

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto De Biologia**  
**Departamento De Microbiologia E Parasitologia**  
**Programa De Pós-Graduação Em Microbiologia E Parasitologia**



Tese

**Mecanismos de modulação da resposta imune de larvas de *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente infectados**

**Jéssica Lopes Borchardt**

**Pelotas, 2021**

**Jéssica Lopes Borchardt**

**Mecanismos de modulação da resposta imune de larvas de *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente infectados**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas com concentração de conhecimentos em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B726m Borchardt, Jéssica Lopes

Mecanismos de modulação da resposta imune de  
larvas de *Toxocara canis* em camundongos  
experimentalmente infectados / Jéssica Lopes Borchardt ;  
Fábio Pereira Leivas Leite, orientador. — Pelotas, 2021.

60 f. : il.

Tese (Doutorado) — Microbiologia e Parasitologia,  
Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas,  
2021.

1. *Toxocara canis*. 2. IL4. 3. IL10. 4. IL12 . 5. YM1. I.  
Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Título.

CDD : 595.1

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**Jéssica Lopes Borchardt**

**Mecanismos de modulação da resposta imune de larvas de *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente infectados**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 20/01/2021 - 09h e 30 min

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade de Wisconsin – Madison

Profa. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne  
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Micaele Quintana de Moura  
Doutora em Ciências Biológicas (Parasitologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Neida Lucia Conrad  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila  
Doutora em Ciências Biológicas (Parasitologia) pela Universidade Federal de Pelotas

BORCHARDT, Jéssica Lopes. **Mecanismos de modulação da resposta imune de larvas de *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente infectados** 2021. 60f. Teses (Doutorado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

## Resumo

Toxocaríase é considerada uma das helmintoses mais prevalentes no mundo, caracterizada pela migração e permanência de larvas de *Toxocara canis* em diferentes tecidos dos hospedeiros acidentais. As larvas liberam substâncias de excreção-secreção (TES), que interagem e modulam a imunidade do hospedeiro. O objetivo do trabalho foi avaliar a modulação imunológica em diferentes tecidos (esplenócitos e nódulos linfoides mesentéricos), mediada pela infecção com *T. canis* no modelo experimental camundongo (Balb/c). Através do teste de ELISA indireto foi avaliado o perfil e níveis de imunoglobulinas produzidas após a infecção com 100 larvas L3 de *T. canis*. Por meio do qPCR foram avaliados os níveis de transcrição das citocinas *IL4*, *IL10*, *IL12* e da proteína *YM1* (*chitinase-like protein-3*) nos esplenócitos e nódulos linfoides mesentéricos nos períodos de 24 h, 48 h, 15 e 30 dias após infecção com *T. canis*. A infecção com larvas de *T. canis* gerou um nível significativo ( $p < 0,05$ ) de IgG total específica aos 15 dias e 30 dias pós-infecção (p.i). Observamos níveis significativos ( $p < 0,05$ ) de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 com a mesma tendência da resposta observada de IgG total. Ao avaliar a transcrição relativa dos genes, observou-se diferentes níveis de transcrição com relação ao tecido e ao período avaliado. Nos esplenócitos a citocina *IL-4* e o gene *YM1* apresentaram maiores níveis de transcrições durante a fase crônica, já a citocina *IL-10* apresentou-se em maiores níveis durante a fase aguda da infecção. A citocina *IL-12* apresentou-se em níveis basais tanto na fase aguda quanto na fase crônica nos esplenócitos. Nos nódulos linfoides mesentéricos, as citocinas *IL4*, *IL10*, *IL-12* e do gene *YM1* apresentaram transcrições significativas ( $p < 0,05$ ) maiores do que os controles a partir das 24 horas (fase aguda) diminuindo os níveis com o passar dos períodos estudados, sendo que a *IL-12* nos períodos de 15 e 30 p.i (fase crônica) foi para níveis basais. Foram detectados maiores níveis de *IL4*, *IL-10* e *YM1* durante a infecção aguda com *T. canis*. Com os dados obtidos nesse estudo pode-se sugerir que as citocinas *IL4*, *IL10*, *IL12* bem como a proteína *YM1* exercem papel significativo na resposta imune de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com larvas de *Toxocara canis*. A resposta predominantemente Th2, com níveis de transcrição de *IL4* e resposta regulatória através da *IL10*, sugerem terem sido as responsáveis pela ativação de células do sistema imune e por consequência a transcrição do gene *YM1* nos esplenócitos e nódulos linfoides mesentéricos.

**Palavras Chave:** *Toxocara canis*, *IL4*, *IL10*, *IL12*, *YM1*.

BORCHARDT, Jessica Lopes. **Mechanisms of modulation of the immune response of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice** 2021. 60f. Theses (Doctorate in Parasitology) - Graduate Program in Microbiology and Parasitology. Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

### **Abstract**

Toxocariasis is considered one of the most prevalent helminth infections in the world, characterized by the migration and permanence of *Toxocara canis* larvae in different tissues of accidental hosts. Larvae release excretory-secretory substances (TES), which interact and modulate host immunity. The aim of this study was to evaluate the immune modulation in different tissues (splenocytes and mesenteric lymphoid nodes), mediated by infection with *T. canis* in the experimental mouse model (Balb/c). Through the indirect ELISA test, the profile and levels of immunoglobulins produced after infection with 100 *T. canis* L3 larvae were evaluated. Using qPCR, transcription levels of cytokines IL4, IL10, IL12 and YM1 protein (chitinase-like protein-3) were evaluated in splenocytes and mesenteric lymphoid nodules at 24 h, 48 h, 15 and 30 days after infection with *T. canis*. Infection with *T. canis* larvae generated a significant ( $p < 0.05$ ) level of total specific IgG at 15 days and 30 days post-infection (p.i). We observed significant levels ( $p < 0.05$ ) of IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 with the same tendency of the observed response of total IgG. When evaluating the relative transcription of the genes, different levels of transcription were observed in relation to the tissue and the evaluated period. In splenocytes, the cytokine IL-4 and the YM1 gene showed higher levels of transcripts during the chronic phase, while the cytokine IL-10 showed higher levels during the acute phase of the infection. Cytokine IL-12 was present at basal levels both in the acute phase and in the chronic phase in splenocytes. In the mesenteric lymphoid nodules, the cytokines IL4, IL10, IL-12 and the YM1 gene showed significantly higher transcriptions ( $p < 0.05$ ) than the controls from 24 hours onwards (acute phase), decreasing levels over time studied, and IL-12 in the periods of 15 and 30 p.i (chronic phase) went to baseline levels. Higher levels of IL4, IL-10 and YM1 were detected during acute infection with *T. canis*. With the data obtained in this study, it can be suggested that the cytokines IL4, IL10, IL12 as well as the YM1 protein play a significant role in the immune response of Balb/c mice experimentally infected with *Toxocara canis* larvae. The predominantly Th2 response, with levels of IL4 transcription and regulatory response through IL10, suggest that they were responsible for the activation of immune system cells and, consequently, the transcription of the YM1 gene in splenocytes and mesenteric lymphoid nodules.

**Keywords:** *Toxocara canis*, IL4, IL10, IL12, YM1.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	6
<b>2. Objetivos</b> .....	9
2.1. Objetivo geral .....	9
2.2. Objetivos específicos .....	9
<b>3. Revisão de literatura</b> .....	10
<b>4. Manuscritos</b> .....	24
4.1 Manuscrito 1.....	24
4.2 Manuscrito 2.....	36
<b>5. Conclusões finais</b> .....	46
<b>Referencias</b> .....	47
<b>Anexos</b> .....	57

## 1. Introdução

A infecção ocasionada pelo nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães, está entre as zoonoses mais difundidas em todo o mundo, possuindo elevada prevalência em países em desenvolvimento (RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010; NÚÑEZ *et al.*, 2013). Esta infecção pode gerar a doença conhecida como toxocaríase, sendo caracterizada pela migração e permanência de larvas de helmintos em tecidos de hospedeiros acidentais, sendo o *T. canis* o agente etiológico mais associado a ela (MENDONÇA *et al.*, 2012). Afetando assim a saúde dos seres humanos causando lesões, às vezes, irreparáveis (SOUZA *et al.*, 2011); causa também doença nos animais domésticos (DESPOMMIER, 2003) e contamina o solo (SANTAREM *et al.*, 2011).

A toxocaríase humana ocorre pela ingestão de ovos embrionados de *T. canis* contendo a larva L3 através do consumo de água, alimentos não higienizados (principalmente hortaliças folhosas) (VIEIRA *et al.*, 2013), contato direto com cães e gatos (NÚÑEZ *et al.*, 2013). Além disso a infecção pode ocorrer através da ingestão de larvas pelo consumo de carne mal cozida, sendo que este modo de ingestão é menos comum, pois envolve hospedeiros paratênicos como suínos, ruminantes e aves (OVERGAAW & KNAPEN, 2013; DUTRA *et al.*, 2013).

Por sua vez, dentro do hospedeiro as larvas de *T. canis* atravessam a parede intestinal e realizam migração nos tecidos, podendo atingir vários órgãos, como fígado, pulmões, olhos ou encéfalo (CHEN *et al.*, 2012). Deste modo, os quadros clínicos são muito variáveis (SMITH *et al.*, 2009), variando entre assintomáticos ou graves. Nos seres humanos, as larvas não evoluem até sua forma adulta no intestino delgado, como ocorre em hospedeiros definitivos. Neste caso as larvas podem permanecer viáveis, encapsuladas dentro de granulomas, durante meses

ou anos (RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010). As larvas do parasito podem também morrer, devido à ação da resposta imune do hospedeiro, mas não antes de causar dano físico e imunopatológico (HOTEZ & WILKINS, 2009).

No sistema imunológico as células TCD4+ indiferenciadas, também chamadas de linfócitos T *helper naive*, sofrem polarização para diferentes padrões de células T helper (Th), adquirindo determinadas funções efetoras e assim direcionam o perfil das respostas imunológicas. Devido aos estímulos antigênicos as células TCD4+ expressam fatores de transcrição, que determinam vias de sinalização específicas, responsáveis pela produção de interleucinas para cada um destes padrões de células T. A diferenciação para um tipo particular de células T efetoras é diretamente dependente das interleucinas disponíveis no microambiente no qual uma célula TCD4+ naive é exposta (YAMANE & PAUL, 2013).

Durante o curso da resposta imune na infecção por *T. canis*, existe predominância de uma resposta imune Th2, caracterizada pela produção de *IL4*, *IL5*, *IL13* e subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgE, bem como um aumento de eosinófilos no sangue periférico, nos pulmões e fígado (PINELLI *et al.*, 2007). Por outro lado, a produção de linfócitos Th1 é suprimida durante a infecção por *T. canis* e as produções de *IL12* e *TNF- $\alpha$* , importantes citocinas envolvidas no recrutamento celular, encontram-se reduzidas em macrófagos de animais infectados. A supressão de linfócitos Th1, associada à redução de *IL12*, é uma característica imunomodulatória do nematódeo *T. canis*, que dificulta o recrutamento de macrófagos para os locais de infecção e a morte parasitária (KURODA *et al.*, 2001). A resistência à infecção e a eliminação dos helmintos não depende somente de uma célula em particular ou um único mecanismo molecular, múltiplas vias estão envolvidas na degradação e eliminação parasitária (MAIZELS *et al.*, 2012). YM1 é uma proteína expressa principalmente durante a exposição a nematóides e pode atuar na resolução de processos inflamatórios por mascarar sítios de ligação a lectinas e prevenir a entrada de novas células inflamatórias no local (CHANG *et al.*, 2001). Sua expressão é bastante acentuada na presença de *IL4* e *IL13*, sendo dependente de STAT-6 (WELCH *et al.*, 2002).

Compreender as alterações imunológicas que ocorrem no organismo durante a invasão pelo *T. canis* é de suma importância, pois a partir do entendimento de

como este helminto modula a imunidade e se instala no hospedeiro que permitirá o desenvolvimento de uma proteção imunológica contra ele (MAIZELS *et al.*, 2013).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de modulação da resposta imune mediada por larvas de *Toxocara canis* em camundongos Balb/c.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a dinâmica de IgG específica sérica anti-*T. canis* durante a infecção experimental com 100 larvas *T. canis* no período de 15 e 30 dias após infecção.
- Avaliar os níveis dos isotipos, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, de IgG específica anti-*T. canis*, no período de 15 e 30 dias após infecção com larvas de *T. canis*.
- Avaliar a transcrição gênica de citocinas *IL12*, *IL4*, *IL10* e do gene *YM1* nos esplenócitos, nos períodos de 24 h, 48 h, 15 e 30 dias após infecção experimental com 100 larvas de *T. canis*.
- Avaliar a transcrição gênica de citocinas *IL12*, *IL4*, *IL10* e do gene *YM1* nos nódulos linfoides mesentéricos, nos períodos de 24 h, 48 h, 15 e 30 dias após infecção experimental com 100 larvas de *T. canis*.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1 *Toxocara canis*

*Toxocara canis* é um dos parasitos zoonóticos mais comuns em saúde pública, com alta prevalência associada a fatores socioeconômicos, ressaltando o impacto das desigualdades sociais como fator determinante da alta prevalência desta infecção parasitária nas populações menos privilegiadas. *T. canis* é responsável por causar a toxocaríase, doença negligenciada, prevalente em países tropicais e em desenvolvimento. Entretanto, *T. canis* também está presente em países desenvolvidos como Estados Unidos, Japão, Canadá, Alemanha, Reino Unido, Itália, França e Rússia, sendo a soroprevalência maior nas áreas rurais (35-42%), diminuindo (2-5%) em áreas urbanas (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

Destacando-se maiores taxas de prevalência entre crianças pelo maior contato com cães, hábitos de geofagia e onicofagia, chegando acometer 50% dessa população (LEE *et al.*, 2014). A prevalência global de contaminação de ovos de *Toxocara* sp. em solos de locais públicos é de 21%, sendo a taxa de contaminação maior em países com maior longitude, como Brasil e Argentina, em que as condições climáticas e ambientais são muito adequadas para a sobrevivência de ovos de *Toxocara* sp. e onde o número de animais errantes em áreas públicas é alto (FAKHRI *et al.*, 2018).

*Toxocara canis* e *Toxocara cati* são as espécies mais descritas na literatura pois elas infectam os seres humanos e tem como hospedeiro definitivo cães e gatos, respectivamente (CAMPOS JÚNIOR, *et al.*, 2003). Outras espécies como *T. malaysiensis*, que ocorre em gatos na Malásia e China, *T. vitulorum*, que ocorre em ruminante e *T.*

*pteropodis* em morcegos, possuem certo potencial para causarem zoonose, porém sua importância é mais limitada (MORGAN, 2013).

Fatores biológicos inerentes ao ciclo de vida de *T. canis* contribuem para a perpetuação da espécie. Dentre os fatores destacam-se a transmissão vertical no hospedeiro definitivo jovem, garantido o início precoce da produção de ovos de parasitos adultos; a alta fecundidade, a sobrevivência prolongada de ovos no ambiente, e a alta diversidade de hospedeiros definitivos e paratênicos (MCPHERSON, 2013). Além disso, o fácil acesso de cães e gatos às praças e parques públicos, destinados à recreação infantil, favorece a contaminação do solo destas áreas por ovos de *T. canis*, constituindo-se em importantes fontes de infecção (OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002).

Nos hospedeiros definitivos, a transmissão do nematódeo pode ocorrer pela ingestão de ovos embrionados presentes no meio ambiente, da cadela para os filhotes pelas vias transplacentária e mamária, ou ainda pela ingestão de hospedeiros paratênicos (NIEC, 1980). Os ovos ingeridos, contendo larva de terceiro estágio (L3) em seu interior (forma infectante) (SCHNIEDER *et al.*, 2011), sofrem ação do suco gástrico e as larvas eclodem no intestino delgado, atravessam a parede intestinal, seguindo pela veia porta ou vasos linfáticos até o fígado, coração e então para os pulmões. Nos pulmões, as larvas rompem os bronquíolos, atingindo a traqueia, quando são deglutidas e retornam ao intestino delgado, realizando uma migração conhecida como: hepato-pulmonar-traqueal (SANTARÉM *et al.*, 2009). A seguir, ocorre o desenvolvimento do parasito na forma adulta no lúmen do intestino delgado e, conseqüentemente, a eliminação de ovos pelas fezes. A fêmea de *T. canis* é capaz de produzir até 200.000 ovos por dia, ocasionando a elevada contaminação do meio ambiente (TRAVERSA *et al.*, 2014).

Nessa etapa, os ovos, que são eliminados não embrionados, permanecem no ambiente sem capacidade de infectar novos hospedeiros até ocorrer o embrionamento dos mesmo. Esse processo ocorre em condições adequadas, como a temperatura, entre 25 °C a 30 °C, e umidade relativa de 85 a 95%. Os ovos tornam-se infectantes no período de 2 a 5 semanas (ARAÚJO, 1972; SCHANTZ, 1989). Os ovos são muito resistentes e conseguem se manter viáveis em condições adversas por longos períodos. Sobrevivem bem sobre a maioria dos invernos e climas temperados, sobrevivendo por seis a doze meses. Alguns ovos podem ser capazes de sobreviver em local fresco e úmido por dois a quatro anos ou mais (GAMBOA, 2005).

Além da migração hepato-pulmonar-traqueal, a segunda rota de migração é a somática. Neste caso, quando as larvas chegam aos pulmões há o retorno das mesmas para o coração, pelas veias pulmonares, e assim sua migração é facilitada para qualquer parte do organismo seguindo a circulação sanguínea. As larvas ainda podem passar por um estágio de hipobiose em tecidos ou órgãos como fígado, rins, olhos e cérebro (BARRIGA, 1988). A idade do hospedeiro definitivo é determinante para o tipo de migração. Filhotes com menos de cinco meses apresentam sistema imunológico imaturo, o que os torna os hospedeiros mais acometidos pelo *T. canis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2002). Por isso, nesses animais, as larvas migram pela via hepato-traqueal, retornando ao intestino delgado, onde evoluem para as formas adultas. Aos seis meses, os cães montam uma resposta imunológica adquirida contra o parasito. Dessa forma, as larvas não realizam o ciclo pulmonar, retornam ao coração, não havendo o desenvolvimento dos parasitos até a forma adulta. As larvas ingeridas atingem a circulação, migram por diversos órgãos, onde permanecem em estado de hipobiose (GLICKMAN *et al.*, 1978; OVERGAAUW, 1997; RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010).

Os cães, principalmente os filhotes, são acometidos pelo *T. canis* de outras maneiras que não pela ingestão de ovos. Fêmeas prenhes sofrem alterações hormonais e baixa de imunidade, possibilitando que as larvas deixam o estado de hipobiose e, através da via transplacentária, migram para o feto, as larvas adquirem mobilidade no terço final da gestação, e alcançam o fígado dos fetos. Os filhotes nascem com as larvas nos pulmões e, a partir da segunda semana de vida, os parasitos adultos são aptos a produzir ovos. Ou ainda pode ocorrer à transmissão transmamária, mais comum que a transplacentária, com larvas eliminadas no colostro e/ou no leite. Cães em fase de lactação podem infectar-se ao ingerirem larvas durante as três primeiras semanas de vida, neste caso as larvas vão direto para o intestino e a presença de ovos nas fezes dos filhotes se dá duas semanas após a ingestão da larva pelo leite (BARRIGA, 1988; KRAMER, *et al.*, 2006). A infecção do *T. canis* nos filhotes pode fazer com que a barriga destes fiquem aumentados, deixando o abdômen distendido, causando incômodo ao animal. Também causa desnutrição e se a quantidade do parasito for muito alta, o animal pode vir a óbito por obstrução intestinal (AIRES *et al.*, 2008). As cadelas em puerpério podem ser acometidas pelo *T. canis* através da ingestão de parasitos adultos contidos em vômitos e ovos contidos nas fezes dos filhotes, durante a higienização da ninhada (MAGNAVAL *et al.*, 2001).

Outra forma dos cães se infectarem com este parasito é através da ingestão de hospedeiros paratênicos (hospedeiros de transporte) tais como: ratos, camundongos, aves, minhocas e insetos que ingerem os ovos infectantes (HOFFMEISTER *et al.*, 2007). Nestes as larvas vão para os tecidos onde ficam até estes hospedeiros serem ingeridos pelos cães (hospedeiros definitivos). Ou seja, em hospedeiros paratênicos as larvas de *Toxocara* penetram na parede intestinal e, movendo-se através do sistema circulatório, iniciam a fase hepato-pulmonar e avançam para a fase miotrópico-neurotrópica, acumulando-se no cérebro e na carcaça (ABO-SHEHADA & HERBERT, 1984). Eles permanecem viáveis como larvas encapsuladas por meses ou anos e, nesse estágio, podem continuar seu ciclo de vida se o hospedeiro paratênico for consumido como presa por um hospedeiro definitivo (STURBE *et al.*, 2013).

A infecção humana ocorre pela ingestão acidental de ovos embrionados presente em solos contaminados ou contato direto com cães e gatos, ou ingestão de larvas presentes em carne crua ou mal cozida de uma variedade de hospedeiros paratênicos, como: coelho (STURCHLER *et al.*, 1990), ovino (ALDAWEK *et al.*, 2002; SANTARÉM *et al.*, 2011), suíno (FAN *et al.*, 2004); frango (MORAMATSU *et al.*, 2006) e bovino (ESPAÑA *et al.*, 1993; YOSHIKAWA *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2011; YOSHIKAWA *et al.*, 2011). No hospedeiro acidental, o *T. canis* não chega na sua fase adulta no intestino, ao invés disso, os ovos eclodem no duodeno dentro de 2 a 4 h e as larvas liberadas atravessam a parede intestinal e estabelecem-se nos tecidos, podendo invadir órgãos como o fígado, pulmões, olhos ou cérebro (MATA-SANTOS *et al.*, 2015). Esta migração pode gerar lesão nas paredes dos vasos, podendo ocorrer hemorragias, necrose e processos inflamatórios no hospedeiro infectado, que podem resultar no encapsulamento fibroso das larvas no tecido acometido (MACPHERSON, 2013).

### **3.2 Toxocaríase**

Os sintomas clínicos da toxocaríase humana são causados pela migração da larva L3 de *Toxocara* spp. através da corrente sanguínea para o interior de órgãos, incluindo músculo, fígado, cérebro e olhos. Entre os múltiplos quadros clínicos que produz a toxocaríase, salientam-se manifestações alérgicas, hipereosinofilia, fraqueza crônica e dor abdominal (LI *et al.*, 2014; GYANG *et al.*, 2015). É também caracterizada por ser uma

síndrome que pode apresentar gravidade variável de acordo com o órgão acometido (ZIBAEI & SADJJADI, 2017; MENDONÇA *et al.*, 2013; OTHMAN *et al.*, 2013). As migrações das larvas podem ser assintomáticas ou pode conduzir uma ampla variedade de sintomas, dependendo além do órgão acometido, da duração da migração, intensidade da infecção, idade e resposta imunológica do hospedeiro (DESPOMMIER, 2003). As apresentações mais comuns da toxocaríase são: a forma visceral (larva migrans visceral - LMV) ou forma clássica, marcada pelo comprometimento hepático e pulmonar, a toxocaríase ocular (larva migrans ocular – LMO), considerada uma das causas mais frequentes de cegueira em crianças e também a toxocaríase neurológica (FAN *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 2009; ROSTAMI *et al.*, 2019). A maioria das infecções causadas pelo *Toxocara* são assintomáticas, podendo chegar a 44,4% (ALTCHEH *et al.*, 2003), enquanto a toxocaríase sistêmica manifesta-se em torno de 15,5% dos casos diagnosticados (LOEZ *et al.*, 2005).

A toxocaríase ocular ocorre principalmente em pacientes jovens e acomete homens e mulheres com frequência semelhante (ZINKHAM, 1978). Tem maior incidência em crianças de 5 a 10 anos, com danos à visão unilateral e acompanhados de estrabismo intermitente, granuloma e deslocamento de retina, causado pela migração da larva L3 de *T. canis* no olho e reações imunológicas resultantes (AREVALO *et al.*, 2013). A apresentação clínica varia desde granuloma na periferia da retina, em 50% do olho acometido, 25% na mácula, e outros 25% têm endoftalmite. Um granuloma pode também ocorrer no nervo óptico. Os sinais clínicos mais comuns e os maiores causadores de perda de visão são inflamação vítrea, edema macular cistoide e tração de filamentos vítreo-retinianos em direção ao nervo óptico e/ou um granuloma (STEWART *et al.*, 2005). Infecções em longo prazo por *Toxocara* spp. podem levar até mesmo a uma corioretinite da membrana neovascular coroidal (DESPOMMIER, 2003; CDC, 2011). Os mecanismos patogênicos da LMV e da larva *migrans* ocular (LMO) são diferentes. Quantidades menores de larvas de *Toxocara* estão associadas à maior probabilidade de LMO do que LMV (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981), o que pode explicar por que títulos de anticorpos de *Toxocara* são geralmente mais baixos nos casos de LMO do que nos de LMV (ABE-JACOB & OSELKA, 1991).

Já os locais de invasão do SNC pelas larvas de *Toxocara* (Toxocaríase neurológica) incluem o cérebro e a medula espinhal. Esta é uma das formas não muito frequentes de infecção por este parasito, que é influenciada por alguns fatores, como fatores genéticos do

hospedeiro, número de ovos ingeridos e exposição anterior, os quais contribuem para a patogênese complexa da neurotoxocaríase (FAN *et al.*, 2013). Adicionalmente, a presença de apenas uma larva no cérebro humano caracteriza a neurotoxocaríase, podendo não ocasionar sintomatologia perceptível (HOLLAND, 2017) ou causar sintomas como: confusão mental, febre, dor de cabeça, taquicardia, hiperreflexia, dispnéia, letargia, irritabilidade, fraqueza motora e rigidez nuchal. A função cognitiva de crianças infectadas pode ser alterada. Anticorpos imunoglobulina G (IgG) específicos para *Toxocara* foram detectados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de crianças. A maioria dos sintomas diminui em resposta ao tratamento com albendazol e corticosteroides (WALSH *et al.*, 2012).

A síndrome LMV foi descrita por Beaver *et al.*, em 1952, como forma sistêmica grave. A toxocaríase visceral pode acometer diversos órgãos e tecidos, incluindo fígado, pulmões, coração, encéfalo, dentre outros. Alguns sintomas que podem ocorrer é: febre, palidez, mal-estar, hepatoesplenomegalia, distúrbios respiratórios (TONELLI, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007; BEDE *et al.*, 2008) e nervosos (MAIGA *et al.*, 2007; NICOLETTI *et al.*, 2007; HELBOK *et al.*, 2007), irritabilidade, perda de peso, erupção cutânea, miocardite, leucocitose, eosinofilia e ocasionalmente, urticária (SMITH *et al.*, 2009; MORII *et al.*, 2015). Entre as possíveis consequências de eosinofilia prolongada e grave estão a fibrose pulmonar e a fibrose miocárdica eosinofílica (KENDELL *et al.*, 1995; LUZNA-LYSKOV, 2000). A toxocaríase visceral é a mais comum diagnosticada em crianças menores de oito anos de idade, e está associada com a alta intensidade ou repetidas infecções larvais por *T. canis*, as quais podem persistir por semanas ou meses (DESPOMMIER, 2003).

### **3.3 Resposta imune no hospedeiro contra infecções por helmintos**

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção de um parasito é dinâmica, constantemente este desenvolve uma resposta imune na tentativa de controlar a infecção (LOUKAS *et al.*, 2001). Nesse sentido, é vantajoso para o hospedeiro produzir uma resposta imune que controla o parasito, mas limita o dano a si próprio e preserva a capacidade de responder efetivamente a outros patógenos. De outro modo, é vantajoso, do ponto de vista do parasito, manter o hospedeiro vivo por tempo suficiente para concluir seu ciclo de vida, possivelmente suprimindo a resposta imune do hospedeiro ou subvertendo-o

para produzir uma resposta ineficaz (JANKOVIC *et al.*, 2001). É uma característica dos helmintos regular a imunidade do hospedeiro não somente em seu favor, mas em busca de um ambiente mutuamente benéfico para a sobrevivência de ambos - parasito e hospedeiro. Muitas das infecções causadas por helmintos têm sido associadas a alterações na resposta a vacinas, alergias, doenças autoimunes, modulação de reações inflamatórias nos pulmões e asma (PINELLI, *et al.*, 2006; MOREAU & CHAUVIN, 2010). Dessa forma, a importância da infecção por helmintos inclui não somente o efeito patogênico do parasito, mas também o efeito modulatório sobre o sistema imune, o qual pode alterar a resposta contra outros antígenos e causar patologias adicionais (WENG *et al.*, 2007; MENEGON *et al.*, 2020).

O modelo de equilíbrio da imunidade baseia-se na ideia de que o sistema imunológico nunca está em repouso, mas sim em um equilíbrio dinâmico entre os tipos de respostas imunes (HAMMAD & LAMBRECHT, 2015). As células TCD4+, também chamadas de linfócitos T helper naive, sofrem polarização para diferentes padrões de células T helper (Th), adquirindo diversas funções efetoras e assim direcionam o perfil das respostas imunológicas. Th1 e Th2 foram os primeiros perfis a serem descritos na literatura. Após, teve a identificação de células T efetoras Th17, T reguladoras (Tregs), Th9 e Th22. Devido aos estímulos antigênicos as células TCD4+ expressam fatores de transcrição, que determinam vias de sinalização específicas, responsáveis pela produção de interleucinas para cada um destes padrões de células T. A diferenciação para um tipo particular de células T efetoras é diretamente dependente das interleucinas disponíveis no microambiente no qual uma célula TCD4+ naive é exposta (YAMANE & PAUL, 2013). Um padrão importante na resposta imune a patógenos intracelulares, como vírus, bactérias e parasitos, com a produção de IL12 e IFN- $\gamma$  é a resposta Th1, sendo a Th2 atuante na resposta especialmente contra parasitas extracelulares em função da produção de IL4, IL5 e IL6 (HOE *et al.*, 2017).

Os primeiros indícios da existência de uma polarização de resposta, diferente das já conhecidas, Th1 e Th2, apareceram em meados da década de 90, com a descoberta da IL 17a. Os linfócitos TCD4+ ativados que produzem IL17 ficaram denominados de Th17. Este padrão exerce papel fundamental no controle da microbiota intestinal e também na defesa contra antígenos extracelulares como bactérias e fungos (MADDUR *et al.*, 2012). Um outro subtipo de células T com capacidade para secretar, especialmente, grandes quantidades de IL9, foi caracterizado como células Th9. Para a diferenciação dessas células é

necessário a integração das vias de sinalização de IL4, responsável por amplificar sua produção, estímulo do TGF- $\beta$  e a participação coordenada de múltiplos fatores de transcrição. A IL9, uma citocina produzida por linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), eosinófilos e por mastócitos, é responsável por estimular a proliferação e crescimento de outros mastócitos, eosinófilos e linfócitos T e prevenir a apoptose destas células. Atua através do receptor de interleucina-9 (CD129 ou IL9R) ativando um "transdutor e ativador de sinais diferentes" (STAT). O seu papel tem sido importante na imunidade contra parasitos e em processos inflamatórios, podendo aumentar respostas imunitárias, mas também pode causar alergia e doenças auto-imunes (ROJAS-ZULETA & SANCHEZ, 2017). A resposta Th22, com a IL22, também estaria provavelmente envolvida na patofisiologia de doenças autoimunes (ZHANG *et al.*, 2011; JABEEN & KAPLAN, 2012).

Além das células Th9, dos mastócitos e eosinófilos, outros tipos de células, como as células linfoides inatas (ILCs) e células NKT, também podem produzir IL9, no entanto ainda não foram identificados os mecanismos que levam a esta produção seja em condições fisiológicas ou patológicas (SUN & ZHANG, 2014). A IL9 tem como função celular, atuar como fator de crescimento para mastócitos e potencializar a produção de citocinas por estas células (WIENER, FALUS & TOTH, 2004). Nos linfócitos B esta citocina induz a produção de IgG e IgE, sendo demonstrado também que ela é capaz de induzir produção de muco por células epiteliais pulmonares e expressão do receptor de IL5 em eosinófilos (LOUAHED *et al.* 2000; LOUAHED, 2001).

Os helmintos são parasitos eucarióticos multicelulares que infectam mais de um quarto da população mundial (WHO, 2013). Além disso, quase metade da população mundial é cronicamente infectada por helmintos ou tem doenças alérgicas, conferindo uma prevalência da resposta imune do tipo 2. Através da coevolução com o sistema imunológico humano, esses organismos adaptaram-se às vias imunorregulatórias, resultando em tolerância assintomática às infecções em muitos indivíduos. Quando infecções e as respostas imunes resultantes se tornam desreguladas, não estando em equilíbrio, as patologias agudas e crônicas geralmente se desenvolvem (WHO, 2013).

A defesa contra muitas infecções helmínticas é mediada por células do tipo 2 (Th2) rica em eosinófilos, basófilos, mastócitos, células T helper 2 (Th2) / CD4+ e as células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s), além de resultar na produção de anticorpos IgE. Essas células protegem o hospedeiro da infecção por helmintos, mas também causam doenças

alérgicas crônicas como asma e dermatite atópica (HAMMAD & LAMBRECHT, 2015). As ações combinadas de mastócitos e eosinófilos levam à expulsão e destruição dos parasitos. A maioria das infecções parasitárias é crônica devido à fraca imunidade inata e à capacidade dos parasitos de escapar ou resistir à eliminação pela resposta imune adaptativa. Os parasitos evitam o sistema imunológico variando seus antígenos durante a residência em hospedeiros vertebrados, adquirindo resistência aos mecanismos efetores do sistema imunológico e mascarando e eliminando seus antígenos de superfície (GAZZINELLI-GUIMARAES *et al.*, 2018).

Embora a resposta predominante seja de natureza Th2, um grande componente regulador envolvendo citocinas reguladoras e células também fazem parte desse repertório. A resposta Th2 induzida por helmintos é bastante conhecida e caracterizada, mas seu início, progressão e culminação exigem interação com muitos tipos diferentes de células (MISHRA *et al.*, 2014). Assim, os helmintos são frequentemente expulsos do hospedeiro por meio de uma resposta Th2, tipificada por secreção elevada de IL3, IL4, IL5 e IL13, imunoglobulina E (IgE), além de anticorpos IgG1 e IgG4 (ALLEN *et al.*, 2011). Também fazem parte desse tipo de resposta populações expandidas de eosinófilos, basófilos, mastócitos, células linfoides inatas do tipo 2 e macrófagos ativados alternativamente (M2) (MAIZELS *et al.*, 2018).

A IL4 permite a troca de classe de isotipo nos linfócitos B, resultando na produção de IgE específica para parasitos ou alérgenos, ativando mastócitos efetores e basófilos que carregam o receptor de IgE de alta afinidade Fc $\epsilon$ RI. A IL4 e IL5 estão implicadas em reações cruzadas entre células B e eosinófilos, gerando desgranulação de mastócitos, basófilos e eosinófilos. Acredita-se que essa cascata seja responsável pela expulsão do parasito (MACDONALD *et al.*, 2002; MAIZELS *et al.*, 2018). A IL5 é responsável pela produção e ativação de eosinófilos na medula óssea e nos tecidos. A IL13 (e em menor grau a IL4) causa hiper-reatividade do músculo liso, metaplasia das células caliciformes, hipersecreção de muco e diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (ZAISS *et al.*, 2015).

Ao passo que gerar uma resposta Th2 para infecções por parasitos é essencial, controlar essa resposta é igualmente imperativo (MCSORLEY *et al.*, 2012). Parte desse controle é fornecido pelos linfócitos Treg. Neste modelo, o próprio parasito promove a diferenciação dos linfócitos Treg das células T CD4+ virgens, que se liga aos receptores TGF- $\beta$  dos hospedeiros. A inibição dessa interação *in vivo* diminui a intensidade da

infecção, presumivelmente como resultado de respostas Th2 mais efetivas, ilustrando a vantagem evolutiva dessa via para o parasito (MCSORLEY *et al.*, 2012).

O bloqueio terapêutico da imunidade do tipo 2 tem o potencial de desregular importantes mecanismos de regulação cruzada, levando à inflamação prejudicial do tipo 1. Estratégias de bloqueio duplo visando componentes-chave da imunidade tipo 1 e tipo 2 simultaneamente podem auxiliar nesse processo (WYNN & VANELLA, 2016). A terapêutica que bloqueia a fibrose guiada por tipo 2 deve evitar a redução das funções regenerativas teciduais críticas da IL4 e IL13. Foi demonstrado que essas citocinas facilitam diretamente o reparo tecidual, ativando populações de células progenitoras teciduais e visando a proliferação de várias populações de células epiteliais (VAN DYKEN & LOCKSLEY, 2013).

Os sinais que induzem respostas imunes de tipo 1 incluem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que comunicam a presença de um agente infeccioso ao sistema imunitário (MILLS, 2011). Os sinais que induzem a imunidade do tipo 2 são fundamentalmente diferentes e não são tão bem compreendidos. Sugere-se que o dano tecidual, na ausência de PAMPs que promovem uma resposta imune de tipo 1, seja um potente mecanismo que impulse a imunidade do tipo 2, particularmente no contexto da infecção por helmintos (GAUSE, WYNN & ALLEN, 2013). Quase todos os tipos de células que estão associados com imunidade a infecções por helmintos também estão implicados na reparação de tecidos. Estas células como já mencionadas, incluem células T, eosinófilos, macrófagos M2 e ILC2 (FAZ-LÓPEZ, MORALES-MONTOR & TERRAZAS, 2016).

Hipótese amplamente aceita para a função de mediadores envolvidos na resposta Th2 modificada contra helmintos é que PAMPs de helmintos podem estimular células dendríticas com tendência a células Th1 em Th2 ou subconjuntos de células T reguladoras (Treg). As células Th2 produzem uma variedade de citocinas que conduzem respostas efetoras, incluindo: respostas eosinofílica, as respostas de mastócitos, células B, aumento na permeabilidade intestinal, contração do músculo liso, a produção de muco intestinal e a diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (aaM $\phi$ ). Linfócitos Treg, induzidos paralelamente, produzem citocinas supressoras como IL10 e TGF- $\beta$  e amenizam os níveis de ativação imunológica inata e adaptativa (JACKSON, 2008)

Os macrófagos são uma característica fundamental do tecido cronicamente inflamado. No decurso da inflamação em longo prazo, o fenótipo macrófago desloca-se

frequentemente de um estado altamente microbicida para uma via de "ativação alternativa" à medida que o perfil de citocinas das células T desloca do tipo 1 para o tipo 2 (GORDON, 2003). No caso da infecção por helmintos ou alergia, a resposta do tipo 2 pode dominar desde o início.

Macrófagos M1 e macrófagos M2 estão associados a diversas doenças. M1 exercem importante função no controle de várias infecções bacterianas (EHRT *et al.*, 2001; QUIDING-JARBRINK, RAGHAVAN E SUNDQUIST, 2010). Já macrófagos M2 estão bem descritos principalmente em infecções causadas por parasitos, principalmente helmintos (SATOH *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2014), e em tumores malignos (XIAO *et al.*, 2014). A polarização dessas células parece ser simples, mas é mais complexa no organismo. Alguns estudos já sugeriram a participação das duas populações de macrófagos na mesma doença, como na hanseníase, que pode haver ativação de respostas tanto Th1 como Th2 (MÉGE, MEHRAJ & CAPO, 2011). Além disso, a plasticidade e a capacidade reversível dos macrófagos sugerem que esse processo é dinâmico e que as duas populações podem ser observadas tanto em fases de indução da inflamação como de resolução (PORCHERAY *et al.*, 2005)

A diferenciação dos macrófagos M2 é principalmente dependente das citocinas Th2, IL4 e IL13. Os macrófagos M2 produzem caracteristicamente moléculas semelhante a resistina  $\alpha$  (RELM  $\alpha$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), arginase 1, YM1, Fizz1, receptor desencadeante expresso nas células mieloides 2 (TREM2), TGF $\beta$  e fatores de crescimento tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), todos os quais estão intimamente associados com as ações de reparação tecidual (WYNN & RAMALINGAM, 2012). Os aumentos nos níveis desses mediadores também foram observados durante a infecção por helmintos (LOKE *et al.*, 2007; SANDLER *et al.*, 2003), o que sugerindo que estes podem contribuir para o controle da lesão tecidual induzida pelo parasito.

Sendo assim, a resposta Th2 induzida por helmintos promove a reparação de tecidos por suprimir o eixo pró-inflamatória que é mediado por macrófagos M1, células Th1 e Th17, o que poderia agravar ainda mais a lesão tecidual gerada pelos helmintos caso não for controlada rapidamente. Os macrófagos M2 e as células Th2 produtoras de IL10 demonstraram ter papéis importantes na supressão deste eixo pro-inflamatório e também podem controlar as respostas imunitárias de tipo 2 potencialmente nocivas (GAUSE, WYNN

& ALLEN, 2013). Após vários estudos descobriu-se que os macrófagos ativados pelas citocinas de tipo 2 *in vivo* produzem altos níveis da proteína Ym1 (FALCONE *et al.*, 2001; WELCH *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2001).

YM1 é membro de uma família de proteínas de mamíferos que compartilham homologia com quitinases de organismos inferiores (JIN *et al.*, 1998). O papel do YM1 ainda está sendo estudado, originalmente foi descrito como um fator de eosinófilos quimiotático (OWHASHI, ARITA & NIWA, 1998), mas essa propriedade ainda não está clara. Em estudos posteriores foi proposto um papel do Ym1 na deposição de matriz extracelular durante o processo de cicatrização de feridas (SUN *et al.*, 2001). O alto nível de YM1 é consistente com o papel dos macrófagos ativados pelas citocinas da resposta Th2 no reparo tecidual (HESSE *et al.*, 2001; SANDLER *et al.*, 2003).

### **3.4 Resposta contra infecção por *Toxocara canis***

No início da infecção ocorre inflamação aguda que se caracteriza por agregados de eosinófilos, neutrófilos e alguns monócitos, e as larvas são rodeadas parcialmente por uma cápsula de colágeno. Já em infecções crônicas, as larvas são geralmente encapsuladas por granulomas maduros com centro de células mononucleadas e leucócitos (CANCRINI *et al.*, 1998). A formação de granulomas é considerada uma manifestação de hipersensibilidade tipo tardia (Th<sub>1</sub>), enquanto que IgE e eosinofilia são características de respostas mediadas por Th2 (KAYES, 1997). A maior resposta do hospedeiro aos antígenos inclui eosinofilia marcante e hiperglobulinemia. Os anticorpos IgE e os eosinófilos são manifestações de Th2 de células T helper e das citocinas que elas secretam. E ainda há evidências que os antígenos liberados da larva de *T. canis* favorecem a indução dessa população de células. Sabe-se que a produção crônica de antígenos parasitários, estimulação contínua do sistema imune do hospedeiro e uma concomitante produção de eosinófilos podem deixar complicações sistêmicas. O fígado é um dos locais mais comuns para essas lesões devido à drenagem portal dos órgãos (RAYES & LAMBERTUCCI 1999)

Em seres humanos a toxocaríase raramente é fatal, mas as respostas inflamatórias devido à migração das larvas geralmente são associadas com linfadenopatia generalizada, hepatite granulomatosa, endomiocardite, endoftalmite, asma e leucocitose, incluindo alta

eosinofilia. As infecções são geralmente autolimitadas e as larvas ficam encapsuladas na musculatura e no fígado, e assim os sintomas desaparecem. As síndromes da infecção por *Toxocara* spp. são relacionadas com a migração das larvas e da resposta imune do hospedeiro em relação a isso. A morte das larvas de *T. canis* gera consequências patológicas ao hospedeiro e, a morte destas nos tecidos desencadeia o início das respostas de hipersensibilidade do tipo imediata e tardia (DESPOMMIER, 2003).

*Toxocara canis* possui habilidades para sobreviver por muitos anos nos tecidos de diversas espécies de vertebrados, bem como para se desenvolver até a maturidade no trato intestinal de seu hospedeiro definitivo (NICHOLS, 1956). A sobrevivência a longo prazo das larvas de *T. canis* podem ser atribuída a duas estratégias moleculares desenvolvidas pelo parasito. Em primeiro lugar, as larvas liberam quantidades de substâncias de excreção-secreção, que incluem lectinas, mucinas e enzimas que interagem e modulam a imunidade do hospedeiro. A segunda estratégia é a elaboração de uma camada superficial frouxamente ligada na epicutícula do parasito, rica em mucina especializada, que permite uma fuga rápida quando os anticorpos e as células do hospedeiro aderem, resultando em uma reação inflamatória em torno de um foco recém-desocupado (MAIZELS, 2013; DLUGOSZ *et al.*, 2015).

Durante a migração das larvas de *T. canis* no hospedeiro, fase aguda da toxocaríase, o antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES) é depositado nos tecidos e, na fase crônica, o antígeno é encontrado no granuloma em torno da larva ou na camada mais interna do granuloma sem a presença do parasito (PARSONS *et al.*, 1986). Esses antígenos são glicoproteínas altamente antigênicas e responsáveis pelo desenvolvimento de resposta inflamatória no hospedeiro (GÓNZALEZ *et al.*, 2000), sendo as principais: TES-32, TES-55, TES70, TES-120 e TES-400 (MAIZELS *et al.*, 1984). Essas proteínas ativam a resposta imune e originam mecanismos imunopatogênicos que contribuem para o surgimento das formas clínicas da doença (PAWLOWSKI, 2001).

Após a infecção, ocorre a produção de anticorpos e ativação de células efetoras que se ligam aos antígenos TES presentes na cutícula da larva. Entretanto, para escapar desse ataque do hospedeiro a larva altera sua cutícula e produz uma nova com epítomos diferentes, induzindo o sistema imune reorganizar a resposta contra o parasito (GEMS & MAIZELS, 1996). O antígeno TES pode ativar uma variedade de células do sistema imune, tais como: células dendríticas, linfócitos T CD4+ e CD8+, células natural killer (NK) e

linfócitos Treg, conduzindo a modulação do sistema imune do hospedeiro (KAYES *et al.*, 1997; PINELLI *et al.* 2007; HAMILTON *et al.*, 2008).

Havendo imunossupressão do hospedeiro, ocorre depressão da resposta imune celular e diminuição da formação de granulomas, favorecendo a sobrevivência das larvas de *T. canis* (TORINA *et al.*, 2005). Rayes e Lambertucci (1999), após estudo experimental em modelo murino, relatam que a presença de larvas de *T. canis* nos órgãos induz a formação de granuloma que favorece a aderência e a multiplicação de bactérias, as alterações imunológicas induzidas pelas larvas levam a um estado de imunodeficiência, permitindo a disseminação das bactérias e a instalação das mesmas em vários órgãos.

Durante a infecção por *T. canis*, existe predominância de uma resposta imune Th2, caracterizada pela produção de IL4, IL5, IL13 e subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgE, bem como um aumento de eosinófilos no sangue periférico, pulmão e fígado (PINELLI *et al.*, 2007). Por outro lado, a produção de linfócitos Th1 é suprimida durante a infecção por *T. canis* e as produções de IL12 e TNF- $\alpha$ , importantes citocinas envolvidas no recrutamento celular, encontram-se reduzidas em macrófagos de animais infectados (KURODA *et al.*, 2001). A supressão de linfócitos Th1, associada à redução de IL-12, é uma característica imunomodulatória do nematódeo *T. canis*, que dificulta o recrutamento de macrófagos para os locais de infecção e a morte parasitária (KURODA *et al.*, 2001). Segundo Pinelli *et al.* (2007) e Hamilton *et al.* (2008), a modulação da resposta imune mediada por *T. canis* é complexa dependendo do período de infecção, do órgão parasitado, dose infectante e também do modelo experimental utilizado. Para que se possa ter uma visão mais completa da resposta imune na toxocaríase, é necessário que se avaliem tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias (HOLLAND & HAMILTON, 2013). A resistência à infecção e a eliminação dos helmintos não depende somente de uma célula em particular ou um único mecanismo molecular, múltiplas vias estão envolvidas na degradação e eliminação parasitária (MAIZELS *et al.*, 2012).

Em experimentos realizados com camundongos Balb/c e NIH, infectados por *T. canis*, foram relatados diferentes tipos de resposta imune ativadas, podendo haver uma resposta imune mista com elevação na expressão das citocinas IL5, IL10 e IFN $\gamma$ , sem predomínio de linfócitos Th1 ou Th2 (HAMILTON *et al.*, 2008), podendo ocorrer também ativação de uma resposta predominantemente Th2, com níveis elevados de IL4 (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2019) ou com indução de uma resposta mista, resposta inflamatória inata/ Th17/Th2,

com aumentos significativos de citocinas como: IL4, IL5, IL13 e IL33, e níveis crescentes de IL6 e IL17 (REZENDE *et al.*, 2015). Além de uma resposta imune Th2 dominante durante a infecção por *T. canis*, a migração das larvas resulta em inflamação pulmonar crônica, que independe do tamanho do inóculo utilizado na infecção experimental (PINELLI *et al.*, 2007). A resposta imune durante a neurotoxocaríase, caracteriza-se por ser uma resposta predominantemente anti-inflamatória, fazendo com que ocorra a sobrevivência do parasito e do hospedeiro infectado (WAINDOK *et al.*, 2019).

## **4. Manuscritos**

### **4.1 Manuscrito 1**

**Artigo Submetido à Revista Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research- BJSCR**

Normas da revista disponíveis em:

⟨[https://www.mastereditora.com.br/máster\\_editora-37-251](https://www.mastereditora.com.br/máster_editora-37-251)⟩. Acesso em novembro de 2020.

# AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA TH2 EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *TOXOCARA CANIS*

EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATION MECHANISM OF THE TH2 RESPONSE  
IN MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *TOXOCARA CANIS*

JÉSSICA LOPES BORCHARDT<sup>1\*</sup>, ALICE CORREA SANTOS<sup>2</sup>, GULHERME BORGES WEEGE<sup>3</sup>,  
MICAEL QUINTANA DE MOURA<sup>4</sup>, WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO<sup>5</sup>, MARIA ELISABETH  
AIRES BERNE<sup>6</sup>, FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>7</sup>

1 - Bióloga, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 2- Veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas. 3 - Biotecnologista, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 4 - Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 5 - Biólogo, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 6- Veterinária, Docente na Universidade Federal de Pelotas. 7 - Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Docente na Universidade Federal de Pelotas.

\* Travessa Andre Dreyfuss, Universidade Federal de Pelotas, Campus: Capão do Leão – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório 11, S/N, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, ZIP CODE: 96010-900. [lopesborchardt@gmail.com](mailto:lopesborchardt@gmail.com)

## RESUMO

A toxocaríase é considerada uma das helmintoses mais prevalentes no mundo, caracterizada pela migração e permanência de larvas de *T. canis* em tecidos de hospedeiros acidentais. Durante a infecção por *T. canis* ocorre o predomínio da resposta imune Th2 e a supressão da produção de linfócitos Th1. O objetivo do trabalho foi avaliar a modulação imunológica em esplenócitos mediada pela infecção com larvas de *T. canis* em camundongos Balb/c. Através do teste de ELISA indireto foi avaliado o perfil e níveis de imunoglobulinas produzidas no soro de camundongos após a infecção com 100 larvas e por meio do qPCR foi avaliado os níveis de transcrição do mRNA das citocinas *IL4*, *IL10*, *IL12* e da proteína *YMI* (*chitinase-like protein-3*) nos esplenócitos de animais infectados com lavas de *T. canis*. A infecção com larvas de *T. canis* foi capaz de gerar um nível significativo de IgG total específica aos 15 e 30 dias pós-infecção (p.i) com níveis de absorvância significativos ( $p < 0,05$ ). Analisando os soros dos animais infectados estes apresentaram diferenciação de classe dos isotipos: IgG1, IgG2a,

IgG2b e IgG3 em níveis significativos ( $p < 0,05$ ), sendo que a imunoglobulina IgG1 se destacou em níveis de absorvância superiores ( $p < 0,05$ ). Ao avaliar a transcrição gênica gerada após a infecção, foram detectados níveis de *IL4*, *IL10*, *IL12* e *YMI* ( $p < 0,05$ ). Neste estudo a infecção com as larvas mantiveram maiores níveis da transcrição gênica para *IL4* e *YMI* durante fase crônica. Os níveis de *IL10* estiveram elevados na fase aguda da infecção e os níveis de *IL12* suprimidos em todos os períodos avaliados. Concluímos que a infecção com 100 larvas L3 de *T. canis* em camundongos BALB/c gerou a ativação de resposta imune Th2, na qual a razão de IgG2a/IgG1 obtida de 0,320 e 0,409, sugere que este foi o padrão de resposta imune que esteve predominante durante o período analisado da infecção experimental. Por meio da detecção da transcrição de níveis significativos de *IL4* e *IL10*, sugere-se que durante a infecção experimental com *T. canis* ocorreram à diferenciação de células do sistema imune em macrófagos alternativamente ativados (M2), e por consequência a transcrição por essas células de níveis significativos ( $p < 0,05$ ) do gene *YMI* e supressão de *IL12* nos esplenócitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxocara canis*; *IL4*; *IL10*; *YMI*.

**KEYWORDS:** *Toxocara canis*; *IL4*; *IL10*; *YMI*.

## ABSTRACT

Toxocariasis is considered one of the most prevalent helminths in the world, characterized by the migration and permanence of *T. canis* larvae in tissues of accidental hosts. During *T. canis* infection, the Th2 immune response predominates and the production of Th1 lymphocytes is suppressed. The objective of the work was to evaluate the immunological modulation in splenocytes mediated by infection with *T. canis* larvae in Balb / c mice. Through the indirect ELISA test, the profile and levels of immunoglobulins produced in the serum of mice after infection with 100 larvae were evaluated and, using qPCR, the levels of mRNA transcription of cytokines *IL4*, *IL10*, *IL12* and *YMI* protein were evaluated ( chitinase-like protein-3) in the splenocytes of animals infected with *T. canis* lavas. Infection with *T. canis* larvae was able to generate a significant level of specific total IgG at 15 and 30 days post-infection (p.i) with significant absorbance levels ( $p < 0.05$ ). Analyzing the sera of the infected animals, they showed class differentiation of the isotypes: IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 at significant levels ( $p < 0.05$ ), with IgG1 immunoglobulin standing out at higher absorbance levels ( $p < 0.05$ ). When evaluating the gene transcription generated after infection, levels of *IL4*, *IL10*, *IL12* and *YMI* were detected ( $p < 0.05$ ). In this study, infection with the larvae maintained higher levels of gene transcription for *IL4* and *YMI* during the chronic phase. *IL10* levels were elevated in the acute phase of infection and *IL12* levels were suppressed in all evaluated periods. We concluded that infection with 100 *T. canis* L3 larvae in BALB / c mice generated the activation of the Th2 immune response, in which the IgG2a / IgG1 ratio obtained of 0.320 and 0.409, suggests that this was the pattern of immune response that was predominant during the analyzed period of the experimental infection. By detecting the transcription of significant levels of *IL4* and *IL10*, it is suggested that during the experimental infection with *T. canis* the differentiation of cells of the immune system occurred into alternatively activated macrophages (M2), and consequently the transcription by these cells significant levels ( $p < 0.05$ ) of the *YMI* gene and suppression of *IL12* in splenocytes.

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção ocasionada pelo nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães, está entre as zoonoses mais difundidas em todo o mundo, possuindo elevada prevalência em países em desenvolvimento (RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010; NÚÑEZ *et al.*, 2013). E estando também presente em países desenvolvidos. (LEE *et al.*, 2014; WALSH & HASEEB, 2014). Essa infecção é conhecida como toxocaríase (MENDONÇA *et al.*, 2012). A toxocaríase humana ocorre pela ingestão de ovos embrionados de *Toxocara canis* contendo a larva L3, através do consumo de água, alimentos não higienizados (VIEIRA *et al.*, 2013), contato direto com cães e gatos (NÚÑEZ *et al.*, 2013), e por consumo de carne mal cozida (OVERGAAW & KNAPEN, 2013; DUTRA *et al.*, 2013).

Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, nestes, após a inoculação, as larvas não evoluem até seu estágio adulto e também não ocorre a migração desta para o intestino delgado, como ocorre em hospedeiros definitivos. Contudo, as larvas permanecer viáveis, encapsuladas, durante meses ou anos (DESPOMMIER, 2003; RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010), podendo atingir vários órgãos (CHEN *et al.*, 2012, SMITH *et al.*, 2009). A defesa contra infecções helmínticas é mediada pela ativação das células Th2, que resulta na produção de anticorpos IgE e na ativação de eosinófilos e mastócitos, assim como a secreção elevada de *IL3*, *IL4*, *IL5* e *IL13*, além de imunoglobulinas IgG1 e IgG4 (ALLEN *et al.*, 2011, MAIZELS *et al.*, 2018).

Compreender as alterações imunológicas que ocorrem no organismo durante a invasão pelo *T. canis* é de suma importância, pois a partir do entendimento de como este helminto modula a imunidade e se instala no hospedeiro que permitirá o desenvolvimento de uma proteção imunológica contra ele (MAIZELS *et al.*, 2013). O objetivo do presente estudo foi avaliar mecanismos da modulação envolvidos na resposta imune em esplenócitos de camundongos infectados com *Toxocara canis* durante diferentes períodos de infecção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 50 camundongos BALB/c, fêmeas, com 28 dias, providas do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada  $22 (\pm 2^\circ\text{C})$  e ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), tendo ração (sem adição de antibióticos e antifúngicos) e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA - 4840).

### **Delineamento experimental**

A infecção experimental foi realizada pela administração oral de 100 larvas (L3) de *T. canis*, por camundongo. O método de infecção foi através da sonda intragástrica (AVILA *et al.*, 2012). Neste trabalho cinco grupos contendo 10 camundongos cada, foram infectados com 100 larvas infectantes (L3). Os grupos experimentais foram submetidos a eutanásia em períodos diferenciados: grupo 1 após 24 h de infecção, o grupo 2 após 48 h de infecção, grupo 3 no 15º dia de infecção e grupo 4 no 30º dia de infecção. O grupo 5, foi o grupo controle, o qual não sofreu infecção. Foi avaliado a produção de IgG total e isotipos de imunoglobulinas através da análise dos soros dos camundongos após a coleta de sangue pelo plexo retro-orbital. Foi avaliado também a transcrição gênica de *IL4*, *IL10*, *IL12* e da proteína *YMI* após a infecção experimental com 100 larvas, no período de 24 h, 48 h, 15 e 30 dias nos esplenócitos. A recuperação das larvas de *T. canis* foi realizada através da técnica de digestão tecidual do fígado (XI & JIN, 1998).

### **Obtenção de formas adultas de *T. canis* e histerectomia**

Cães com idade entre quatro e oito semanas foram tratados com pamoato de pirantel (15 mg/Kg) para a eliminação nas fezes de formas adultas de *T. canis*. Após, foi feita a sexagem, identificação específica das formas adultas e histerectomia para coleta dos ovos. Os ovos de *T. canis* foram incubados em formalina 2%, a  $28^\circ\text{C}$ , com umidade relativa acima de 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias, até o embrionamento dos ovos e observada a motilidade das larvas no interior dos ovos embrionados (L3) (AVILA *et al.*, 2012). Os ovos foram mantidos sob refrigeração até o momento da inoculação.

### **Extração e cultivo de larvas de *T. canis***

Uma parcela dos ovos embrionados foi lavada em Solução salina fosfatada (PBS) e centrifugados em

centrífuga 5804 R (Eppendorf™) por sete vezes a  $1200 \times g / 5$  minutos, para remoção da formalina. Em seguida foi adicionado solução de hipoclorito de sódio 6% (PA), durante 15 minutos para remoção das duas camadas mais externas dos ovos, a camada proteica e quitinosa. A seguir foram realizadas lavagens em PBS e centrifugações a  $1200 \times g / 5$  minutos até a remoção completa do hipoclorito de sódio.

Posteriormente os ovos foram submetidos à agitação manual em Erlenmeyer com pérolas de vidro e meio RPMI-1640/MERCK (suplementado com HEPES 25mM, Glicose a 1%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, ofloxacina 0,4 µg/ml e fungizona 50 µg/ml) até o rompimento da camada mais interna do ovo (camada lipídica) e a liberação das larvas no meio. Estas foram concentradas através de aparelho de Baermann modificado, colhidas em tubos estéreis e cultivadas a  $37^\circ\text{C}$  e 5-8% de  $\text{CO}_2$  (DE SAVIGNY, 1975). O meio de cultivo das larvas foi trocado semanalmente para manter a viabilidade das mesmas até o momento da sua utilização para a infecção dos camundongos.

### **Obtenção do antígeno de Excreção e Secreção de *T. canis* (TES)**

O antígeno de excreção e secreção (TES) de larvas de *T. canis* foi obtido segundo De Savigny (1975) e De Savigny & Voller (1979), com algumas modificações. As larvas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), sendo realizadas trocas de meio durante o período de cultivo destas e acrescido inibidor de protease (Phenyl-methylsulphonyl-fluoride) 200mM (5µl/ml de meio coletado), após os sobrenadantes foram congelados a  $-20^\circ\text{C}$  em tubos estéreis. Foi realizada diálise em água destilada, centrifugado a  $4^\circ\text{C}$ , a 12.000g, por 60min, e filtrado em membrana Millipore de 0,22µ. O antígeno sofreu o processo de liofilização e para sua quantificação proteica o antígeno foi dissolvido em água *free*, sua concentração e pureza foram estimadas usando o kit BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA).

### **Avaliação da resposta imune humoral dos animais experimentais**

A avaliação dos níveis séricos de IgG totais (anti-*Toxocara*) foram realizadas mediante ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando como antígeno o TES na concentração de 1 µg / ml e diluição sérica do anticorpo primário de (1:50), conforme descrito por Avila *et al.* (2011). Para o soro secundário, soro anti-IgG total de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich), foi utilizado a diluição

1:5000 em PBS-T. As amostras de soro foram examinadas individuais e em duplicata, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 492 nm.

Os isotipos avaliados foram: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, seguindo-se as recomendações do Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich). A concentração de antígeno usado na sensibilização e a diluição do soro primário foi a mesma utilizada para avaliação de IgG total. Cada amostra (pool de soros) foi examinada em duplicata para obtenção da absorbância média. Os anticorpos secundário, anticorpo de cabra anti-IgG1, anti-IgG2a, anti IgG2b e IgG3 (Sigma-Aldrich) foram diluídos 1:2000 em PBS-T e anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) foi diluído 1:4000 em PBS-T. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 492 nm.

### Cultivo de esplenócitos e método quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR)

O cultivo de esplenócitos foi realizado a partir de um *pool* de cinco baços dos camundongos de cada grupo. Os baços foram removidos, macerados e os esplenócitos obtidos foram suspensos em solução balanceada de HANK'S (sem Ca e Mg). Após, às células foram centrifugadas e o *pellet* suspenso em soluções de lise (cloreto de amônia a 0,8%), seguido de lavagem e suspensão em RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil). Foi realizado o cultivo de  $2 \times 10^6$  células por cavidade em placas de 24 poços e incubação por 24 horas em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após este período, as células foram estimuladas com meio RPMI + Soro fetal bovino (10%), Concanalina A (5 µg/ml) e TES (10 µg/ml). Após o cultivo, as células foram coletadas em Trizol (SIGMA) a -70 °C. Foi realizada a extração de RNA pelo método do TRIzol e síntese de cDNA a partir de 400 ng/µl de mRNA, conforme as instruções do fabricante (Applied Biosystems). Para o método quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi utilizado para a amplificação de segmentos dos genes de *IL12* (F: AGCACCAGCTTCTTCATCAGG, R: CCTTTCTGGTTACACCCCTCC), *IL4* (F: CCAAGGTGCTTCGCATATTT, R: ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT), *YMI* (F: CACAGGTCTGGCAATTCTTCTG, R: TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTCG), *IL10* (F: TTTGAATTCCTGGGTGAGAA, R: ACAGGGGAGAAATCGATGACA) e *β-actina* (F: AACGCCCTTCATTGAC, R: TCCACGACATACTCAGCAC). As reações de qPCR

foram realizadas com 1µL de cDNA, 5,0 µL de SYBR Green (Invitrogen), 0,25 µM de cada oligômero iniciador e 3,5µL de água livre de RNase (Gibco-BRL), em um volume total de 10 µL. As temperaturas utilizadas foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 60 s e extensão a 72 °C por 60 s e extensão final a 72 °C por 5 min. A partir dos valores de CycleThreshold (Ct) obtidos foi calculada a variação das transcrições gênicas através da comparação com a expressão de *β-actina* (controle). O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para quantificação relativa da transcrição gênica entre as amostras (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software Past 1.0.0. Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logaritmo de base 10. Após análise de variância (ANOVA), os dados passaram por teste de Tukey para comparação das médias. Foi atribuída significância de  $p < 0,05$ . Os gráficos foram realizados pelo programa Graphpad Prims 7.0 (Graphpad Software Inc; San Diego, CA, EUA.).

## 3. RESULTADOS

Por meio da técnica de digestão tecidual foi possível confirmar a infecção experimental quando avaliado a fase aguda da infecção pelo *T. canis*. Obtivemos uma média de recuperação de 10 larvas no grupo de 24h e de uma média de 20 larvas no grupo de 48h. Após esse período não foi possível a recuperação de lavas no fígado. Nos animais infectados com larvas de *T. canis* após a soroconversão foi avaliado a dinâmica de produção de IgG sérica total, sendo possível confirmar a infecção pelo *T. canis* durante a fase crônica. Os isotipos de IgG's também foram avaliados através do ELISA indireto. Foi possível detectar presença de anticorpos específicos no grupo de 15 dias p.i e no grupo de 30 dias p.i, se diferenciando estatisticamente do grupo controle. Os níveis de absorbâncias detectadas foram de 0,915 no 15º dia e 1,116 no 30º dia de infecção (figura 1).

Fig. 1

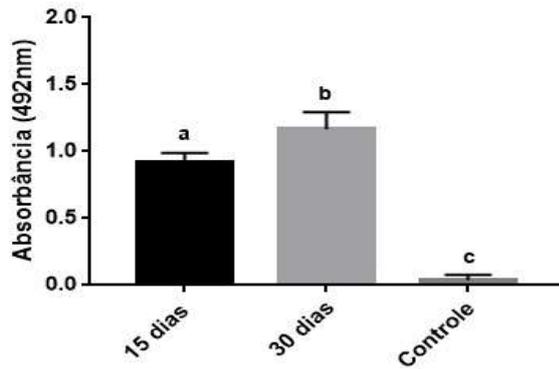


Figura 1 – Dinâmica do nível médio sérico de IgG total anti-*T. canis* obtidos nos soros individuais pelos grupos infectados com larvas de *T. canis* e PBS (grupo controle), utilizando placas sensibilizadas com o antígeno TES. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. Análise estatística entre os grupos foi realizado através do teste de Tukey, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Na análise dos isotipos de imunoglobulinas presentes nos soros de camundongos avaliados infectados com larvas de *T. canis*, pode-se observar que nos períodos de 15 e 30 dias de infecção, os quatro isotipos avaliados, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, se diferenciaram estatisticamente entre si e do grupo controle. A imunoglobulina IgG1 foi a que apresentou maiores níveis detectados em ambos os períodos (figura 2). A razão de IgG2a/IgG1 obtida no 15º dia foi de 0,320 e no 30º dia foi de 0,409.

Fig.2

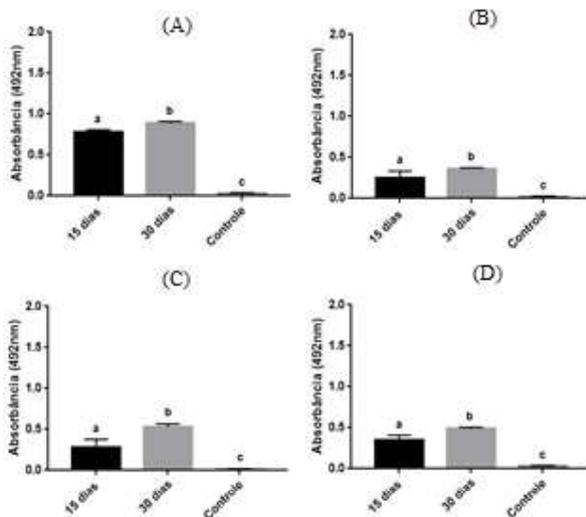


Figura 2- Níveis dos isotipos IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C) e IgG3 (D) obtidos através de pools de soros pelos grupos infectados com larvas de *T. canis* e PBS (grupo controle), utilizando placas sensibilizadas com o antígeno TES. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. Análise estatística entre os grupos foi realizado através do teste de Tukey, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Através do qPCR foram avaliados os níveis de transcrição gênica produzidos nos esplenócitos após infecção com larvas de *T. canis* (figura 3) nos períodos de 24 h, 48 h, 15 dias e 30 dias de infecção. Detectou-se níveis de transcrição gênica para todos os períodos avaliados, obtendo transcrições próximas a 2 vezes em 24h e 48h, e próximas a 4 vezes no 15º e 30º dia de infecção. Observou-se que a transcrição gênica de *IL10* diferenciou-se estatisticamente dos outros grupos no período de 24 h de infecção (superior a 30 vezes). A transcrição deste gene apresentou níveis aumentados durante a fase inicial, com transcrição relativa superior a 16 vezes, diminuição no 15º e 30º dia após a infecção, chegando a níveis de transcrição relativa próximas a 5 vezes e 6 vezes, respectivamente. O nível de transcrição gênica do gene *YMI* foi aumentando ao longo do período, sendo no de infecção, entre o período de 24 h e ao 30º dia, sendo no 30º dia de infecção houve diferença em relação aos demais períodos com nível de transcrição relativa próxima a 9 vezes. Já a transcrição gênica obtida referente ao gene *IL12* embora que a níveis basais nos grupos avaliados, se diferenciou estatisticamente dos outros grupos no 30º dia de infecção.

Fig. 3

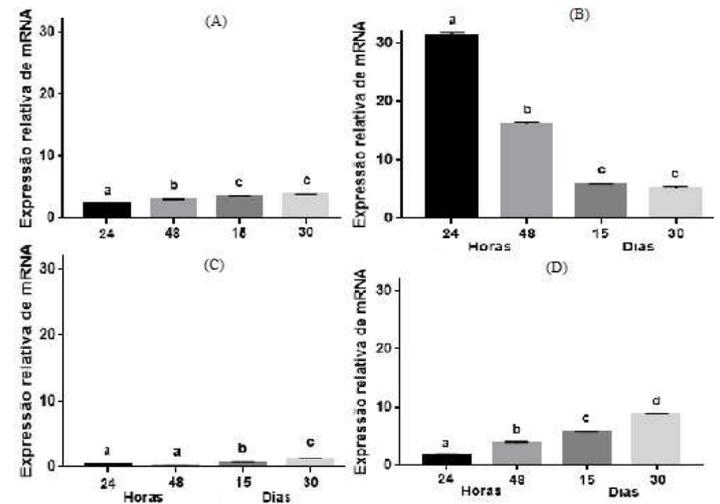


Figura 3- Transcrição gênica do mRNA de *IL-4* (A), *IL-10* (B), *IL-12* (C) e *YMI* (D) em esplenócitos estimulados com a proteína TES avaliados 24 h, 48 h, 15 dias e 30 dias após infecção experimental com 100 larvas. Os valores para os genes foram calculados a partir dos valores do ciclo limiar (Ct) normalizados para os valores de Ct obtidos a partir de animais do grupo controle. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados podemos inferir que a infecção experimental foi bem sucedida, apresentando através do teste de ELISA, níveis de anticorpos anti-Toxocara da classe IgG aumentados, mantendo-se elevados ao longo do experimento até o 30º dia p.i. Através da recuperação de larvas obteve-se uma taxa de recuperação de aproximadamente 10% e 20% no fígado dos animais infectados, no período de 24 h e 48 h p.i, respectivamente. Após esse período não foi possível a recuperação de lavras nesse órgão, estando de acordo com o que está presente na literatura, onde as larvas chegam ao fígado 24 h após a infecção, e posteriormente, através da circulação, as larvas migram para o coração e pulmões do hospedeiro (GLICKMAN; SCHANTZ, 1981). Assim como foi detectado em outros estudos, as larvas se apresentam em maior número no tecido hepático no período de 44-48 horas pós-inoculação (OSHIMA, 1961; NUNES & OGASSAWARA *et al.*, 1997).

As subclasses de IgG induzidas após a infecção são um indicador indireto da contribuição relativa de citocinas do tipo Th2 e do tipo Th1. Em camundongos, a produção de anticorpos do tipo IgG1 e IgG2b é primeiramente induzida por citocinas do tipo Th2, enquanto a produção de anticorpos do tipo IgG2a é um reflexo do envolvimento de citocinas do tipo Th1 (FERNANDEZ-PEREZ *et al.*, 2003; JEGERLEHNER *et al.* 2007). Ao avaliar as subclasses após infecção com 100 larvas de *T. canis*, o isotipo IgG1 foi o que apresentou maiores níveis, tanto no período de 15 dias, quanto no período de 30 dias após a infecção. Esse perfil de resposta já foi relatada em outros estudos, na maioria utilizando ovos embrionados de *T. canis* como modelo de infecção, sendo então a infecção com larvas marcada também pela maior produção do isotipo de imunoglobulina IgG1 (MUALLEM & HUNTER 2014; GAZZINELLI-GUIMARAES *et al.*, 2018), sendo considerada a principal representante dos marcadores de infecção por *T. canis* (NOVÁK *et al.*, 2017).

Para verificar se houve alteração no perfil de resposta, foi calculada a razão de IgG2a/IgG1. Observamos um aumento da razão com 30 dias de infecção, sendo que se manteve o mesmo perfil de resposta, sugerindo, assim como em outros estudos, que a infecção pelo *T. canis* ativa uma resposta predominantemente Th2 durante a migração de larvas nos tecidos (FAN *et al.*, 2003; MUALLEM & HUNTER 2014). No presente estudo identificou-se que a produção de imunoglobulinas dos subtipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foi apenas significativa a partir dos 15 dias após a infecção, pois é necessário a presença de citocinas para

ocorrer a troca de classe dos linfócitos B. Os isotipos das imunoglobulinas são gerados após troca de classe e maturação da resposta de anticorpos, portanto, eles participam predominantemente na resposta imune secundária (ZAIA *et al.*, 2015). Durante a infecção as respostas polarizadas do tipo Th2 promovem a troca da classe dos linfócitos B para IgE e IgG1. A sinalização de *IL4*, e as interações de linfócitos T e B mediam a produção de ambos os isotipos (GOMEZ, 2019; RUIZ-MANZANO *et al.* 2019).

Em contrapartida, em infecções por helmintos em geral uma combinação de resposta imune Th1 e Th2, muitas vezes é necessária para uma resolução adequada da infecção. Citocinas Th2 modulam uma excessiva reação inflamatória protegendo o hospedeiro não somente da infecção, mas dos danos causados pela irrestrita inflamação mediada por células Th1 (MAIZELS & YAZDANBAKHS, 2003). Neste estudo, apesar da resposta Th2 tenha se apresentado predominante com níveis aumentados de IgG1 e níveis de IgG2b, foram detectadas também imunoglobulinas IgG2a e IgG3, sugerindo que tanto a resposta Th2, quanto a resposta Th1 foram ativadas. Esses achados foram relatados também no estudo de Cuéllar *et al.* 2001 e Fan *et al.* (2003) durante a avaliação da infecção experimental com *T. canis*. Os níveis de IgG1 podem ter se apresentado em maior níveis pelo fato que em camundongos a análise da subclasse IgG1 apresenta-se significativamente elevada até mesmo com uma intensidade de infecção mais branda, o que não ocorre com a subclasse IgG2a, a qual apresenta-se elevada somente com uma infecção mais intensa (PINELLI *et al.*, 2007).

O perfil de citocinas produzidas frente a apresentação do antígeno está relacionado com a produção de subclasses de imunoglobulinas (FERNANDEZ-PEREZ *et al.*, 2003). Sugere-se que os níveis de transcrição do gene que codifica para *IL4* sejam responsáveis pela diferenciação da imunoglobulina IgG1, pois em camundongos, a secreção de *IL4* promove a produção de IgG1, enquanto IFN- $\gamma$  eleva a produção de IgG2a (ROSTAMIAN *et al.*, 2015). Não avaliamos IFN- $\gamma$  neste estudo, porém ter sido através desse gene que os níveis de IgG2a apresentou-se estatisticamente significativo, apesar de que alguns pesquisadores observaram redução na expressão de IFN- $\gamma$  durante infecção por *T. canis*, em macrófagos (KURODA *et al.*, 2001), no soro (PILARCZYK *et al.*, 2008) e nos esplenócitos de camundongos (ÁVILA *et al.* 2016). A ativação e a supressão de células envolvidas na resposta imune

ocorrem paralelamente e dependem das citocinas que seram secretadas, as quais variam conforme o número de formas parasitárias, o tempo de infecção e o sistema imune do hospedeiro (NAGY *et al.*, 2012). Podendo auxiliar a explicar as diferenças encontradas na expressão de citocinas em diferentes modelos experimentais infectados por *T. canis* (PINELLI *et al.*, 2007b, HAMILTON *et al.*, 2008, VALLI *et al.*, 2010).

Os níveis de transcrição gênica para *IL12*, que também está envolvido da diferenciação da IgG2a, se mantiveram em níveis basais nos esplenócitos durante os períodos avaliados. Sugere-se que a expressão de *IL4*, que está associada a infecção por helmintos, como o *T. canis*, tenha exercido importante papel na diminuição da produção de *IL12* (LOGAN *et al.*, 2018). Estudos indicam que esse é um mecanismo de sobrevivência do *T. canis*, na medida em que o *T. canis* modula a expressão do mRNA das citocinas em camundongos infectados experimentalmente, levando principalmente a diminuição dos níveis de *IL12* no hospedeiro infectado (KURODA *et al.*, 2001; FRANTZ *et al.*, 2010; HAMILTON *et al.*, 2008; AVILA *et al.*, 2016).

A análise das citocinas supõe um aumento de linfócitos Th2, com uma elevada expressão da citocina *IL4*, além de linfócitos Treg, com detecção de *IL10* em níveis consideráveis. Essas citocinas detectadas também apresentaram níveis estatisticamente significativos em outros estudos, quando avaliaram as células pulmonares (PINELLI *et al.*, 2007; FRANTZ *et al.*, 2010), o baço e soro (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2019) de animais experimentalmente infectados com *T. canis*.

A inibição de transcrição de *IL12* nos sugere ter ocorrido devido a capacidade de imunomodulação do *T. canis*, levando a supressão da resposta Th1. O trabalho de Dlugosz *et al.* (2015) também sugere que a resposta Th1 foi inibida, juntamente com a Th17, detectando *IL5*, *IL6* e *TGF-β* em quantidades significativamente menores nos esplenócitos dos animais infectados. Esse mecanismo de imunomodulação do *T. canis* pode ser explicado pelo fato deste induzir o sistema imunológico do hospedeiro a produzir a *IL4*, ativando macrófagos de maneiras distintas dos macrófagos expostos às citocinas Th1. Esses macrófagos chamados alternativamente ativados exibem um receptor de manose e de *IL4Ra* em suas membranas externas e produzem algumas moléculas únicas como arginase1, RELM $\alpha$ , *YMI* e algumas quitinases (GORDON & MARTINEZ, 2010; LIU *et al.*, 2015; KIMURA *et al.*, 2016), mostrando que RELM $\alpha$  e *YMI* exercem junto com a resposta Th2 reduzindo a carga parasitária. Além disso, as proteínas

produzidas por macrófagos alternativamente ativados também têm papel importante na quimiotaxia de eosinófilos, remodelamento tecidual e produção de fibrose (ZHU *et al.*, 2004). Embora produzam pouca *IL12*, o que justifica os níveis basais deste gene no nosso estudo, os macrófagos alternativamente ativados podem tornar a *IL10*, *TGF-β* e outros fatores imunomoduladores notáveis por limitar a inflamação do tipo Th1 (JOHNSTON *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2013).

Através da predominância de resposta Th2 gerado nos esplenócitos, pela presença de *IL4*, pode-se sugerir que resultou na ativação dos macrófagos (M2). Sendo estes macrófagos importantes no processo de reparo tecidual e resolução de inflamação gerada pelo *T. canis*, efetivos na resposta imune protetora contra nematódeos gastrintestinais bem como na imunopatologia associadas a estas infecções (MARTINEZ, *et al.* 2014). Embora a expressão do *YMI* não seja estudada na mesma frequência que as demais citocinas, sua importância precisa ser avaliada durante infecção experimental por *T. canis*, pois está associada a infecções por helmintos e respostas imunes do tipo 2 (MUALLEM & HUNTER, 2014). Baseado nisso, Faz-Lopez *et al.* (2019) avaliaram a ação dos macrófagos ativado via *IL4*, devido a infecção por *T. canis*, e concluíram que os macrófagos têm um papel importante na mediação da proteção contra inflamação excessiva e têm sido associados ao reparo tecidual no pulmão, com expressão de *Arg1*, *FIZZ1* e *YMI* (FAZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Originalmente, encontramos na literatura *YMI* como genes de macrófagos altamente expressos em um modelo de infecção por *Brugia malay* (FALCONE *et al.*, 2001; LOKE *et al.*, 2002), em *Litomosoides sigmodontis* e *Nippostrongylus brasiliensis* (NAIR *et al.*, 2005) e *Trichinella spiralis* (CHANG *et al.* 2001). No estudo de Sutherland *et al.* (2018), foi observado que embora dependente da sinalização de *IL4* durante uma resposta do tipo 2, o *YMI* também tem padrões de expressão independentes dessa citocina no pulmão, através da molécula efetora RELM $\alpha$ . Justificando em nosso estudo, que mesmo com níveis de transcrições de *IL4* pouco expressivos na infecção, houve transcrição do gene nos esplenócitos de camundongos infectados com larvas. Os autores concluíram ainda que *YMI* tem efeitos opostos na imunidade do tipo 2 durante a infecção por nematódeos, dependendo se ela é expressa no momento de respostas inatas ou adaptativas. Durante a migração de *Nippostrongylus brasiliensis* no pulmão, *YMI* promoveu a resposta reparativa, mas uma vez que a resposta foi estabelecida, *YMI* dependente de *IL4Ra* foi

importante para limitar a magnitude da produção de citocinas tipo 2 tanto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto de células linfoides inatas no pulmão, justificando a detecção em nosso estudo deste gene tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Baseado nestas observações acredita-se que *YMI* exerce papel importante na modulação tipo 2 (Th2) mediada pelo *T. canis*.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pelas imunoglobulinas podemos inferir que a infecção com 100 larvas L3 de *T. canis* em camundongos BALB/c gerou a ativação de resposta imune predominantemente Th2 durante o período analisado da infecção experimental. Durante a infecção experimental de *T. canis*, foi detectado níveis de transcrição gênica de *IL4*, estando presente em maiores níveis durante a infecção crônica. Também houve ativação de uma resposta imune regulatória com a presença de níveis de transcrição de *IL10*, apresentando transcrições elevadas na fase aguda da infecção com *T. canis*. Detectamos a supressão da transcrição de *IL12* em todos os períodos avaliados. Sugere-se ter sido esses os fatores importantes para a ativação de células do sistema imune, como por exemplo diferenciação de macrófagos alternativamente ativados e por consequência a transcrição de níveis detectáveis do gene *YMI* nos esplenócitos. É possível, por estar presente em níveis expressivos na fase aguda e crônica na infecção por *T. canis*, que o *YMI* exerça papel importante na modulação tipo 2 (Th2) mediada pelo *T. canis*.

## 6. REFERÊNCIAS

- Allen, JE, Maizels, RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11(6):375–88.
- Avila, LFC, Conceição, FR, Telmo, PL, Dutra, GF, Santos, DG, Martins, LHR, Berne, ME, Silva, PE, Scaini, CJ. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Veterinary Parasitology* 2012; 187:337–40.
- Avila, LFC, De Leon, PMM, De Moura, MQ, Berne, MEA, Scaini, CJ, Leite, FPL. Modulation of IL-12 and IFN $\gamma$  by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology* 2016; 38(5):326-330.
- Chen, J, Zhou, D, Nisbet, AJ, Xu, MJ, Huang, SY, Li, MW, Wang, CR; Zhu, XQ. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012; 12:1344–1348.
- De Savigny, DH, Voller, A, Woodruff, AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 1979; 32(3):284-288.
- De Savigny, DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*, 1975; 61(4): 781–782.
- Despommier, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003; 16(2):265-272.
- Fan, CK, Lin, YH, Du, WY, Su, KE. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Veterinary Parasitology*, 2003; 113:145-155.
- Faz-Lopez, B, Mayoral-reyes, H, Hernández-pando, R, Martínez- labat, P, McKay, DM, Medina-andrade, Olguin, JE, Terrazas, LI. A Dual Role for Macrophages in Modulating Lung Tissue Damage/Repair during L2 *Toxocara canis* Infection. *Pathogens*, 2019; 8(4): 280, 2019.
- Gazzinelli-guimaraes, PH, Nutman, TB. Helminth parasites and immune regulation. *F1000Res*, 2018; 7:1685.
- Gomez, G. Current Strategies to Inhibit High Affinity Fc $\epsilon$ RI-Mediated Signaling for the Treatment of Allergic Disease. *Frontiers Immunology*, 2019; 10:175.
- Lee, RM, Moore, LB, Bottazzi, ME, Hotez, PJ. Toxocariasis in North America: A Systematic Review, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014; 8(8): 3116.
- Maizels, RM, Hermelijn, HS, Henry, JM. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity*, 2018; 49(5): 801-818.
- Mendonça, LR, Figueiredo, CA, Esquivel, R, Fiacconed, RL, Pontes-de-carvalho, L., Cooperg, P, Barreto, MB, Alcantara-Neves, NM. Seroprevalence and risk factors for toxocara infection in children from

- an urban large setting in Northeast Brazil. *Acta Tropica*, 2013.
- Muallem, G., Hunter, CA. ParadYm shift: Ym1 and Ym2 as innate immunological regulators of IL-17. *Nature Immunology*, 2014; 15(12):1099-1100.
- Novák, J, Panská L, Macháček, T, Kolářová, L, Horák, P. Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitologica*, 2017; 62(4): p. 823-835.
- Núñez, RC, Mendoza, MGD, Yañez, AS, Ponce Macotela, M, Bustamante, MP, Ramírez, DN. Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *ScientificWorld Journal*, 2013; 2013:572089.
- Overgaauw, PAM, Knapen, FV. Veterinary and public health aspects of *Toxocara*. *Veterinary Parasitology*, 2013; 193(4):398–403.
- Rubinsky-eflant, G, Hirata, CE, Yamamoto, JH & Ferreira, MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2010; 104(1):3-23.
- Ruiz-manzano, RA, Hernández-cervantes, R, Del río-araiza, VH, Palacios-arreola, MI, Nava-castro, KE, Morales-montor, J. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. *Parasite Immunology*, 2019; 41(12).
- Smith, H, Holland, C, Taylor, M, Magnaval, JF, Schantz, P, Maizels, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*, 2009; 25(4).
- Sutherland, TE, Ruckerl, D, Logan, N, Duncan, S, Wynn, TA, Allen, JE. Ym1 induces RELM $\alpha$  and rescues IL-4R $\alpha$  deficiency in lung repair during nematode infection. *PLoS Pathogens*, 2018; 14(11).
- Vieira, JN, Pereira, CP, Bastos, CGG, Nagel, AS, Antunes, L, Villela, MM. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2013; 12(1):45-49, 2013.
- Walsh, MG, Haseeb, MA. Reduced cognitive function in children with toxocariasis in a nationally representative sample of the United States. *International Journal of Parasitology*, 2014; 42(13-14):1159-1163.
- Zaia, MG, Oliveira, SR, Castro, CA.; SOARES, EG, Afonso, A, Monnazzi LG, Filho, OP, Faccioli, LH, Anibal, FF. *Toxocara canis* and the allergic process. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015; 110(6):726-31.

## **4.2 Manuscrito 2**

### **Artigo a ser Submetido à Revista Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research- BJSCR**

Normas da revista disponíveis em:

⟨[https://www.mastereditora.com.br/máster\\_editora-37-251](https://www.mastereditora.com.br/máster_editora-37-251)⟩. Acesso em novembro de 2020.

TEMPLATE PADRÃO - Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR

# CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA IMUNE DESENVOLVIDA FRENTE À INFECÇÃO POR *TOXOCARA CANIS* EM NÓDULOS LINFOIDES MESENTÉRICOS APÓS INFECÇÃO EXPERIMENTAL

CHARACTERISTICS OF THE IMMUNE RESPONSE DEVELOPED AGAINST *TOXOCARA  
CANIS* IN MESENTERIC LYMPHID NODULES AFTER EXPERIMENTAL  
INFECTION

JÉSSICA LOPES **BORCHARDT**<sup>1\*</sup>, ALICE CORREA **SANTOS**<sup>2</sup>, GULHERME BORGES **WEEGE**<sup>3</sup>,  
MICAEL QUINTANA DE **MOURA**<sup>4</sup>, WESLEY DOUGLAS DA SILVA **TERTO**<sup>5</sup>, MARIA ELISABETH  
AIRES **BERNE**<sup>6</sup>, FÁBIO PEREIRA LEIVAS **LEITE**<sup>7</sup>

---

1 - Bióloga, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 2- Veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas. 3 - Biotecnologista, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 4 - Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 5 - Biólogo, Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas. 6- Veterinária, Docente na Universidade Federal de Pelotas. 7 - Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Docente na Universidade Federal de Pelotas.

\* Travessa Andre Dreyfuss, Universidade Federal de Pelotas, Campus: Capão do Leão – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório 11, S/N, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, ZIP CODE: 96010-900. [lopesborchardt@gmail.com](mailto:lopesborchardt@gmail.com)

## RESUMO

O nematódeo *Toxocara canis* é um parasito que completa seu ciclo biológico no intestino delgado de cães. Dentre os helmintos intestinais mais encontrados, o *T. canis* se destaca. Responsável por causar a enfermidade conhecida como Toxocaríase, uma importante zoonose, sendo considerada como a mais prevalente helmintíase humana em países industrializados. O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta imune, através da análise da transcrição relativa dos genes *IL4*, *IL10*, *IL12* e da proteína *YMI* nos nódulos linfóides mesentéricos durante a infecção experimental com *T. canis*. Por meio do PCR em tempo real (qPCR) foi avaliado os níveis de *IL4*, *IL10*, *IL12* e *YMI* transcritos nos nódulos linfóides mesentéricos dos camundongos após o período de 24 h, 48 h, 15 e 30 dias de infecção com 100 larvas de *T. canis*. Ao avaliar a transcrição relativa dos genes, detectou-se níveis significativos ( $p < 0,05$ ) e expressivos de *IL4*, *IL10*, *IL12* e *YMI* nos nódulos linfóides mesentéricos. Sugerimos que houve a ativação de uma resposta predominantemente Th2 nesse tecido, com níveis significativos de transcrição dos genes na fase aguda da infecção pelo *T. canis*. Houve uma transcrição significativa ( $p < 0,05$ ) de *IL12* durante a fase aguda e uma supressão deste gene durante a fase crônica nos nódulos linfáticos mesentéricos, sugerindo que ocorreu inicialmente também uma ativação de resposta Th1 neste órgão que foi suprimida durante a infecção crônica. Necessário mais estudo para confirmar e identificar mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune nos nódulos linfóides mesentéricos. Concluímos que a ativação da resposta predominantemente Th2 e a resposta regulatória através da *IL10*, sugerem que ocorreu diferenciação das células do sistema imune dos animais experimentais em macrófagos alternativamente ativados (M2), e por consequência a transcrição de níveis significativos ( $p < 0,05$ ) do gene *YMI* neste órgão.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxocara canis*; *IL4*; *IL10*; *IL12*; *YMI*; Nódulos Linfóides Mesentéricos.

## ABSTRACT

The nematode *Toxocara canis* is a parasite that completes its biological cycle in the small intestine of dogs. Among the most common intestinal helminths, *T. canis* stands out. Responsible for causing the disease known as Toxocaríasis, an important zoonosis, being considered the most prevalent human helminthiasis in industrialized countries. The objective of the work was to evaluate the immune response, through the analysis of the relative transcription of *IL4*, *IL10*, *IL12* and *YMI* protein in mesenteric lymphoid nodules during experimental infection with *T. canis*. Using real-time PCR (qPCR), the levels of *IL4*, *IL10*, *IL12* and *YMI* transcribed in the mesenteric lymphoid nodules of the mice after the period of 24 h, 48 h, 15 and 30 days of infection with 100 T larvae were evaluated. When evaluating the relative transcription of genes, significant ( $p < 0.05$ ) and expressive levels of *IL4*, *IL10*, *IL12* and *YMI* were detected in the mesenteric lymphoid nodules. We suggest that a predominantly Th2 response was activated in this tissue, with significant levels of gene transcription in the acute phase of *T. canis* infection. There was a significant transcription ( $p < 0.05$ ) of *IL12* during the acute phase and one suppression of this gene during the chronic phase in the mesenteric lymph nodes, suggesting that an activation of the Th1 response in this organ initially occurred, which was suppressed during chronic infection. Further study is needed to confirm and identify immunological mechanisms involved in the immune response in mesenteric lymphoid nodules. We conclude that the activation of the predominantly Th2 response and the regulatory response through *IL10*, suggest that differentiation of the cells of the immune system of the experimental animals occurred in alternatively activated macrophages (M2), and consequently the transcription of significant levels ( $p < 0.05$ ) of the *YMI* gene in this organ.

**KEYWORDS:** *Toxocara canis*; *IL4*; *IL10*; *IL12*; *YMI*; Mesenteric Lymphoid Nodules.

## 1. INTRODUÇÃO

Os helmintos estão entre os agentes infecciosos mais comuns em cães

(FANKHAUSER *et al.*, 2016) e, dentre os helmintos intestinais mais encontrados, destaca-se o *Toxocara canis*, também causador de zoonose (FERREIRA *et al.*, 2016).

Uma resposta imune tipo Th2 com produção de citocinas *IL4*, *IL10* e *IL13*, mobilização de eosinófilo, acúmulo de mastócitos e produção de IgE é montada na tentativa do hospedeiro em expelir os helmintos (CORTÉS *et al.*, 2017). Helmintos, como todo patógeno, provocam uma gama de resposta imune em seus hospedeiros, que é determinada pela interação parasito-hospedeiro. O organismo hospedeiro analisa rapidamente a ameaça, ativando o mecanismo apropriado para a situação, no caso de agentes infecciosos, mobiliza as células linfoides tipo 2 (ILC2) caso as respostas imunes inatas sejam insuficientes (GAUSE *et al.*, 2013). A resposta imune Th2 está associada a um grupo de células imune inatas, como basófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos ativados e um grupo inato de células linfoides Th2 que funcionam como mediadores da resposta adaptativa (PULENDRAN; ARTIS, 2012; WILLS-KARP; FINKELMAN, 2011). Os antígenos de helmintos são apresentados às células TCD4+ nos linfonodos mesentéricos e outros tecidos linfoides associados ao intestino, induzindo a diferenciação em células Th2 e a produção das citocinas. As células Th2 migram para a submucosa e ocorre um infiltrado de neutrófilos e macrófagos ativados, que podem danificar as larvas. Além disso, a citocina *IL4* pode provocar a expulsão dos helmintos adultos do intestino (ANTHONY *et al.*, 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune presente nos nódulos linfoides mesentéricos durante a infecção por *T. canis* em camundongos Balb/c.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 50 camundongos Balb/c, fêmeas, com 28 dias, provindas do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada 22 °C ( $\pm 2$  °C) e ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), tendo ração (sem adição de antibióticos e antifúngicos) e água a disposição. Este estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA - 4840).

### Delineamento experimental

A infecção experimental foi realizada pela administração oral de 100 larvas de *T. canis*, por camundongo. O método de infecção foi através da sonda intragástrica (AVILA *et al.*, 2012). Cinco grupos, contendo 10 camundongos cada foram infectados. Os grupos experimentais foram submetidos a eutanásia em tempos diferenciados: grupo 1 após 24 h de infecção, o grupo 2 após 48 h de infecção, grupo 3 no 15° dia de infecção e grupo 4 no 30° dia de infecção. O grupo 5, foi o grupo controle, o qual não sofreu infecção. Foi realizada a técnica de digestão tecidual do fígado de cada animal para recuperação das larvas de *T. canis* (XI & JIN, 1998).

### Obtenção de formas adultas de *T. canis* e histerectomia

Cães com idade entre quatro e oito semanas foram tratados com pamoato de pirantel (15 mg/Kg) para a eliminação de formas adultas de *T. canis*. Após, foi feita a sexagem, identificação específica das formas adultas e histerectomia para coleta dos ovos. Os ovos de *T. canis* após coletados foram incubados em formalina 2%, a 28 °C, com umidade relativa acima de 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias, até o desenvolvimento das larvas ao estágio infectante (L3). Após, foi observada a motilidade das larvas no interior dos ovos embrionados (AVILA *et al.*, 2012).

### Extração e cultivo de larvas de *T. canis*

Ovos embrionados foram lavados em Solução tampão de fosfato (PBS) e centrifugados por sete vezes a 1200g/5 minutos, para remoção da formalina. Em seguida foi adicionado solução de hipoclorito de sódio 6% (PA), durante 15 minutos para remoção das duas camadas mais externas dos ovos, a camada proteica e quitinosa. A seguir foram realizadas lavagens em PBS e centrifugações a 1200g/5 minutos até a remoção completa do hipoclorito de sódio.

O centrifugado de ovos foi submetido à agitação manual em Erlenmeyer com pérolas de vidro e meio RPMI-1640/MERCK (suplementado

com HEPES 25mM, Glicose a 1%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, ofloxacina 0,4 µg/ml e fungizona 50 µg/ml) até o rompimento da camada mais interna do ovo (camada lipídica) e a liberação das larvas no meio. Estas foram concentradas através de aparelho de Baermann modificado, colhidas em tubos estéreis e cultivadas a 37 °C e em atmosfera contendo 5-8% de CO<sub>2</sub> (DE SAVIGNY, 1975). O meio de cultivo das larvas foi trocado semanalmente para manter a viabilidade das mesmas até o momento da infecção dos camundongos.

### Nódulos linfóides mesentéricos

Após a eutanásia dos animais os nódulos linfóides mesentéricos, localizados entre os folhetos do mesentério do duodeno ao reto foram coletados dos animais. Os órgãos foram lavados em PBS e macerados. As células foram coletadas e suspensas em solução de HANK'S, após os pellet's de células foram dissolvidos e congelados em Trizol. Foi realizada a extração de RNA pelo método do TRIzol e síntese de cDNA a partir de 400 ng/µL de mRNA, conforme as instruções do fabricante (Applied Biosystems).

### Método quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR)

Utilizou-se do método quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR) para a amplificação de segmentos dos genes de *IL12* (F: AGCACCAGCTTCTTCATCAGG, R: CCTTCTGGTTACACCCCTCC), *IL4* (F: CCAAGGTGCTTCGCATATTT, R: ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT), *YMI* (F: CACAGGTCTGGCAATTCTTCTG, R: TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTCG), *IL10* (F: TTTGAATTCCTGGGTGAGAA, R: ACAGGGGAGAAATCGATGACA) e  $\beta$ -actina (F: AACGCCCTTCATTGAC, R: TCCACGACATACTCAGCAC). As reações de qPCR foram realizadas com 1µL de cDNA, 5,0 µL de SYBR Green (Invitrogen), 0,25 µM de cada oligômero iniciador e 3,5µL de água livre de RNase (Gibco-BRL), em um volume total de 10 µL. As temperaturas utilizadas foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 60 s e extensão a 72 °C por 60 s e extensão final a 72 °C por 5 min. A

partir dos valores de CycleThreshold (Ct) obtidos foi calculada a variação das transcrições gênicas através da comparação com a expressão de  $\beta$ -actina (controle). O método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  foi utilizado para quantificação relativa de expressão gênica entre as amostras (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software Past 1.0.0. Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logaritmo de base 10. Após análise de variância (ANOVA), os dados passaram por teste de Tukey para comparação das m dias. Foi atribuída significância de  $p < 0,05$ . Os gráficos foram realizados pelo programa Graphpad Prims 7.0 (Graphpad Software Inc; San Diego, CA, EUA.).

## 3. RESULTADOS

Por meio da técnica de digestão tecidual foi possível confirmar a infecção experimental quando avaliado a fase aguda da infecção pelo *T. canis*. Obtivemos uma média de recuperação de 10 larvas no grupo de 24h e de uma média de 20 larvas no grupo de 48h. Após esse período não foi possível   recuperação de lavas no fígado. Nos animais infectados com larvas de *T. canis* após a soroconversão foi avaliado a dinâmica de produção de IgG sérica total, sendo possível confirmar a infecção pelo *T. canis* durante a fase crônica (dados não mostrados). Através do qPCR foram avaliados os níveis de transcrição gênica produzidos nos nódulos linfóides mesentéricos (figura 1) após infecção com 100 larvas de *T. canis* nos grupos experimentais (período de 24 h, 48 h, 15 dias e 30 dias de infecção). As citocinas avaliadas foram *IL4*, *IL10*, *IL12* e a proteína *YMI*. Nos nódulos linfáticos mesentéricos os níveis de transcrição gênica relativa foram altamente observados. O gene *IL4* foi transcrito em níveis significativos em todos os períodos avaliados, 24 h, 48 h, 15° dia e 30° dia de infecção. Apresentou uma transcrição relativa de 65 vezes no grupo de 24 h de infecção, se destacando estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Analisando os outros períodos, podemos perceber um declínio dos níveis de transcrição deste gene ao longo da

infecção, embora com transcrições relativas em níveis altos durante a infecção crônica. A transcrição do gene *IL10* apresentou-se em maiores níveis ( $p < 0,05$ ) no período de 24 h de infecção, com transcrição relativa de aproximadamente 12 vezes, e esse nível foi diminuindo entre os períodos avaliados, chegando no 30º dia de infecção (fase crônica) com transcrição relativa próxima a 3 vezes. Avaliando a transcrição do *YMI* nos nódulos linfoides mesentéricos percebemos que durante a fase aguda foi o período com maiores níveis de transcrição desta proteína, o qual o período de 48 h de infecção foi o que se diferenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ), com transcrição relativa próxima a 76 vezes, havendo uma diminuição dos níveis de transcrição na fase crônica, chegando no 30º dia de infecção com transcrição relativa próxima a 16 vezes. Avaliando a transcrição gênica de *IL12* é possível notar uma supressão significativa do gene neste órgão, o qual apresentou uma transcrição relativa com níveis superiores aos outros genes avaliados no período de 48 h. Sendo que nos períodos do 15º e 30º dia de infecção (fase crônica) a transcrição relativa para esse gene ficou em níveis basais.

Fig.1

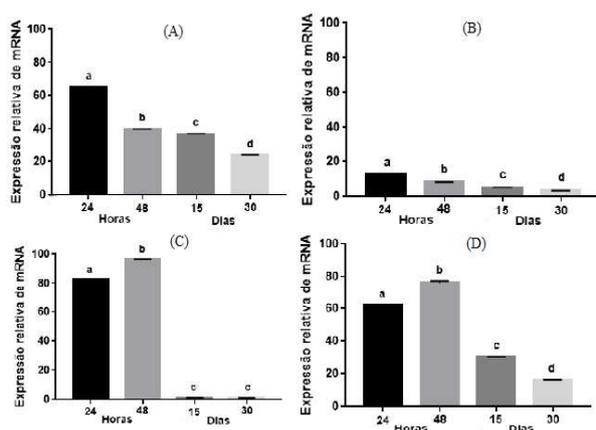


Figura 1- Expressão relativa do mRNA de *IL4*, *IL10*, *IL12* e *YMI* em nódulos linfoides mesentéricos avaliados 24 h, 48 h, 15 e 30 dias do experimento. Os valores para os genes foram calculados a partir dos valores do ciclo limiar (Ct) normalizados para os valores de Ct obtidos a partir de animais do grupo controle. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Com os dados obtidos nos nódulos linfoides mesentéricos dos animais infectados supõe-se um aumento de linfócitos Th2 durante a infecção experimental, com expressão da citocina *IL4*, além de linfócitos Treg, com a detecção de *IL10* em níveis consideráveis. As citocinas detectadas neste estudo também apresentaram níveis estatisticamente significativos em outros, quando avaliaram as células pulmonares (PINELLI *et al.*, 2007; FRANTZ *et al.*, 2010), o baço e soro (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2019) de animais infectados com *T. canis*. Sabemos que a infecção por nematódeos gastrintestinais, no geral, além de induzir eosinofilia, aumento nos níveis séricos de IgE e IgG1, e mastocitose no hospedeiro (URBAN *et al.*, 1992; ALLEN e MAIZELS, 1996; FINKELMAN *et al.*, 1997, ONAH & NAWA, 2000), podem ativar a resposta imune controlada por linfócitos Th2, que são linfócitos T que expressam o determinante antigênico CD4 na superfície celular e que secretam, principalmente, as citocinas *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL10* (esta, podendo ser também produzida por células Th1 e T regulatórias). A indução da resposta imune do tipo 2 tem sido associada ao desenvolvimento de proteção em alguns modelos experimentais de infecção por nematódeos gastrintestinais (ANTHONY *et al.*, 2007; FINKELMAN *et al.*, 2004), mas também está relacionada a algumas consequências patológicas destas parasitoses (POWEL *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Porém essas citocinas não atuam diretamente nos parasitos, possíveis mecanismos imunológicos induzidos pela produção de *IL4* e ativação de *IL4R/STAT6* podem ser os responsáveis pela proteção do hospedeiro contra infecções por nematódeos. Apesar de possíveis diferenças no mecanismo de controle das diferentes espécies de nematódeos, o aumento da produção de *IL4* estimulam a multiplicação e diferenciação Th2, mastócitos e células caliciformes, que irão produzir quimiocinas e citocinas, como eotaxina (CCL11) e *IL5*, responsáveis pela diferenciação e migração de eosinófilos para o sítio da infecção (CARA *et al.*, 2000). Além destas células, estudos têm demonstrado a participação de macrófagos alternativamente ativados na resposta alérgica e infecções helmínticas, sendo que a ativação deste

tipo celular é induzida por citocinas Th2, como *IL4* (GORDON, 2003).

Helminhos tem a capacidade de induzir uma variedade de mecanismos regulatórios com objetivo de impedir a sua eliminação pelo hospedeiro e permitir a sobrevivência em longo prazo. A resposta do hospedeiro desenvolvida pela presença de helmintos também inclui a ativação de macrófagos alternativamente ativados (M2) (TERRAZAS *et al.*, 2017). Além dos M1 (macrófagos classicamente ativados) e M2 distinguem na produção de citocinas e quimiocinas, são diferenciados também na expressão de marcadores celulares (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Os macrófagos do perfil M1 expressam marcadores como, iNOS, CXCL10 (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; YANG *et al.*, 2016). Já os macrófagos do perfil M2 expressam *arginase-1*, *FIZZ-1* e *YMI* (NAIR *et al.*, 2009; NAIR; COCHRANE; ALLEN, 2003; RAES *et al.*, 2002).

O fenótipo dos macrófagos é determinado pelo ambiente imune local e com os resultados obtidos das transcrições da citocinas e da proteína *YMI* nos nódulos linfoides mesentéricos acreditamos que houve a diferenciação dos macrófagos em macrófagos M2 durante a infecção por *T. canis*. ZHAO *et al.* (2008) demonstraram que a infecção de camundongos por *Nippostrongylus brasiliensis* provoca aumento da infiltração de macrófagos no intestino, sendo que a maioria destas células apresentou perfil de macrófagos alternativamente ativados. Estes macrófagos podem mediar efeitos diretos sobre helmintos intestinais, através da produção de proteínas pertencentes à família Fizz, que incluem quitinases e proteínas que têm homologia com quitinases, como *YMI*, que possuem efeito enzimático e podem danificar a cutícula dos parasitos (NAIR *et al.*, 2006). As proteínas produzidas por macrófagos alternativamente ativados também têm papel importante na quimiotaxia de eosinófilos, remodelamento tecidual e produção de fibrose (ZHU *et al.*, 2004). Assim os macrófagos M2 podem ter papel fundamental na resposta imune protetora contra nematódeos gastrintestinais bem como na imunopatologia associadas a estas infecções.

Outras células não pertencentes à população de leucócitos têm sido associadas à resposta

contra a infecção por nematódeos intestinais. Estudos *in vitro* sugerem que células do epitélio intestinal secretam mediadores, incluindo Linfopoiétina do Estroma Tímico (TSLP), que bloqueia a produção de *IL12* pelas células dendríticas inibindo a capacidade destas células promoverem a resposta do tipo Th1, e desta forma sustentando a resposta protetora Th2 (ANTHONY *et al.*, 2007). Assim nos nódulos linfoides mesentéricos a resposta ativada inicialmente foi diferenciado, detectamos a presença de altos níveis de transcrição de *IL12* durante a fase aguda, mas na medida em que o *Toxocara canis* modulou a expressão do mRNA das citocinas, durante a infecção crônica levou a diminuição dos níveis de *IL12* no hospedeiro infectado. A supressão de *IL12* já foi relato por outros estudos (KURODA *et al.*, 2001; FRANTZ *et al.*, 2010; HAMILTON *et al.*, 2008; AVILA *et al.*, 2016). A supressão de linfócitos Th1, associada à redução de *IL12*, é uma característica imunomodulatória do nematódeo *T. canis*, que dificulta o recrutamento de macrófagos para os locais de infecção e a morte parasitária (KURODA *et al.*, 2001).

No intestino estudos têm demonstrado o efeito de citocinas do tipo Th2 em alterações fisiológicas relatadas durante a infecção por helmintos intestinais (ZHAO *et al.* 2003). CLIFFE *et al.* (2005) mostraram que a produção de *IL4* e *IL13* aumenta a proliferação das células epiteliais intestinais e que o aumento da contração intestinal induzido por *N. brasiliensis* e *H. polygyrus* é promovido por ação estas citocinas. Comprovando a atuação destas duas citocinas no músculo intestinal durante infecção por nematódeos, foi demonstrada por HORSNELL *et al.* (2007), onde a ausência do receptor *IL-4Ra* (receptor de ambas citocinas) exclusivamente em células do músculo liso, causa atraso na expulsão de vermes de *N. brasiliensis* do intestino de camundongos. O atraso na eliminação foi associado ao retardo na hiperplasia de células caliciformes, e a uma reduzida produção de citocinas Th2 pelos linfonodos mesentéricos durante a infecção.

No nosso estudo de transcrições dos genes ficou bastante evidente a alta transcrição de *IL4*, *IL10*, *IL12*, e *YMI* pelos nódulos linfoides mesentéricos, o que pressupõe que este órgão é

efetivo na apresentação de antígenos e na intensificação da resposta imune. Essa eficiência em resposta pode estar relacionado por ser um local constituído por células reticulares, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, incluindo as células foliculares dendríticas e as células dendríticas apresentadoras de antígenos (LOWE & ANDERSON, 2015; GENESER, 2003; ROSS & PAWLINA, 2012).

## 5. CONCLUSÃO

Por meio da análise das citocinas transcritas durante a infecção sugere-se que houve a ativação de uma resposta imune predominantemente Th2 nos nódulos linfóides mesentéricos, com maiores níveis de transcrição gênica de *IL4* e ativação de uma resposta imune regulatória, com a presença de níveis de transcrição de *IL10* durante a fase aguda da infecção pelo *T. canis*. Houve uma transcrição significativa de *IL12* durante a fase aguda e uma supressão deste gene durante a fase crônica, sugerindo que ocorreu inicialmente uma ativação de resposta também Th1 neste órgão que foi suprimida durante a infecção crônica. A detecção de níveis significativos expressivos de *IL4* na fase aguda e também de *IL10*, sugere que houve a diferenciação das células do sistema imune em macrófagos M2 nos nódulos mesentéricos e por consequência a transcrição de níveis detectáveis e expressivos do gene *YMI* na fase aguda nesse tecido.

## 6. REFERÊNCIAS

ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol.*, v. 109, p. 3-10, 1996.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J.; GAUSE, W. C.. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007.

AVILA, L.F.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; TELMO, P.L.; DUTRA, G.F.; SANTOS, D.G.; MARTINS, L.H.R.; BERNE, M.E.; SILVA, P.E.; SCAINI, C.J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocaríasis. *Veterinary Parasitology*, v.187, p.337–40, 2012.

AVILA, L.F.C.; DE LEON, P.M.M., DE MOURA, M.Q., BERNE, M.E.A., SCAINI, C.J.; LEITE, F.P.L. Modulation of IL-12 and IFN $\gamma$  by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 5, p. 326-330, 2016.

CLIFFE, L.J.; HUMPHREYS, N.E.; LANE, T.E.; POTTEN, C.S.; BOOTH, C.; GRENCIS, R.K. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*, v. 308 (5727), p. 1463-5, 2005.

CORTÉS, A.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J. G.; TOLEDO, R. Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 9, p. 678–693, 2017.

DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*, v. 61, n. 4, p. 781–782, 1975.

FERREIRA, J. I. G. S; PENA, H. F. J.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n. 4, p. 435–440, 2016.

FINKELMAN F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN, J.R.Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol.*, v. 15, p. 505-533, 1997.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S.C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K.B.; SCHOPF, L.; URBAN, J.F. JR. Interleukin-4 and interleukin-13- mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol.*, v. 201, p. 139- 155, 2004.

FRANTZ, F.G.; ROSADA, R.S.; PERES-BUZALAF, C.; PERUSSO, F.R.; RODRIGUES, V.; RAMOS, S.G.; KUNKEL, S.L.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Helminth coinfection does not affect therapeutic effect of a DNA vaccine in mice harboring tuberculosis. *PLoS Negl Trop Dis*, v.4, n.6, e700, 2010.

- GAUSE, W. C.; WYNN, T. A.; ALLEN, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 607–614, 2013.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p. 23–35, 2003.
- HORSNELL, W.G.C.; CUTLER, A.J.; HOVING, C.J.; MEARN, H.; MYBURGH, E.; ARENDSE, B.; FINKELMAN, F.D.; OWENS, G.K.; ERLE, D.; BROMBACHER, F. Delayed goblet cell hyperplasia, acetylcholine receptor expression, and worm expulsion in SMC-specific IL-4R $\alpha$ -deficient mice. *PLoS Pathogens*, v. 3, p. 46–53, 2007.
- KURODA, E.; YOSHIDA, Y, E.N.; SHAN, B.; YAMASHITA, U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor- $\alpha$  production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunology*, v. 23, n. 6, p. 305–11, 2001
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 231–241, 2012.
- NAGLER-ANDERSON, C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology*, v.1, n. 1, p. 59–67, 2001.
- NAIR, M.G.; GUILD, K.J.; ARTIS, D. Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy. *J. Immunol.*, v.177, p. 1393–1399, 2006.
- ONAH, D.N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *The Korean journal of parasitology*, v. 38, p. 209–236, 2000.
- PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; FONVILLE, M.; HAMILTON, C. M.; GIESSEN, J. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.115, n.1, p.76–82, 2007.
- POWELL, N.; WALKER, M.M., TALLEY, N.J. Gastrointestinal eosinophils in health, disease and functional disorders. *Nature Reviews/Gastroenterology & Hepatology*. doi:10.1038/nrgatro.2010.
- PULENDRAN, B.; ARTIS, D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*, v. 337, p. 431–435, 2012.
- RUIZ-MANZANO, R. A.; HERNÁNDEZ-CERVANTES, R.; DEL RÍO-ARAIZA, V. H.; PALACIOS-ARREOLA, M. I.; NAVA-CASTRO, K. E.; MORALES-MONTOR, J. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. *Parasite Immunology*, v. 41, n. 12, 2019.
- SILVEIRA, M.R; NUNES, K.P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORREA, A.Jr.; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORREA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, and increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun.*, v. 70. p. 6263–6272, 2002.
- URBAN, J.F. Jr, MADDEN, K.B.; SVETIC, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P.P.; GAUSE, W.C.; KATONA, I.M.; FINKELMAN, F.D. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev.*, v. 127, p. 205–220, 1992.
- WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. Innate lymphoid cells wield a double-edged sword. *Nature Immunology*, v.12, p. 1025–1027, 2011.
- XI, W. G.; JIN, L. Z. A novel method for the Recovery of *Toxocara Canis* in Mice. *Journal of Helminthology*, v. 72, p. 183–184, 1998.
- ZHAO, A.; McDERMOTT, J.; URBAN, J.F.; GAUSE, W.; MADDEN, K.B.; YEUNG, K.A.; MORRIS, S.C.; FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T. Dependence of IL4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat-6 and enteric nerves. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 948–954, 2003.
- ZHAO, A.; URBAN Jr, J.F.; ANTHONY, R.M.; SUN, R.; STILTZ, J.; ROOIJEN, N.V.; WYNN, T.A.; GAUSE, W.C.; SHEA-DONOHUE, T. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology*, v. 135, p. 217–225, 2008.
- ZHU, Z.; et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, v. 304, p.1678–1682, 2004.

## 5. Conclusões finais

Com os resultados obtidos pelas imunoglobulinas podemos inferir que a infecção com 100 larvas de *T. canis* em camundongos Balb/c gerou a ativação de resposta imune tipo 2 (Th2). A razão de IgG2a/IgG1 obtida evidencia que a resposta Th2 foi o padrão que esteve predominante durante o período analisado.

Através da análise das citocinas, detectamos uma resposta imune Th2 nos esplenócitos e nódulos linfoides, com significativos níveis de transcrição gênica de IL4, principalmente nos nódulos linfoides mesentéricos durante a fase aguda (24 h e 48 h) da infecção com larvas de *T. canis* comparados ao grupo controle. É possível inferir também que houve ativação de uma resposta imune regulatória nos dois tecidos avaliados, com a presença de IL10, principalmente nos esplenócitos, que apresentaram transcrições de 30 e 16 vezes comparado aos controles na fase inicial (24 h e 48 h) da infecção com *T. canis*. Sugerindo que as citocinas IL4 e IL10 são fatores importantes para a ativação de macrófagos M2 e a transcrição do gene YM1 nos esplenócitos e nódulos linfoides.

A presença de níveis de transcrição gênica para YM1 presente durante a fase aguda e crônica da infecção corrobora com a hipótese que este gene atue na resposta imune do tipo 2 mediada pelo *T. canis*.

Os resultados obtidos nesse estudo auxiliam no entendimento dos mecanismos imunológicos que ocorrem durante a infecção por *T. canis*. Entretanto, a continuidade dos estudos de modulação da resposta imune por *T. canis* são necessários para compreendermos os mecanismos envolvidos e de alguma forma poder intervir no controle da Toxocaríase.

## Referencias

- ABE-JACOB, C. M.; OSELKA, G.W. Toxocaríase na infância. **Pediatria**, v. 13, p. 48-55, 1991.
- ABO-SHEHADA, M. N.; HERBERT, I. V. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. II. Postintestinal migration in primary infections. **Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 75-83, 1984.
- AIRES, W.O.; FRIAS, R.B.; PASCHOAL, G.R. Toxocaríase e larva migrans visceral. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, 2008.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375–88, 2011.
- ARAUJO, P. Observações pertinentes à primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 14, p. 83-90, 1972.
- ALTCHEH, J; NALLAR, M; CONCA, M; BIANCARDI, M; FREILIJ, H. Toxocariasis: clinical and laboratory features in 54 patients. **Anales de Pediatria**, v. 58, p. 425-31, 2003.
- AREVALO, J.F.; ESPINOZA, J.V.; AREVALO, F.A. Ocular toxocariasis. **Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus**, v. 50, n. 2, p. 76–86, 2013.
- AVILA, L. F. C.; FONSECA, J. S. V.; DUTRA, G. F.; TELMO, P. L.; SILVA, A. M. W. A.; BERNE, M. E. A.; SILVA, P. E. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; SCAINI, C. J. Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone. **Parasitology Research**, 2011. Doi: 10.1007/s00436-011-2510-5.
- AVILA, L.F.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; TELMO, P.L.; DUTRA, G.F.; SANTOS, D.G.; MARTINS, L.H.R.; BERNE, M.E.; SILVA, P.E.; SCAINI, C.J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, p.337–40, 2012.
- AVILA, L.F.C.; DE LEON, P.M.M., DE MOURA, M.Q., BERNE, M.E.A., SCAINI, C.J.; LEITE, F.P.L. Modulation of IL-12 and IFN $\gamma$  by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 5, p. 326-330, 2016.
- BEAVER, P. C.; SNYDER, C.H.; CARRERA, G. M.; DENT, J. H.; LAFFERTY, J. W. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. **Pediatrics**, v. 9, p. 7-19, 1952.
- CAMPOS JÚNIOR, D.; ELEFANT, G.R.; DE MELO E SILVA, E.O.; GANDOLFI, L.; JACOB, C.M.A.; TOFETI, A.; PRATESI, R. Frequência de soropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 509–513, 2003.

- CANCRINI, G.; BARTOLONI, A.; ZAFFARONI, E.; GUGLIELMETTI, P.; GAMBOA, H.; NICOLETTI, A. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. **Parasitology**, v. 40, p. 473-475, 1998.
- CHANG, N.C., HUNG, S.I., HWA, K.Y., KATO, I., CHEN, J.E., LIU, C.H., CHANG, A.C. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 20, p.17497-17506, 2001.
- CHEN, J.; ZHOU, D.; NISBET, A. J.; XU, M. J.; HUANG, S. Y.; LI, M. W.; WANG, C. R.; ZHU, X. Q. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1344–1348, 2012.
- COCHEREAU, I. Infections oculaires. Médecine et Maladies infectieuses; 8-003-L-10; 2000.
- DAVIS, M. J.; TSANG, T. M.; QIU, Y.; DAYRIT, J. K.; FREIJ, J. B.; HUFFNAGLE, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.
- DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.265-272, 2003.
- DE SAVIGNY, D. H.; VOLLER, A.; WOODRUFF, A.W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, n. 3, p. 284-288, 1979.
- DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 781–782, 1975.
- DLUGOSZ, E.; WASYL, K.; KLOCKIEWICZ, M.; WISNIEWSKI, M. *Toxocara canis* mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. **Parasitology Research**, v.114, n.9, p. 3365-3371, 2015.
- EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; BEKIRANOV, S.; DRENKOW, J.; SHI, S.; GINGERAS, T. R.; GAASTERLAND, T.; SCHOOLNIK, G. NATHAN, C. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 8, p. 1123–1140, 2001.
- FAKHRI, Y.; GASSER, R. B.; ROSTAMI, A.; FAN, C.K.; GHASEMI, S. M.; JAVANIAN, M.; BAVANI, M.; ARMOON, B.; MORADI, B. *Toxocara* eggs in public places worldwide - A systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v.242, p. 1467-1475, 2018.
- FALCONE, F.H.; LOKE, P.; ZANG, X.; MACDONALD, A.S.; MAIZELS, R.M.; ALLEN, R.M. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. **Journal Immunology**, v. 167, p. 5348– 5354, 2001.
- FAN, C. K.; LIAO, C. W.; CHENG, Y. C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 342–352, 2013. Doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.030.

FAN, C. K.; LIN, Y. H.; DU, W.Y.; SU, K. E. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 145-155, 2003.

FAZ-LOPEZ, B.; MAYORAL-REYES, H.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; MARTÍNEZ-LABAT, P.; MCKAY, D.M.; MEDINA-ANDRADE, I.; OLGUÍN, J.E.; TERRAZAS, L.I. A Dual Role for Macrophages in Modulating Lung Tissue Damage/Repair during L2 *Toxocara canis* Infection. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 280, 2019.

FAZ-LÓPEZ, B.; MORALES-MONTOR, J.; TERRAZAS, L.I. Role of Macrophages in the Repair Process during the Tissue Migrating and Resident Helminth Infections. **Biomed Research International**, v.2016, 2016.

FILLAUX, J.; MAGNAVAL, J.F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v.193, p.327–336, 2013. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.028.

FONSECA, G.R.; DOS SANTOS, S. V.; CHIEFFI, P. P.; DE PAULA, F. M.; GRYSCHKEK, R. C. B.; LESCANO, S. A. Z. Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n.5, p. 382-386, 2017.

FRANTZ, F.G.; ROSADA, R.S.; PERES-BUZALAF, C.; PERUSSO, F.R.; RODRIGUES, V.; RAMOS, S.G.; KUNKEL, S.L.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Helminth coinfection does not affect therapeutic effect of a DNA vaccine in mice harboring tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.6, e700, 2010.

GAUSE, W.C.; WYNN, T.A.; ALLEN, J.E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p.607–614, 2013.

GAZZINELLI-GUIMARAES, P. H.; NUTMAN, T. B. Helminth parasites and immune regulation. **F1000Res**, v. 7, p. 1685, 2018.

GEMS, D.; MAIZELS, R.M. An abundantly expressed mucin-like protein from glycoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 93, p. 1665-1670, 1996.

GENESER, F. **Histologia: com bases moleculares**. 3.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana/ Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 318, 348, 2003.

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

GOMEZ, G. Current Strategies to Inhibit High Affinity FcεRI-Mediated Signaling for the Treatment of Allergic Disease. **Frontiers Immunology**, v. 10, p. 175, 2019.

GÓNZALEZ, M.T.; IBANEZ, O.; BALCARCE, N.; NANFITO, G.; KOZUBSKY, L.; RADMAN, N.; DONATONE, J.; FYNN, A.; DRUT, R.; CUETO R.E. Toxocariasis con afectación hepática. **Acta Gastroenterol Latinoam**, v. 30, n.3, 2000.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.23-35, 2003.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 16, p. 3035-51, 2016.

GYANG, P.V.; AKINWALE, O.P.; LEE, Y.; CHUANG, T.; OROK, A.B.; AJIBAYE, O.; LIAO, C.; CHEN, P.; CHOU, C.; HUANG, Y.; BARGHOOTH, U.; FAN, C. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria, **Acta Tropica**, n. 146, p. 135- 140, 2015.

HAMILTON, C. M.; BRANDES, S.; HOLLAND, C.V.; PINELLI, E. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. **Parasite Immunology**, v.30, p. 181- 185, 2008.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Barrier Epithelial cells and the control of type 2 immunity. **Immunity**, v. 43, p. 29–40, 2015.

HESSE, M., MODOLELL, M., LA FLAMME, A.C., SCHITO, M., FUENTES, J.M., CHEEVER, A.W., PEARCE, E.J., WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. **Journal Immunology**, v.167, p. 6533-6544, 2001.

HOLLAND, C. V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. **Parasitology**, v. 144, n. 01, p. 81–94, 2017.

IKEDA, N.; ASANO, K.; KIKUCHI, K.; UCHIDA, Y.; IKEGAMI, H.; TAKAGI, R.; YOTSUMOTO, S.; SHIBUYA, T.; MAKINO-OKAMURA, C. ET AL. Emergence of immunoregulatory Ym1(+) Ly6C(hi) monocytes during recovery phase of tissue injury. **Science Immunology**, v.3, n. 28, 2018.

JANECEK, E.; BEINEKE, A.; SCHNIEDER, T.; STRUBE, C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, p. 194, 2014.

JANKOVIC, D.; LIU, Z.; GAUSE, W.C. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergente pathways. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 8, p. 450-457, 2001.

JIN, H. M., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., KIRKPATRICK, R.B, ROSENBERG, M. Genetic characterization of the murine Ym1 gene and identification of a cluster of highly homologous genes. **Genomics**, v.54, p.316-322, 1998.

JOHNSTON, M. J.G., A. WANG, M. E.D. CATARINO, L. BALL, V. C. PHAN, J. A. MACDONALD, D. M. MCKAY. Extracts of the Rat Tapeworm, *Hymenolepis Diminuta*, Suppress Macrophage Activation in Vitro and Alleviate Chemically Induced Colitis in Mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1364–75, 2010.

KAYES, S.G. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. **Chemical Immunology**, v.66, p.99-124, 1997.

KENDELL, K. R.; DAY, J.D.; HRUBAN, R.H.; OLSON, J. L.; ROSEMBLUM, W. D.; KASPER, E. K.; et al. Intimate association of eosinophils to collagen bundles in eosinophilic myocarditis ans ranitine-induced hypersensitivity myocarditis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 119, p. 1154-1160, 1995.

KRAMER, F.; HAMMERSTEIN, R.; STOYE, M.; EPE, C. Investigations into the prevention of prenatal and lactogenic *Toxocara canis* infections in puppies by application of moxidectin to the pregnant dog. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, n.5, p.218-223, 2006.

- KURODA, E.; YOSHIDA, Y, E.N.; SHAN, B.; YAMASHITA, U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha production in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 6, p. 305-11, 2001.
- LEE, R.M.; MOORE, L.B.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J. Toxocariasis in North America: A Systematic Review, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8: e3116, 2014. LESCANO, S. Z.;
- QUEIROZ, M.L.; CHIEFFI, P. P. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 627-628, 2004.
- LI, L.; GAO, W.; YANG, X.; WU, D.; BI, H.; ZHANG, S.; HUANG, M.; YAO, X. Asthma and toxocariasis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 113, p. 187-192, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LLANES, K. K. R.; BESANA, C. M. & PALLER, V. G. V. Larval distribution, migratory pattern and histological effects of *Toxocara canis* in *Rattus norvegicus*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 43, p. 679–685, 2019.
- LOEZ, L; MARTIN, G; CHAMORRO, C; MARIO ALONSO, J. Toxocariosis en niños de una region subtropical. **Medicina**, v. 65, p. 226-230, 2005.
- LOKE, P.; NAIR, M.G; PARKINSON, J.; GUILIANO, D.; BLAXTER, M.; ALLEN, J.E. Macrófagos ativados alternativamente dependentes de IL-4 têm um fenótipo de expressão gênica in vivo distinto. **BMC Immunol**, v. 3, p. 7, 2002.
- LOKE, P., GALLAGHER, I., NAIR, M.G., ZANG, X., BROMBACHER, F., MOHRS, M., ALLISON, J. P., ALLEN, J.E. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4<sup>+</sup> T cells to be sustained during chronic infection. **The Journal Immunology**, v.179, p.3926–3936, 2007.
- LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. **Clinical. Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 689–703, 2001.
- LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens & Lowe's Human Histology**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, p. 56-57, 132, 2015.
- LUZNA-LYSKOV A. Toxocarosis in children living in a highly contaminated area. An epidemiological and clinical study. **Acta Parasitology**, v. 45, p. 40-42, 2000.
- MACDONALS A.S.; PEARCE, E. J. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 3127-3130, 2002.
- MACPHERSON, C.N. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 999–1008, 2013.
- MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 39, p. 1-11, 2001.

- MAIZELS, R. M.; HERMELIJN, H. S.; HENRY, J. M. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. **Immunity**, v.49, n.5, P. 801-818, 2018.
- MATA-SANTOS, T.; PINTO, N.F.; MATA-SANTO, H.A.; DE MOURA, K.G.; CARNEIRO, P.F.; CARVALHO, T.S.; DEL RIO, K.P.; PINTO, M.C.F.R.; MARTINS, L.R.; FENALTI, J.M.; DA SILVA, P.E.A.; SCAINI, C.J. Anthelmintic activity of lapachol, B-lapachobe and its derivatives against *Toxocara canis* larvae. **Ver Inst Med Trop São Paulo**, v. 57, n.3, p. 197-204, 2015.
- MARTINEZ-PULGARIN, D. F.; MUNOZ-URBANO, M.; GOMEZ-SUTA, D. L.; DELGADO, O. M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Ocular toxocariasis: new diagnostic and therapeutic perspectives. **Recent Patents on Antiinfect Drug Discovery**, v. 10, p.35–41, 2015.
- MCSORLEY, H.J.; O'GORMAN, M. T.; BLAIR, N.; SUTHERLAND, T. E.; FILBEY, K. J.; MAIZELS, R. M. Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. **European of Journal Immunology**, v. 42, p. 2667-2682, 2012.
- MÉGE, J. L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Corrent Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 230-234, 2011. 2011
- MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONE, R. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPER, P.; BARRETO, M. B.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Seroprevalence and risk factors for toxocara infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, 2013.
- MENEGON, Y.A.; PINHEIRO, N.B.; SANTOS, L.M.; RODRIGUES, P.R.C.; AVILA, L.F.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L., *Toxocara canis* infection may impair bovine herpesvirus type 5 immunization, **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 268-270, 2020.
- MILLS, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p.807–822, 2011.
- MISHRA, P.K.; PALMA, M. BLEICH, D.; LOKE, P.; GAUSE, W.C. Systemic impact of intestinal helminth infections. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 753–762, 2014.
- MOLDOVEANU, B.; OTMISHI, P.; WALKER, J. K.; SARMIENTO, X.; GUARDIOLA, J.; SAAD, M.; YU, J. Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of Inflammation Research**, v. 2, p. 1-11, 2009.
- MORII, K.; ODA, T.; SATOH, H.; KIMURA, Y.; AOYAMA, Y.; FUJIWARA, Y.; HIRAMATSU, Y.; OKUSHIN, H.; UESAKA, K.; NAKAMURA, S. *Toxocara canis* associated visceral larva migrans of the liver. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. 148–149, 2015.
- MUALLEM, G.; HUNTER, C. A. Paradigm shift: Ym1 and Ym2 as innate immunological regulators of IL-17. **Nature Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1099-1100, 2014.
- MUSSO, C.; CASTELO, J.S.; TSANACLIS, A. M.; PEREIRA, F. E. Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitória, ES, Brazil. **Virchows Archiv**, v. 450, p. 411–447, 2007.
- NAIR, M.G., GALLAGHER, I.J., TAYLOR, M.D., LOKE, P., COULSON, P.S., WILSON, R.A., MAIZELS, R.M., ALLEN, J.E. Chitinase and Fizz Family Members Are a Generalized Feature of Nematode Infection with Selective Upregulation of Ym1 and Fizz1 by Antigen-Presenting Cells. **Infection and immunity**, v.73, p.385-394, 2005.

- NICHOLS, R. L. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. **Journal of Parasitology**, v.42, p. 349–62, 1956.
- NOVÁK, J.; PANSKÁ, L.; MACHÁČEK, T.; KOLÁŘOVÁ, L.; HORÁK, P. Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 4, p. 823-835, 2017.
- ORÉFICE, F.; BORATTO, L. M.; SILVA, H. F. Presumível toxocaríase ocular: revisão de 30 casos (1978-1989); relato de dois casos atípicos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 50, p. 31-37, 1991.
- OTHMAN, A. A.; ASHOUR, D. S.; MOHAMED, D. A. Toxocara-induced hepatic inflammation: immunohistochemical characterization of lymphocyte subpopulations and Bcl-2 expression. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 76-81, 2013.
- OVERGAUW, P.A.M. Aspects of Toxocara epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, p. 233-251, 1997.
- OVERGAUW, P. A. M.; KNAPEN, F. V. Veterinary and public health aspects of *Toxocara*. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 398–403, 2013.
- OWHASHI, M.; ARITA, H.; NIWA, A. Production of eosinophil chemotactic factor by CD8<sup>+</sup> T-cells in *Toxocara canis*-infected mice. **Parasitology Research**, v.84, p.136-138, 1998.
- PARSONS, J.C.; BOWMAN, D.D.; GRIEVE, R.B. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, 1986.
- PAWLOWSKI, Z.; Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **Journal of Helminthology**, v. 75, n. 4, p. 299-305, 2001.
- PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; URBAN, J. F. JR.; WYNN, T.A. Retn1a (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.
- PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; FONVILLE, M.; HAMILTON, C. M.; GIESSEN, J. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v.115, n.1, p.76-82, 2007.
- PORCHERAY, F.; VIAUD, S.; RIMANIOL, A. C.; LÉONE, C.; SAMAH, B.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; DORMONT, D.; GRAS, G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n.3, p. 481-489, 2005.
- QUIDING-JÄRBRINK, M.; RAGHAVAN, S.; SUNDQUIST, M. Enhanced M1 macrophage polarization in human helicobacter pylori-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. **PLoS One**, v. 5, n. 11, 2010.
- RAYES, A. A.; LAMBERTUCCI, J.R. Visceral larva migrans and pyogenic liver abscess. **Am J Gastroenterol**, v. 94, p. 1116, 1999.
- RESENDE, N. M.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; BARBOSA, F.S.; OLIVEIRA, L. M.; NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. **Parasite and Vectors**, v. 8, p. 354, 2015.

- RUBINSKY-ELEFANT, G.; HIRATA, C.E.; YAMAMOTO, J.H. & FERREIRA, M.U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.104, n.1, p. 3-23, 2010.
- ROSTAMI, A.; MA, G.; WANG, T.; KOEHLER, A.V.; HOFMANN, A.; CHANG, B. C. H.; MACPHERSON, C. N.; GASSER, R. B. Human toxocariasis - A look at a neglected disease through an epidemiological 'prism'. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, 2019.
- ROSTAMIAN, M.; SOHRABI, S.; KAVOSIFARD, H.; NIKNAM, H.M. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n.2, p. 160-166, 2017.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 450-451, 468-471, 2012.
- RUIZ-MANZANO, R. A.; HERNÁNDEZ-CERVANTES, R.; DEL RÍO-ARAIZA, V. H.; PALACIOS-ARREOLA, M. I.; NAVA-CASTRO, K. E.; MORALES-MONTOR, J. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 12, 2019.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3a Ed, 2001.
- SANDLER, N. G., MENTINK-KANE, M.M., CHEEVER, A.W., WYNN, T.A. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. The **Journal of Immunology**, v.171, p. 3655-3667, 2003.
- SANTARÉM, V.A.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; CHESINE, P.A.F.; LELI, F.N.C. Toxocaríases canina e humana. **Veterinária e Zootecnia.**, v.16, n.3, p. 437-447, 2009.
- SANTARÉM, V.A.; LELI, F.N.C.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; GIUFFRIDA, R. Protective and risk factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 53, n. 2, p. 67-72, 2011.
- SATOH, T.; TAKEUCHI, O.; VANDENBON, A.; YASUDA, K.; TANAKA, Y.; KUMAGAI, Y.; MIYAKE, T.; MATSUSHITA, K.; OKAZAK, I. T.; SAITOH, T.; HONMA, K.; MATSUYAMA, T.; YUI, K.; TSUJIMURA, T.; STANDLEY, D. M.; NAKANISHI, K.; NAKAI, K.; AKIRA, S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 936-44, 2010.
- SCHANTZ, P.M. *Toxocara larva migrans* now. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 41, p. 21-34, 1989.
- SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J.F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in Parasitology**, v. 25, n.4, 2009.
- SOUZA, R.F.; DATTOLI, V.C.C.; MENDONÇA, L.R.; JESUS, J.R.; SANTANA, T.B.; CARVALHO, C.; SANTOS, N.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 4, p. 516-519, 2011.
- STEWART, J.M.; CUBILLAN, L. D.; CUNNINGHAM, E.T. JR. Prevalence, clinical feature, and causes of vision loss among patients with ocular toxocariasis. **Retina**, v. 25, p. 1005-1013, 2005.

- STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 93, p. 375–389, 2013.
- SUN, Y. J.; CHANG, N.C.; HUNG, S.I.; CHANG, A.C.; CHOU, C.C.; HSIAO, C.D. The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.17507-17514, 2001.
- SUTHERLAND, T.E.; RÜCKERL, D.; LOGAN, N.; DUNCAN, S.; WYNN, T. A.; ALLEN, J.E. Ym1 induces RELM $\alpha$  and rescues IL-4R $\alpha$  deficiency in lung repair during nematode infection. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 11, 2018.
- TRAVERSA, D.; REGALBONO, A.F.; CESARE, A.; TORRE, F.; DRAKE, J.; PIETROBELLI, M. Environmental contamination by canine geohelminths. **Parasites & Vectors**, v.7:67, 2014.
- VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 317-343, 2013.
- VIEIRA, J.N.; PEREIRA, C.P, BASTOS, C.G.G.; NAGEL, A.S.; ANTUNES, L.; VILLELA, M.M. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.1, p.45-49, 2013.
- WAINDOK, P.; STRUBE, C. Neuroinvasion of *Toxocara canis*- and *T. cati*-larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile. **Journal of neuroinflammation**, v. 16, n.1, p. 147, 2019.
- WALSH, M. G.; HASEEB, M. A. Reduced cognitive function in children with toxocariasis in a nationally representative sample of the United States. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n.13-14, p. 1159-1163, 2012.
- WELCH, J. S.; ESCOUBET-LOZACH, L.; SYKES, D.B.; LIDDIARD, K.; GREAVES, D.R.; GLASS, C.K. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p. 42821-42829, 2002.
- WHO. Neglected tropical diseases - prevention, control, elimination and eradication. WHA 66.20. In: Sixty-Sixth World Health Assembly. Geneva: World Health Organization; 2013.
- WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.
- WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v.18, p.1028–1040, 2012.
- XI, W. G.; JIN, L. Z. A novel meth for the Recovery of *Toxocara Canis* in Mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 183-184, 1998.
- XIAO, Q.; ZHANG, X.; WU, Y.; YANG, Y. Inhibition of macrophage polarization prohibits growth of human osteosarcoma. **Tumour Biology**, v. 35, n. 8, p. 7611-6, 2014.
- ZAIA, M.G.; OLIVEIRA, S.R.; CASTRO, C.A.; SOARES, E. G.; AFONSO, A.; MONNAZZI, L.G.; FILHO, O. P.; FACCIOLI, L. H.; ANIBAL, F. F. *Toxocara canis* and the allergic process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 726-31, 2015.
- ZHU, J.; XU, Z.; CHEN, X.; ZHOU, S.; ZHANG, W.; CHI, Y.; LI, W.; SONG, X.; LIU, F.; SU, C. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 25, n. 7, p.122, 2014.

ZIBAEI, M.; SADJJADI, S. M. Trend of toxocariasis in Iran: a review on human and animal dimensions. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 4, p. 233-242, 2017.

ZINKHAM, W.H. Visceral larva migrans. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. **American Journal of Diseases of Children**, v. 132, p. 627-633, 1978.

## **Anexos**

## Anexo 1: Histórico escolar do doutorado

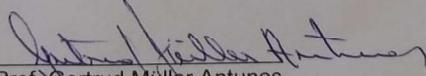
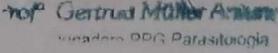

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**  
**HISTÓRICO ESCOLAR**  
 Grau: **Doutorado em Ciências Biológicas**

**Nº DE MATRÍCULA:**  
**Nome:** Jéssica Lopes Borchardt  
**Filiação:** Gilberto Klasen Borchardt e Cleni Lopes Borchardt  
**Local de nascimento:** Pelotas, RS **Data de nascimento:** 14/01/1991  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**  
**Área de Concentração:** Parasitologia **Início no Programa:** 01/03/2016  
**Orientador:** Fabio Pereira Leivas Leite

DISCIPLINA	PERÍODO	CONCEITO	CRÉDITOS	CARGA HORÁRIA			CARGA HORÁRIA TOTAL
				T	E	P	
Helmintologia	1º sem/14	P	04	51	00	17	68
Entomologia Médica e Veterinária	1º sem/14	P	04	51	00	17	68
Protozoários de Importância Médica e Veterinária	2º sem/14	P	02	17	00	17	34
Acarologia	2º sem/14	P	02	17	00	17	34
Diagnóstico Parasitológico	2º sem/14	P	04	17	00	51	68
Biologia Molecular	1º sem/15	P	04	34	00	34	68
Imunologia Parasitária	1º sem/16	A	02	34	00	00	34
Epidemiologia Médica e Veterinária	2º sem/16	A	03	51	00	00	51
Estágio de Docência Orientada	1ºsem/17	A	01	17	00	00	00
Imunodiagnóstico	2ºsem/17	A	03	51	00	00	51
Seminário I	2ºsem/17	A	02	34	00	00	34
Imunologia I	1ºsem/18	A	04	68	00	00	68
Imunologia II	1ºsem/18	A	04	68	00	00	68
Estágio de Docência Orientada	1ºsem/18	A	01	17	00	00	17
Seminário II	2ºsem/18	A	02	34	00	00	34
Exame de Proficiência em Língua Inglesa	Aprovada						

Convenções:  
 A = excelente; B = bom; C = regular; D = insuficiente; P = aproveitados; S = satisfatório.  
 São consideradas aprovadas as disciplinas com conceito A, B, C, S e P.

T = teórica  
 E = exercício  
 P = prática

Pelotas, 27 de maio de 2019  
  
 Prof. Gertrud Müller Antunes  
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia  
  
 Gertrud Müller Antunes  
 Coordenadora PPG Parasitologia

## Anexo 2: Aprovação no comitê de ética (CEEA/UFPEL)




Pelotas, 08 de agosto de 2017

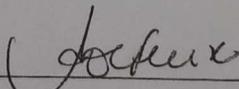
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da resposta imune durante a infecção de *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente infectados**”, registrada com o nº **23110.004840/2017-56**, sob a responsabilidade de **Fábio Pereira Leivas Leite** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/07/2017.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da autorização	Início: 08/2017    Término: 12/2020
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus / Balb/c ou Swiss conforme disponibilidade
Nº de animais	50
Idade	28 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central da UFPel

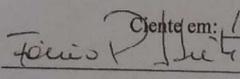
**Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.**

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 4840-2017**).



**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**  
*Presidente da CEEA*

Ciente em: 16 / 08 / 2017

Assinatura do Professor Responsável: 

**Anexo 3:** Comprovante de Submissão do Manuscrito 1**Listagem de Artigos Enviados**

<b>Título:</b> avaliação do mecanismo de imunomodulação da resposta th2 em camundongos experimentalmente infectados com toxocara canis <b>Subtítulo:</b> evaluation of the immunomodulation mechanism of the th2 response in mice experimentally infected with toxocara canis <b>Autores:</b> jÉssica lopes borchardt, alice correa santos, guilherme borges weege, micaele quintana de moura, wesley douglas da silva tertó, fÁbio pereira leivas leite <b>Periodico:</b> Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research <b>Data de envio:</b> 03/12/2020	Análise
--	---------

Conheça os E-Books da Master Editora

## Anexo 4: Dados complementares ao estudo

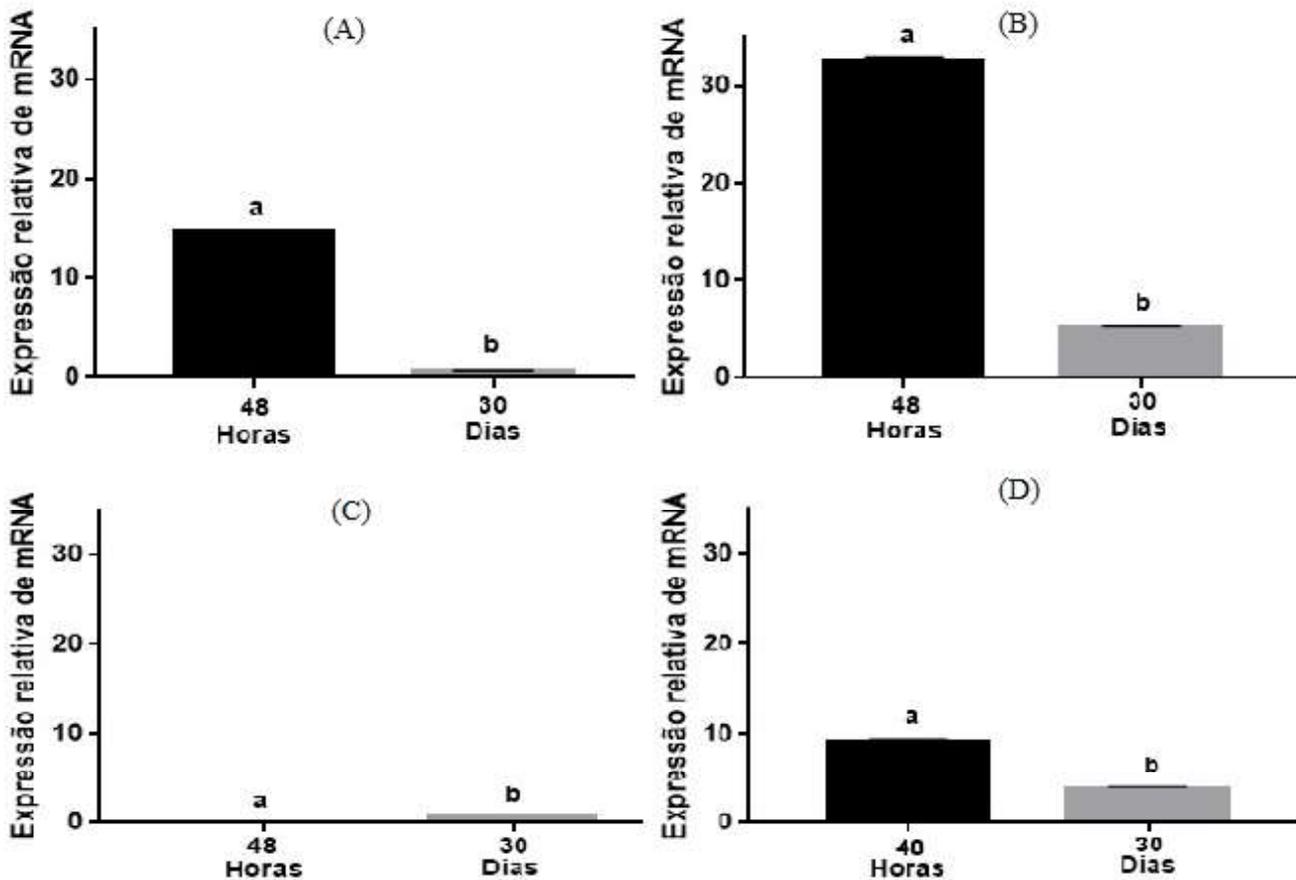


Figura 1- Transcrição gênica do mRNA de *IL4* (A), *IL10* (B), *IL12* (C) e *YMI* (D) em esplenócitos estimulados com a proteína TES avaliados 48 h e 30 dias após infecção experimental com 1200 ovos de *T. canis*. Os valores para os genes foram calculados a partir dos valores do ciclo limiar (Ct) normalizados para os valores de Ct obtidos a partir de animais do grupo controle. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Analisando os esplenócitos dos animais infectados com 1200 ovos de *T. canis* no período de 48 h e 30 dias p.i, pode-se observar que o grupo de 48 h de infecção foi o que apresentou maiores níveis de transcrição relativa dos genes *IL4* (14 vezes), *IL10* (32 vezes) e *YMI* (9 vezes). No período de 30 dias p.i, os níveis de transcrição para *IL4* detectável sofreu grande queda, apresentando-se em nível praticamente nulo. *IL10* e *YMI* sofreram diminuição dos níveis de transcrição relativa aos 30 dias p.i, mas apresentaram níveis superiores a 5 vezes e 4 vezes, respectivamente. Comparando com as transcrições obtidas nos esplenócitos dos animais infectados com 100 larvas, a infecção manteve maiores os níveis de *IL4* e *YMI* no período de 30 dias p.i (fase crônica) do que o modo de infecção com ovos. Enquanto que a infecção com ovos manteve os níveis de *IL4*, *IL10* e *YMI* aumentados no período de 48 h p.i (fase aguda). A citocina *IL12* continuou apresentando níveis de transcrições inferiores em ambos os períodos avaliados.

Avaliando a transcrição gênica de *IL4*, *IL10*, *YMI* e *IL12* na mucosa intestinal dos camundongos infectados com 100 larvas de *T. canis* percebemos que a detecção de níveis de transcrição para esses genes ocorreu após o período de 15 e 30 dias de infecção, ou seja, na fase crônica. Analisando os

níveis detectados, observou-se que a mucosa intestinal apresentou níveis de transcrição relativa menores do que os obtidos nos nódulos linfóides mesentéricos. O gene de *IL4* apresentou níveis de transcrição gênica com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no período de 30 dias de infecção (próximas a 7 vezes). Já a transcrição relativa dos genes *IL10* e *YMI* se diferenciaram estatisticamente com maiores níveis no 15º de infecção, com transcrições relativas próximas a 6 vezes para ambos os genes. Pode-se perceber que a transcrição de *IL12* na mucosa intestinal manteve-se em níveis basais tanto durante a fase aguda quanto durante a fase crônica da infecção por *T. canis*. (figura 2)

Fig. 2

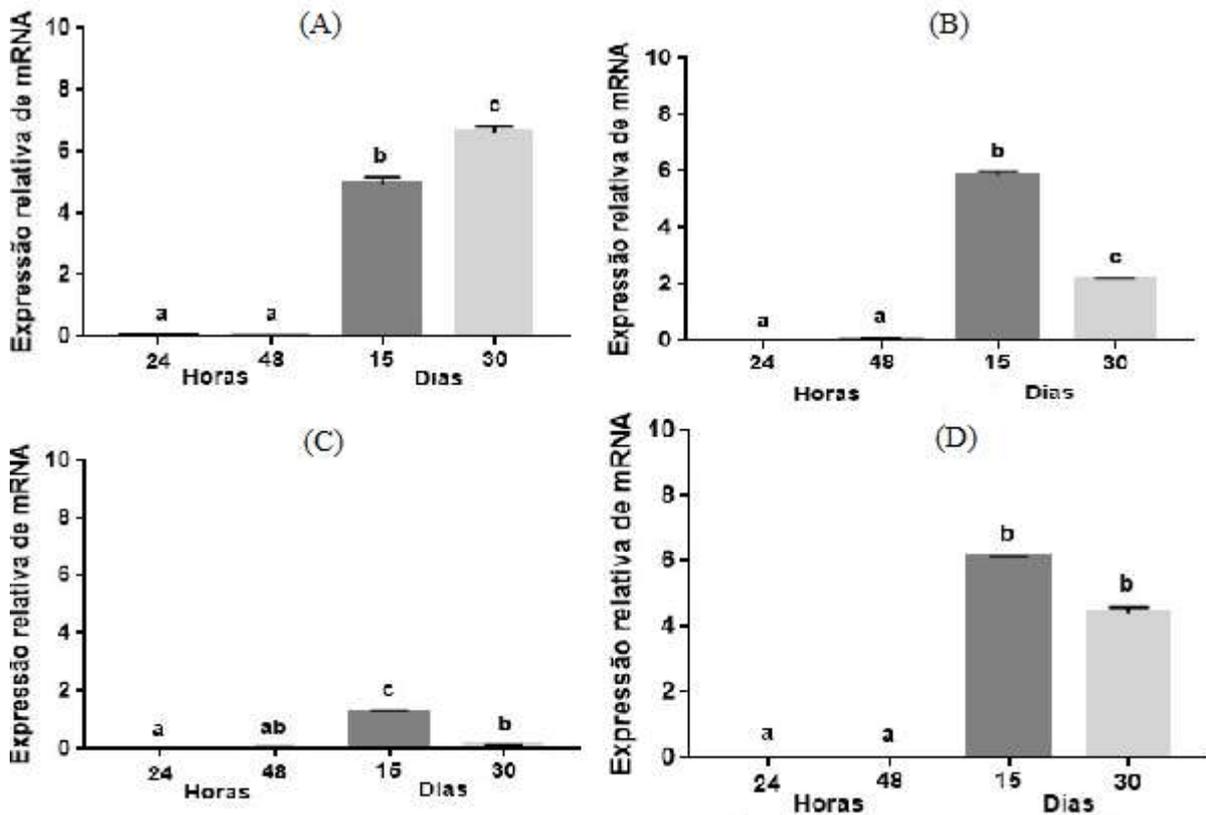


Figura 2- Expressão relativa do mRNA de *IL4* (A), *IL10* (B), *IL12*(C) e *YMI*(D) na mucosa intestinal avaliados 24 h, 48 h, 15 e 30 dias após infecção experimental com 100 larvas de *T. canis*. Os valores para os genes foram calculados a partir dos valores do ciclo limiar (Ct) normalizados para os valores de Ct obtidos a partir de animais do grupo controle. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).