARI, C.; TORTI, C.; BELTRAME, A.; MATTEELI, A.; CASTELLI, F.; GULLETTA, M.; RIBAS, M.; MORENA, S.; ; URBANI, C. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth (STH) infections in urban and indigenous schoolchildren in Ortigueira, State of Paraná, Brasil: implications for control. **Trop. Med. Inter. Health**. v. 5, p. 302-307, 2000.

SÁ-NUNES, A, et al, Disodium cromoglycate prevents ileum hyperreactivity to histamine in *Toxocara canis*-infected guinea pigs. **Pharmacology Research**, v.48, p. 451-455, 2003

SCHANTZ, P. *Toxocara larva migrans* now. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, p.21-34, 1989.

SILBERSTEIN, D.S. Eosinophil function in health and disease. **Hematol.**, v. 19, n.1, p.47-77, Apr. 1995.

SIMON, H.; BLASER, K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? **Immunol. Today**, v.16, n.2, p.53-5, Feb. 1995.

SMIT, S. Overview. 2010 maio 17. Disponível em:

<http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2005/Toxocariasis/whole%20thing.htm>.

SHURIN M.R., KUSNECOV AW, RIECHMAN S.E., RABIN B.S. Effect of a conditioned aversive Stimulus on the immune response in three strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 837-849. 1995.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346. p. 425-434, 1990.

SUGANE, k., OSHIMA, T. Eosinophilia granuloma formation and migratory behavior of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis* **Parasite Immunol** 1982. V.4, pp. 307

TAKAMOTO, M., ISOBE, M., SUGANE, K. The role of ICAM/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4 interactions on T helper 2 cytokine production by lung T cell of *Toxocara canis* infected mice. **Immunology**, 1998. V. 95, pp. 419

TURNER, K.J, et al, Regulation of asthma by intestinal parasites. Investigation of possible mechanisms. **Immunology**, v. 35, nº2, p. 281-288, 1979.

VALENT, P. The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells. **J Allergy Clin Immunol**, 94: 1177-83, 1994.

VOSTERS O, BEUNEU C, NAGY N. *et al* (2004) CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. **Dia- betologia** 47:660–668

WARDLAW, A.J. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. **Postgrad. Med. J.**, v.70, n.826, Aug. 1994.

WARDLAW, A.J.; MOQBEL, R.; KAY, B. **Eosinophils: biology and role in disease.** *Advanc. Immunol.*, v.60, p.151-266, 1995.

WELLER, P.F. The immunobiology of eosinophils. **New Engl. J. Med.**, v.324, n.16,p.1110-8, Apr. 1991.

WELLER, P.F. Eosinophils: structure and functions. **Curr. Opinion Immunol.**, v.6, n.1,p.85-90, Feb. 1994.

WONG et al. Human eosinophils express transforming growth factor **J. Exp. Med.**, v.172, n.3, p.673-81, Sept. 1990.

YANG, G-Y.; WEST, A. B. What do eosinophils tell us in biopsies of patients with Inflammatory Bowel Disease? **J Clin Gastroenterol**, 36(2): 93-98,2003

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 051/2009**

Protocolo nº 046/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 36ª. Reunião, ocorrida em 20/10/2009, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Estudo dos mecanismos de defesa durante a infecção experimental pelo nematóide Toxocara canis**” apresentado por Fernanda de Freitas Aníbal, Joice Margareth de Almeida Rodolpho, Naiara Naiana Dejani e Sandra Regina Pereira de Oliveira.

São Carlos, 4 de dezembro de 2009.

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal