

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CD80, CD86 E MHCII EM
EOSINÓFILOS DURANTE A SINDROME DA LARVA MIGRANS VISCERAL**

JOICE MARGARETH DE ALMEIDA RODOLPHO

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 DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CD80, CD86 E MHCII EM
EOSINÓFILOS DURANTE A SINDROME DA LARVA MIGRANS VISCERAL**

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

Joice Margareth de Almeida Rodolpho

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Débora Gusmão Melo

São Carlos – SP

2012

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

R695ae Rodolpho, Joice Margareth de Almeida.
Avaliação da expressão das moléculas CD80, CD86 e MHCII em eosinófilos durante a síndrome da larva migrans visceral / Joice Margareth de Almeida Rodolpho. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
70 f.

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

1. Imunologia. 2. Eosinófilos. 3. APC. 4. SLMV. I. Título.

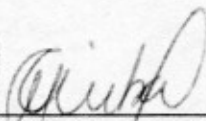
CDD: 616.079 (20ª)

Joice Margareth de Almeida Rodolpho

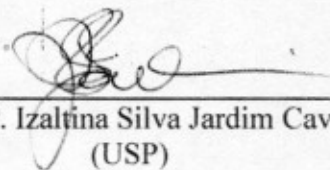
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 28/02/2012

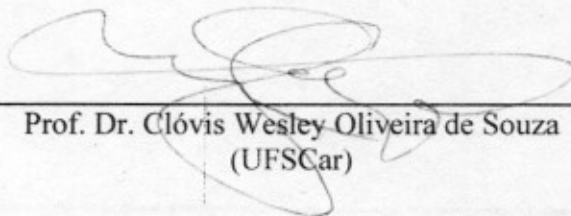
BANCA EXAMINADORA



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



Prof.ª Dr.ª Izaltina Silva Jardim Cavalli
(USP)



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

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Orlando e Roselene e a meu irmão Renato pelo incentivo, apoio e amor dedicado sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter guiado meu caminho para que eu pudesse chegar até aqui, e seguir meu destino mantendo minha fé, calma, sabedoria e acima de tudo paciência para enfrentar todos os obstáculos até aqui enfrentados.

Aos meus pais Orlando Rodolpho e Roselene de Almeida Rodolpho que me deram a vida e me ensinou a viver com dignidade, vocês que iluminou meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo. Pela compreensão e espera das minhas dúvidas e angustia. Agradeço a Deus por ele ter colocado pessoas como vocês para que eu pudesse me espelhar e ter como exemplo para minha vida.

Ao meu irmão Renato A. de A. Rodolpho pelo incentivo, pela dedicação e por acreditar que eu era capaz. Obrigado pela ajuda financeira dedicada todos esses anos. Obrigado por demonstrar uma pessoa de caráter, sincero e amigo. Obrigado por fazer parte da minha vida e da minha família que são as coisas mais preciosas que eu tenho.

A equipe do laboratório LAP: Débora Neris, Laís Cristina de Souza, Naiara Dejani, Sandra Oliveira e Ricardo Correia que contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído com tanta dedicação incentivo e esforço realizado não só por mim, mas também por vocês.

As meninas “Helmínticas” (Débora, Laís, Naiara e Sandra) por surgirem em minha vida, agradeço por me suportarem a cada dia ou quase todos os dias, por cada palavra que me doaram, por cada livro e CDs emprestados, cada minuto de atenção que me deram, cada puxão de orelha, cada abraço, cada luta que lutaram comigo, cada loucura que me deram crédito, cada novidade que me apoiaram, enfim agradeço a Deus por ter me dado a vocês como amigas, pois com vocês eu aprendi que há amigos mais chegados que irmãos.

Ao amigo, vizinho e agregado Danilo Arantes pela compreensão e pela conversa jogada fora quando eu me sentia mais sozinha em casa, obrigada pelos momentos amigáveis e felizes que junto de todas as meninas me fizeram passar em todos esses anos aqui.

Aos amigos Juliane Ferreira e Maycon Ravagnani, amizades essa que, por mais longe que estivessem nunca nos separáramos; amizade que, o tempo nunca foi capaz de apagar; amizade que, mesmo estando longe, estávamos perto; amizade que a idade não as

tornavam mais velhas porém, mais novas e unidas; amizade que uma crítica era um sinônimo de preocupação; amizade em que haviam discussões, mas sempre eram esquecidas por um abraço sincero e um pedido de desculpas; amizade onde a união sempre era algo fundamental no dia-a-dia; amizade em que o simples fato de estar perto já era sinônimo de segurança; amizade em que momentos tristes eram maneiras de comprovar que nunca íamos nos separar enfim nossa amizade, é assim e espero que possa continuar.

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

Agradeço também as equipes de outros Laboratórios, e professores por terem contribuído com o desenvolvimento deste trabalho

-Profª Drª Lucia Helena Faccioli

-Profº Dr Edson Soares

-Profª Drª Débora Gusmão Melo pela valiosa contribuição dedicada a este trabalho.

As Técnicas de Laboratório:

Ana Soares, Aline Galvão e Fabiana Moraes.

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

“ O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: Esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

Resumo

O eosinófilo é uma célula hematopoiética, originada a partir de células precursoras presentes na medula óssea, cuja diferenciação e proliferação são reguladas por citocinas como GM-CSF, IL-3 e IL-5. Quando ativados, os eosinófilos são capazes de realizar fagocitose de pequenas partículas e bactérias, mas sua principal forma de atuação no processo inflamatório consiste na liberação de proteínas tóxicas, citocinas, enzimas, mediadores lipídicos e produtos reativos de oxigênio. O aumento no número de eosinófilos é uma característica importante em diversas doenças como a alergia e as infecções parasitárias. Na condição de APC (Células Apresentadoras de Antígenos), os eosinófilos são considerados similares as CD (Células Dendríticas) em seu potencial para ativar células T *naïve*, podendo ter potencial tão eficiente quanto as CD pulmonares em estimular células T nas vias aéreas superiores no modelo da inflamação. As APC são definidas por serem capazes de ingerir, processar e apresentar o antígeno como: CD, macrófagos, linfócitos B e possivelmente os eosinófilos. A expressão na superfície da APC é caracterizada por moléculas coestimatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) e ainda pelo MHCII. O modelo proposto para esta avaliação foi a Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) causada pelo *Toxocara canis*, um dos helmintos mais frequentes em cães jovens. Uma das principais consequências desta infecção é o aumento marcante de eosinófilos circulantes e teciduais. A eosinofilia tem sido associada com doenças parasitárias particularmente quando o parasita invade os tecidos ou promove danos na superfície das mucosas. No presente estudo avaliamos a expressão de MHC II e moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em eosinófilos na SLMV. Nossos resultados mostraram que as moléculas analisadas foram expressas em eosinófilos no sangue de camundongos infectados com *Toxocara canis* quando comparado com o grupo controle. Correlacionando ainda uma intensa eosinofilia durante o curso da doença com o aumento de IL-5 no grupo infectado. Sugere que, durante o curso da infecção pelo *Toxocara canis*, eosinófilos podem apresentar comportamento de uma APC, aumentando a expressão de moléculas coestimulatórias e MHCII e possivelmente amplificando a resposta imune nesse modelo.

Palavras Chaves: Eosinófilos, APC, SLMV

Abstract

Eosinophils are a hematopoietic cell originated from precursor cells found in bone marrow, whose differentiation and proliferation is regulated by cytokines such as GM-CSF, IL-3 and IL-5. When activated, eosinophils are capable of phagocytosis of small particles and bacteria, but their main form of activity in the inflammatory process is the release of toxic proteins, cytokines, enzymes, lipid mediators and reactive oxygen products. The increase in eosinophil is an important feature in many diseases such as allergy and parasitic infections. Provided APC (Antigen-Presenting Cells), eosinophils are considered similar to the DC (Dendritic Cells) in its potential to activate naïve T cells and may have potential as efficient as the DC in stimulating lung T cells in the upper airways in the model inflammation. The APC are defined by being able to take, processing and presenting antigen such as DC, macrophages, B lymphocytes and possibly eosinophils. The surface expression of APC is characterized by coestimatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) and also by MHCII. The proposed model for this evaluation was to Visceral Larva Migrants syndrome (VLMS) caused by *Toxocara canis*, one of the most frequent helminth in young dogs. One of the main consequences of this infection is the marked increase in circulating and tissue eosinophils. Eosinophilia has been associated with parasitic diseases particularly when the parasite invades or promotes tissue damage at mucosal surfaces. In the present study we evaluated the expression of MHC II and CD80 and CD86 molecules coestimatory in eosinophils in VLMS. Our results showed that the molecules studied were expressed in eosinophils in the blood of mice infected with *Toxocara canis* compared with the control group. Correlating an intense eosinophil still during the course of the disease with increased IL-5 in the infected group. Suggests that during the course of *Toxocara canis*, eosinophils can exhibit behavior of an APC, increasing the expression of MHCII molecules coestimatory and possibly amplifying the immune response in this model.

Keywords: eosinophil, APC, VLMS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Eosinófilos.....	13
1.2 Células Apresentadoras de Antígenos (APC)	15
1.3 Moléculas coestimulatória (CD80 e CD 86).....	16
1.4 Ativação da resposta imune específica	17
1.5 Síndrome da Larvas Migrans Visceral (SLMV)	18
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Obtenção dos ovos de <i>T. canis</i>	26
3.3 Infecção dos camundongos com ovos de <i>T. canis</i>	26
3.4 Delineamento Experimental	27
3.5 Obtenção das células dos lavados broncoalveolares (LBA), do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue	27
3.6 Contagem total e diferencial das células do LBA, LPC e do sangue	28
3.7 Avaliação do perfil celular durante o modelo experimental da Síndrome da Larvas Migrans visceral.....	28
3.8 Cultura de células do baço e quantificação dos níveis de citocinas e imunoglobulinas dos sobrenadantes	28
3.9 Extração do antígeno total de <i>T. canis</i>	29
3.10 Homogenato de Pulmão.....	29
3.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	30
3.11.1 Citocinas	30
3.11.2 Anticorpos Monoclonais	30
3.12 Protocolo experimental para análise da expressão das moléculas de adesão por Citometria de fluxo (FACS)	31

3.13 Análise Estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Contagem diferencial e total de células (leucócitos) no sangue de animais infectados ou não com <i>Toxocara canis</i>	33
4.2 Contagem diferencial e total de células (leucócitos) no Lavado da Cavidade Peritoneal de animais infectados ou não com <i>Toxocara canis</i>	35
4.3 Contagem diferencial e total de células (leucócitos) no Lavado da Cavidade Broncoalveolar de animais infectados ou não com <i>Toxocara canis</i>	37
4.4 Avaliação da expressão das moléculas coestimulatórias e MHC II em diferentes compartimentos celular.....	39
4.4.1 Expressão das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em eosinófilos e monócito no sangue	39
4.4.2 Expressão das moléculas (MHCII, CD80 e CD86) em eosinófilos, macrófagos e células dendríticas no LPC	42
4.5 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no plasma de animais infectados ou não com T. canis.	46
4.6 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no pulmão de animais infectados ou não com T. canis	48
4.7 Avaliação da produção de citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ em cultura ex vivo no baço	50
4.8 Avaliação dos Anticorpos Circulantes	52
4.8.1 Avaliação dos Anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a no plasma	52
5 Discussões	54
6 Conclusões	59
7 Referências	60
Anexo- A	70

LISTA DE ABREVIATURAS

APC- *Antigen-presenting cell*

B7- Molécula Coestimulatória

CD- Células Dendríticas

CD86 *Cluster of differentiation* 86

CD80 *Cluster of differentiation* 80

CLC- *Cristais de Charcot Leyden*

CTLA-4- *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

D.O- Densidade óptica

ECP- *Proteína Catiônica dos Eosniófilos*

EDN- *Neurotoxina Derivada de Eosinófilos*

ELISA- *Enzime linked Immunosorbent Assay*

EPO- *Peroxidase dos Eosinófilos*

Fc- Fração Cristalizável do Anticorpo

Fig.- Figura

FITC- *Fluorescein Isothiocyanate*

GM-CSF- Fatores estimulantes das colônias de monócitos granulócitos

IFN- gama- *Interferon gama*

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

LFA- Antígeno Associado á Função Linfocitário

L3- Larva de 3º estágio

LBA- Lavado da Cavidade Brocoalveolar

LCP- Lavado da Cavidade Peritoneal

MAC- Complexo de ataque a membrana

MBP- *Proteína Básica Maior*

MHC- *Major Histocompatibility complex*

PAF- Fator Ativador de Plaquetas

PBS- *Phosphate Buffered Saline*

PE- *Phycoerythrin*

PGE- Prostaglandinas

SBF- Soro Bovino Fetal

SLMV- Síndrome da Larvas Migrans Visceral

TES- Antígeno de excreção e secreção de *Toxocara*

Th- Células T helper

TNF- alfa- Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Recrutamento, ativação e função dos eosinófilos na inflamação	14
FIGURA 2- Esquema representativo da interação das moléculas coestimulatórias presentes nas APC (CD80 e CD86) na ativação e inibição das células T ligando aos seus receptores ...	18
FIGURA 3- Foto de ovos larvados de <i>Toxocara canis</i> mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos, no aumento de 40 X em microscópio óptico comum	20
FIGURA 4 – Esquema representativo do desenvolvimento do ciclo biológico do <i>Toxocara canis</i> nos hospedeiros definitivos (cães)	21
FIGURA 5- Delineamento Experimental	27
FIGURA 6 – Contagem total e diferencial de células no sangue no 5º, 18º e 36º após a infecção	34
FIGURA 7- Contagem total e diferencial de células no Lavado da Cavidade Peritoneal no 5º, 18º e 36º após a infecção	36
FIGURA 8- Contagem total e diferencial de células no Lavado Broncoalveolar no 5º, 18º e 36º após a infecção	38
FIGURA 9- Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (CD80, CD86 e MHCII) em eosinófilos no sangue	40
FIGURA 10- Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (CD80, CD86 e MHCII) em monócitos no sangue	41
FIGURA 11 - Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (CD80, CD86 e MHCII) em eosinófilos no Lavado da Cavidade Peritoneal	43
FIGURA 12 - Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (CD80, CD86 e MHCII) em Macrófago no Lavado da Cavidade Peritoneal.....	44
FIGURA 13 - Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (CD80, CD86 e MHCII) em Células dendríticas no Lavado da Cavidade Peritoneal.....	45
FIGURA 14- Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no plasma de animais infectados ou não com <i>T.canis</i>	47
FIGURA 15- Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no pulmão de animais infectados ou não com <i>T.canis</i>	49
FIGURA 16- Avaliação da produção das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no em cultura <i>ex vivo</i> de células do baço	51
FIGURA 17- Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a no plasma.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eosinófilos

Os eosinófilos são células hematopoiética, originada a partir de células precursoras presentes na medula óssea, cuja diferenciação e proliferação são reguladas por fatores de crescimento como GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito) e interleucinas IL-3 e IL-5 (diferenciação e a proliferação dos eosinófilos). Os eosinófilos foram observados pela primeira vez por Wharton Jones em 1846, mas somente em 1879, Paul Erlich nomeou estas células de eosinófilos, devido à intensa avidez de seus grânulos citoplasmáticos por corantes ácidos como a eosina (SPRY, 1992 (SANDERSON et al., 1985; METCALFE, 1986). Os eosinófilos são granulócíticos que representam cerca de 1 a 3% dos leucocitos no sangue periférico, apresentam formato polimórfico, núcleo bilobulado, com grande mobilidade e múltiplas vesículas citoplasmáticas (MENDES et al., 2000).

O aumento no número de eosinófilos é uma característica importante em diversas doenças como: alergia (HUBSCHER, 1975; OKUBO et al., 1998), asma (PREISER et al., 1969; KOTSIMBOS; HAMID, 1997) e as infecções parasitárias (HOGARTH-SCOTT; FEERY, 1976; SABIN et al., 1996; RAINBIRD et al., 1998; BEHM; OVERTON, 2000). Em certas doenças, os eosinófilos podem apresentar um acúmulo seletivo no sangue periférico ou em qualquer tecido do organismo causando prejuízo ao indivíduo (ROTHENBERG, 1998).

O citoplasma dos eosinófilos é rico em grânulos contendo proteínas catiônicas, como: a Proteína Básica Maior (MBP), a Proteína Catiônica dos Eosinófilos (ECP), a Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (EDN) e a Peroxidase dos Eosinófilos (EPO), além de outras enzimas como colagenases e cristais de Charcot - Leyden (CLC), esta última proteína possui atividade de lisofosfolipase (SHURIN, 1995; GLEICH; ADHOLPHSON, 1986). Esta célula apresenta uma série de receptores em sua membrana citoplasmática, como receptores de baixa afinidade para a porção Fc de imunoglobulinas das classes IgE, IgG e IgA e para fragmentos do complemento como C3b (WARDLAW et al., 1994).

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

integrina)(RESNIK, WELLER, 1993).

O recrutamento dos leucócitos e as interações das células com as moléculas de adesão estão representadas na figura 1. (ROTHENBERG, 1998).

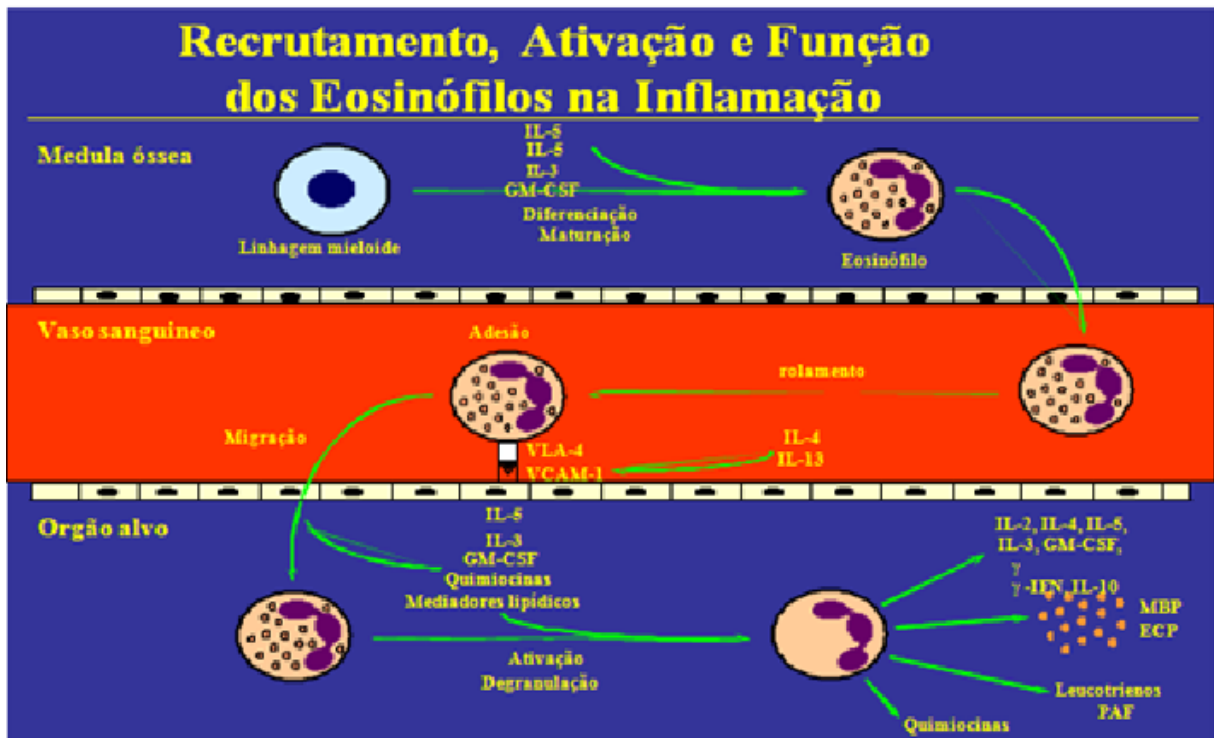


Figura 1: Recrutamento, ativação e função dos eosinófilos na inflamação.

Fonte: (RESNIK et al., 1993).

Quando os eosinófilos chegam ao sítio inflamatório sofrem apoptose e são rapidamente retirados pelos macrófagos, sobrevivendo por menos de 48 horas. Algumas citocinas, como IL-3, IL-5 e GM-CSF, retardam a apoptose dos eosinófilos no sítio inflamatório, aumentando sua sobrevivência por longos períodos (ROTHENBERG et al., 2001; SPERGEL et al., 2002). E em muitos processos inflamatórios, os próprios eosinófilos produzem esses mediadores que atuam de forma autócrina para a manutenção dessas células nos tecidos inflamados.

Uma das principais funções dos eosinófilos é a defesa contra helmintos, estes estimulam a população de células Th2 a produzir IL-4 e IL-5, o primeiro promove aumento de IgE que se liga à superfície do helminto, e o segundo ativa os eosinófilos a se ligarem ao imunocomplexo e secretarem os grânulos com componentes enzimáticos (ABBAS et al., 1998). Outra participação marcante dos eosinófilos é nas desordens alérgicas. Depois da exposição ao alérgeno em indivíduos sensibilizados, dois eventos não mútuos podem levar ao acúmulo de eosinófilos. Um deles é pela liberação imediata de mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas, leucotrienos) por meio da interação de

receptores da IgE com os mastócitos. Os mastócitos promovem a liberação de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 e TNF-alfa) que induzem a produção de citocinas relacionadas aos eosinófilos (GM-CSF, IL-4 e IL-5), este processo também é conhecido como hipersensibilidade imediata (ROTHENBERG, 1998).

Na condição de APC (Células Apresentadoras de Antígenos), os eosinófilos são considerados similares as Células Dendríticas (CD) em seu potencial para ativar células T *naïve* (PADIGEL et al., 2006). No modelo experimental de inflamação em camundongos foi realizado cultura de eosinófilos estimulados com antígeno de *Strongyloides stercoralis*. Nesse modelo observaram a ativação das células T por eosinófilos com a mesma proporção que células dendríticas estimulam com o mesmo antígeno sugerindo assim um potencial eficiente dos eosinófilos quanto as CD pulmonares em estimular as células T nas vias aéreas superiores (PADIGEL et al., 2006). Todavia, esses achados não diminuem o papel das CD e de outras APC; mas possibilita ampliar os conhecimentos no que diz respeito à ativação específica durante um processo inflamatório, principalmente em modelos parasitários.

1.2 Células Apresentadoras de Antígenos

As células apresentadoras de antígenos (APC) são definidas por serem capazes de ingerir, processar e apresentar o antígeno. São exemplos de APC as Células Dendríticas (CD), macrófagos, linfócitos B e possivelmente os eosinófilos (PADIGEL, et al.; 2006), contudo, estas células possuem diferentes funções imunológicas (PALUCKA et al., 1998).

As células dendríticas apresentam aspecto dendrítico, projeções membranosas e por expressarem altos níveis de moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II em sua superfície. Elas são responsáveis por reconhecer, reter e transportar os antígenos até os sítios imunorreativos, apresentando-os aos linfócitos T *naïve* (HEADINGTON; CERIO, 1990). São consideradas APC por serem as únicas capazes de iniciar uma resposta imune primária, contribuindo para o estabelecimento da memória imunológica (CUTLER; JOTWANI, 2004; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Os macrófagos fazem parte da resposta imune inata, fagocitam suas próprias proteínas e restos celulares durante o reparo tissular normal. Todas estas proteínas são degradadas e apresentadas pelo MHC de classe II. Proteínas próprias, contudo, não ativam células T porque na ausência de infecção, os macrófagos expressam baixos níveis de MHC de classe II e praticamente não expressam as moléculas coestimulatórias (JANEWAY Jr, et al., 2001). São importantes células fagocíticas que capturam microorganismos invasores e participam da sua

eliminação tanto por citólise direta, quanto pela apresentação de peptídeos a células T e indução de imunidade específica (AL- DARMAKI, et al, 2003).

Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares (incluindo os que se encontram na superfície celular) e se diferenciam em plasmócitos que são células secretoras de anticorpos, funcionando, assim como mediadores da imunidade humoral (ABBAS, 2008).

A investigação clínica e experimental tem mostrado que os eosinófilos podem funcionar como APC, sendo capaz de processar e apresentar uma variedade de antígenos (SHI, 2004).

1.3 Moléculas Coestimulatórias (CD 80 e CD86)

As moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são moléculas coestimuladoras mais bem caracterizadas, sendo expressas predominantemente na superfície das APC (HATCOCK et al., 1994; STACK et al., 1994). Apesar das moléculas CD80 e CD86 possuírem funções semelhantes, existem diferenças quanto á expressão dessas nas APC e sua afinidade pelos receptores CD28 e CTLA-4 presentes nas células T. A molécula CD86 possui expressão (baixos níveis) em monócitos, células dendríticas e linfócitos B em repouso, que aumenta após a ligação do MHC ao TCR do Linfócito T. Enquanto que, a expressão de CD80 é induzida e ocorre posteriormente ao aumento de expressão de CD86, existem evidências de que as moléculas CD80 e CD86 possuem maior afinidade pelo receptor CTLA-4 do que para CD28 presentes nos linfócitos T (HATHCOCK et al.,1994, LARSEN et al., 1994), e também que CD80 se ligue a ambos os receptores com mais avidéz que CD86 (LINSLEY et al.,1994).

Além das diferenças relacionadas à cinética de ligação de CD80 e CD86 aos seus receptores, um número relevante de estudos tem questionado a equivalência dos efeitos coestimuladores gerados por estas duas moléculas com resultados contrastante frente ao papel funcional desempenhado por CD80 e CD86 na ativação de células T, sugerindo diferenças de natureza qualitativa e quantitativa entre as duas moléculas (FIELDS et al., 1998;BOYLAN et al., 1999; LANG et al., 2002; XIANG et al., 2008).

A molécula CD80 é expressa predominantemente na forma de dímeros na membrana das APCs. Apresenta lenta cinética de expressão e é estável por 4 a 5 dias. A ligação de CD80 ao CD28 contribui para ativar resposta Th2 que favorece diferenciação dos linfócitos T, sendo ligante preferencial de CTLA4, com maior afinidade e avidéz na ligação, se comparada à

ligação de CTLA4 com CD86, além disso, pode participar da finalização da ativação de linfócitos T (SAMSON, MANZOTTI, ZHENG, 2003; BHATIA et al., 2006).

Já a molécula CD86 possui uma rápida cinética de associação e dissociação e sua expressão máxima ocorre em torno de 24 a 48 horas após a ativação dos linfócitos T. Acredita-se que CD86 seja o ligante preferencial de CD28, pois apresenta maior afinidade com esse receptor do que CD80. Ambos, CD86 e CD28, estão disponíveis no momento inicial da ativação das células T (SAMSON, MANZOTTI e ZHENG, 2003; BHATIA et al., 2006).

1.4 ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA

Existem muitos estudos que apontam a importância das moléculas coestimulatórias nas mais variadas infecções por patógenos. A ativação e diferenciação de células T dependem de dois sinais principais. Primeiramente é necessário que haja o contato entre as células apresentadoras de antígenos (APC) e as células T com o reconhecimento do complexo peptídeo MHC. O segundo sinal necessita da interação de moléculas coestimulatórias nas superfícies de células APC e da produção de citocinas por essas células (BLUESTONE, 2006). As moléculas coestimulatórias, como CD28 presentes na superfície de linfócitos T, interagem com as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (B7) expressas em APC profissionais e participam da diferenciação e da amplificação da resposta imune, principalmente para Th1 e/ou Th2 (GREENWALD et al., 1999; SOOS et al., 1999).

As moléculas CD80 e CD86 (B7) também podem se ligar a molécula CTLA4, e neste caso promovem um sinal negativo com baixa ativação de células T (NAKAJIMA et al., 1996; GREENWALD et al., 1999; WANG et al., 2006). Esta ligação leva à inativação das células T, interrompendo a resposta imune e ocorre com cerca de 20 vezes mais avidéz do que a ligação de CD80 e CD86 (B7) a CD28 (figura 2). Acredita-se que essa regulação possa ser promovida não por sinais negativos enviados por meio da ligação de CTLA4, mas pela exclusão dos complexos CD28/CD80 e/ou CD86 e/ou por competição direta pela ligação das moléculas CD80 e CD86 (B7), representado na figura 2 (BHATIA et al., 2006; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Em experimentos realizados com eosinófilos das vias aéreas superiores de camundongos, foi observado a capacidade de processar antígenos inalados, a migração para linfonodos e expressão de moléculas MHC e coestimulatórias CD80 e CD86 (B7) (SHI, et al., 2000). Essa característica permite especular-se essas células são capazes de realizar a apresentação de antígenos assim como induzir a proliferação de linfócitos T CD4.

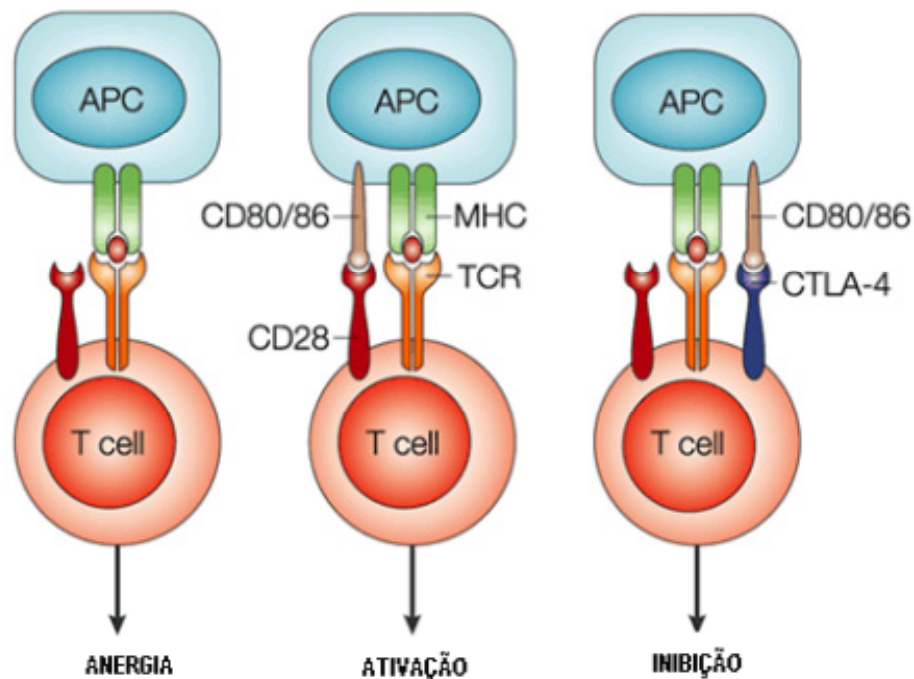


Figura 2 – Esquema representativo da interação das moléculas coestimulatórias presentes nas APC (CD80 e CD86) na ativação e inibição das células T ligando aos seus receptores. **NOTA:** APC: célula apresentadora de antígeno; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; TCR: receptor de célula T.

FONTE: ALEGRE, FRAUWIRTH e THOMPSON, 2001

1.5 Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV)

O termo Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) foi proposto inicialmente por Beaver em 1952, o qual identificou larvas de *Toxocara canis* em fragmentos hepáticos obtidos por biópsia, de crianças com síndrome febril caracterizada por hepatomegalia, infiltrado pulmonar, hipergamaglobulinemia e eosinofilia. Em 1956, Beaver considerou outros helmintos como possíveis causadores da SLMV, porém destacava o *Toxocara canis* como o principal agente (BEAVER, 1956). Em 1969, Beaver restringiu a definição da SLMV somente para aquelas situações onde havia a ocorrência da migração e persistência de larvas vivas por período prolongado nos tecidos de hospedeiros intermediários ou paratênicos, sendo esse o conceito aceito até os dias de hoje. Por todas essas razões e pelas peculiaridades do ciclo biológico do *Toxocara canis* (*Tc*), esse agente tem sido considerado como o mais importante causador da SLMV (BEAVER, 1969; CARVALHO; ROCHA 2011).

A SLMV é uma zoonose de distribuição mundial considerada uma das helmintíases mais prevalente em países industrializados (MAGNAVAL et al., 2001). Entretanto, pouco é reconhecida como problema de saúde pública (ALTCHEH et al., 2003) e subestimada, principalmente em locais favoráveis ao desenvolvimento de *Toxocara* spp. (ALDERETE, et

al.; 2003). O *Toxocara* é encontrado em países tropicais e em desenvolvimento sendo a mais comum helmintíase nos Estados Unidos da América, afetando milhões de americanos que vivem na pobreza (HOTEZ; WILKINS, 2009).

Nos canídeos, os vermes adultos vivem em média quatro meses, sendo que, por volta de seis meses quase todos são eliminados espontaneamente pelo hospedeiro natural. A fêmea produz cerca de 25.000 a 200.000 ovos/dia que saem nas fezes e conseguem sobreviver por vários meses e até anos em areia úmida e alta temperatura levando algumas semanas para maturação. Os cães jovens infectados são potenciais disseminadores do ambiente, podendo liberar milhares de ovos por dia (SPRENT, 1963; GLICKMANN, SCHANTZ, 1981; GILLESPIE, 1988), sendo esses extremamente resistentes a fatores climáticos. Os ovos eliminados nas fezes não são embrionados, para que estes se tornem embrionados é necessário condições adequadas de temperatura (15° a 35°C) e umidade. Nessas condições, 85% dos ovos tornam-se infectantes até a 5ª semana (ARAÚJO, 1972). A forma infectante do parasito ocorre pelo ovo larvado de 3º estágio (L3), (HALLACK, CUNHA, 1996; MAGNAVAL et al., 2001; CUNHA, 2005), como demonstrado na figura 3.

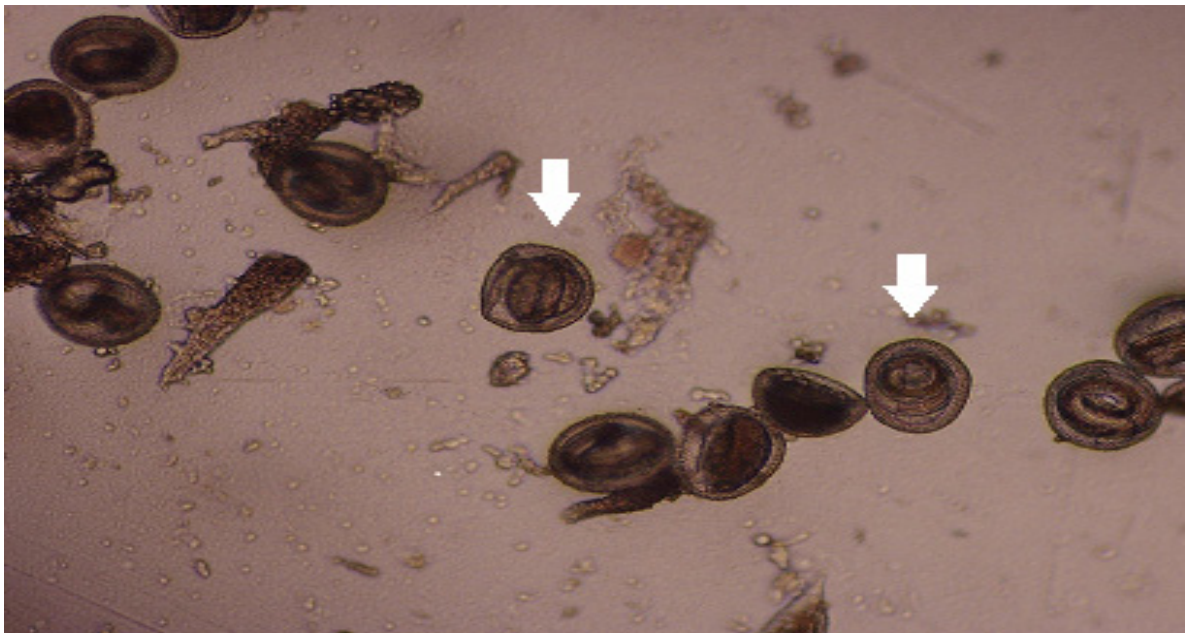


Figura 3: Foto de ovos larvados de *Toxocara canis* mantidos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos, no aumento de 40 X em microscópio óptico comum.

Fonte: Rodolpho, J. M de A; Oliveira, S. R. P., 2010.

Nos cães os ovos ingeridos contendo larvas (L3) irão ao intestino delgado, onde as larvas são liberadas e invadem a mucosa intestinal na altura do ceco, penetram nos vasos linfáticos ou nos vasos sanguíneos e atingem o fígado. Do fígado, estas larvas caem na

circulação sanguínea, indo para o coração e depois chegam nos pulmões. Nos pulmões, algumas larvas rompem os capilares pulmonares e passam para os bronquíolos atingindo a traquéia e a faringe, sendo ou não deglutidas, se deglutidas chega novamente ao intestino delgado onde se desenvolvem em formas adultas. Outras, por meio dos capilares pulmonares, atingem o coração e assim que caem na circulação sistêmica, disseminam para vários órgãos e tecidos (fígado, músculos, cérebro, rins, etc.) (BARRIGA, 1988; Beaver, 1952). Esta fase caracteriza a migração somática sendo este o término do ciclo das larvas em cães adultos fêmeas e machos. Nas fêmeas prenhas, as larvas (L3) estimuladas pelas alterações hormonais, além da migração traqueal, migram também por via transplacentária, atingindo os filhotes, onde completarão o ciclo. Os filhotes infectados eliminam ovos nas fezes, cerca de três ou quatro semanas após o nascimento (forma mais importante de disseminação do parasito entre a população canina). As alterações hormonais da fêmea em lactação continuam a estimular a migração das larvas (L3), que podem atingir a glândula mamária, sendo eliminadas no colostro e no leite, contribuindo para aumentar a gravidade da infecção dos filhotes (KALKOFEN, 1987). De acordo com a Figura 4 podemos observar o desenvolvimento biológico do ciclo de *Toxocara canis*.

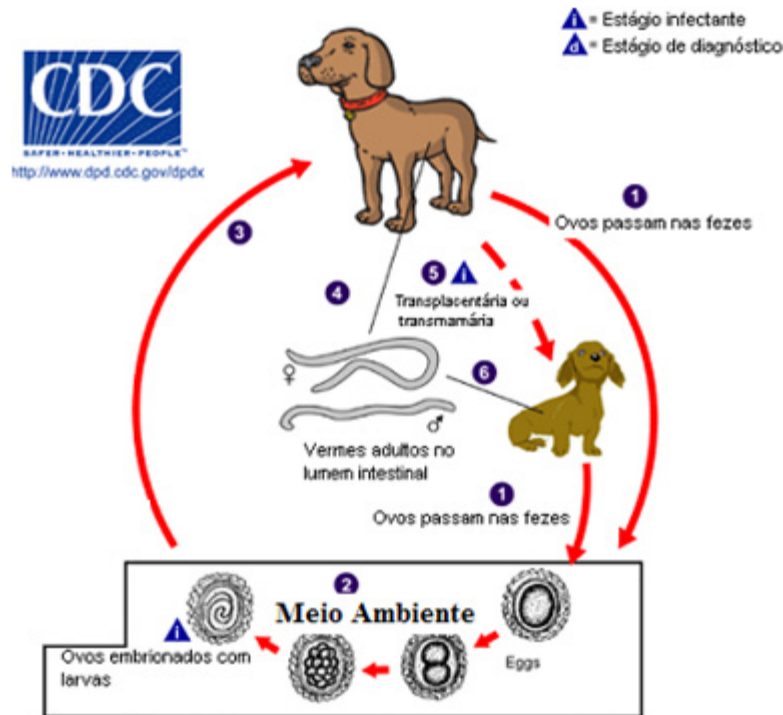


Figura 4- Esquema representativo do desenvolvimento do ciclo biológico do *Toxocara canis* nos hospedeiros definitivos (cães). 1- passagem dos ovos nas fezes/ 2- desenvolvimentos dos ovos no meio ambiente/ 3- ingestão dos ovos larvados pelos cães/ 4- desenvolvimento do verme adulto no intestino delgado/ 5- transmissão placentária e mamária/ 6- desenvolvimento do verme adulto no filhote.
Fonte: CDC, 2010. (Imagem adaptada).

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

principalmente crianças de 6 meses à 6 anos de idade. No entanto, os adultos também podem desenvolver a doença (CAMPOS JUNIOR et al., 2003) causando a SLMV (BEAVER et al, 1952), ou Síndrome de Larvas Migrans Ocular (ZINKHAM, 1978) que são conhecidas também respectivamente como Toxocariase Visceral (TV) e Toxocariase Ocular (TO) (MAGNAVAL et al., 2001).

A forma clássica da SLMV ocorre frequentemente em crianças com sintomas como: febre, hepatomegalia, eosinofilia persistente, irritabilidade, mal-estar, anorexia, lesões urticariformes no tronco e nos membros. Nesta forma clínica, as manifestações pulmonares são tosse, sibilos e infiltrados pulmonares ricos em eosinófilos (KAYES; OAKS, 1980). Alguns indivíduos podem ainda apresentar comprometimento do sistema nervoso central com crises convulsivas focais ou generalizadas, distúrbio do comportamento e aumento de eosinófilos no líquor (MOREIRA-SILVA et al, 2004, VIDAL et al, 2003).

A resposta imunológica do hospedeiro ao parasito pode englobar tanto os fatores humorais quanto os celulares (JACOB, OSELKA, 1991). No primeiro contato, ocorre uma reação tecidual inespecífica, o aumento da especificidade pode estar fortemente relacionado à reexposição ao parasito sendo caracterizado pela formação de granuloma (JACOB, OSELKA, 1991). A larva de *Toxocara* spp apresenta certa habilidade em sobreviver em seu hospedeiro por muitos meses, estimulando os linfócitos (Th2) com consequente produção de imunoglobulina E (IgE) e eosinofilia por longos períodos (BUIJS et al., 1997). Dessa forma, se torna um modelo excelente de estudo para processos inflamatórios eosinofílicos e que caracterizam uma resposta com perfil Th2.

O antígeno de excreção e secreção de *Toxocara* (ASE) pode ativar fortemente os linfócitos T, levando a uma alta produção de citocinas. Fatores como hemopoetinas para eosinófilos IL-3, IL-5 e GM-CSF são produzidos pelos linfócitos T e intensamente implicados na patogênese dessa infecção parasitária (JACOB, OSELKA, 1991). Os linfócitos T helper são diferenciados em seis subpopulações: Th0, Th1, Th2, Th3, Th17 e Th23, mas, as duas principais subpopulações mais estudadas são: Th1 e Th2 (MOSMANN, COFFMAN, 1989). As células Th1 se caracterizam principalmente pela produção de grandes quantidades de IL-2, IL-12 e interferon-gama (INF- γ), resposta típica da imunidade celular, enquanto, as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13, controlando a resposta humoral (RAYES, LAMBERTUCCI JUNIOR, 1999). As respostas Th1 desencadeiam os mecanismos de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são muito eficientes na eliminação de patógenos intracelulares. As células Th2 são mais eficientes em auxiliar a resposta imune humoral, desencadeando produção de imunoglobulinas e inflamação eosinofílica, respostas

estas mais importantes no combate aos patógenos extracelulares. Caracteristicamente, as citocinas do perfil Th1 ou Th2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Desse modo, uma vez polarizada a resposta imune para o padrão Th1, a via Th2 será inibida e vice-versa. Isso ocorre principalmente devido à regulação do nível de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas (ABBAS, et al 2003, HOFFMANN *et al.*, 2000).

E também temos as células T regulatórias que são originadas por duas formas distintas. Uma delas surge a partir do timo como um subtipo de células T maduras com funções definidas (SMITH et al.,1997) e a outra a partir da diferenciação das células T *naïves* na periferia após o contato com elevadas concentrações de antígeno, as células T reconhecem especificamente os Ag próprios presentes nos tecidos periféricos tornando-se assim incapaz de responder a estes, tem importância fundamental na resposta a Ag estranhos (WEINER, 1997; AKDIS et al., 1998, YSSEL et al., 2001; MELO; CARVALHO 2009).

Estudos com pacientes atópicos demonstram que os linfócitos do tipo Th2 produzem altas quantidades de IL-4 (que estimulam a produção de IgE pelos plasmócitos) e IL-5 (que estimulam a maturação de eosinófilos na medula óssea) e a mastocitose parece estar envolvida na destruição do parasito (FINKELMAN, et al, 1997). Em modelos experimentais há uma associação entre a resposta de células Th2 e a proteção contra diversos helmintos. A eosinofilia e o aumento do nível sérico de IgE são, portanto, características da resposta imune Th2. Uma parte da IgE produzida durante a resposta imune Th2 é antígeno-específica, e quando a IgE se liga a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos, deixa o sistema imune pronto para reações alérgicas a qualquer exposição ao alérgeno (BUSSE, et al, 2001; KAY, et al., 2001). Esse fenômeno parece estar relacionado com a resposta imunológica característica da infecção por *T. canis* e, conseqüentemente pode estar envolvido na patogênese da síndrome (BUIJS et al., 1997; RAYES, LAMBERTUCCI JUNIOR, 1999).

As citocinas produzidas por células Th2, em especial a IL-5, promovem a ativação de eosinófilos e seu recrutamento para os sítios de inflamação das reações tardias, promovendo a liberação do conteúdo granular do eosinófilo (BRODELL et al., 2008). A IL-5 ainda aumenta a maturação de eosinófilos a partir de precursores da medula óssea, o recrutamento e a infiltração de eosinófilos. Além da IL-5, dependem de várias quimiocinas, que são produzidas pelas células epiteliais nos sítios das reações alérgicas (FERRER et al., 2002). A importância da IL-5 na mediação da inflamação eosinofílica, como principal citocina participante do crescimento e maturação dos eosinófilos, tem sido objeto de muitos estudos na tentativa de

neutralizá-la. A IL-5 é produzida predominantemente pelos linfócitos Th2, assim como pelos mastócitos, e eosinófilos, (SANDERSON, 2004), IL-5 tem sido identificada como fator importante no crescimento, maturação, ativação, migração tecidual e no aumento da sobrevivência dos eosinófilos (OKUIDARA et al., 1997).

As principais características da SLMV na fase crônica são eosinofilia sanguínea e tecidual (KAYES; OAKS, 1976; FACCIOLI et al., 1996, ANIBAL et al., 2007) e altos níveis de IgE sérica (TURNER et al., 1979; NUTMAN et al., 1989). Outra característica observada é o aumento de mastócitos na parede do intestino delgado de camundongos infectados e o aumento da hiperreatividade intestinal destes animais, sugerindo um papel ativo destas células na SLMV (SÁ-NUNES et al., 2003). Nas manifestações clínicas da SLMV humana alguns fatores predisponentes são considerados como: o grau de infecção parasitária, estado nutricional do hospedeiro, intensidade da resposta inflamatória, localização tecidual das larvas e sensibilização do hospedeiro por antígenos próprios das larvas (SÁ-NUNES et al., 2003). Estes fatores podem ou não estar associados, o que leva os indivíduos a evoluírem da forma assintomática para as manifestações clássicas da síndrome ou ainda para a forma ocular.

À medida que a infecção progride, as células inflamatórias se organizam ao redor das larvas e de seus metabólitos, formando uma reação granulomatosa caracterizada por um centro necrótico onde é possível encontrar vestígios de larvas. Circundando-as há um acúmulo de células multinucleadas, neutrófilos e número elevado de eosinófilos (BEAVER et al., 1952). Assim, o modelo SLMV, favorece um excelente modelo para estudar a participação dos eosinófilos na ativação da resposta imune apresentando fenótipo de APC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a expressão das moléculas CD80, CD86 e de MHCII em eosinófilos durante a Síndrome da Larva Migrans Visceral.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar o perfil de eosinófilos durante a fase aguda e crônica da infecção pelo *T. canis* em modelo experimental murino;
- Determinar os níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ e imunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgE plasmáticos e pulmonares em camundongos durante a infecção pelo *T. canis*;
- Determinar a expressão das moléculas de MHCII, CD80 e CD86 em eosinófilos *ex vivo* no período de 18 dias após infecção pelo *T. canis*.
- Determinar o perfil fenotípico dos eosinófilos como APC em modelo experimental murino infectado com *T. canis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 84 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). Desses camundongos 48 foram infectados com *T. canis* e 36 utilizados no grupo controle. Foram realizados 2 experimentos independentes. Os animais foram mantidos no Biotério do DMP- UFSCar, com livre acesso à água e alimento.

3.2 Obtenção de ovos embrionados de *T. canis*

Os ovos foram obtidos de fêmeas do parasito recuperadas de cães jovens. Os cães doadores foram oriundos do Centro de Zoonoses de 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 infectivo (L3) (Gomes de Moraes, 1971).

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

Os camundongos foram infectados oralmente com 500 ovos/0,5 mL salina, empregando-se cânulas apropriadas por gavagem (SUGANE & OSHIMA, 1982).

3.4 Delineamento Experimental

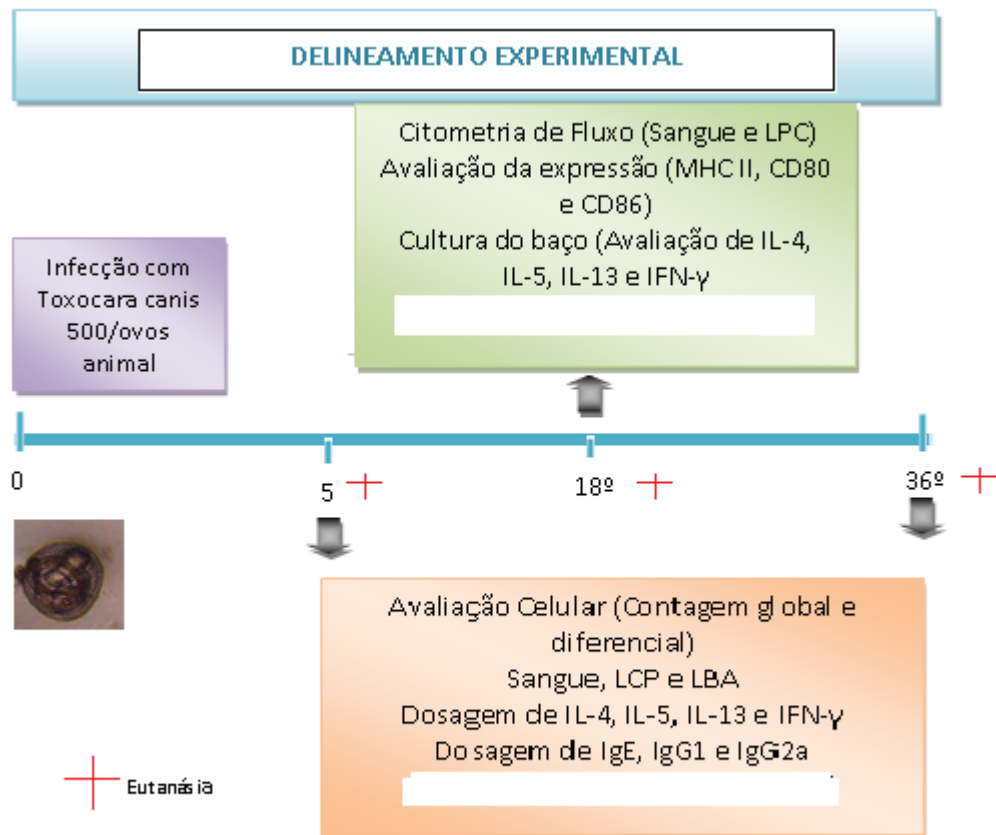


Figura 5- Esquema representativo do experimento *in vivo* frente a análise de parâmetros celulares, imunológicos e parasitários em três fases distintas da infecção: 5º dia após infecção, de acordo com o ciclo de vida do *T. canis*, caracterizando a fase pulmonar da doença, 18º dia após infecção caracterizando a fase aguda e o pico de eosinofilia da doença, e 36º dia após infecção caracterizando o início da fase crônica da doença.

3.5 Obtenção das células dos lavados broncoalveolares (LBA), do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue.

Os camundongos foram eutanasiados com anestésico Tionembutal (North Chicago, Illinois, USA), nos dias previamente estabelecidos de acordo com ciclo descrito do *T. canis*, ou seja no 5º, 18º e 36º dia após infecção. As técnicas de lavagem broncoalveolar (LBA) e peritoneal (LCP) foram utilizadas para recuperação de células da cavidade pulmonar (LBA) e peritoneal (LCP), respectivamente. 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. Para recuperação do lavado da cavidade peritoneal (LCP) foi utilizado 3 mL de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando uma agulha na cavidade peritoneal no qual os mesmos foram retirados. O sangue foi obtido após sangria total dos animais por punção cardíaca. Realizou-se a contagem global e diferencial de células do sangue, do lavado da cavidade peritoneal e do lavado broncoalveolar. As células sanguíneas e do lavado peritoneal foram ainda preparadas para análise da expressão das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) na superfície das células por meio de citometria de fluxo, *ex vivo*.

3.6 Contagem diferencial e total das células do LBA, LCP e do sangue

A contagem diferencial das células do sangue foi realizada através de esfregaços sanguíneos e as células da cavidade peritoneal (LPC) e broncoalveolar (LBA) foram preparados em citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem) 1500rpm em 3min 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/mm³ nos diferentes compartimentos foi determinado empregando solução de Turk para a lise das hemáceas (STIBBE *et al.*, 1985), na diluição 1:20 e posterior contagem em câmara de Neubauer.

3.7 Avaliação do Perfil Celular Durante o Modelo Experimental da Síndrome da Larva Migrans Visceral

O número total e diferencial de células por mm³ foi determinado em períodos distintos da infecção: 5º, 18º e 36º dia após a infecção, no sangue, no lavado broncoalveolar (LBA) e no lavado da cavidade peritoneal (LCP). O objetivo foi avaliar a resposta celular à infecção, nos diferentes períodos e principalmente diferenciar os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, classificando as células em mononucleares (linfócitos e monócitos) no sangue (linfócitos e macrófagos) nos lavados e eosinófilos e neutrófilos em ambos.

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. 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 5×10^6 /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 CO₂ 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 (N líquido) e água quente para que ocorra a eclosão dos ovos, liberando as larvas. Posteriormente, estes tubos foram centrifugados a 3000rpm 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

Para a detecção de citocinas, por meio da realização da técnica de ELISA, o pulmão esquerdo de cada animal foi removido, lavado em salina 1x, pesado, mantido em tubo

criogênico e congelado em freezer – 80°C até a análise das amostras, na qual 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 e Imunoglobulinas

Para o ELISA (Kit RD e BD-Trio) utilizou-se placas de microtitulação com 96 poços. Inicialmente foi feita a sensibilização da placa com 100 µL/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, a placa foi lavada e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas foi feito adicionando-se 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. 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 biotinizado 0.125 µg/mL). Após nova incubação de 1 hora a 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 a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100 µL/poço do substrato. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, a reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 450nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

3.11.2 Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais foram utilizados para análise das moléculas envolvidas nas funções de APC dos eosinófilos e analisadas nos ensaios de citometria de fluxo (FACS). Os

anticorpos foram doados pela Dra. Lúcia Helena Faccioli, do Laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. OS anticorpos utilizados foram: (1) anticorpo anti-IA/I-E (MHC II) (IgG2b de rato) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), (2) anticorpo anti-CD80 de camundongos (Armenian hamster, IgG) marcado com *Phicoerythrin* (PE), (3) anticorpo anti-CD86 de camundongo (IgG1 de camundongo) marcado com (APC) e (4) anticorpo de bloqueio (“Fc Block”). Como isotipos controles foram utilizados: (1) IgG2b de rato, (2) anticorpos irrelevantes (especificidades desconhecidas) 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 Protocolo Experimental para a Análise da Expressão de Moléculas Coestimulatórias por Citometria de Fluxo (FACSsort)

A análise da expressão das moléculas (CD80, CD86 e MHC II) 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. Os resultados foram expressos na forma de histograma e representam a mediana da intensidade de fluorescência, que reflete a expressão das moléculas MHC II, CD80 e CD86 na superfície das células. A mediana da intensidade de fluorescência das moléculas foi determinada em populações selecionadas que representam por complexidade e granulosidade celular serem linfócitos ou eosinófilos.

Após a eutanásia dos camundongos, 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 NH₄Cl, 0,84g NaHCO₃, 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-SBF 2% (Tampão FACS). Posteriormente foi feita a contagem das células e as suspensões acertadas para 1 x 10⁷ células/mL. Em seguida foram pipetados 100 µL de cada amostra em um tubo apropriado (1 x 10⁶ 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%).

3.13 Análise Estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Contagem diferencial e total de leucócitos no sangue de animais infectados ou não com *T. canis*.

A figura 6 representa a contagem diferencial e total de leucócitos no sangue dos animais dos grupos controle e infectado com *T. canis*. Os animais do grupo infectado apresentaram um aumento significativo no número de eosinófilos quando comparado aos animais do grupo controle, no 5º dia após infecção (Fig. 6 A) Já no 18º e 36º dias após a infecção, as contagens de leucócitos, eosinófilos e células mononucleares apresentaram um aumento significativo nos animais do grupo infectado quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 6 A, B e C)

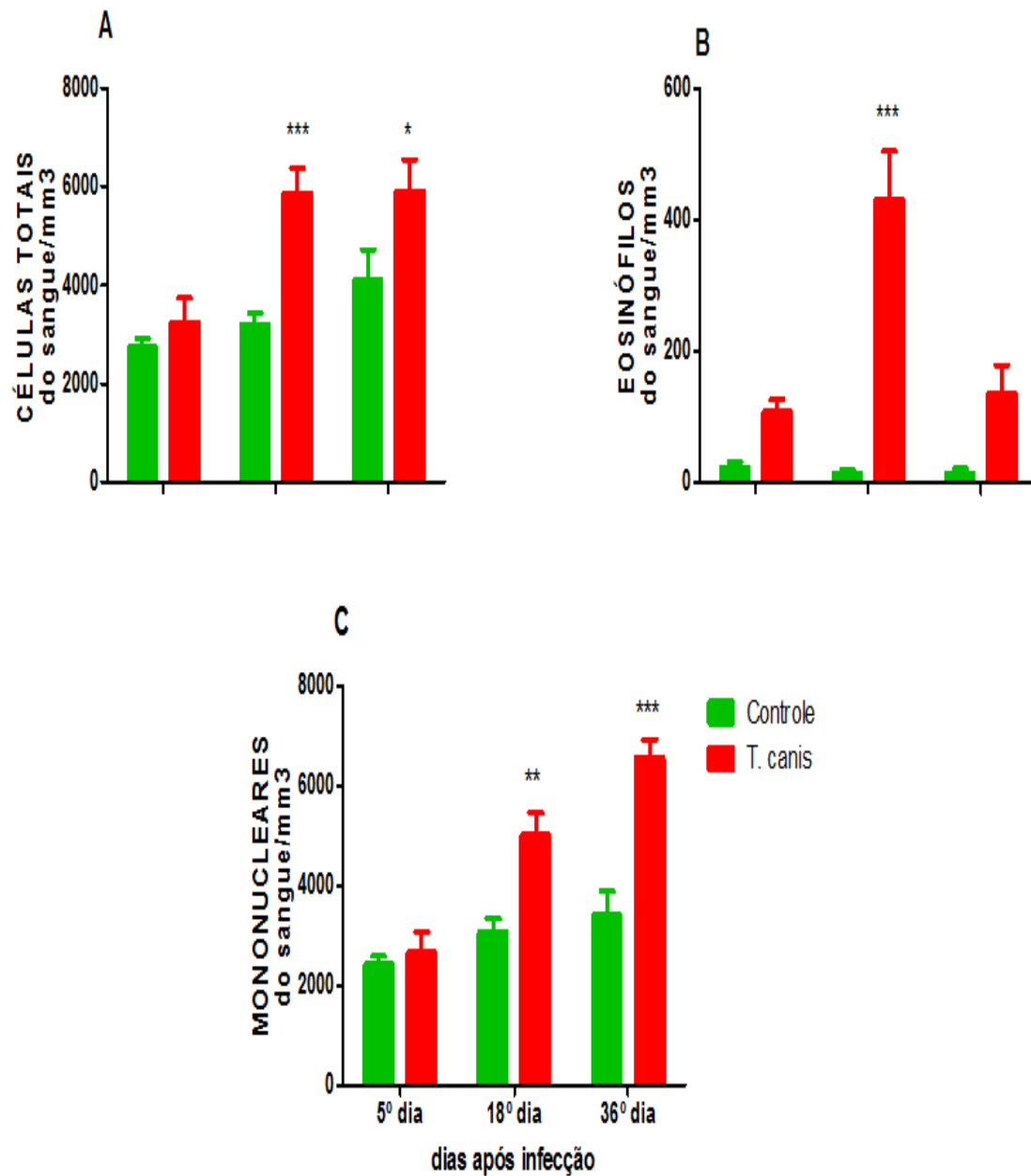


Figura 6. Contagem total e diferencial de células no sangue, 5, 18 e 36 dias após a infecção. Células totais/mm³ (A); eosinófilos/mm³ (B); células mononucleares/mm³ (C). Os dados representam a média \pm SE (n= 9-13 animais) de 2 experimentos independentes. * p < 0,05 ** p < 0,01 e ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados quando comparados com os grupos controles, usando o teste TWO WAY ANOVA.

4.2 Contagem diferencial e total de leucócitos no lavado da cavidade peritoneal (LPC) de animais infectados ou não com *T. canis*

A figura 7 representa o perfil das células inflamatórias recuperadas do lavado da cavidade peritoneal dos animais dos grupos experimentais 5, 18 e 36 dias após a infecção. No 5° e 36° dias após a infecção não foram observadas diferenças significativas nas contagens de células totais (Fig.7 A), eosinófilos (Fig.7 B) e células mononucleares (Fig. 7 C) entre os animais dos dois grupos analisados. No 18° dia após infecção todos os animais infectados apresentaram um aumento significativo nas contagens de leucócitos, eosinófilos e mononucleares em relação ao grupo controle (Fig. 7 A, B, C).

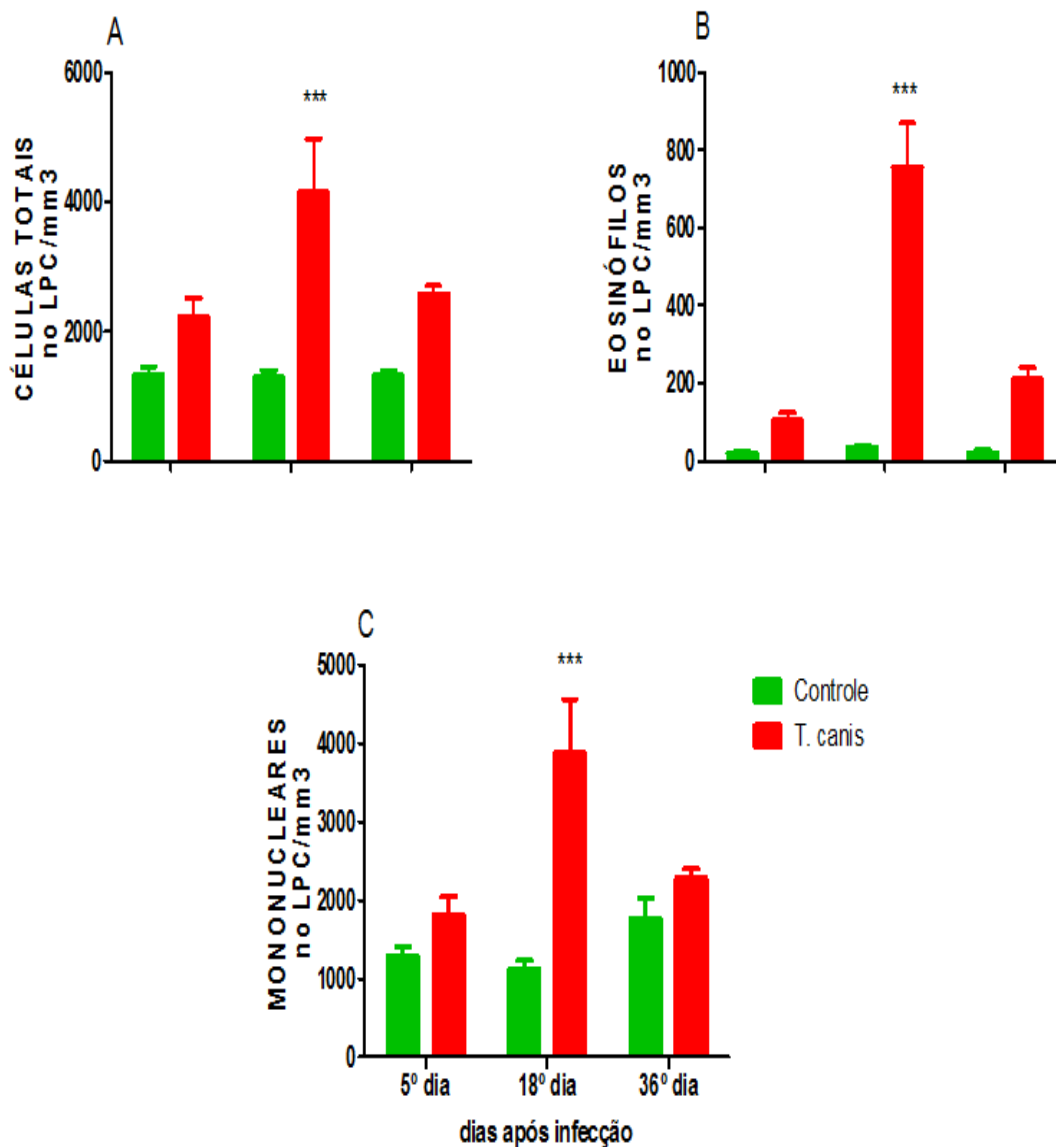


Figura 7. Contagem total e diferencial de células no lavado da cavidade peritoneal, 5º, 18º e 36º dias após a infecção. Células totais/mm³ (A); eosinófilos/mm³ (B); células mononucleares/mm³ (C). Os dados representam a média \pm SE (n= 9-13 animais) de 2 experimentos independentes. ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados quando comparados com os grupos controles, usando o teste TWO WAY-ANOVA.

4.3 Contagem diferencial e total dos leucócitos no lavado da cavidade broncoalveolar (LBA) de animais infectados ou não com *T. canis*

A figura 8 representa o perfil das células inflamatórias recuperadas do lavado broncoalveolar dos diferentes grupos no tempo de 5, 18 e 36 dias após a infecção. No 5º dia após a infecção, os animais do grupo infectado apresentaram um aumento significativo na contagem de eosinófilos e células mononucleares (Fig. 8 B, C) quando comparado ao grupo controle. Os animais do grupo infectado apresentaram diferenças significativas em relação a contagem de células totais, eosinófilos e células mononucleares no 18º dia após infecção quando comparado com o grupo controle (Fig. 8 A, B, C). Já no 36º dia após infecção o grupo infectado não apresentou diferença significativa em relação a contagem de células totais, eosinófilos e células mononucleares quando comparado com o grupo controle.

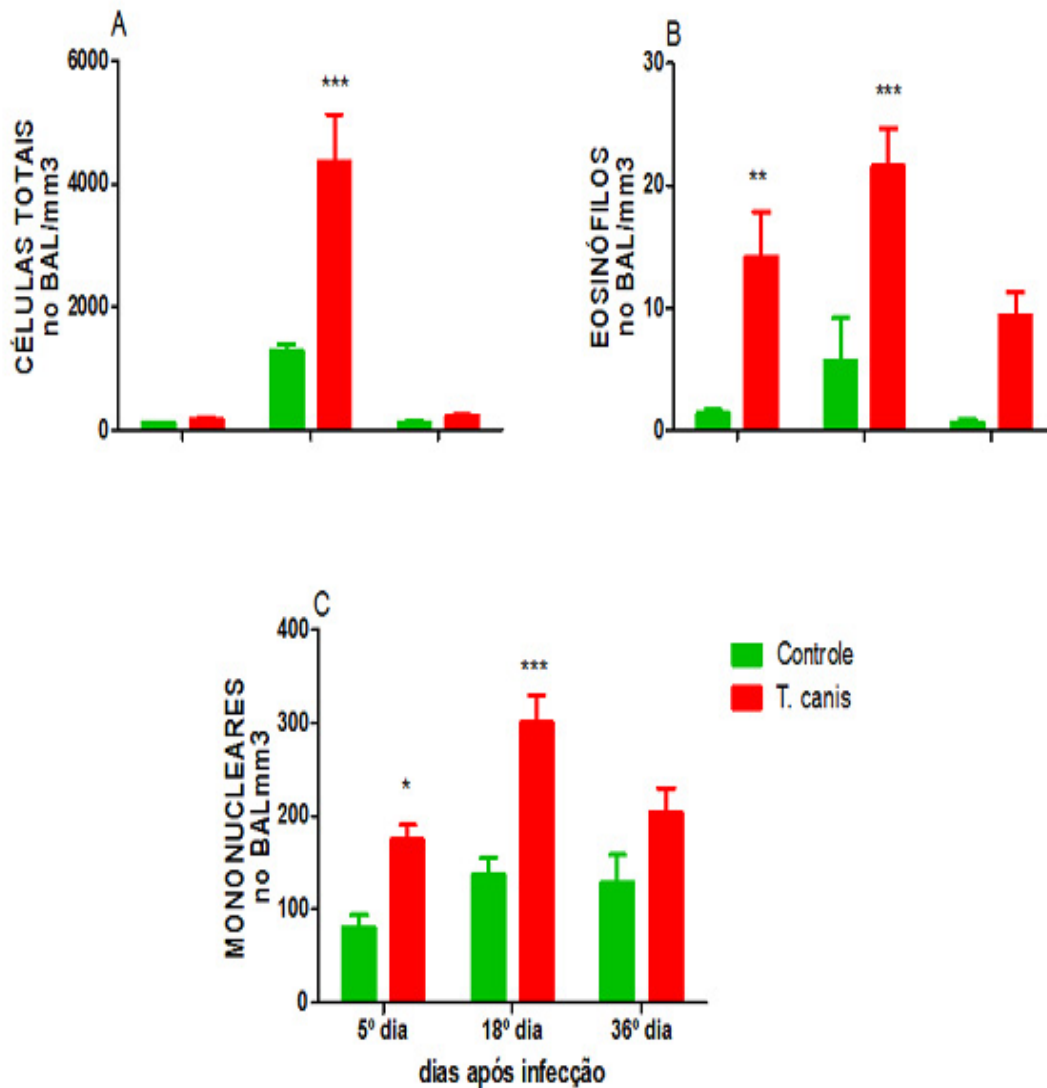


Figura 8. Contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar, 5º, 18º e 36º dias após a infecção. Células totais/mm³ (A); eosinófilos/mm³ (B); células mononucleares/mm³ (C). Os dados representam a média ± SE (n= 9-13 animais) de 2 experimentos independentes. * p < 0,05 ** p < 0,01 e ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados quando comparados com o grupo controle, usando o teste TWO WAY-ANOVA.

4.4 Avaliação da expressão de moléculas coestimulatórias em células de diferentes compartimentos.

Um dos objetivos do trabalho foi avaliar a expressão das molécula CD80, CD86 (B7-1; B7-2) e MHC II na superfície das células, quando estas deixam o sangue e migram para a cavidade peritoneal. Os resultados estão apresentados de modo a comparar a expressão das moléculas nas células do sangue e LCP, após 18 dias de infecção.

4.4.1 Expressão das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em Eosinófilos, e Monócitos no Sangue

Avaliou-se a mediana da intensidade de fluorescência da marcação das moléculas (MHC II, CD80 e CD86), e foi possível observar que no sangue de animais infectados, houve aumento na expressão das moléculas CD80 e CD86 (Fig. 9 A, B) e MHC II (Fig.9 C) nos eosinófilos quando comparado com as mesma células do grupo controle. Nos monócitos houve aumento dessa expressão no grupo infectado quando comparado com o grupo controle, para as molécula de MHC II e CD80 (Fig.10 A e B). A molécula CD86 em monócitos (Fig. 10 C) apresentou aumento mais não foi significativo.

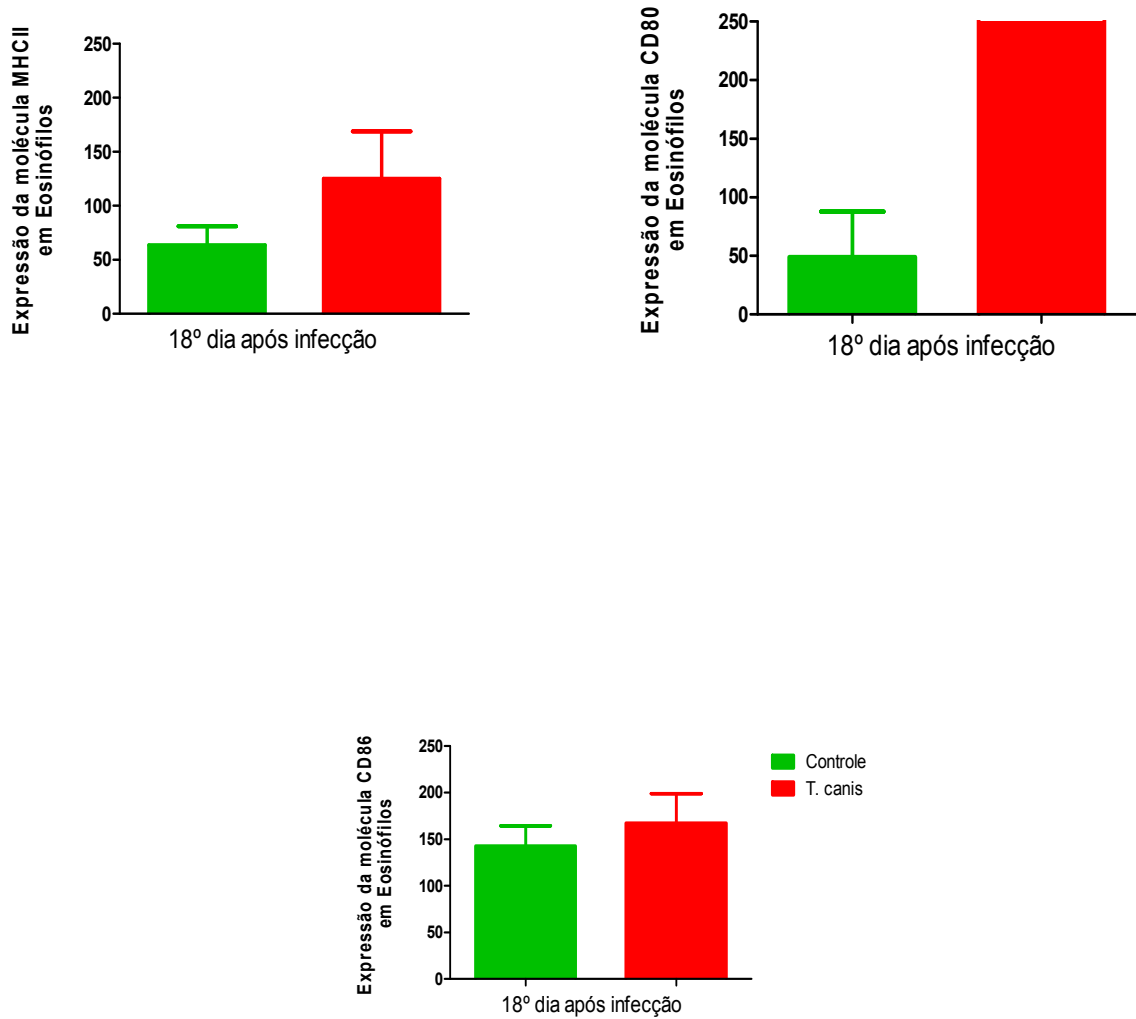


FIGURA 9. Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (MHCII, CD80 e CD86) em eosinófilos do Sangue. A barra verde representa o grupo controle e a barra vermelha representa o grupo infectado com *T. canis*.

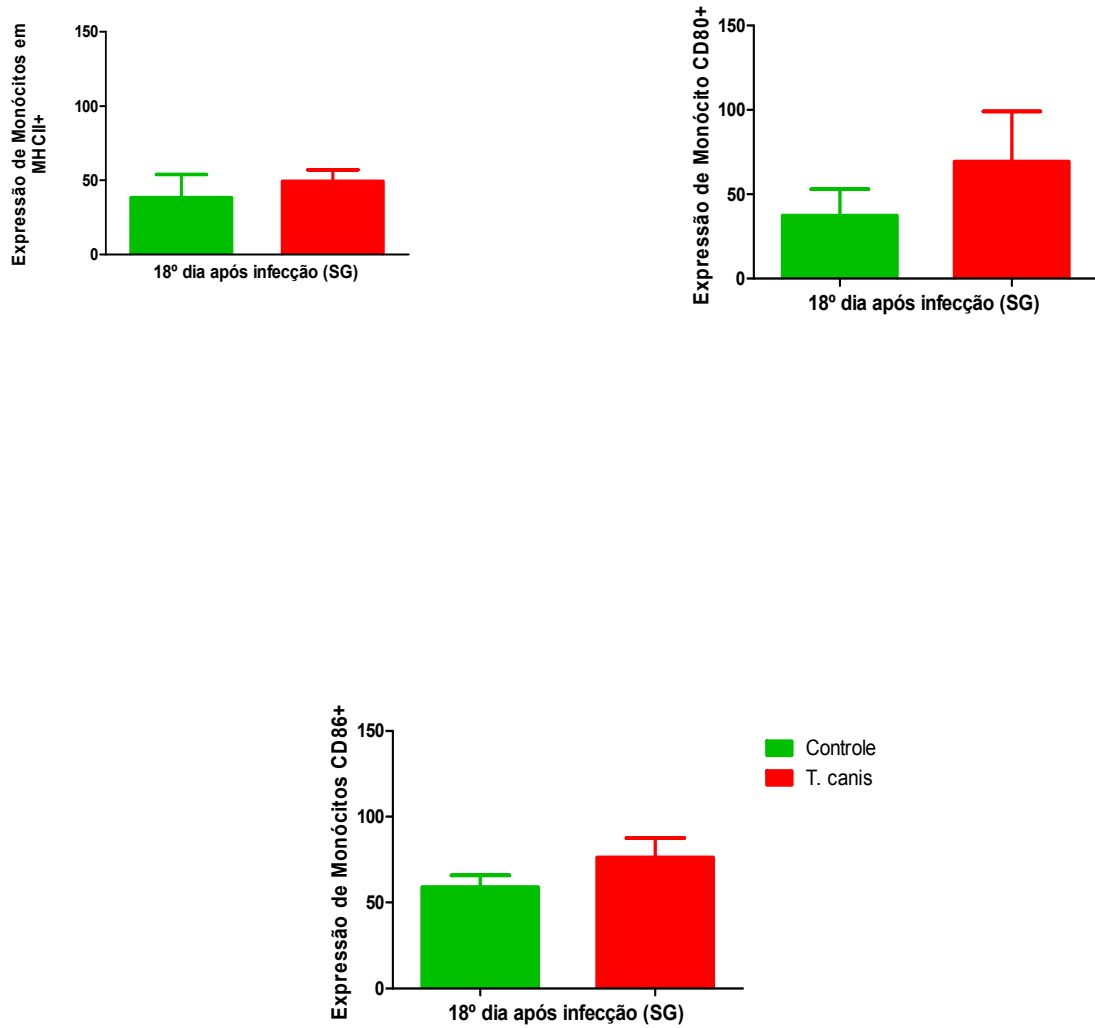


FIGURA 10. Mediana da intensidade de fluorescência de MHC II+, CD80+ e CD86+ em Monócito do Sangue. A barra verde representa o grupo controle e a barra vermelha representa o grupo infectado com *T. canis*.

4.4.2 Expressão das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em Eosinófilos, Macrófagos e Células Dendríticas do Lavado da Cavidade Peritoneal

Avaliou-se a mediana da intensidade de fluorescência da marcação das moléculas (MHC II, CD80 e CD86), e observou-se que no Lavado da cavidade peritoneal, houve aumento na expressão da molécula MHC II e CD80 em eosinófilos do grupo infectado quando comparado com o grupo controle (Fig.11 A - B). Entretanto a molécula CD86 não apresentou aumento nos eosinófilos no grupo infectado quando comparado com o grupo controle (Fig.11 C).

Em macrófagos observamos que não houve aumento na expressão da molécula MHC II no grupo infectado quando comparado com o grupo controle (Fig.12 A), já a molécula CD80 e CD86 apresentaram aumento na expressão nos macrófagos quando comparado com grupo infectado com o grupo controle (Fig. 12 B e C).

Nas Células Dendríticas observamos um aumento no grupo infectado quando comparado com o grupo controle na expressão das moléculas de MHC II e CD80 (Fig.13 A - B). (Fig. 13 C) não houve um aumento na molécula CD86 de Células Dendríticas no grupo infectado quando comparado com o grupo controle.

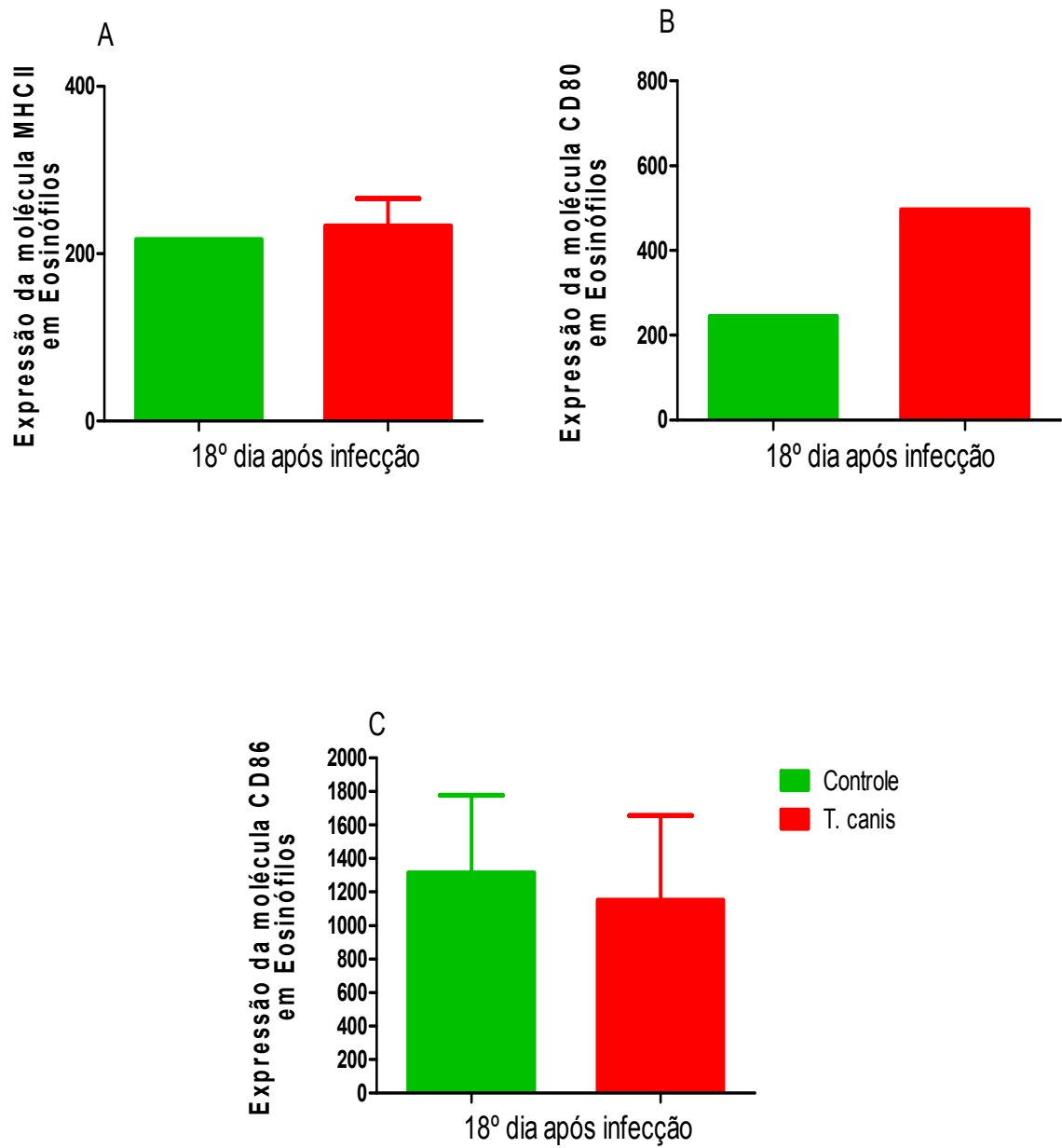


FIGURA 11. Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em Eosinófilos do Lavado da Cavidade Peritoneal. A barra verde representa o grupo controle e a barra vermelha representa o grupo infectado com *T. canis*.

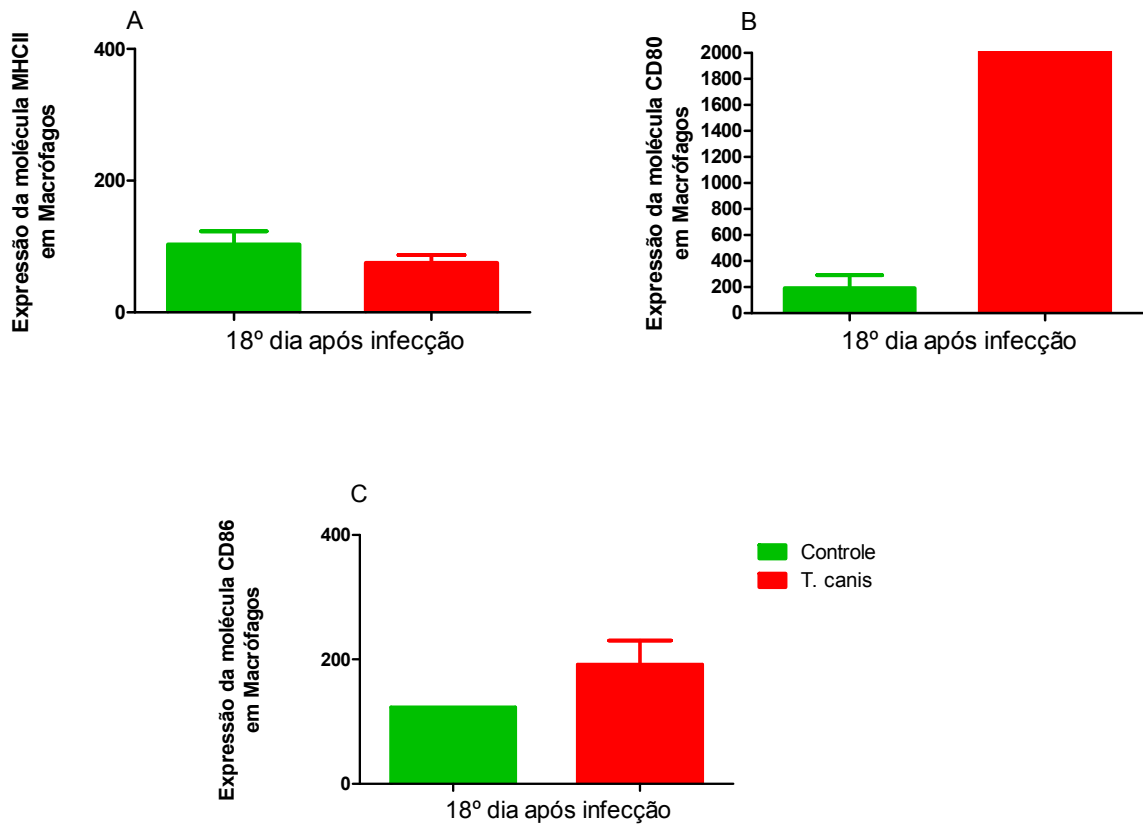


FIGURA 12. Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em Macrófagos do Lavado da Cavidade Peritoneal. A barra verde representa o grupo controle e a barra vermelha representa o grupo infectado com *T. canis*.

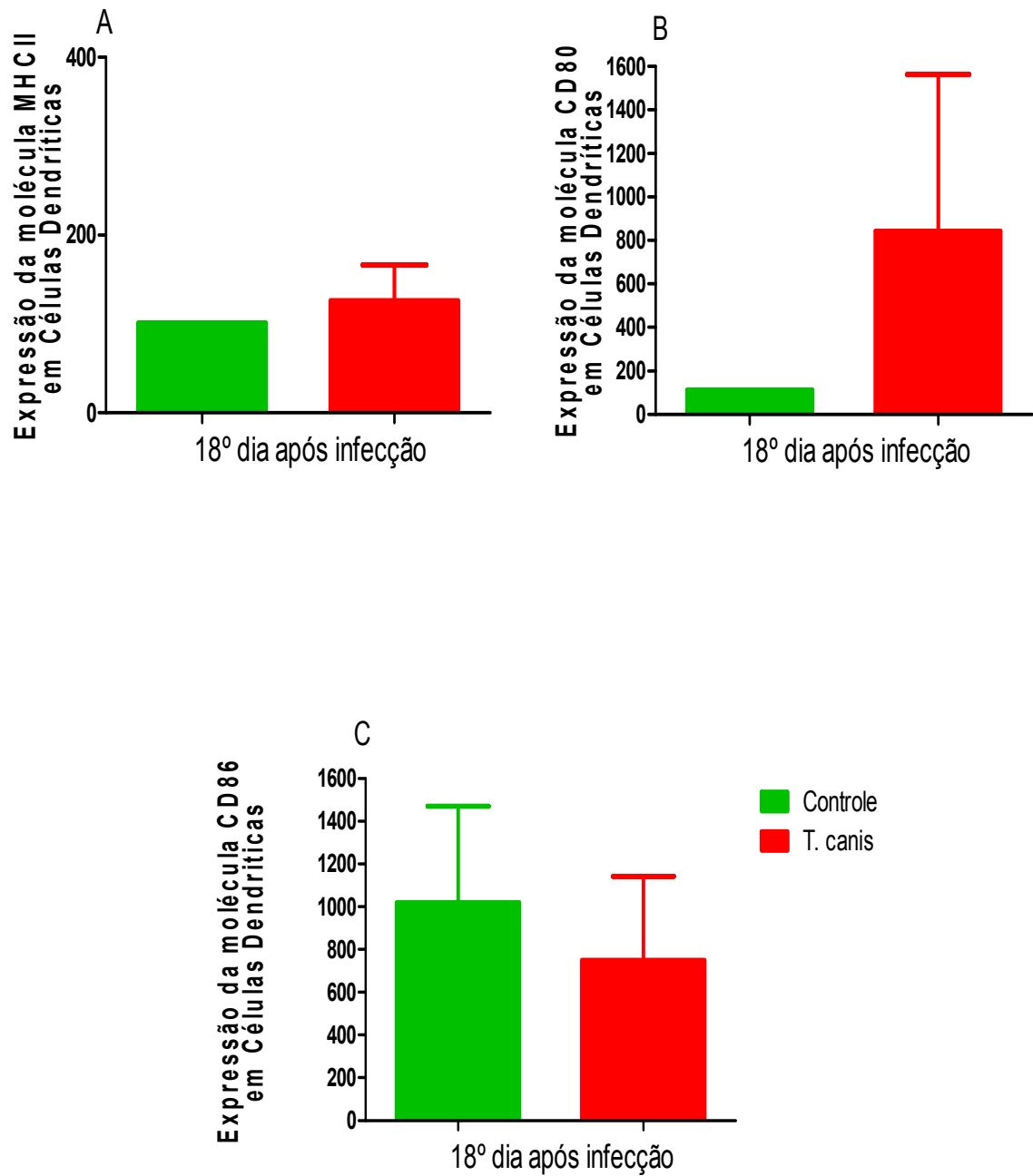


FIGURA 13. Mediana da intensidade de fluorescência das moléculas (MHC II, CD80 e CD86) em Células Dendríticas do Lavado da Cavidade Peritoneal. A barra verde representa o grupo controle e a barra vermelha representa o grupo infectado com *T. canis*.

4.5 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no plasma de animais infectados ou não com *T.canis*

A concentração das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ foi determinada no plasma dos camundongos infectados ou não com *T. canis* nos tempos descritos: 5, 18 e 36 dias após a infecção. O valor em pg/mL das citocinas dos diferentes grupos estão representados na figura 14.

Na figura 14 (A, B e D) observamos aumento nos níveis de IL-5, IL-4 e IFN- γ 5, 18 e 36 dias após infecção no grupo infectado com *Toxocara canis*, quando comparado com o grupo controle, mas essas diferenças não foram significativas. Os níveis de IL-13 no grupo infectado com *T. canis* no 18º e 36º dia após infecção quando comparados com o grupo controle apresentaram diferenças significativas.

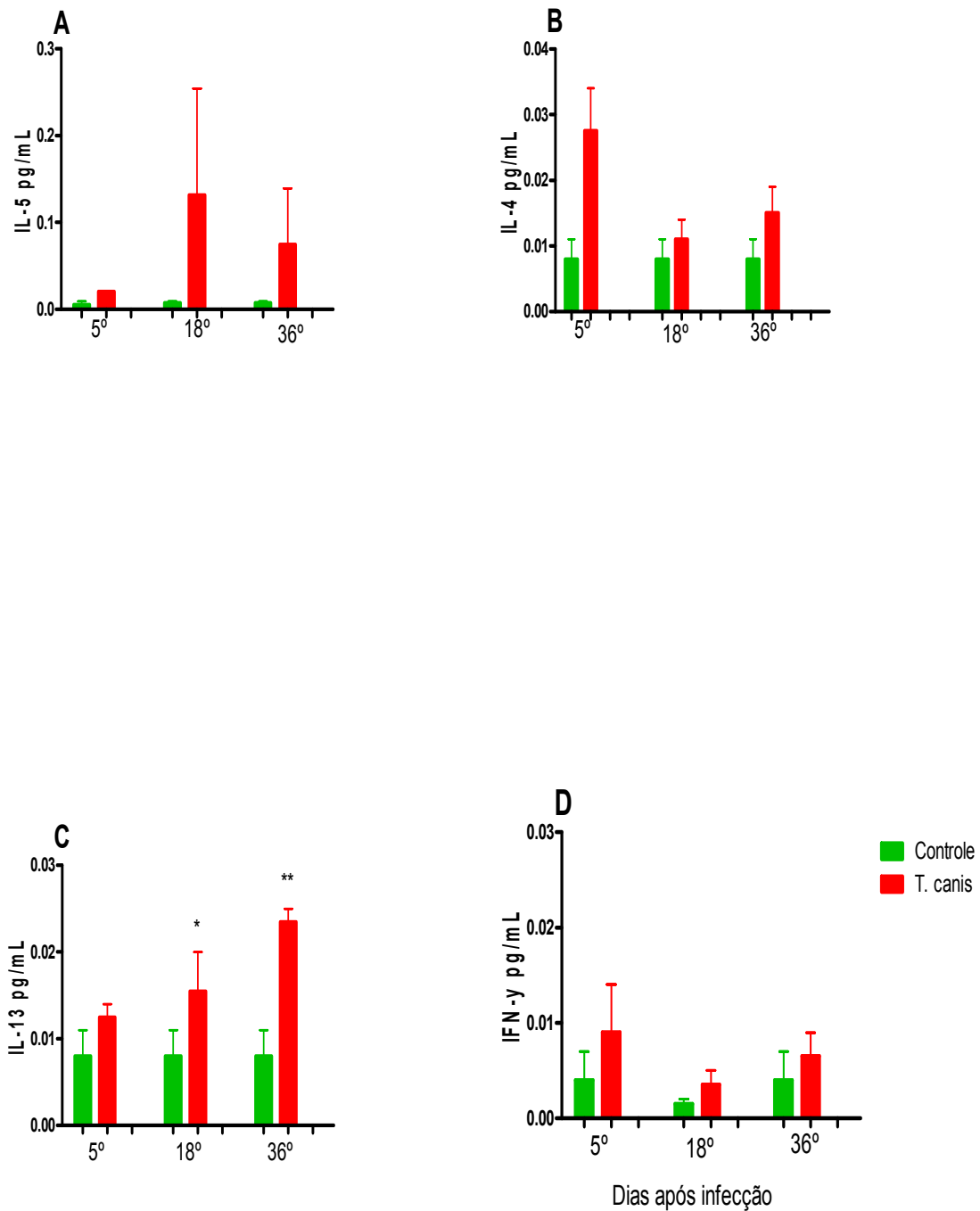


Figura 14 : Produção de citocinas IL-5 (A), IL-4 (B); IL-13 (C) e IFN- γ (D) no plasma no 5°, 18°, 36° dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos controle representado em verde e grupo infectado com *Toxocara canis* representado em vermelho, usando o teste TWO WAY-ANOVA.

4.6 Avaliação das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ no pulmão de animais infectados ou não com *T.canis*.

A concentração das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ foi determinada no sobrenadante do homogenato do pulmão nos animais controle e infectados 5° e 18° dias após a infecção.

Em relação aos níveis de IL-5, IL_4, IL-13 e IFN- γ foi observado aumento em todos os períodos avaliados, no entanto apenas no 5° dia após a infecção foi observado diferença significativa, sendo essa diferença apenas nos níveis de IL-5 (Fig.15).

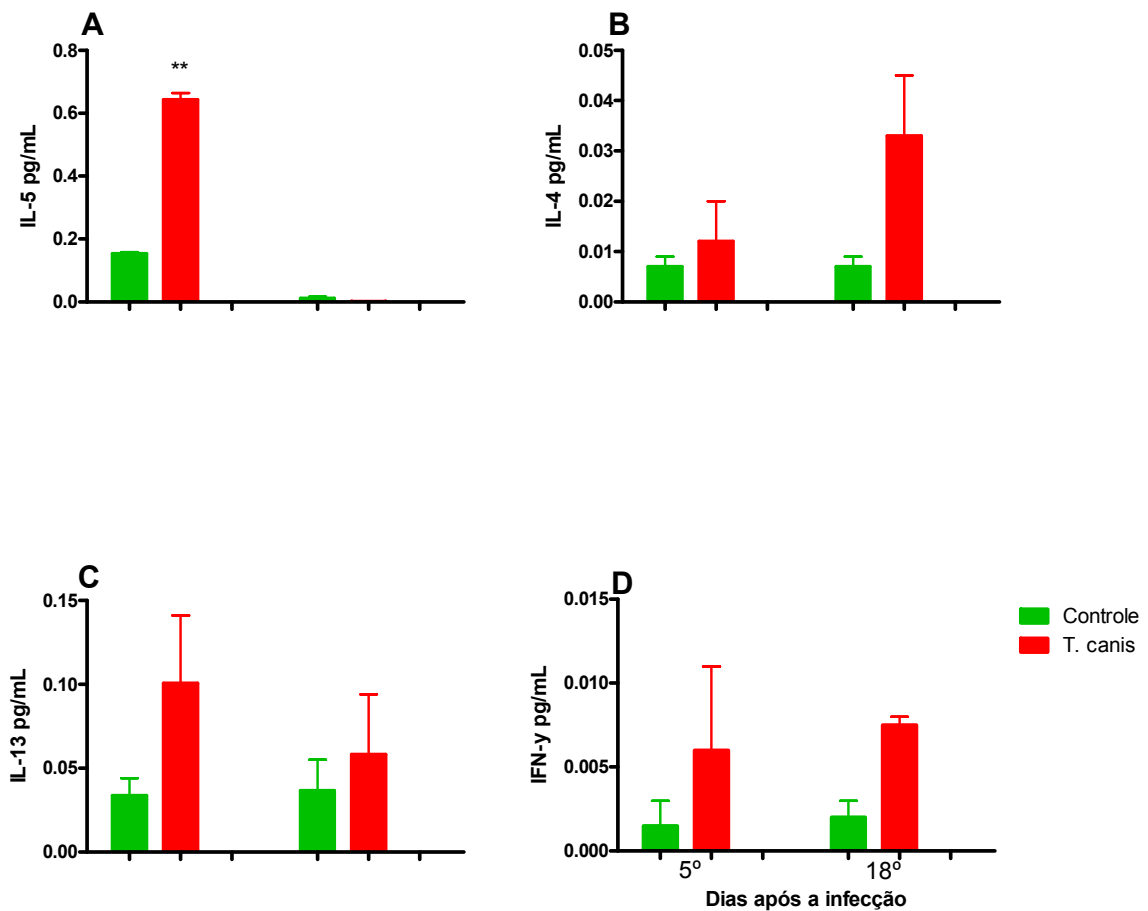


Figura 15: Produção de citocinas IL-5 (A), IL-4 (B); IL-13 (C) e IFN- γ (D) pg/mL no pulmão no 5^o e 18^o dias após a infecção. Os dados representam a média \pm SEM de 2 experimentos independentes. **p < 0,01 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos controle representado em verde e grupo infectado com *Toxocara canis* representado em vermelho, usando o teste TWO WAY-ANOVA.

4.7 Avaliação da produção das citocinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ em cultura *ex vivo* de células do baço

Para avaliar a resposta imune de animais infectados ou não com *T. canis*, células do baço foram coletas no 18º dia após a infecção e os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ foram determinados no sobrenadante do cultivo celular após 48 horas de estimulação ou não com antígeno total de *T. canis* e estimulação ou não com concavalina-A (Con-A) (Fig. 16).

Os níveis de citocinas nos sobrenadantes do cultivo celular utilizado células do baço foram variados. Foi observado que IL-4 apresentou maiores níveis nos grupos onde o antígeno de *T.c* foi ausente, e nos grupos estimulados com Con-A, independente do Ag de *T.c* (Fig. 16 A). Em relação a Il-5 nenhum estímulo apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados. No entanto a associação do Con-A e *T.c* modulou positivamente a liberação de IL-13 e IFN- γ de forma dependente do Ag de *T.c* (Fig. 16 C e D).

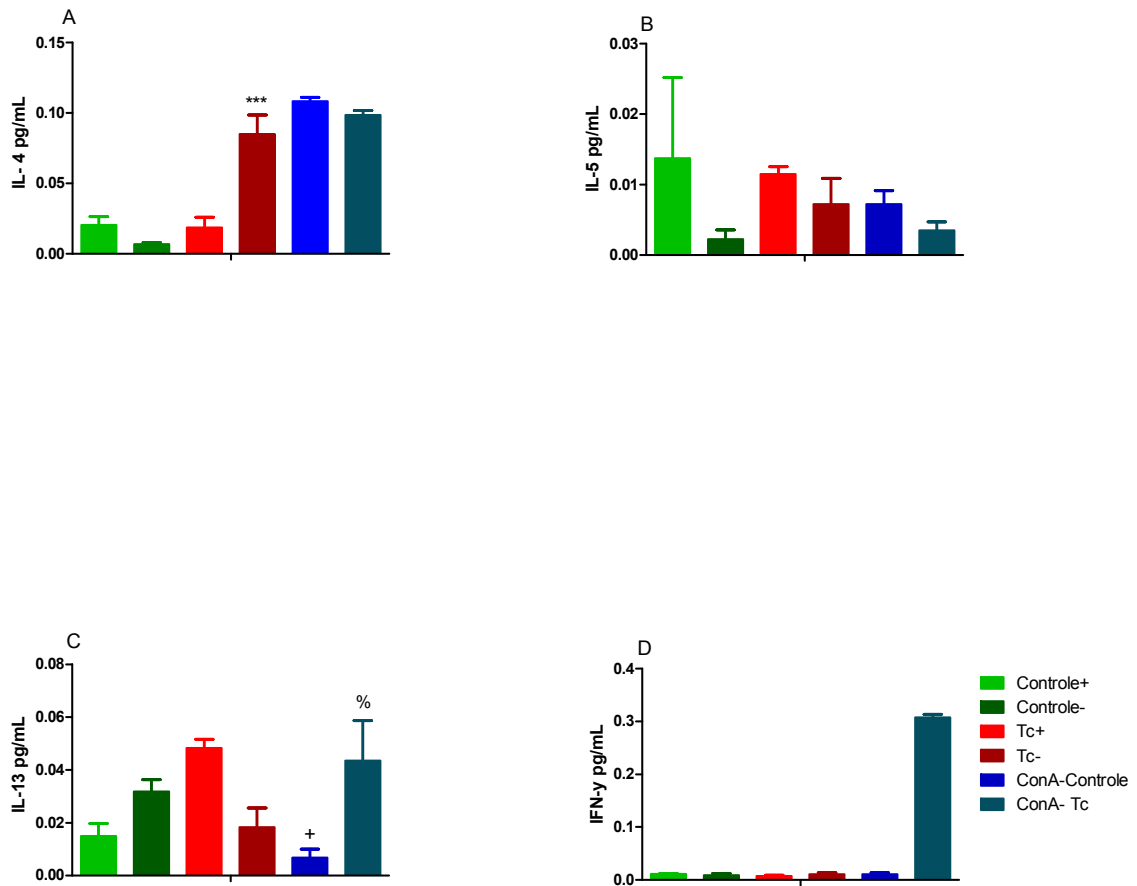


Figura 16: Produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ 18 dias após a infecção no sobrenadante de cultura ex vivo de células totais do baço. Após 72 horas de incubação a 37°C/5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações da citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados representam a média \pm EPM de modo avaliar a produção das citocinas nos grupos Controle e Tc com adição (+) e/ou não (-) de estímulo de antígeno total de *T. canis* e dos grupos Controle e Tc estimulados ou não com Con-A.

4.8 Avaliação dos anticorpos circulantes

Com o objetivo de avaliar a resposta imunológica específica frente o modelo da SLMV, avaliamos os níveis das imunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a no plasma dos grupos experimentais controle e infectado em diferentes períodos da infecção.

4.8.1 Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a no plasma

Nossos resultados indicam que os níveis de IgE aumentou nos períodos 5° e 18° dias após infecção no grupo infectado quando comparado com o grupo controle, no entanto apenas no 36° dias após a infecção foi observado aumento significativo de IgE em animais infectados quando comparados ao grupo controle (Fig. 17 A).

A (Fig. 17 B) representa aumento significativo nos níveis do anticorpo IgG1 no plasma de animais infectados com *Toxocara canis* nos 18° e 36° dias após a infecção quando comparado com o grupo controle. Em relação aos níveis de IgG2a foi observado aumento no plasma do grupo infectado em relação ao grupo controle no 18° e 36° dias após infecção (Fig. 17 C) embora não significativo.

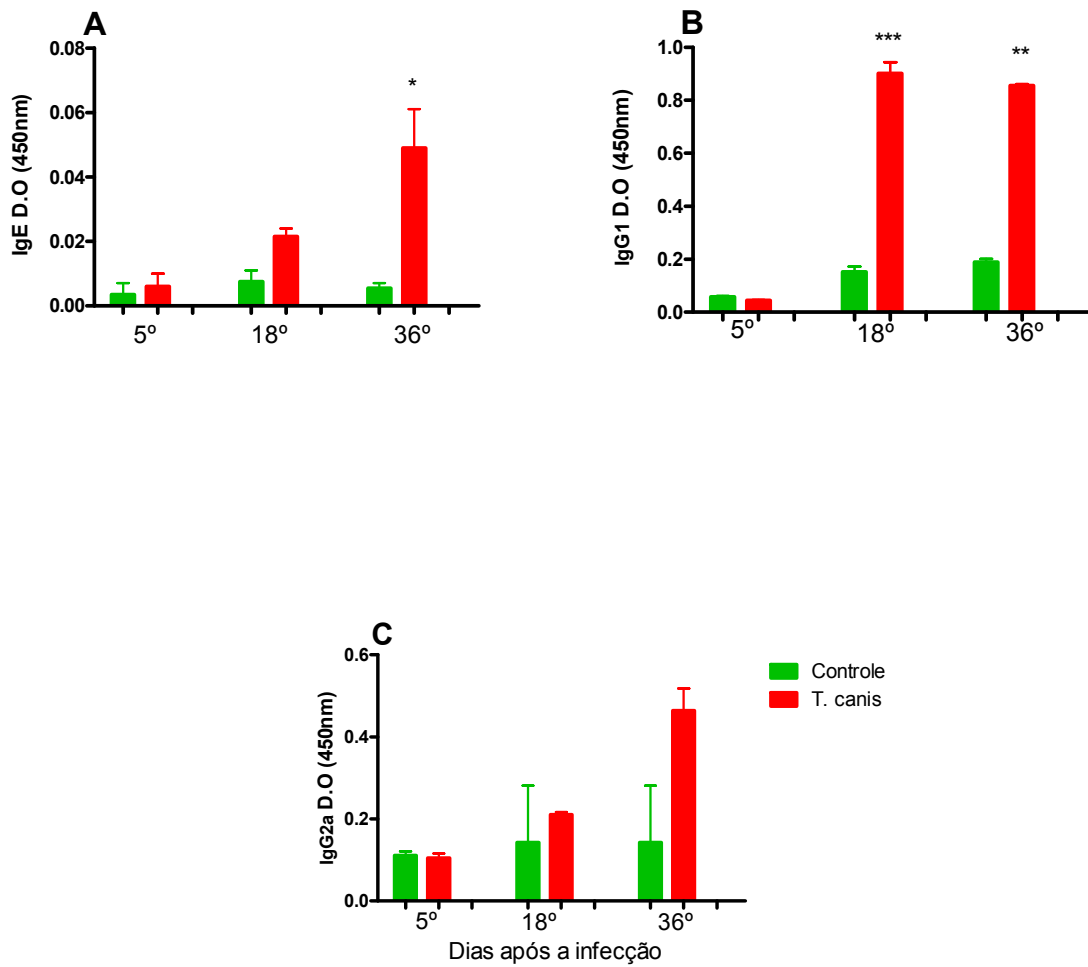


Figura 17 . Níveis de IgE (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti- *T. canis* presentes no plasma de camundongos BALB/c infectados no 5, 18 e 36 dia após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos controle representado em verde e grupo infectado com *Toxocara canis* representado em vermelho, usando o teste TWO WAY-ANOVA.

5. DISCUSSÃO

Os eosinófilos possuem papel importante em várias doenças, e quando associadas aos casos de helmintíases, asma e alergias podem estar presentes nos infiltrados teciduais e aumentados no sangue (SHIN, 2000), muitas vezes esse aumento favorece os efeitos tóxicos dessas células. Nas infecções helmínticas os eosinófilos possuem a função de proteger o hospedeiro contra os helmintos, sendo responsável por boa parte da resposta inflamatória observada nas infecções helmínticas e apresentam efeitos citotóxicos contra os parasitas (USTUN et al., 2004).

Após a infecção com *T. canis* foram observados aumento significativo de eosinófilos em diferentes compartimentos sangue (Figura 6B), cavidade peritoneal (Figura 7B) e espaço broncoalveolar (8B). Os resultados encontrados corroboram com outros autores que demonstraram em cobaias (FACCIOLI et al., 1996), em camundongo da linhagem C57BL/6 (TAKAMOTO et al., 1998), camundongos BALB/c (ANIBAL et al., 2007) e em humanos (BEAVER et al., 1952) que a SLMV é caracterizada por uma intensa eosinofilia sistêmica. As variações observadas quanto ao número de eosinófilos nos diferentes modelos experimentais, podem ser explicadas pelas quantidades de ovos viáveis utilizadas nas infecções (BUJIS et al., 1994; KAYES, 1997; TAKAMOTO et al., 1998).

Alguns autores demonstraram que, durante o curso da infecção (SLMV) a reação inflamatória é caracterizada por aumento dos leucócitos totais no sangue, no lavado broncoalveolar (ANIBAL et al., 2007; FACCIOLI et al., 1996) e no lavado da cavidade peritoneal, além do aumento do número significativo de eosinófilos que atinge o pico no 18º dia após infecção independente do modelo experimental (CARLOS et al, 2011; ANIBAL et al, 2007; FACCIOLI et al, 1996). Nossos resultados corroboraram com esses autores onde foi observado o aumento significativo de leucócitos totais e eosinófilos no 18º dia após infecção no modelo utilizando camundongos BALB/c no sangue (Fig.8A - B) e na cavidade peritoneal (Fig.7 B) durante a doença da SLMV.

Após a infecção pelo *T. canis* muitos parâmetros celulares são observados, e são esses parâmetros que determinam o curso da infecção durante a SLMV. O processo inflamatório característicos nesse tipo de infecção demonstra além dos eosinófilos e leucócitos totais, aumento de células mononucleares. Essas células aumentam no sangue, na cavidade peritoneal e no espaço broncoalveolar após infecção com *Toxocara canis*. Na cavidade peritoneal o aumento significativo foi observado somente no 18º dia após infecção (Fig. 7 C). Os estudos realizados por CARLOS et al. (2011), demonstram que no 18º após infecção com

Toxocara canis há um aumento significativo das células mononucleares na cavidade peritoneal. Este tipo celular é de grande importância para o direcionamento da resposta imune, principalmente pela produção de citocinas e mediadores envolvidos diretamente no processo inflamatório. Desse modo acreditam-se que essas células mononucleares participam diretamente do processo inflamatório no peritônio dos animais infectados com *T. canis*. No entanto, não estão muito claros quais as citocinas liberadas por essas células que atuam paracrinamente nos eosinófilos.

As respostas dos linfócitos aos antígenos precisam não apenas do sinal resultante da ligação do antígeno com seu receptor, mas também de um segundo sinal, que é fornecido por outra célula. Essa habilidade em transmitir sinais de ativação favorece a essas células o nome de células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) (JANEWAY et al., 2001). A grande quantidade de eosinófilos em algumas infecções helmínticas e a falha dessas células em matar o parasita nos leva a investigar outros papéis atribuídos a essa célula nesse tipo de resposta. Investigando na literatura foram encontrados poucos relatos que sugerem os eosinófilos como (APC) em infecções causadas por helmintos. Embora, em doenças alérgicas já foi demonstrado a possível relação dos eosinófilos como APC (SHI, 2004). Esse conjunto de evidências que demonstram que os eosinófilos possuem a capacidade de estimular células T *naive* sugere que os eosinófilos podem funcionar como verdadeira APC (HANSEL et al., 1992).

Padigel et al. (2006) demonstraram que eosinófilos de camundongos quando estimulados com antígeno de *Strongyloides stercoralis* tiveram a expressão da molécula de MHC II e as moléculas coestimulatórias com possibilidades de estimular a produção IL-4 e IL-5 por células T *naive*. Assim, no presente estudo avaliou se os eosinófilos podem apresentar fenótipo das (APC) durante a Síndrome da Larva Migrans Visceral.

Os eosinófilos encontrados no processo inflamatório no curso decorrente da doença pelo *T. canis* são muito conhecidos e descritos, entretanto, é pouco correlacionada à atuação das (APC). Um grande número de moléculas coestimulatórias tem sido identificado nas APC, sendo as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (B7.1 e B7.2) um dos focos mais importante na relação dos eosinófilos como APC, além da expressão dos receptores (CD28 e CTLA-4) que se ligam a essas moléculas na superfície das células T (OLIVEIRA, 2005). Contudo para ativação dos linfócitos T são necessários dois sinais entre a interação APC e linfócito T, um sinal que confere especificidade ao receptor da molécula de MHC II nas APC fornecido pela interação do receptor de células T (TCR) e um segundo sinal que envolve as

moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 que se liga aos seus respectivos ligantes CD28 e CTLA-4 nas células T (LINSLEY, et al., 1990; FREEMAN, et al., 1993).

De acordo com Oliveira (2005) os monócitos encontrados em indivíduos com asma infectados ou não com *Schistosoma mansoni* apresentam uma frequência na expressão de CD80. O que corroboram com os nossos dados quando sugerimos um aumento expressivo de CD80 em monócitos no sangue no grupo infectado com *T. canis* quando comparado com o grupo controle (Fig.10-B). Esses dados sugerem que essas células podem participar da ativação da resposta imune específica no modelo experimental da infecção com *T. canis*.

Martins-Filho e cols. (1999) avaliaram a expressão de MHC II nos monócitos de indivíduos asmáticos onde foi observada maior expressão nas células dos indivíduos asmáticos infectados, sugerindo que a estimulação antigênica crônica com antígenos parasitários resulta em ativação dos monócitos. Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de MHC II em monócitos (Fig. 10- A) no grupo infectado com *T. canis* quando comparado com o grupo controle o que pode favorecer amplificação da resposta imune através do sinal de perigo.

Favali et al., (2007) avaliaram as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em células dendríticas de ratos Wistar infectado com *Leishmania amazonensis*, onde relataram maior expressão da molécula CD80 quando comparado com a molécula CD86 no grupo infectado em relação ao grupo controle, o que corroboram com os nossos resultados. Nossos resultados no presente estudo demonstram que a moléculas coestimulatória CD80 (Fig. 13 B) apresentou uma maior expressão do que CD86 (Fig. 13 C) quando comparado o grupo infectado com o grupo controle. O aumento na expressão de CD80 comparado ao CD86 sugere que a ativação da resposta imune específica pelos antígenos de *T. canis* ocorre de forma eficiente, visto que a ligação de CD80 ao receptor CD28 de células T apresenta maior avidéz do que a molécula CD86 (FIELDS et al., 1998, XIANG, et al., 2008).

Como se sabe a célula dendrítica é uma das células apresentadoras de antígenos, que expressa moléculas coestimulatória e liberam citocinas pró-inflamatórias. Comparando os dados no presente trabalho com a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 e a molécula MHC II em Células Dendríticas, podemos sugerir uma possível interação entre eosinófilos do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal como uma célula apresentadora de antígeno, visto que os eosinófilos nesse modelo apresentam perfil fenotípico semelhante as células dendríticas em outros modelos.

A molécula coestimulatória CD86 não foi tão expressa pelas células dos animais infectados com *Toxocara canis*, quando comparado com a expressão da molécula CD80 e

MHC II. De um modo geral, a maior expressão da molécula CD80 e MHC II e a menor expressão da molécula CD86 nas células dos camundongos infectados podem ser correlacionadas com a produção de citocinas, já que houve também aumento na produção de IL-5 e IL-4 (Figura 14 A -B). Outros autores já demonstraram que as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 podem influenciar no perfil de citocinas produzidas durante a infecção helmíntica (LU *et al.*, 1994; NAKAJIMA *et al.*, 1996; EKKENS, *et al.*, 2002) e que CD80 parece ser mais eficiente em ativar linfócitos T, do que CD86, principalmente pela maior avidéz de ligação do CD80 ao CD28 do que CD86 (XIANG *et al.*, 2008).

Uma das principais funções dos eosinófilos é a defesa contra helmintos, estes estimulam a população de linfócitos Th2 a produzir IL-4 e IL-5, o primeiro promove aumento de IgE que se liga à superfície do helminto, e o segundo ativa os eosinófilos a se ligarem ao imunocomplexo a secretarem os grânulos com componentes enzimáticos (ROTHENBERG, 1998). Outra forma de ocorrer o acúmulo de eosinófilos é através do reconhecimento do alérgeno (células dendríticas) que subsequentemente apresentam para os linfócitos Th2, e então produzem IL-5 que são citocinas importantes para maturação e diferenciação dos eosinófilos (ABBAS, 1998).

Souza, (2011) relatou no modelo *Shistosoma mansoni* aumento de IL-4 e IL-5 no plasma no grupo infectado tratado com anticorpo monoclonal anti CTLA4, o que sugere que este bloqueio deixou exposta a molécula CD28, possibilitando uma ligação entre a molécula coestimulatória CD80 com CD28. Nossos resultados demonstraram um aumento da IL-4 e IL-5 (Fig. 14 A-B) no plasma, que conseqüentemente favoreceu um aumento de eosinófilos na corrente sanguínea, o que podemos correlacionar com aumento da expressão da molécula CD80 em eosinófilos no sangue demonstrando por Souza, 2011.

Observamos um aumento significativo de IL-5 no pulmão no 5º dia após infecção nos animais infectados com *T. canis* (Fig. 15 A), o que sugere 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 eosinófilos parcialmente depende da IL-5, na SLMV experimental.

A IL-13 atua na regulação da resposta imune e age semelhante 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). Contudo verificamos que no 5º e 18º dia após infecção houve um aumento do nível de IL-13 no grupo infectado quando comparado

com o grupo controle (Fig.14 C e 15 C), corroborando com a eosinofilia nesse mesmo período.

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 (BUJIS *et. al.*, 1997; HALLACK, CUNHA, 1996; ALTCHER *et. al.*, 2003).

Ao analisarmos o perfil das citocinas produzidas a partir da cultura de células totais do baço, verificamos aumento significativo da expressão interleucina IL-4 (Fig. 16 A), e um aumento na expressão IL-5 (Fig. 16 B) e IL-13 (Fig. 16 C), contudo, é notório, que o aumento nos níveis de IL-4 foram consideravelmente mais expressivo em relação à demais citocinas analisadas nos grupos que receberam estímulo de *T. canis*. Sugerindo assim uma possível modulação dependente não somente da IL5 como também de IL-4 no modelo de inflamação induzido por *T. canis*, favorecido pela presença de antígenos de larvas como estímulos.

Belizário *et al.*, (2007) em seu trabalho relataram um aumento no nível de IgE em grupo infectado com *Strongyloides venezuelensis* quando comparado com o grupo controle. O que corrobora com nossos resultados onde observamos que houve um aumento nos níveis de IgE nos diferentes períodos da infecção e com uma significância no 36º dia após infecção (Fig. 17 A) quando comparado o grupo infectado com o grupo controle. Um mecanismo proposto para explicar o aumento nos níveis totais de IgE é a secreção, por parasitas nematoídeos, 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.

A resposta do agente infeccioso induz a mudança do isotipo IgG1 e IgG2a, uma vez que o perfil de resposta Th2 induz a produção de IL-4 estimulando células B a produzirem IgG1, e a produção de IFN- γ induz a mudança de IgG2a através do perfil Th1 (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Nossos resultados demonstraram que os níveis de IgG1 no plasma apresentaram um aumento significativo no 18º e 36º dia após infecção no grupo infectado quando comparado com o grupo controle (Fig. 17 B) e o isotipo IgG2a aumentou também nos dias 18º e 36º dias após infecção no grupo infectado quando comparado com o grupo controle porém esse aumento não foi significativo (Fig. 17 C). Esses dados confirmam os achados anteriores onde o perfil da resposta imune é praticamente Th2.

Assim, nesse estudo sugerimos que durante a SLMV o eosinófilo parece ser a célula fundamental na determinação da resposta imunológica e participa no direcionamento da ativação de linfócitos Th2 nesse modelo de forma direta e indireta.

6 CONCLUSÕES

De acordo como nossos resultados, podemos sugerir que o aumento de IL-4 e de IL-5 favorece a proliferação e ativação de eosinófilos nesse modelo.

Podemos sugerir que, os eosinófilos expressando moléculas como CD80, CD86 e MHC II características de APC podem desencadear funções destas, e então favorecer as interações com as moléculas coestimulatórias de células T promovendo ativação específica das mesmas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S.. **Cellular and Molecular Immunol.** 3 ed, 1998.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.. **Cellular and Molecular Immunology**, 5 ed, 2003.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.. **Imunologia celular e molecular.** 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular.** 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008
- AL-DAMARKI, S.; SHENKEIN, H. A.; TEW, J. G.; BARBOUR, S. E. Differential expression of platelet activating factor acetylhydrolase in macrophages and monocyte derived dendritic cells. *J. Immunol.* n.170, p.167-73,2003.
- ALDERETE, J.M.S.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; ELEFANT, G.R.; CASTRO, A.P.M.; FOMIN, A.B.F.; et al.. Prevalence of Toxocara infection in schoolchildren from the Butanta region, Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.98, nº5, p. 593-7, 2003.
- ALTCHEH, J.; NALLAR, M.; CONCA, M.; BIANCARDI, M.; FREILIJ, H. Toxocariasis: clinical and laboratory features in 54 patients. *An Pediatr.* v.58, nº5,p. 425-31, 2003.
- ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-Cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews**, Londres, v. 1, p. 220-228, 2001.
- 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 as primeiras ecdises de larvas a *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; v.14, p.33-90,1972.
- ASHWATH, M. L.; ROBINSON, D. R.; KATNER, H. P.. A presumptive case of toxocariasis associated with eosinophil pleural effusion: case report and literatue review. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, v.71, p.764, 2004.
- AZAR, D. M.; MARTIN, F. Pediatric uveitis: a Sydney clinic experience. *Clinical Experimental Ophthalmology.* v.32,p.468-471,2004.
- BANCHEREAU, J.;STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*,p.245-52, 1998.
- BANCHEREAU, J. ;BRIERE, F.;CAUX,C.; DAVOUST,J. LEBECQUE,S.; LIU,Y.J. et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev. immunol*, v.18, p.767-811,2000.
- BARRIGA, O. O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. *Vet. Parasitol.*, v. 29,p. 195-234, 1988.
- BATHIA, S.; EDININ, M.; ALMO, S.C.; NATHENSON, S.G. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 104, p. 70-75, 2006.

- BEAVER, P. C. et al.. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics*, v.9,p.7-19,1952.
- BEAVER, P.C. Parasitological Review-Larva Migrans. *Exp. Parasitol.*v. 5, p.587,1956.
- BEAVER, P.C. The nature of visceral larva migrans. *Parasitol.*v. 55,p.3,1969.
- BEAVER, P.C. et al. Chronic eosinophillia due to visceral larva migrans: report of three cases. *Pediatrics*, v. 9p.1,1972.
- BEAVER, P. C. et al.. Chronic eosinophilia due to visceral two forms of clinical expression: visceral and ocular. *American Journal of Diseases in Children*, v.132,p.627-28,1978.
- BEHM, C.A, OVINGTON, K.S. **The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice.** *Parasitol Today*. May, v.16, n°5, p.202-9, 2000.
- BOJANICH, M.V. Tesis de Maestría: Efecto de los epítopes glucídicos en la especificidad de los enzimoimmunoensayos para toxocariosis. Carrera de Magíster en Ciencias Médicas Tropicales. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina, 2006.
- BUIJS, J.; BORSBOOM, G.; RENTING, 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.*, v. 10, n°7, p.1467-75, 1997.
- BRODELL, L.A., BRCK, L.A., SAINI, S.S. Pathophysiology of chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* n°100, p.291-298, 2008.
- BUSSE, W.W., LEMANSKE, R.F. JR. Asthma. *N Engl J Med.*v.344, n°5, p.350-62, 2001.
- BUTTERWORTH, A.E., WASSOM, D.L., GLEICH, G.J., LOEGERING, D.A., DAVID, J.R. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* v.122, p.221–229, 1979.
- CALHOUN, W.J.; SEDGWICK, J.; BUSSE, W. W. The role of eosinophil in the pathophysiology of asthma. *Ann NY Acad. Sci.*v. 629,p. 62-72, 1991.
- CAMPOS JÚNIOR, D.; ELEFANT, G.; de MELO E SILVA E; GANDOLFI, L; JACOB, C.; TOFETI, A, et al. Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in children of different socioeconomic strata. *Rev Soc Bras Med Trop.* v.36, n°4, p.509-13, 2003.
- CARVALHO, E.A; ROCHA, R.L. Toxocariase: Larva Migrans Visceral em crianças e adolescentes. **J. Pediatria.** Vol°87, n°2, 2011.
- CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; DURAND,I.; CELIA, M. et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cells pathways in response to GM-CSF + TNF- α : linfunctional analysis. *Blood*, v.90, p. 1458-70, 1997.

COLLINS ,P.D., et al., Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v.182, n°4, p.1169-1174, 1993.

COLLEY, D. G., *Schistosoma mansoni*: eosinophilia and the development of lymphocyte blastogenesis in response to soluble egg antigen in inbred mice. *Exp. Parasitol.* v. 32, p. 520–526, 1972.

CUNHA, R. M. C. Larva Migrans Visceral. Rotina de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. São Paulo: Atheneu, p. 688- 693, 2005.

CUTLER,C.W.; JOTWANI, R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol*, v.35, p.135-57, 2004 .

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Publish Health Concern. Parasites and Health. Toxocariasis 2010. Acessado: 19 de Maio de 2011. Acesso: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxocariasis.htm>.

DELGADO, O. & RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. *Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis Bol. Mal. Salud Amb.* v. XLIX, n° 1, Enero-Julio, 2009

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.

de SAVIGNY, D.H. Toxocariasis and serological diagnoses by enzyme immunosorbent assay. *J Clin Pathol*, v.32, p.284-8, 1979.

DUEZ, C., A. DAKHAMA, A. TOMKINSON, P. MARQUILLIES, A. BALHORN, A. B. TONNEL, D. L. BRATTON; E. W. GELFAND. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 114, p.820–825, 2004.

EBISAWA, M., BOCHNER, B.S., GEORAS, S.N, SCHLEIMER, R.P. **Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. I. Role of endothelial and eosinophil adhesion molecules in IL-1 beta-induced transendothelial migration.** *J Immunol.* v.149, n°12, p.4021-8, 1992.

ESPINOZA, Y. et al. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. *Anales de La Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, v.64, p.247-251, 2003.

EKKENS, M. J., Z, LIU, J. WHITMIRE, J. PESCE, A. H. SHARPE, J. F. URBAN., and W. C. GAUSE. Memory Th2 effector can develop in the absence of B7-1/ B7-2, CD28 interaction, and effector Th cells after priming with an intestinal nematode parasite. **The J of Immunol.** v.22, p. 1767-1802, 2002.

FACCIOLI, L. H, et al., The accumulation of ¹¹¹In-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.

FREEMAN, G. J., GRIBBEN, J. G., BOUSSIOTIS, V. A., NG, J. W., RESTIVO JR., V. A., LOMBARD, L. A., GRAY, G. S., NADLER, L. M. Cloning of B7-2, a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, v. 262, p.909-911, 1993.

FERRER, M.; LUQUIN, E.; SANCHEZ-IBARROLA, A.; MORENO, C.; SANZ, M.L.; KAPLAN, A.P. Secretion of Cytokines, Histamine and Leukotrienes in Chronic Urticaria. *Int Arch Allergy Immunol.* v.129, p.254-260, 2002.

FINKELMAN, F.D.; DONOHUE, T.S.; GOLDHILL, J. Cytokine Regulation of Host Defense Against Parasitic Gastrointestinal Nematodes. *Annual Review of Immunology* v.15, p. 505-533, 1997.

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.

GILLESPIE, S. The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitol Today*. 1988 Jun; v.4, n°6, p.180-2.

GREENWALD, R. F. J.; URBAN, M.J.; EKKENS, S.J.; CHIEN, D.; NGUYEN, H.; FANG, F.D.; FINKELMAN, A.H.; SHARPE, W.C. B7-2 Is required for the progression but not the initiation of the type 2 immune response to a gastrointestinal nematode parasite. *The J of Immunol.* v.22,p.1767-1799, 1999.

GLEICH, G. J. et al. **Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence.** *J Exp Med.* v.150, n°6, p.1456-71, 1979.

GLEICH, G. J; ADOLPHSON, C.. Bronchial hyperreactivity and eosinophil granule proteins. *n.43*, p.223-30, 1986.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*, v. 3, p. 230-250, 1981.

GRIFFITHS-JOHNSON, D.A, et al, The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro* and causes their accumulation into the lung *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.197, n°3, p.1167-1172, 1993.

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

HANSEL, T.T.; de VRIES, I.J.; CARBALLIDO, J.M.; et al. Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J Immunol*, v.149, p.2130-2136, 1992.

HEADINGTON, J.T.; CERIO, R. Dendritic cells and the dermis: 1990. *Am J . Dermatopathol*, v.12, p.217-220, 1990.

- HOGARTH-SCOTT, R.S, FEERY, B.J. **The specificity of nematode allergens in the diagnosis of human visceral larva migrans.** *Aust J Exp Biol Med Sci*, v.54, n°4,p.317-27, 1976.
- HOFFMANN, K.F., CHEEVER, A.W. e WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v.164, n.12, p.6406-6416. 2000.
- HUBSCHER, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI-an eosinophilderived inhibitor of histamine release. **The Journal of Immunology**, v.114, n°4, 1379-1388, 1975.
- JACOB, C. M. A, OSELKA, G. W. Toxocaríase na infância. *Pediatrics (São Paulo)*. v.13, n°2, p.48-55,1991.
- JANEWAY, Jr. C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Immunobiology: the immune system in health and diseases*. 5ed, New York, 2001.
- JONES D.G.The eosinophil. *J. Comp. Path.*, v.108,p. 317-335. 1993.
- JUNE, C. H.; BLUESTONE, J. A.; NADLER, L. M.; THOMPSON, C. B. The B7 and CD28 receptor families. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 321-330, 1994.
- KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med*. v.344, n°1, p.30-7, 2001.
- KAY, A.B. Asthma and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.87, p.893-899, 1991.
- KALKOFEN, U.P. Hookworms of dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.17, n.6, p.1341-1354, 1987.
- 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.
- KITA, H. et al,Chemokines active eosinophils: potential roles in allergic inflammation.**The Journal of Experimental Medicine**, v.183, n°6,p. 2421-2426, 1991.
- KOTSIMBOS, A.T, HAMID, Q. IL-5 and IL-5 receptor in asthma. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n°2, p. 75-91, 1997.
- LAMKHIOUED, 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.
- LINSLEY, P. S., CLARK, E. A., LEDBETTER, J. A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,v. 87,p. 5031–5035,1990.
- LYNCH, N.; WILKES, L.; HODGEN, A.; TURNER, K. Specificity of Toxocara ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol*. v.10, n°3,p.323-37, 1988.
- LU, P., ZHOU, X., CHEN, S. J. MOORMAN, M., MORRIS, S. C., FINKELMAN, F. D.,

LINSLEY, P., URBAN, J. F. and GAUSE, W. C. CTLA-4 Ligands are required to induce an *in vivo* interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. **J Exp Med.** v.180, p. 693- 698, 1994.

LUZNA-LYSKOV A. Toxocarosis in children living in highly contaminated area. An epidemiological and clinical study. *Acta Parasitol*, v.45,p.40-2, 2000.

MACKENZIE, J. R., J. MATTES, L. A. DENT; P. S. FOSTER. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J. Immunol.* v.167,p.3146–3155, 2001.

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

MAWHORTER, S. D., E. PEARLMAN, J. W. KAZURA; W. H. BOOM. Class II major histocompatibility complex molecule expression on murine eosinophils activated *in vivo* by *Brugia malayi*. *Infect. Immun.*, v.61, p.5410–5412, 1993.

MARTINS-FILHO, O. A., CUNHA-MELO, J. R.; LAMBERTUCCI, A. M.; SILVEIRA, D. G.; COLLEY, G.; GAZZINELLI, R. "Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules." v.44, n°3, p. 570-7, 1999.

MELO, K. M.; CARVALHO, B.T.C. Células T regulatória: Mecanismo de ação e função nas doenças humanas. **Rev. Bras. Alerg.Imunopatologica.** Vol.32, n° 5, 2009.

MOQBEL, R; et al,. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. **The Journal of Experimental Medicine**, v.174, n°3, 749-752, 1991.

METCALFE, D.D; et al,Mast cells. **Physiology Review**, v. 77, n° 4, p. 1033-1079, 1986.

MOORE, D. L., GROVE, D. I., WARREN, K. S.The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J. Pathol.* v.121, p. 41–50, 1977.

MOREIRA- SILVA, S. F. et al. Toxocariasis of the central nervous system: with report two cases. *Rev. Med.Trop. São Paulo*, v.7, p.169-174, 2004.

MUELLER, D. L. A proliferation of costimulatory molecules.*Cur. Biol.* v.10, p.227-230, 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.

NEUTRA, M. R. Current concepts in mucosal immunity. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J. Physiol*, p.785-91, 1998.

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.

OKUBO, Y, et al., Predominant implication of IL-5 in acute eosinophilic pneumonia: comparison with chronic eosinophilic pneumonia. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.116, p.76-80, 1998.

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.

OKUMA , M.; AZUMA, 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.

OLIVEIRA, R. R. Estudo do fenótipo, ativação celular e fonte produtora de IL-10 em asmáticos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 91.fl.; Salvador, 2006.

PADIGEL ,U.M, et al., Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infection and Immunity**, v.74, p. 3232–3238, 2006.

PADIGEL UM, HESS JA, LEE JJ, ET AL. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis*, p.196:1844–1851, 2007.

PALUCKA,K.A.; TAQUET,N.; SANCHEZ-CHAPUIS,F.; GLUCKMAN,J.C. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. immunol*. p.4587-95,1998.

PALFRAMAN, R.; et al., Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*, v.7,p. 2240-2246, 1998.

PARKS, S. P. et al. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. *The Korean Journal of Parasitology*,v.38, p.267-273, 2000.

PREISER ,F.M, et al., Comparison of midplane, full-chest tomograms, diffusing capacities, sputum eosinophil content, and other parameters in patients with asthma and emphysema. **Journal of Allergy**. v.44, n°3, p. 154-164, 1969.

RAINBIRD, M.A, MACMILLAN, D., MEEUSEN, E.N.. **Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5**. *Parasite Immunol*.v.20, n°2, p.93-103, Feb., 1998.

RAYES, A.A.; LAMBERTUCCI, JR. The association of human toxocariasis and pyogenic abscesses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*.v.32, n°4, p.425-38, 1999.

RESNIK, M.B.; WELLER, P.F. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Repr Cell Mol Biol* 1993; 349-55.

REY, L. **Parasitologia** - parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991.

- RIERA, L. M. C. Tesis Doctoral: Estudios sobre la Toxocariosis humana en Barcelona. Puesta a punto y ensayo de una técnica diagnóstica. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Barcelona, España, 1990.
- RODOLPHO, J.M.de A.; OLIVEIRA, S. R. P. Fotos arquivos pessoais, 2010.
- RODRÍGUEZ, P.D.F.; RIPOLL, B.E.D.; ALBERTO, E.B.; SOTELO, J.Á. *Toxocara canis* y Síndrome *Larva Migrans Visceralis* (*Toxocara canis* and Syndrome *Larva Migrans Visceralis*). *Rev. Elec. Vet. - REDVET*. v.7, nº4, p.:1-42, 2006.
- REYES-REYES, M., N. MORA, G. GONZALEZ; C. ROSALES. Beta1 and beta2 integrins activate different signalling pathways in monocytes. *Biochem. J.* v.363, p.273–280, 2002.
- ROTHENBERG ME. Eosinophilia. *N Engl J Med*.v.338, p.1592–1600, 1998.
- SABIN, E.A., KOPF, M.A., PEARCE, E.J.. **Schistosoma mansoni egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils.** *J Exp Med.* v.184, nº5, p.1871-8, Nov. 1996.
- SANDERSON C.J. Interleukin-5, Eosinophil, and Disease. *Blood*, v.79, p.3101- 3109, 1992.
- SANDERSON, C.J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. **Blood**, v.79, nº 12, p. 3101- 3109, 1985.
- SANZ M.J, et al,. IL-1 is a potent inducer of eosinophil accumulation in rat skin Inhibition of response by a platelet-activating factor antagonist and an anti human IL-8 antibody. **The Journal of Immunology**, v.154, nº 3,p.1364-1373, 1995.
- SANSOM, D.M.; MANZOTTI, C.M.; ZHENG, Y. What's the difference between CD80 and CD86? **TRENDS in Immunology**, Oxford, v. 24, p. 313-318, 2003.
- 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.
- SCHLEIMER, R.P., et al. **IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1.** *J Immunol.* v.148, nº4, p.1086-92, Feb, 1992.
- SOUZA, L. C. Fotos arquivo pessoal, 2010.
- SPRY,C.J.. Eosinophils. *Immunol Today*, v.13, nº10,p. 384-7,1992.
- SPRENT, J.F.A. Visceral Larva *Migrans*. *Aust. J. Biol. Sci.*; v.25,p. 344, 1963.
- SOOS,J.M.; ASHLEY,T.A.; MORROW,J.; PATARROYO,J.C.; SZENTE,B.E. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Inter. Immunol.* v.11,p. 1169-79,1999.

SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* v.76, p.520–527, 2004

SHI, H. Z., A. HUMBLE, C. GERARD, Z. JIN; P. F. WELLER. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J. Clin. Investig.* v.105, p.945–953, 2000.

SHIN, M. H. Excretory – secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. ***Kore. J. Parasitol.***, v.38, n°1, p.17 – 23, 2000.

SHURIN, M. R.; KUSNECOV, A. W.; RIECHMAN, S. E.; RABIN, B. S. Effect of a conditioned aversive stimulus on the immune response in three strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, v.20, p. 837-849, 1995.

SPERGEL, J. M.; BEAUSOLEIL, J. L.; MASCARENHAS, M.; LIACOURAS, C. A. The use of skin prick tests and match tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. *Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:363-8.

TAYLOR, M.R. The epidemiology of ocular toxocariasis. *J Helminthol*, v.75, p.109-18, 2001.

TONELLI, E. Toxocariasis and asthma: a relevant association. *Journal de Pediatria.* v.81, p.95-96, 2005.

TURNER, K.J, et al, Regulation of asthma by intestinal parasites. Investigation of possible mechanisms. ***Immunology***, v. 35, n°2, p. 281-288, 1979.

THORNE, K. J. I., MAZZA, G., Eosinophilia, activated eosinophils and human schistosomiasis. *J. Cell Sci.*v. 98, 1991.

USTUN, S. et al. Interleukin (IL) 5 levels and eosinophilia in patients with intestinal parasitic diseases. ***World J Gastroenterol***, v.10, n°24, p.3643 – 3646, 2004.

VARGAFTIG, B. B., BRAQUET, P.G.. **PAF-acether today--relevance for acute experimental anaphylaxis.** *Br Med Bull.* v.43, n°2, p.312-35, April, 1987.

VIDAL, J. E.; SZTCJNBOK, J.; SEGURO, A. C..Eosinophil meningorhcephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature.*Journal of tropical medicine.* v.69,p. 341-343, 2003.

XIE, Z. F., H. Z. SHI, X. J. QIN, L. F. KANG, C. P. HUANG; Y. Q. CHEN.Effects of antigen presentation of eosinophils on lung Th1/Th2 imbalance. *Chin. Med. J.* v.118, p.6–11, 2005.

ZINKHAM, W. H.A review and assessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular.*American Journal of Diseases in Children*, v.132, p.627-628, 1978.

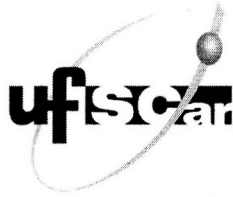
WANG, Y. C.; SASHIDHAMURTHY, R.; NAGARAJAN, S. S. B7-1 HAS (CD80- CD24) a recombinant hybrid costimulatory molecule retains ligand and costimulatory functions. *Imm Lett*, 2006.

WARDLAW, A. J., et al. Eosinophil adhesion in allergic inflammation. ***Allergy and Clinical Immunology***, v. 94, n° 6,p. 1163-1171, 1994.

WARDLAW, A.J, et al,. Leukotrienes, LTC4 e LTB4 in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. ***Journal Allergy and Clinical Immunology***,v. 84, p. 19-26, 1989.

WEG, V.B, et al,. LPS-induced ¹¹¹In-eosinophil accumulation in guinea-pig skin: evidence for a role for TNF-alpha. ***Immunology***, v.84,p. 36-40, 1995.

Anexo A



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
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal n°. 001/2010

Protocolo n°. 056/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 39ª. Reunião, ocorrida em 23/02/2010, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Participação dos eosinófilos como células apresentadora de antígenos na infecção pelo Toxocara canis**”, elaborado por Joice Margareth de Alemida Rodolpho, Fernanda de Freitas Aníbal, Sandra Regina Pereira de Oliveira e Naiara Naiana Dejani.

São Carlos, 25 de fevereiro de 2010.


Profª. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal