UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Patologia e Medicina Legal

NATHALIA BUTSCHKAU PALAZZIN YODONO

**Análise das alterações na musculatura duodenal e resposta do hospedeiro contra
infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona: o papel da
via JAK-STAT 6**

Ribeirão Preto
2016

NATHALIA BUTSCHKAU PALAZZIN YODONO

**Análise das alterações na musculatura duodenal e resposta do hospedeiro contra
infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona: o papel da
via JAK-STAT 6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia

Curso: Patologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dra. Simone G. Ramos

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e na Biblioteca digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

FICHA CATALOGRÁFICA

Palazzin-Yodono, Nathalia Butschkau

Análise das alterações na musculatura duodenal e resposta do hospedeiro contra infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona: o papel da via JAK-STAT 6.

70 páginas

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Ramos, Simone Gusmão.

Palavras-chave: nematódeos, *Strongyloides*, músculo liso, hipertrofia, Dexametasona.

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA BUTSCHKAU PALAZZIN YODONO

Análise das alterações na musculatura duodenal e resposta do hospedeiro contra infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona: o papel da via JAK-STAT 6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia
Curso: Patologia Experimental

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por sua presença durante esta jornada, me auxiliando e dando forças quando eu achava que não conseguiria.

À minha amada mãe, Sílvia, e ao meu padrasto, Luiz Carlos, pelo constante apoio e carinho durante toda a minha vida, orando sempre por mim, me auxiliando, apoiando e incentivando na concretização deste sonho.

Ao meu filho, Arthur Teruo, que foi a minha inspiração e motivação para não parar no caminho.

Ao meu esposo, Renato, por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

Agradeço por vocês me fazerem parte da minha vida e me ajudarem a me tornar uma pessoa melhor...

Amo vocês!

Agradecimentos

À minha irmã Fabiana, minha avó Marina e à minha amiga Renata Stackflech, pelo apoio, companheirismo e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus colegas de laboratório e de departamento, especialmente à Elaine M. Floriano pela constante ajuda, pelo companheirismo e amizade. À Ana Carolina Silva de Freitas (Carol), Maria José Figueiredo (Zezé), Érica Carolina Campos Pulici, Mara Rúbia Nunes Celes e Cristiane Tefé pelos conselhos, esclarecimentos e motivação.

À minha orientadora Profa. Dra. Simone por acreditar no meu trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação e funcionários do departamento que conheci nesta caminhada pelo apoio e por ajudarem a tornar esta jornada mais leve e descontraída.

Aos colegas de trabalho da sala de urgência da Unidade de Emergência do HCFMRP-USP pelo companheirismo e apoio.

À professora Marlene por nos ceder os animais infectados, possibilitando o desenvolvimento do nosso trabalho e ao Dr. Vinícius Kannen por me auxiliar na quantificação das células caliciformes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este momento se concretizasse.

Muito Obrigada.

RESUMO

Palazzin-Yodono, NB. **Análise das alterações na musculatura duodenal e resposta do hospedeiro contra infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona: o papel da via JAK-STAT 6.** 2016. 70f. Dissertação (Mestrado). Departamento de patologia e medicina legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

A estrongiloidíase é uma parasitose intestinal sendo considerada a quarta maior causada por nematódeos. O mecanismo de defesa contra a estrongiloidíase é mediada pela ativação de células de perfil Th2, que amplificam a resposta celular através da secreção de mediadores inflamatórios. O que faz da estrongiloidíase um grave problema de saúde pública, é o desenvolvimento da hiperinfecção, principalmente devido ao uso de glicocorticóides, onde ocorre aumento do número de larvas e fêmeas que se disseminam por todo organismo. Estudos demonstraram que algumas infecções helmínticas têm sido acompanhadas por hipertrofia e hipercontratibilidade da musculatura intestinal, via JAK-STAT 6. Entretanto pouco se sabe sobre a influência desta via nas alterações da parede muscular do duodeno durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis*. O presente trabalho objetivou investigar as alterações morfológicas, imunológicas e patológicas da musculatura lisa intestinal que ocorrem em decorrência da infecção experimental pelo *S. venezuelensis*, bem como a interferência do tratamento com Dexametasona e o papel da via JAK - STAT 6 neste processo. Ratos *Wistar* foram inoculados com larvas de *S. venezuelensis*, tratados com dexametasona e sacrificados nos dias 5, 7, 14 e 21. Foram realizadas diversas colorações com a finalidade de quantificar as fêmeas adultas no duodeno, realizar morfometria da musculatura duodenal, quantificar eosinófilos e células caliciformes. Foi realizada análise da expressão gênica do gene STAT 6. Nossos resultados mostraram hiperplasia das células caliciformes, infiltrado eosinofílico e espessamento da musculatura lisa duodenal. Houve aumento na expressão de STAT 6 nos animais infectados. O tratamento com a Dexametasona inibiu drasticamente estas alterações. Entretanto o número de parasitas foi significativamente maior nos ratos infectados tratados quando comparados aos infectados. As alterações intestinais durante a infecção ocorreram na tentativa de expulsar o parasita e resolução da infecção. Contudo, a inibição deste processo provocada pela Dexametasona possivelmente retardou ou impediu a resolução da infecção.

Palavras-chave: *Strongyloides venezuelensis*, intestino delgado, músculo liso, Dexametasona, STAT.

ABSTRACT

Palazzin-Yodono, NB. **Analysis of changes in the duodenal musculature and host response to infection venezuelensis *Strongyloides* and Dexamethasone treatment: the role of the JAK-STAT 6.** 2016. 70f. Thesis (Ms). Departamento de patologia e medicina legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Strongyloidiasis is an intestinal parasitosis with an obligatory pulmonary cycle, which represents the fourth largest parasitosis caused by nematodes. The mechanism of defense against strongyloidiasis is mediated by activation of Th2 cells, which amplify the cellular response through the secretion of inflammatory mediators. Strongyloidiasis is a serious public health problem due the development of hyperinfection, due to the use of glucocorticoids, where the number of worms and females increases, and disseminate to other organs. Studies have shown that some helminth infections have been accompanied by hypertrophy of intestinal muscles and hypercontractility, JAK-STAT 6 pathway. However little has been reported about on the influence of JAK-STAT 6 pathway in changes of the muscular wall of the duodenum during *Strongyloides venezuelensis* infection. The aim of this study was to identify the morphological, immunological and pathological changes of the intestinal smooth muscle during *Strongyloides venezuelensis* in Wistar rats and to determine the effects of Dexamethasone treatment and role of JAK-STAT 6 pathway in these process. Wistar rats were inoculated with *S. venezuelensis* larvae, treated with dexamethasone and killed at 5, 7, 14 and 21 days. Morphological and morphometric analyzes with routine stains to quantify goblet cells, eosinophils and measure the circular and longitudinal layers of duodenal smooth muscle. Performed gene expression analysis of STAT 6. Goblet cell hyperplasia and increased of intestine smooth muscle wall thickness and eosinophils levels were elevated throughout the course of the infection. Moreover, an increase in the expression of STAT 6 in infected animals. The morphological findings and the immunomodulatory response to the infection were drastically reduced in dexamethasone-treated rats. However, the number of worms was significantly higher on infected and treated rats with Dexamethasone compared to just infected ones. The intestinal changes during infection occurred in an attempt of expel the parasite and elucidate the infection. Although, the inhibition of the process caused by Dexamethasone possibly delay or prevent the resolution of infection.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*, small intestine, smooth muscle, Dexamethasone, STAT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 O parasita e seu ciclo de vida	14
1.2 Manifestações Clínicas e Hiperinfecção	16
1.3 Resposta imunológica à infecção	18
1.4 A relação entre a strongiloidíase e a Dexametasona	19
1.5 Aspectos histopatológicos da strongiloidíase	21
1.6 A relação entre STAT6 e as alterações na parede intestinal	22
2. OBJETIVOS GERAIS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Animais	26
3.2. Grupos	26
3.3. Manutenção dos parasitas	26
3.4. Infecção dos animais	26
3.5. Tratamento dos animais com Dexametasona	27
3.6. Delineamento experimental	27
3.7. Microscopia óptica convencional	27
3.8. Análise histológica/morfométrica	28
3.9. PCR em Tempo Real	28
3.10. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Quantificação dos <i>Strongyloides venezuelensis</i> adultos e tratamento com a Dexametasona	30
4.2. Quantificação das células caliciformes da mucosa duodenal nos animais controles e infectados pelo <i>S. venezuelensis</i> e o tratamento com a Dexametasona	34
4.3. Quantificação de eosinófilos na mucosa e submucosa duodenal nos animais controles e infectados pelo <i>S. venezuelensis</i> e o tratamento com a Dexametasona	36
4.4. Alterações da musculatura lisa duodenal durante infecção pelo <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratamento com a Dexametasona	38
4.5 Análise da expressão gênica do gene STAT 6 por <i>real time PCR</i> durante infecção pelo <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratamento com a Dexametasona	42

5. DISCUSSÃO	44
5.1. Aspectos gerais da infecção pelo <i>S. venezuelensis</i> e tratamento com a dexametasona	44
5.2. Parasitas <i>versus</i> Dexametasona	45
5.3.1. Alterações das células caliciformes durante infecção pelo <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratamento com a Dexametasona.....	47
5.3.2. Os eosinófilos durante infecção pelo <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratamento com a Dexametasona.....	48
5.3.3. Outros fatores envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro contra os <i>Strongyloides</i>	49
5.4. Alterações da musculatura lisa duodenal durante infecção pelo <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratamento com a Dexametasona.....	49
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS	55
ANEXO B - Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	67
ANEXO C - <i>Sirius Red</i> pH 10,2 (Para Eosinófilos).....	69
ANEXO D – Hematoxilina e Eosina (HE).....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Strongyloides sp.</i>	15
Figura 2. Diagrama esquemático das vias de transdução de sinal de IL-4 e IL-13 envolvidas na resposta inflamatória do tipo Th2.....	23
Tabela 1. Tabela do número de parasitas no duodeno.....	30
Figura 3. Gráfico da quantificação de <i>S. venezuelensis</i> no duodeno.....	30
Figura 4. Fotomicrografia da mucosa intestinal nos dias 5 e 7 dos animais controles e infectados pelo <i>S. venezuelensis</i>	31
Figura 5. Fotomicrografia da mucosa intestinal nos dias 14 e 21, dos animais controles e infectados pelo <i>S. venezuelensis</i>	32
Figura 6. Fotomicrografia das células caliciformes da mucosa duodenal nos animais controles e 14 dias após infecção pelo <i>S. venezuelensis</i>	34
Figura 7. Gráfico da quantificação das células caliciformes da mucosa duodenal.....	35
Figura 8. Gráfico da quantificação de eosinófilos.....	36
Figura 9. Fotomicrografia dos eosinófilos na mucosa duodenal nos animais controles e 5 dias após infecção pelo <i>S. venezuelensis</i>	37
Figura 10. Gráfico da morfometria das túnicas musculares lisas, circular e longitudinal, no duodeno.....	38
Figura 11. Fotomicrografia das túnicas musculares lisas, circular e longitudinal, no duodeno dos animais controles e infectados após 5 e 7 dias de infecção pelo <i>S. venezuelensis</i>	39
Figura 12. Fotomicrografia das túnicas musculares lisas, circular e longitudinal, no duodeno dos animais controles e infectados após 14 e 21 dias de infecção pelo <i>S. venezuelensis</i>	40
Figura 13. Gráfico da análise do perfil de expressão do gene STAT 6.....	42
Figura 14. Figura representativa da coloração <i>Sirius red</i>	69
Figura 15. Figura representativa da coloração <i>Sirius red</i>	69

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais, helmintíases e protozooses, constituem um grande problema de saúde mundial, principalmente em países em desenvolvimento, onde são endêmicas e representam problemas de Saúde Pública (MONTEIRO et al., 1986; WHO, 1987; MONTEIRO, 1995). Infecções por parasitas gastrointestinais são comuns, porém negligenciadas, afetando mais de 30% da população mundial (LODO et al., 2010). Geralmente, estão relacionadas à ausência de saneamento básico, baixo nível socioeconômico, grau de escolaridade inferior, idade e hábitos de higiene precários que contribuem para os altos índices de parasitismo, podendo por vezes ser fatal, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (VITALLE, 2003). Segundo o Ministério da Saúde, a infraestrutura do saneamento básico ainda é muito desigual no Brasil e está concentrada em áreas urbanas e em Estados com maior desenvolvimento econômico (WALDMAN; SILVA; MONTEIRO, 2000).

Dentre os parasitas mais comuns estão os *Strongyloides*, nematódeos que possuem complexo ciclo de vida, sendo encontrados tanto na forma parasitária, fêmeas adultas, como vermes adultos de vida livre, machos e fêmeas. Existem 50 espécies de *Strongyloides* que, obrigatoriamente, parasitam o trato gastrointestinal de vertebrados (SPEARE, 1989). Eles podem infectar mamíferos, aves, répteis e anfíbios, entretanto é usual certa especificidade parasita - hospedeiro, uma vez que algumas espécies infectam apenas determinado hospedeiro.

Apenas duas espécies de *Strongyloides* infectam seres humanos, o *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni*. O *S. stercoralis* apresenta distribuição cosmopolita em regiões tropicais e subtropicais (SCHAD, 1989) e o *S. fuelleborne* ocorre na África e na Nova Guiné (NORMAND, 1876; GROVE, 1996; VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006). Entretanto para estudos em modelos animais estas espécies não podem ser utilizadas, uma vez que parasitam apenas humanos. Neste caso, devido às semelhanças nos ciclos biológicos, o *S. venezuelensis* e *S. ratti* são muito utilizados em roedores para estudo da infecção humana (GROVE, 1996).

A determinação da epidemiologia das strongiloidíases é complexa, devido à dificuldade de detecção, especialmente pela baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos, podendo então ser subestimada. Entretanto está presente em todos os continentes, exceto na Antártida, mas é mais comum nas regiões tropicais e subtropicais devido ao clima quente. A

prevalência global das estrogiloidíases é desconhecida, contudo especialistas estimam que exista entre 30 e 100 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (CDC, 2014). Podendo ocorrer desde uma infecção assintomática até a falência de múltiplos órgãos (GENTA, 1989). Sua prevalência é alta no sudoeste dos Estados Unidos, África, sudoeste da Ásia e América do Sul, particularmente no Brasil e na Colômbia, onde condições ambientais como, umidade relativa do ar alta, temperaturas elevadas e solos ricos em matéria orgânica bem oxigenada, favorecem o desenvolvimento do parasita (CARVALHO; PORTO, 2004; VADLAMUDI et al., 2006). Um estudo epidemiológico desenvolvido no Brasil entre 1990 e 2009 mostrou a ocorrência da hiperinfecção, quando ocorre reprodução partenogênica e autoinfecção dentro do hospedeiro, em torno de 5,5% pelo *S. stercoralis* (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Não foram encontrados estudos recentes sobre a incidência deste parasita a nível nacional.

1.1 O parasita e seu ciclo de vida

O ciclo de vida do *S. stercoralis* é bastante complexo, constituído por duas fases evolutivas distintas: o ciclo parasitário, no hospedeiro humano, e ciclo de vida livre, no qual as larvas adultas habitam o meio ambiente na ausência de um hospedeiro.

No ciclo parasitário encontram-se as larvas filarióides que medem aproximadamente 490-630 μm e são capazes de infectar o hospedeiro. Ainda no ciclo parasitário, a fêmea partenogenética mede aproximadamente entre 1,5 e 10 mm de comprimento. No ciclo de vida livre, os vermes medem aproximadamente 1 mm, sendo a fêmea maior que macho e a reprodução é do tipo sexuada. As larvas rabditóides são encontradas nas fezes e medem cerca de 210 μm (SPEARE, 1989).

O ciclo parasitário ocorre quando as larvas filarióides infectantes (L3) penetram ativamente na pele, ou ocasionalmente nas mucosas, através da excreção de metaloproteases que facilitam sua penetração através dos tecidos do hospedeiro. As larvas, então, migram pela corrente sanguínea e em 24 horas, pós-infecção, podem ser encontradas no trato respiratório do hospedeiro. Nos pulmões, elas rompem os septos alveolares causando focos hemorrágicos. Posteriormente, elas ascendem o trato respiratório até a faringe, onde podem ser expelidas ou deglutidas, passando pelo esôfago, estômago, e finalmente, instalam-se na porção duodenal do intestino delgado. Durante sua migração pelo corpo do hospedeiro, as larvas (L3) sofrem muda para o estágio L4 e, finalmente, quando alcançam o duodeno, aproximadamente 4 dias após a infecção, são fêmeas adultas que podem se reproduzir, na ausência de machos por partenogênese (reprodução assexuada), iniciando a deposição de ovos. No intestino, as fêmeas se fixam na mucosa duodenal, entre as criptas, onde depositam seus ovos. Uma fêmea

adulta produz aproximadamente de 30 a 40 ovos por dia, originando simultaneamente, três tipos de ovos que originam as larvas rabditóides (L1), que migram através do lúmen intestinal, atingindo o meio externo nas fezes (GROVE, 1996).

Dependendo da temperatura e umidade do ambiente, as larvas rabidformes podem ter dois diferentes ciclos de vida. O ciclo de vida indireto (heterogônico), no qual as larvas rabditóides se diferenciam em vermes adultos de vida livre (machos e fêmeas), que por reprodução sexuada, originam ovos cujas larvas se transformam em larvas filarióides infectantes (L3), ou o ciclo de vida direto (homogônico ou assexuado), no qual as larvas rabditóides sofrem mudas diretamente para o estágio de larvas filarióides infectantes (L3) e são capazes de penetrar a pele ou mucosas do hospedeiro, principalmente pela boca e esôfago quando são deglutidas através de alimentos contaminados, reiniciando o ciclo (SCHAD, 1989).

Uma das características que diferenciam o *S. stercoralis* de outros vermes é a capacidade de se replicar dentro do hospedeiro. As larvas rabidformes que eclodem dos ovos e migram para o lúmen intestinal se transformam em larvas filarióides infectantes (ciclo direto) e penetram a parede intestinal ou a pele perianal, reiniciando o ciclo, este processo é denominado auto-infecção (CONCHA et al., 2005). Esta habilidade do *Strongyloides* de estabelecer ciclos de autoinfecção dentro do hospedeiro pode resultar em infecções crônicas, podendo persistir no interior do hospedeiro durante décadas (GENTA, 1989; SIDDIQUI; BERK, 2001; CONCHA et al., 2005). A figura 1 mostra de forma esquemática o ciclo de vida do *Strongyloides*.

Figura 1. Ciclo de vida do *Strongyloides sp.* (PORTO et al., 2002, modificado por TEFÉ-SILVA et al., 2012).

1.2 Manifestações Clínicas e Hiperinfecção

As manifestações clínicas das strongiloidíases variam de acordo com a imunocompetência do hospedeiro, o tempo de parasitismo e a duração dos sinais e sintomas, sendo a infecção classificada em: aguda, crônica ou severa.

Infecções agudas apresentam amplo espectro de sinais e sintomas, desde estado assintomático até manifestações cutâneas como urticária, pulmonares como tosse e irritação traqueal e manifestações gastrointestinais como diarreia ou constipação. Entretanto a maior parte das infecções por *S. stercoralis* são resolvidas pelo sistema imunológico do hospedeiro (MAHMOUD, 1996).

Contudo, a capacidade do *S. Stercoralis* de promover autoinfecção pode resultar em infecções crônicas que podem persistir por décadas. Estas infecções também podem ser assintomáticas, entretanto usualmente podem ocasionar episódios prolongados de náusea, vômitos, diarreia, constipação, desnutrição e reações cutâneas (GROVE, 1989). Em indivíduos normais e imunocompetentes, muitas vezes a infecção pode ser assintomática, porém pode comprometer o estado nutricional do indivíduo. (STEPHENSON; LATHAM; OTTESEN, 2000).

A autoinfecção, contudo, pode ocorrer de maneira descontrolada, podendo resultar em ciclos subsequentes de autoinfecção, resultando em expansão fulminante das populações de parasitas, envolvendo múltiplos órgãos, com consequências potencialmente fatais para o hospedeiro (IGRA-SIEGAMN et al., 1981).

Neste contexto, o que faz da strongiloidíase um grave problema médico e social, é o desenvolvimento da hiperinfecção, geralmente em indivíduos imunossuprimidos, onde ocorre um aumento do número de larvas e um aumento da fertilidade das fêmeas que se multiplicam dentro do hospedeiro, disseminando por todo organismo (GENTA, 1989; 1992; CONCHA et al., 2005). Este aumento significativo do número de larvas, detectáveis em regiões extra-intestinais pode elevar a taxa de mortalidade, próximo a 80%. Fatores predisponentes para a hiperinfecção incluem as doenças autoimunes, desnutrição, indivíduos transplantados, com neoplasias ou em infecções virais, tais como: infectados pelo vírus HIV (Vírus da imunodeficiência humana) e HTLV (Vírus T-linfotrófico humano), ou ainda, pelo uso frequente de glicocorticóides (SIDDIQUI; BERK, 2001; KEISER; NUTMAN, 2004; MARCOS et al., 2008). Nestes indivíduos pode ocorrer a disseminação do *S. stercoralis*, que se não diagnosticado e tratado precocemente, pode levar o paciente a óbito.

A presença do parasita no intestino pode causar sinais e sintomas como diarreia, náusea, vômitos, dores abdominais, e desnutrição (CONCHA et al., 2005; VINEY; LOK, 2007; 2015).

A Transmigração bacteriana, que podem resultar em bacteremias, são complicações frequentes na síndrome da hiperinfecção, causadas pelas larvas filarióides que podem levar bactérias do intestino até a corrente sanguínea do hospedeiro (SEGARRA-NEWNHAM, 2007; BAMIAS et al., 2010). Patógenos como o *Streptococcus bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter cloacae* foram encontrados durante complicações fatais das strongiloidíades (LINK; ORENSTEIN, 1999). A taxa de mortalidade da disseminação ou hiperinfecção associada a infecções bacterianas é de aproximadamente 90% (IGRA-SIEGAMN et al., 1981).

Na disseminação do *Strongyloides*, larvas podem ser encontradas também no fígado, coração, linfonodos, rins, pâncreas e cérebro (KEISER; NUTMAN, 2004). Foram reportadas petéquias e púrpura em casos de disseminação, resultado da migração das larvas através das paredes dos vasos, promovendo hemorragia (BASILE et al., 2010). Outras complicações resultantes da disseminação pelo *S. stercoralis* incluem: colecistites, pancreatites, íleo paralítico, perfuração intestinal, infarto, peritonite e sepse (KRISHNAN et al., 2006). Menos usual, a presença de larvas no cérebro durante a disseminação da infecção pode causar

sintomas como alteração do estado mental, cefaleia, meningites bacterianas e coma (DUTCHER et al., 1990).

1.3 Resposta imunológica à infecção

A interação parasita-hospedeiro é complexa e pouco se sabe sobre os mecanismos imunomodulatórios que regulam esta interação. Diferentes fatores estão envolvidos, incluindo a capacidade de replicação do parasita, a resposta imunológica do hospedeiro à infecção e a capacidade de evasão parasita (GROVE, 1994; TRAJMAN; MACDONALD; ELIA, 1997).

Durante infecção helmíntica, os mecanismos de defesa do hospedeiro são mediados pela ativação de células do perfil Th2 (MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; ANTHONY et al., 2007; TEFÈ-SILVA et al., 2012), que secretam principalmente as interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, resultando na produção de anticorpos IgE, IgG e na ativação de células inflamatórias. A resposta imunológica, celular e humoral, contribuem efetivamente para a resolução da *estrongiloidíase* (KORENAGA et al., 1991; GROVE, 1996). Em hospedeiros humanos e modelos animais a resposta imunológica às *estrongiloidíases* é caracterizada por eosinofilia intraepitelial e tissular, neutrofilia e mastocitose com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (EL-MALKY et al., 2003; PATERSON et al., 2008; IRIEMENAM et al., 2010).

Os eosinófilos são essenciais contra infecções de parasitas não-fagocitáveis, como o *Strongyloides*. Os eosinófilos são produzidos e se diferenciam na medula óssea, sendo importantes células envolvidas nas infecções helmínticas e também nas doenças atópicas como asma e rinite alérgica (COFFMAN et al., 1989; DRUILHE et al., 2003; ABBAS; LITCHMAN, 2005). Sua produção e diferenciação ocorrem na medula óssea e a quimiotaxia ocorre com auxílio dos anticorpos como a IgG e IgA que podem levar os eosinófilos até os helmintos. O recrutamento destas células ocorre por quimiotaxia, com auxílio dos anticorpos como a IgG e IgA que podem levar os eosinófilos até os helmintos. Os eosinófilos ativados também secretam grânulos citoplasmáticos como a proteína básica principal, a proteína catiônica de eosinófilo e as peroxidases que são tóxicas para os parasitas (FACCIOLI et al., 1996; ABBA; LICHTMAN, 2005). Outras funções incluem a mediação de processos inflamatórios através da síntese e produção de numerosas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na defesa contra infecção por parasitas (COFFMAN et al., 1989; DRUILHE et al., 2003).

As infecções causadas pelos nematódeos gastrointestinais são acompanhadas também por mastocitose na tentativa de eliminação do parasita (ONAH; NAWA, 2000). Assim como os eosinófilos, os mastócitos possuem grânulos contendo histamina, heparina e proteases, e

expressam receptores em sua superfície que se ligam à IgE, onde ocorre a ligação cruzada de antígenos do parasita com os mastócitos, levando a desgranulação, ativação e secreção de uma série de mediadores pró-inflamatórios e citocinas (YAMAGUCHI et al., 1997; ONAH; NAWA, 2000).

Dentre as principais citocinas produzidas durante a infecção pelo *S. stercoralis* a IL-4 apresenta funções imuno-regulatórias, incluindo atividade do fator de crescimento das células T, regulação das células B, aumento dos níveis de IgE no plasma e estimulação e crescimento/diferenciação de macrófagos, células hematopoiéticas e mastócitos (URBAN et al., 1991; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006; WILKES et al., 2007).

A IL-13 participa dos mecanismos de defesa contra helmintos, promovendo aumento da secreção de muco e da contratilidade, fenômenos que podem contribuir com a expulsão do parasita (PORTO et al., 2001; SHEA-DONOHUE; URBAN, 2004; PATEL et al., 2009).

Infecções experimentais usando camundongos geneticamente deficientes mostraram que IL-4 foi necessária para a eliminação do *Heligmosomoides polygyros* (FINKELMAN et al., 1997), um nematódeo que se desenvolve na mucosa do intestino delgado. A IL-13 também foi crítica na eliminação do *Nippostrongylus brasiliensis* (URBAN et al., 1998) um nematódeo que, da mesma forma que o *Strongyloides*, migra através dos pulmões do hospedeiro e os vermes adultos vivem no intestino delgado. Ambas IL-4 e IL-13 foram necessárias na expulsão do epitélio intestinal do *Trichuris muris* (BANCROFT et al., 1998) e *Trichinella spiralis* (FINKELMAN et al., 2004).

A resposta humoral auxilia os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *Strongyloides* através da produção de imunoglobulinas por células plasmáticas. Muitas delas são essenciais para a eliminação do parasita, como a IgE, IgG e IgM (LIGAS et al., 2003; MACHADO et al., 2005). Estes anticorpos medeiam ativação de células que reconhecem o parasita, promovendo aumento na secreção de muco pelas células caliciformes e desgranulação dos mastócitos afetando a sobrevivência do verme no hospedeiro (MACHADO et al., 2009).

1.4 A relação entre a estrogiloidíase e a Dexametasona

Desde 1966, estudos reportam que a autoinfecção pode resultar na disseminação dos parasitas, ou seja, causando a síndrome da hiperinfecção. Neste caso, o aumento da carga parasitária e disseminação dos vermes para regiões extra-intestinais apresentou aumento expressivo na taxa de mortalidade, estimada em torno de 80% (SIDDIQUI; BERK, 2001; VADLAMUDI; CHI; KRISHNAWAMY, 2006). Como mencionado anteriormente, existem

diversos fatores de risco para a ocorrência de hiperinfecção e disseminação do *S. stercoralis*, destacamos então a terapia com glicocorticóides. Estudos reportam muitos casos de hiperinfecção em pacientes que receberam tratamento com glicocorticóides (CARVALHO; DA FONSECA PORTO, 2004; KEISER; NUTMAN, 2004; VADLAMUDI et al., 2006; ROXBY et al., 2009).

Nas últimas décadas, a síndrome da hiperinfecção aumentou significativamente com o uso de terapias com drogas imunossupressoras. Os glicocorticóides que são amplamente prescritos atuam como potentes imunossupressores aumentando o risco de transformação de estrongilodíase crônica em hiperinfecção, com consequente aumento da mortalidade (ARMIGNACCO et al., 1989; AL MASLAMANI et al., 2009). Os glicocorticoides (GCs) são hormônios estereoidais sintetizados na zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais, sob controle regulatório da secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) pela hipófise. Devido seus efeitos imunossupressores, anti-inflamatórios e antialérgicos (BARNES, 1998; NEWTON, 2000) são utilizados para tratamento de diversas doenças com anormalidades imunológicas, como o linfoma, artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), polimiosites, asma, lúpus eritematoso sistêmico, doenças renais, entre outras, muitas vezes pode levar a hiperinfecções fatais (KEISER; NUTMAN, 2004).

Os glicocorticóides possuem uma estrutura lipofílica que facilita sua passagem através da membrana plasmática. No citoplasma, os GCs se ligam a receptores protéico-específicos (receptores de glicocorticóide (GCR)) que pertencem à superfamília dos receptores nucleares, formando então o complexo GC-GCR. Esse complexo é translocado para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas de DNA, chamados elementos responsivos aos GCs (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; NEWTON, 2000). Dependendo do gene alvo, a ligação com os GCs pode resultar na inibição da ação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NFκB) e proteína ativadora 1 (AP-1) na região gênica responsável pela expressão de genes pró-inflamatórios, o que leva a inibição da síntese de citocinas como IL1-β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e das quimiocinas RANTES (quimiocina secretada e expressa por células T normais), MCP1 (proteína quimiotática de macrófago-1), MCP3, MCP4, MIP1 (proteína inflamatória de macrófago-1) e eotaxina. Os GCs também podem induzir a transcrição de proteínas anti-inflamatórias como a interleucina IL-10, anexina A e IκB (inibidor do fator nuclear kappa B), chamada transativação. Além disso, os GCs induzem apoptose na maior parte das células nucleadas (BARNES, 1998; LIBERMAN et al., 2007).

Devido ao fato dos GCs serem drogas imunossupressoras, eles podem levar a exacerbação de doenças infecciosas, dentre elas, a estrongiloidíase. Casos de hiperinfecção

em pacientes infectados por *Strongyloides* e que recebem o tratamento com GCs têm sido descritos na literatura, entretanto ainda pouco se sabe sobre esta interação e quais são os fatores de risco para a transformação da autoinfecção em hiperinfecção. Nestes casos, o tratamento com os GCs poderia ser o principal potencializador da hiperinfecção, podendo levar os pacientes a óbito (VADLAMUDI et al., 2006).

A Dexametasona é um GC sintético de amplo espectro de ação e considerado um potente anti-inflamatório e imunossupressor que inibe a ativação, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias, e no bloqueio de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, sendo amplamente utilizado no tratamento de diferentes patologias (BARNES, 1998). Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram que a Dexametasona interferiu na resposta à infecção pelo *S. venezuelensis*, promovendo um aumento do número de larvas e disseminação do parasita (TEFE-SILVA et al., 2008; MACHADO et al., 2011).

1.5 Aspectos histopatológicos da strongiloidíase

No intestino, a análise histopatológica tem mostrado a presença de fêmeas nas criptas duodenais a partir do 5º dia de infecção, com aumento da secreção de muco e infiltrado eosinofílico na lâmina própria (RIVASI et al., 2006; WERNECK-SILVA et al., 2006; KISHIMOTO et al., 2008). Na hiperinfecção, ocorre a invasão das larvas em direção à mucosa, sistema linfático e vasos sanguíneos. Observa-se hemorragia das mucosas que apresentam alta carga parasitária. Além disso, os parasitas podem ser encontrados em outros órgãos, incluindo pele, pulmões, fígado, coração e cérebro (SATHE; MADIWALE, 2006; AL MASLAMANI et al., 2009).

Modelos experimentais de infecção induzida por *S. venezuelensis* cujos hospedeiros são os roedores, tem sido amplamente utilizados para investigação dos vários aspectos patológicos e imunológicos, uma vez que este modelo assemelha-se consideravelmente à situação clínica da infecção humana.

Ratos infectados pelo *S. venezuelensis* apresentaram importantes alterações na parede intestinal, tais como: hiperplasia das células caliciformes nos brônquios, além de hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa das vias aéreas. Alterações semelhantes àsquelas encontradas durante a asma na resposta do tipo Th2. A Dexametasona inibiu todas estas respostas nos pulmões (TEFÈ-SILVA et al. 2012).

No intestino delgado de roedores infectados com *S. venezuelensis*, fêmeas e ovos foram observados na parede do trato gastrointestinal (TGI) e invadindo a mucosa, com aumento do exsudato inflamatório e eosinofilia (MACHADO et al., 2005). A Dexametasona aumentou a

fertilidade e proliferação das fêmeas, com disseminação de larvas para outros órgãos, como baço, rins, coração, fígado e cérebro (MACHADO et al., 2011).

Trabalhos usando modelos animais demonstraram que outros nematódeos, como o *T. spiralis* estão associados com aumento da contratilidade da musculatura do intestino delgado durante infecção (SUKHDEO; CROLL, 1981; COLLINS, 1996; VALLANCE, COLLINS; SNIDER, 1999). Também foi descrito que durante infecção por *T. spiralis* existe relação entre a hipercontratilidade da musculatura intestinal e a rápida expulsão dos vermes.

Os mecanismos relacionados às alterações da parede intestinal não estão totalmente elucidados.

1.6 A relação entre STAT6 e as alterações na parede intestinal

Polipeptídeos de sinalização extracelular, como os fatores de crescimento e as citocinas, são reconhecidos por receptores transmembrana específicos e complexos de receptores nas células-alvo. Uma das consequências desta ligação, ligante-receptor, é seu reconhecimento e rápida reprogramação ou alteração no padrão da expressão gênica da célula alvo. Diversas proteínas atuam na regulação da expressão gênica, dentre elas encontra-se a família reguladora de transcrição denominada, transdutor de sinal e ativação do fator de transcrição (STAT) (AARONSON; HORVATH, 2002). A sinalização intracelular é fundamental para o desenvolvimento e controle do crescimento e da homeostasia dos organismos pluricelulares. A não funcionalidade desta via pode acarretar em síndromes de deficiência imunológica e cânceres.

As vias STAT foram encontradas em limo, vermes, moscas e vertebrados, entretanto estão ausentes nos fungos e nas plantas (DARNELL JR., 1997). Em mamíferos foram descritos sete genes, STAT, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6.

As proteínas STAT são fatores de transcrição inativos na ausência da estimulação de receptor específico. Sua ativação ocorre através da ligação de uma variedade de ligantes como interferóns, interleucinas e fatores de crescimento que se ligam aos receptores de superfície associados aos JAKs, ativando-os e aumentando a atividade da quinase (BROOKS et al., 2014). As STAT estão localizadas no citoplasma de células alvo cujo receptor não foi ativado. Contudo ativam-se rapidamente em resposta ao acoplamento ligante-receptor e são recrutadas para o domínio intracelular do receptor por meio de ligação específica entre o domínio STAT Src – homólogo 2 (SH2) e os resíduos de fosfotirosina do receptor. Esta interação SH2-fosfotirosina é altamente específica, constituindo etapa crítica na determinação da especificidade da ativação de STAT mediada por receptor.

No caso das proteínas STAT, a atividade da quinase de tirosina necessária é fornecida por proteínas citoplasmáticas associadas ao receptor de membrana da família Janus Kinase (JAK) (LEONARD, 2001). Em células de mamíferos, são encontrados apenas quatro tipos de proteínas, JAK, JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2. As JAKs ligam-se especificamente aos domínios intracelulares das cadeias de sinalização do receptor de citocina e catalisam a fosforilação, induzida pela interação com o ligante, delas mesmas e dos resíduos intracelulares de tirosina do receptor, criando locais de ancoragem STAT. A fosforilação de STAT e ativação dos resíduos de tirosina no receptor levam à homo e heterodimerização de STAT. Os dímeros de STAT são rapidamente transportados do citoplasma para o núcleo e se ligam a segmentos específicos do DNA. A afinidade da ligação de um determinado dímero STAT ativo para uma sequência alvo de DNA é determinada por variações específicas na sequência nucleotídica (EHRET et al., 2001). Uma vez que o dímero STAT ativo reconhece um promotor alvo, a taxa de transcrição deste promotor aumenta significativamente. A habilidade de induzir a transcrição de genes-alvo é uma propriedade específica dos dímeros de STAT, refletindo a capacidade de domínios de ativação de transcrição STAT para recrutar co-ativadores nucleares que medeiam a ligação do STAT. Neste contexto as STATs aparecem como proteínas promotoras adicionais que variam de um gene para outro e que são necessárias para adequada regulação gene-específicas.

A via JAK-STAT geralmente não funciona de forma autônoma. Pelo contrário, ela é regulada através de extensa variedade de estímulos intrínsecos e ambientais. Estes meios de regulação complexos podem adicionar plasticidade à transcrição em uma célula ou tecido específico.

A supressão da via JAK-STAT pode ocorrer por mecanismos comuns como a internalização do receptor e sua subsequente degradação. Recentemente foram identificados supressores de sinalização de citocinas que inibem a fosforilação do STAT pela ligação e inibição dos JAKs ou competindo com STAT pelo sítio de ligação em receptores de citocina (KREBS; HILTON, 2001). As STATs também podem ser negativamente reguladas por inibidores de proteínas ativados por STAT, que podem atuar no núcleo através de diversos mecanismos (SHUAI, 2006) bloqueando o acesso às sequências-alvo do DNA.

Estudos recentes utilizando modelos animais, cujos camundongos eram deficientes de STAT6 demonstraram que a via STAT 6 é a principal via de sinalização envolvida na diferenciação de células T CD4 na resposta do tipo Th2 (KAPLAN et al., 1996; TAKEDA et al., 1996).

Estudos sugerem que a ligação das interleucinas IL-4 e IL-13 aos receptores de membrana ligados ao JAK – STAT6 são componentes-chave no desenvolvimento da inflamação das vias aéreas, produção de muco e hiperresponsividade na asma (GEBA; MOLFINO, 2010). A figura 2 mostra esquema de como ocorre à ativação de STAT6 na asma.

Figura 2. Diagrama esquemático das vias de transdução de sinal de IL-4 e IL-13 envolvidas na resposta inflamatória do tipo Th2. A IL-4 liga-se ao receptor de IL-4, subunidade α , que é um componente tanto do tipo I (receptor IL-4 α e γ C) e receptores do tipo II (receptor IL-4 α e receptor IL-13 α 1), enquanto que a IL-13 é reconhecida pelo receptor IL-13 α 1, que é um receptor tipo II. IL-13 também se liga à cadeia α 2 do receptor de IL-13 com uma maior afinidade do que a IL-13 α 1. γ C ativa Janus quinase (JAK) 3 e o receptor IL-13 α 1 ativa a tirosina-quinase 2 (TYK2) e JAK2. As JAKs ativadas fosforilam STAT6 que, após dimerização, transloca-se para o núcleo onde se liga aos promotores de IL-4 e IL-13 genes que estão associados com respostas Th2, como: diferenciação celular, inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade das vias aéreas, fibrose e metaplasia da mucosa epitelial (HOWARD et al., 2002).

A ativação de STAT6 foi crítica no desenvolvimento da hipercontratibilidade intestinal durante infecção, em camundongos, pelo nematódeo *T. spiralis*. Possivelmente, a ativação de STAT 6 ocorra pela ligação de IL-4 e IL-13, mediando a hipercontratibilidade da musculatura e

contribuindo de maneira eficiente para a expulsão dos parasitas do intestino (KHAN et al., 2001).

Além de possuírem importantes papéis na expulsão dos vermes adultos de *Nippostrongylus brasiliensis*, um helminto, as IL-4, IL-13 e STAT6, também auxiliam na proteção do hospedeiro nas fases iniciais pré-intestinais de infecções secundárias (KNOTT et al., 2009).

Muitos estudos demonstram a importância da via JAK-STAT 6 nas alterações da musculatura lisa e mucosas, principalmente durante a resposta do tipo Th2 na asma, tais como: hipercontratilidade da musculatura lisa e aumento da secreção de muco pelas células caliciformes. Sendo a ativação desta via mediada principalmente pela ligação das interleucinas 4 e 13 aos receptores acopladas ao complexo JAK-STAT 6. Trabalhos com outros helmintos também demonstraram a importância da hipercontratilidade promovida, ao menos em parte, pela ativação da STAT 6. Nestes estudos esta hipercontratilidade foi essencial para a resolução das infecções, uma vez que contribuía para a expulsão dos parasitas. Ao passo que, animais deficientes de STAT 6 tiveram atraso na expulsão destes nematódeos, prolongando a infecção.

2. OBJETIVOS GERAIS

Verificar se a proteína STAT 6 está envolvida nas alterações da parede intestinal durante infecção pelo *S. venezuelensis* em animais tratados ou não com Dexametasona.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as alterações morfológicas na parede duodenal durante a infecção pelo parasito *S. venezuelensis*;
- Quantificar os eosinófilos e as células caliciformes durante resposta inflamatória do hospedeiro em decorrência da infecção pelo parasita *S. venezuelensis* durante 21 dias de infecção;
- Determinar os efeitos do tratamento com Dexametasona na resposta inflamatória em decorrência da infecção pelo parasita *S. venezuelensis* durante 21 dias de infecção;
- Verificar se a via JAK-STAT6 está envolvida nas alterações da parede intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 100 e 130g, provenientes do biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Brasil). Acondicionados em câmara de ciclo claro/escuro e tiveram acesso livre a água, alimento e maravalha autoclavados. Os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, protocolo nº 188/2009 (Anexo A).

3.2. Grupos

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais:

- Controle+Salina (C);
- Controle+Tratado com Dexametasona (CD);
- Infectado+Salina (I);
- Infectado+Tratado com Dexametasona (ID).

3.3. Manutenção dos parasitas

As larvas do nematódeo *Strongyloides venezuelensis* foram isoladas dos roedores *Bolomys lasiuris*, mantidos no Laboratório da Profa. Dra. Marlene Ueta, do Departamento de Parasitologia da UNICAMP. Para a manutenção da linhagem L-2 do *S. venezuelensis* foram utilizados ratos infectados com 9.000 larvas, via subcutânea, da linhagem L-3 de *S. venezuelensis*. No sétimo dia após infecção, foram colhidas as fezes para a realização de culturas. As fezes dos animais foram colhidas e cultivadas em carvão animal por dois dias, em estufa a 28°C segundo Loos (1934) (apud PESSOA, 1978) para obtenção das larvas filarióides infectantes (L3). As larvas L3 foram recuperadas do carvão utilizando método de Rugai (RUGAI et al., 1954) e foram quantificadas.

3.4. Infecção dos animais

Após a quantificação das larvas recuperadas, os ratos dos grupos (I) e (ID) foram inoculados, via subcutânea, com 9.000 larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* em 300µl de PBS (Tampão Salina Fosfato) na região abdominal. Os grupos controles (C) e (CD) foram

inoculados apenas com 300µl de PBS. Os animais foram sacrificados nos dias 5, 7, 14 e 21 após a infecção (TEFÉ-SILVA et al. 2008; 2012).

3.5. Tratamento dos animais com Dexametasona

Os animais dos grupos CD e ID foram tratados com glicocorticóide comercial (Fosfato dissódico de Dexametasona - Decadron®, Laboratório Aché, Campinas, Brasil) na dose de 2mg/kg, administrado por via subcutânea.

A primeira dose foi administrada 1 hora antes da infecção e depois diariamente até o 21º dia após a infecção, sendo a última dose administrada 1 hora antes do sacrifício dos animais (TEFÉ-SILVA et al. 2008; 2012).

3.6. Delineamento experimental

Para coleta de material, os animais foram anestesiados com Xilazina-8mg/kg e Cloridrato de Cetamina-74mg/kg, via intra-muscular (TEFÉ-SILVA et al. 2008; 2012). Posteriormente, foi realizada tricotomia da região abdominal e o animal foi posicionado em mesa cirúrgica, fixado em decúbito dorsal. A antisepsia da pele foi realizada com álcool iodado. Realizada incisão cirúrgica mediana no abdome. A cavidade abdominal foi aberta e a valva pilórica exposta. Um fragmento de aproximadamente 5 cm foi removido da porção duodenal do intestino delgado, logo após esta valva. O fragmento foi lavado com soro fisiológico 0,9% através de cânula inserida no lúmen intestinal. Imediatamente, as extremidades foram descartadas e o restante cortado em pequenos fragmentos, que foram pesados em balança de precisão. Os fragmentos com corte transversal foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a temperatura -80°C e os com corte longitudinal foram fixados em cortiça com alfinetes de aço-inoxidável e imersos em formol tamponado a 10%.

3. 7. Microscopia óptica convencional

Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas. Foram então processados com desidratação em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados com Xilol e, posteriormente, infiltrados e incluídos em parafina. Foram realizadas secções histológicas de 5 µm de espessura que foram separadas para colorações específicas: ácido periódico-Schiff (“PAS”), anexo B, para contagem das células caliciformes presentes na mucosa duodenal, *Sirius Red*, anexo C, para quantificação de eosinófilos e Hematoxilina-Eosina (HE), anexo D, para análise morfométrica e contagem do número de parasitas na mucosa intestinal.

3.8. Análise histológica/morfométrica

Para realização das análises morfométricas utilizou-se o software Leica Qwin (Leica Microsystems Image Solutions, Cambridge, UK) em conjunto com o microscópio Leica CTR 5000 (Leica, Microsystems GmbH, Wetzlar Germany) e câmera (Leica Microsystems Ltd, Heebrugg, Switzerland) conectados a um computador.

Após coloração com Hematoxilina – Eosina (HE), a espessura das camadas musculares lisas do duodeno, camadas circular e longitudinal, foram medidas separadamente e agrupadas. A mensuração foi aleatória em aumento de 200×. Foi utilizado um n= 4 e 80 mensurações para cada um dos grupos (C) e (CD) e n= 5 e 100 mensurações para os grupos (I) e (ID). Os valores encontrados foram expressos em milímetros.

A contagem de células caliciformes foi aleatória, em aumento de 400×, e obtida após coloração de “PAS”, respeitando a razão:

Número de células caliciformes por cripta

Número total de células epiteliais por cripta

Foram consideradas positivas as células caliciformes marcadas em rosa pela coloração do “PAS”. Apenas as criptas inteiras e voltadas para a luz intestinal foram utilizadas. Para cada grupo (C) e (CD) foram contadas 48 criptas e 50 criptas para cada grupo (I) e (ID).

Os eosinófilos foram identificados e quantificados na mucosa e submucosa duodenal, após a coloração *Sirius Red*, utilizando 20 campos randomizados para cada grupo, aumento de 400× com área total de 1,2 mm² (TEFÉ-SILVA et al. 2012).

Foram incluídos resultados prévios, não publicados, obtidos por nosso grupo da pesquisa da contagem dos parasitas na mucosa duodenal. Foram analisadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e secções intestinais com 5µm de espessura. A contagem foi realizada em 10 campos de cada corte dos grupos (C), (I) e (ID), aumento de 100×.

3.9. PCR em Tempo Real

Para coleta, extração e quantificação de RNA para “Real-Time PCR” foram colhidas amostras de duodeno dos grupos C, CD, I e ID dos dias 5, 7, 14 e 21 após a infecção pelo *S. venezuelensis*. O material coletado foi armazenado em microtubos estéreis de 2mL e imediatamente congelado a -70°C até o momento da extração de RNA.

Coleta, extração e quantificação: Para a extração de RNA foi adicionado 1mL de Trizol® Reagent (Life Technologies Corporation) aos tecidos que, posteriormente, foram triturados com homogeneizador de tecidos (DREMEL®300, Marconi). Após este

procedimento as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de Clorofórmio aos tubos e estes foram homogeneizados no agitador “vórtex” por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 minutos e então centrifugadas a 4°C, 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos livres de RNase e depois precipitado com 500µL de Isopropanol e homogeneizado em “vórtex” por 15 segundos. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, novamente, centrifugadas a 4°C, 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 200µL de etanol 70% e centrifugado a 4°C, 12.000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, o etanol foi retirado e o pellet deixado para secar a temperatura ambiente. Após a secagem, foram adicionados 20µL de água DEPC. O RNA foi quantificado no aparelho Nanodrop 2000. Após a determinação da concentração do RNA total, o lisado foi armazenado a -80°C, para a reação de Real Time-PCR.

PCR em Tempo Real - Para a transcrição reversa, 500ng de RNA total foram transcritos com o “High-capacity cDNA RT” (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em termociclador, conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada reação para detecção dos genes STAT 6 utilizando a sonda TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A detecção ou ausência da sequência de DNA específica foi realizada através da quantificação da emissão de luz durante os ciclos da PCR. A quantificação da expressão dos genes foi expressa em unidades arbitrárias (UA), utilizando a expressão do gene GAPDH como fator de normalização.

3.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico Graphpad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, California, EUA). Foi verificada a normalidade dos dados através do teste de D’Agostino. Múltiplas comparações foram feitas usando análise de variância ANOVA *one-way* e pós-teste Tukey. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e o nível de significância de 5% foi escolhido para mostrar a diferença entre as médias.

4. RESULTADOS

A presença das larvas do *S. venezuelensis* no duodeno promoveu importantes alterações na parede intestinal e na mucosa. Foi evidenciado aumento da espessura das túnica muscular lisas da parede, bem como hiperplasia das células caliciformes da mucosa. Em contrapartida, o tratamento com Dexametasona interferiu em ambos os aspectos, inibindo-os.

4.1. Quantificação dos *Strongyloides venezuelensis* adultos e tratamento com a Dexametasona

A análise das secções histológicas mostrou que no 5º dia após a infecção, já foram encontradas fêmeas adultas de *S.v.* entre as criptas e na luz intestinal. Nos animais infectados (I) não houve diferença estatística entre os dias 5, 7 e 14, porém com 21 dias houve importante decréscimo do número de fêmeas parasitas adultas presentes no duodeno ($p < 0,05$). Semelhantemente ao grupo (I), os intestinos dos animais (ID) também apresentaram fêmeas parasitas adultas, entretanto o pico foi com 14 dias e com 21 dias os dados já mostram tendência de queda do número de parasitas, entretanto não houve diferença estatística entre (ID14) e (ID21). Além disso, o número de parasitas permaneceu aumentado quando comparado aos outros grupos ($P < 0,05$). A tabela abaixo mostra as médias $\pm$ erro padrão obtidas nos (I) e (ID) no 5º, 7º, 14º e 21º dias de infecção. A figura 3 mostra o gráfico do número de parasitas obtidos no duodeno em todos os períodos estudados, enquanto as figuras 4 e 5 mostram fotomicrografias das fêmeas partenogenéticas no duodeno durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis*.

Dias após Infecção	Duodeno	
	I	ID
5	3,2 ± 0,5	4,5 ± 0,5
7	3,6 ± 0,3	4,7 ± 0,4*
14	3,5 ± 0,2	7,3 ± 0,5*
21	0,6 ± 0,3	6,0 ± 0,7*

Tabela 1. Número de vermes adultos de *Strongyloides venezuelensis* encontrados no duodeno de animais infectados, tratados ou não com Dexametasona. Cortes obtidos nos dias 5, 7, 14 e 21 dias após infecção. Número de vermes avaliados em 10 campos de cada corte de 5µm através do microscópio ótico com aumento de 100×. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. * p<0,05. Infectados versus infectados tratados com Dexametasona.

Figura 3. Número de vermes adultos de *Strongyloides venezuelensis* encontrados no duodeno de animais infectados, tratados ou não com Dexametasona. Cortes obtidos nos dias 5, 7, 14 e 21 dias após infecção. Número de vermes avaliados em 10 campos de cada corte de 5µm através do microscópio ótico com aumento de 100×. Os resultados são expressos como média ± erro padrão, * p<0,05, infectados versus infectados tratados.

Figura 4. Imagem representativa da mucosa duodenal de animais controles ou infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, nos dias 5 e 7 após a infecção, tratados ou não com a Dexametasona. Coloração HE (aumentos originais: 100×).

Figura 5. Imagem representativa da mucosa duodenal de animais controles ou infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, nos dias 14 e 21 após a infecção, tratados ou não com a Dexametasona. Coloração HE (aumentos originais: 100×).

4.2. Quantificação das células caliciformes da mucosa duodenal nos animais controles e infectados pelo *S. venezuelensis* e o tratamento com a Dexametasona

O número de células caliciformes da mucosa intestinal dos animais infectados permaneceu semelhante ao dos controles no 5º dia, uma vez que não houve diferença estatística entre estes grupos. Entretanto, no 7º dia houve redução destas células nos grupos (I) quando comparados aos (C), sendo $p < 0,0001$. Contrariamente, com 14 dias nota-se expressivo aumento do número de células caliciformes nos animais infectados (hiperplasia). Também foi verificado aumento na produção de muco durante análise destas lâminas. Entretanto, o número de células caliciformes diminuiu e no 21º dia este valor se equiparou ao dos controles não tratados do mesmo dia de infecção. Os valores (média $\pm$ desvio padrão) dos animais (I) foram $0,10 \pm 0,03$; $0,08 \pm 0,03$; $0,17 \pm 0,04$; $0,12 \pm 0,05$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Houve diferença entre os grupos (I) e (C) nos dias 7 e 14 ($p < 0,0001$), contudo nos dias 5 e 21, não foi encontrada diferença estatística. As médias dos grupos controles foram $0,12 \pm 0,03$; $0,12 \pm 0,03$; $0,11 \pm 0,02$; $0,11 \pm 0,02$, nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente.

O tratamento com Dexametasona inibiu significativamente essa hiperplasia quando comparados os animais infectados *versus* infectados tratados. Os valores encontrados nos grupos (ID) foram $0,10 \pm 0,02$ (*ns*); $0,07 \pm 0,03$ (*ns*); $0,09 \pm 0,03$ ($P < 0,001$); $0,08 \pm 0,02$ ($P < 0,001$), nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Houve redução do número de células caliciformes nos animais (CD) em comparação com os (C) nos dias 5 e 7, sendo $p < 0,001$. A média $\pm$ desvio padrão dos grupos (CD) foram, respectivamente: $0,08 \pm 0,02$; $0,08 \pm 0,02$; $0,12 \pm 0,05$; $0,08 \pm 0,02$.

A Figura 6 mostra imagem representativa das células caliciformes na mucosa duodenal no 14º dia de infecção, enquanto a figura 7 mostra os valores obtidos na quantificação das células caliciformes.

Figura 6. Imagem representativa das células caliciformes da mucosa duodenal após 14 dias de infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com dexametasona. Coloração PAS (aumentos originais: 200×).

Figura 7. Gráfico representativo da Contagem de Células Caliciformes nas criptas da mucosa duodenal em animais controles ou após infecção pelo *Strongyloides venezuelensis*, tratados ou não com Dexametasona. Os símbolos representam a significância entre os grupos controles e infectados e entre (I) e (ID), *** $P < 0,0001$. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4.3. Quantificação de eosinófilos na mucosa e submucosa duodenal nos animais controles e infectados pelo *S. venezuelensis* e o tratamento com a Dexametasona

A coloração de *Sirius Red* mostrou presença de infiltrado eosinofílico em todos os dias de infecção. A contagem destas células revelou que seu pico aconteceu no 5º dia após a infecção, coincidindo com a chegada das larvas no intestino, que ocorre por volta do 4º dia. Durante análise do material notou-se que nos grupos (I5) e (ID5) os eosinófilos estavam presentes em maior número na submucosa e na base da mucosa. Nos dias 7, 14 e 21, houve declínio no número de eosinófilos, porém a quantidade destas células ainda permaneceu aumentada em relação aos animais controle ($P < 0,001$). Os valores obtidos nos grupos (I) foram $56,52 \pm 14,4$; $41,92 \pm 11,5$; $31,16 \pm 14,25$; $37,12 \pm 12,9$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. As médias dos grupos controles foram $27,32 \pm 7,3$; $16,30 \pm 4,1$; $17,30 \pm 6,16$; $21,85 \pm 7,1$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente.

O tratamento com Dexametasona inibiu significativamente a presença de eosinófilos no duodeno durante todo o experimento. Os valores obtidos nos grupos (ID) foram $7,72 \pm 4,18$; $11,08 \pm 6,6$; $5,8 \pm 3,4$; $3,9 \pm 3,7$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Em todos os dias de infecção a diferença entre os grupos (I) e (ID) foi significativa ($P < 0.001$).

O tratamento provocou também importante redução no número de eosinófilos nos animais (CD) quando comparados aos grupos (C). Os valores obtidos foram: $2,9 \pm 1,6$ ($P < 0,0001$); $2,6 \pm 1,4$ ($P < 0,001$); $5,8 \pm 3,4$ ($P < 0,0001$); $3,9 \pm 3,7$ ($P < 0,0001$) nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. As médias dos grupos controles foram $27,32 \pm 7,3$; $16,30 \pm 4,7$; $17,30 \pm 6,17$; $21,85 \pm 7,1$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. A Figura 8 mostra o gráfico dos valores obtidos na quantificação dos eosinófilos e a figura 9 mostra imagem representativa dos eosinófilos no duodeno no 5º dia de infecção.

Figura 8. Gráfico representativo da contagem de eosinófilos na mucosa e submucosa duodenal, em animais controles ou após infecção pelo *Strongyloides venezuelensis*, tratados ou não com Dexametasona. Os símbolos representam a significância entre os grupos controles e infectados e entre (I) e (ID), *** $P < 0,0001$. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Figura 9. Imagem representativa dos eosinófilos na mucosa duodenal após 5 dias de infecção por *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com dexametasona. A: Controle; B: Controle + Dexa; C: Infectado; ID: Infectado + Dexa. Coloração Sirius Red (aumentos originais: 200×).

4.4 Alterações da musculatura lisa duodenal durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

A infecção pelo *S. venezuelensis* promoveu um importante espessamento das túnicas musculares lisas duodenais, circular e longitudinal, durante todo o período estudado, com expressivo aumento com 14 dias e pico com 21 dias. Os valores obtidos (túnicas circular + longitudinal) foram: $0,12 \pm 0,02$; $0,10 \pm 0,03$; $0,22 \pm 0,03$; $0,26 \pm 0,04$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Houve diferença significativa entre os grupos infectados e os controles ($P < 0,0001$). As médias dos grupos controles foram $0,07 \pm 0,02$; $0,07 \pm 0,01$; $0,09 \pm 0,03$; $0,09 \pm 0,03$; $0,09 \pm 0,03$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Entretanto, o tratamento com Dexametasona inibiu drasticamente o espessamento da camada muscular lisa durante todo o período estudado. Os valores foram $0,07 \pm 0,02$; $0,07 \pm 0,03$; $0,12 \pm 0,03$; $0,09 \pm 0,04$ nos dias 5, 7, 14 e 21, respectivamente. Os grupos (I) e (ID) foram estatisticamente diferentes

($p < 0,0001$). As figuras abaixo demonstram as alterações ocorridas na musculatura lisa duodenal, obtidas nos experimentos (figuras 10, 11 e 12).

Figura 10. Gráfico representativo da espessura das tûnicas musculares duodenais: Circular e Longitudinal, em animais infectados ou não pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com Dexametasona. Os símbolos representam a significância entre os grupos controles e infectados e (I) e (ID), ***P < 0,0001. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Figura 11. Imagem representativa da musculatura lisa do duodeno, tûnicas circular e longitudinal, nos animais controles, infectados com *Strongyloides venezuelensis* e infectados e tratados com Dexametasona nos dias 5 e 7, após infecção. Coloração: HE, aumento original 200×.

Figura 12. Imagem representativa da musculatura lisa do duodeno, tûnicas circular e longitudinal, nos animais controles, infectados com *Strongyloides venezuelensis* e infectados e tratados com Dexametasona nos dias 14 e 21, após infecção. Coloração: HE, aumento original 200×. As barras verticais representam a espessura das camadas circular e longitudinal nos animais controles para cada dia de infecção. São utilizadas para efeito de comparação com os grupos (I) e (ID) de cada dia estudado.

4.5 Análise da expressão gênica do gene STAT 6 por *real time PCR* durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

A análise da expressão gênica do gene STAT 6 por *real time PCR* foi realizada utilizando amostras duodenais dos animais controles, controles tratados com Dexametasona, infectados e infectados tratados com Dexametasona com a finalidade de estimar a quantidade relativa de RNA mensageiro (mRNA) para STAT6. A figura 13 mostra a expressão gênica de STAT 6 com valores expressos em unidades arbitrárias (UA) após infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* nos dias 5, 7, 14 e 21. A expressão de STAT 6 não foi diferente entre os grupos controles em todos os dias estudados ($1,00 \pm 0,00$). Houve expressivo aumento da transcrição de STAT 6 no grupo (I21) ($5,77 \pm 4,64$) quando comparado ao (C21) ($1,00 \pm 0,00$) com $p < 0,0001$. A expressão de STAT 6 no grupo (I21) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) em comparação a todos os demais grupos infectados não tratados. Os valores das médias $\pm$ desvio padrão obtidos nestes grupos infectados de 5, 7 e 14 dias, respectivamente, foram: $0,11 \pm 0,07$; $0,95 \pm 0,41$; $1,45 \pm 0,69$. Não houve diferença estatística entre os controles tratados com Dexametasona e entre os (CD) e (ID). Os valores obtidos nos grupos (CD5), (CD7), (CD14), (CD21) e (ID5), (ID7), (ID14) e (ID21), respectivamente, foram: $0,18 \pm 0,06$; $0,69 \pm 0,30$; $1,20 \pm 0,69$; $0,95 \pm 0,16$; $0,07 \pm 0,03$; $1,51 \pm 0,90$; $2,65 \pm 1,45$; $1,23 \pm 0,78$. Entre os animais infectados tratados com Dexametasona a transcrição de STAT 6 se manteve praticamente inalterada nos períodos estudados. Houve diferença estatística apenas entre (ID5) e (ID14) ($p < 0,05$). Os valores obtidos nos grupos (ID5), (ID7), (ID14) e (ID21) são respectivamente: $0,07 \pm 0,02$; $1,51 \pm 0,90$; $2,65 \pm 1,45$; $1,23 \pm 0,76$.

Figura 13. Gráfico da análise do perfil de expressão do gene STAT6 por real time PCR do duodeno de animais controles e infectados pelo *S. venezuelensis*, tratados ou não com Dexametasona nos dias 5, 7, 14 e 21 dias após a infecção. Observa-se um acentuado aumento nos níveis de expressão do gene STAT6 nos animais (I21) com relação ao (C21) e aos demais grupos estudados em todos os dias de infecção. Os símbolos representam a significância entre os grupos: *** $P < 0,0001$. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos gerais da infecção pelo *S. venezuelensis* e tratamento com a dexametasona

A estrongiloidíase é uma parasitose intestinal na qual o nematódeo *Strongyloides stercoralis* infecta um hospedeiro humano através de penetração ativa na pele, nas mucosas ou através da ingestão de alimentos ou água contaminados pelas larvas do parasita. Posteriormente, por volta do quarto dia de infecção, os parasitas adultos, fêmeas partenogênicas, instalam-se na porção duodenal do intestino delgado e iniciam a ovoposição.

As manifestações clínicas da infecção podem caracterizar quadros agudos, crônicos e severos. Os sinais e sintomas abrangem desde indivíduos assintomáticos até quadros de diarreia, vômitos, dores abdominais, desnutrição, reações cutâneas (CONCHA et al., 2005; VINEY; LOK, 2007; 2015) e em casos mais graves pode culminar em óbito. Esta é uma enteroparasitose de difícil detecção, por isso sua incidência epidemiológica pode ser subestimada.

Os casos mais graves ocorrem em indivíduos com algum acometimento do sistema imunológico como em indivíduos transplantados, em portadores de neoplasias, durante infecções virais como HIV e HTLV ou pelo uso frequente de glicocorticoides (SIDDIQUI; BERK, 2001; KEISER; NUTMAN, 2004; MARCOS et al., 2008). Estes indivíduos, quando infectados pelo *S. stercoralis*, podem apresentar um estado grave da estrongiloidíase no qual o sistema imunológico deficiente permite grande reprodução de parasitas e, conseqüentemente, ocorre a auto-infecção e a disseminação das larvas para outros órgãos além do intestino, processo denominado hiperinfecção (GENTA, 1989; 1992; CONCHA et al., 2005). Nestes casos a taxa de mortalidade está próxima de 80%.

O presente estudo longitudinal utilizou ratos Wistar como modelos experimentais e demonstrou importantes alterações imunológicas e histológicas, dependentes do período do curso da infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e da presença de parasitas no intestino delgado. A escolha desta espécie de animais deve-se ao fato de que são hospedeiros naturais do *S. venezuelensis*. Além disso, a infecção por este parasita nestes animais apresenta semelhanças quando comparadas aos quadros clínicos encontrados em humanos durante infecção pelo *Strongyloides Stercoralis*.

Os glicocorticóides, como a Dexametasona utilizada neste estudo, são utilizados para suprimir a inflamação e as respostas imunológicas, celular e humoral em indivíduos

transplantados e no tratamento de doenças autoimunes, como na urticária, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, asma e doenças inflamatórias do intestino (BARNES, 1998, LUZI et al., 2009). A supressão imunológica ocasionada por estes tratamentos pode reativar doenças latentes como a tuberculose (LUZI et al., 2009), a doença de Chagas, a toxoplasmose e as estrongiloidíases (RODRIGUES et al., 2001; PINATELLE; MONBRISON; BEDOCK, 2009). Além disso, a ação deste fármaco nos receptores de glicocorticoides localizados no citoplasma permite sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, a transcrição de genes que codificam receptores, citocinas, enzimas e moléculas de adesão. A transcrição de fatores anti-inflamatórios que promovem a redução da síntese de citocinas como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, eotaxinas (BARNES, 1998; NAGASE et al., 2001), entre outros, culmina com a redução no recrutamento de células inflamatórias para os locais de infecção.

5.2. Parasitas *versus* Dexametasona

No presente estudo, a quantificação do número de parasitas no duodeno dos animais revelou que no 5º dia após a infecção já havia parasitas na mucosa duodenal. Nos animais infectados não tratados a quantidade de parasitas permaneceu relativamente estável com acentuada queda no 21º dia após infecção, provavelmente devido aos mecanismos de defesa do hospedeiro para elucidação da infecção e posterior expulsão do parasita. Contrariamente, o tratamento com Dexametasona interferiu no combate à infecção. Nos dias 7, 14 e 21 o número de parasitas nos animais tratados foi significativamente superior ao encontrado nos (I) e não houve decréscimo neste número com 21 dias, ou seja, a imunossupressão ocasionada pela Dexametasona provavelmente postergou ou impossibilitou a expulsão total dos parasitas.

Durante o ciclo do parasita dentro do hospedeiro as larvas do *S. venezuelensis* sofrem mudas e no quarto dia após a infecção, fêmeas adultas já podem ser encontradas no intestino onde rapidamente iniciam a oposição. Na infecção pelo *Strongyloides ratti* a produção de ovos pela fêmea se intensifica com o tempo, ocorrendo o pico produtivo entre o sétimo e oitavo dia (KIMURA et al., 1999). Devido a semelhança entre os ciclo do *Strongyloides ratti* e *S. venezuelensis* pode-se presumir que esta seja a razão pela qual o maior número de parasitas nos animais (ID) ocorreu com 14 dias, não com 7 dias após infecção, uma vez que devemos também considerar o tempo entre a ovoposição e o desenvolvimento das larvas até o estágio adulto e a interferência da Dexametasona no sistema imunológico do hospedeiro.

Camundongos infectados com *S. venezuelensis* e tratados com Dexametasona desenvolveram hiperinfecção. Observou-se grande quantidade de larvas nos pulmões e aumento do número de parasitas no intestino, bem como elevada presença de ovos nas fezes,

mesmo quando a infecção nos animais não tratados já havia sido elucidada (RUANO et al., 2015).

O tratamento de ratos infectados pelo *S. venezuelensis* e tratados com Dexametasona mostrou que houve aumento do tempo de permanência das fêmeas adultas no intestino e aumento da fertilidade do parasita. Também foi evidenciado aumento da carga larval nos pulmões destes animais (MACHADO et al., 2011). Neste mesmo órgão, que é rota das larvas durante o ciclo do *S. venezuelensis* no hospedeiro, foi observada presença de maior número de larvas nos infectados tratados com Dexametasona quando comparados aos infectados não tratados (TEFÉ-SILVA et al., 2012).

Nossos achados corroboram com a literatura que relaciona o tratamento com Dexametasona durante infecção pelo *S. venezuelensis* com o prolongamento do tempo de infecção e aumento do número de parasitas. Contrariamente, trabalho mostrou que camundongos infectados com *S. venezuelensis* e *S. rattii* mostraram declínio do número de parasitas após os dias 6 -7 após infecção, sendo praticamente indetectáveis no 10º dia (ESCHBACH et al., 2010), divergindo dos nossos achados onde o pico de parasitas ocorreu com 14 dias e com 21 dias ainda estava elevado.

5.3. Resposta imunológica do hospedeiro contra o *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

Assim como em outras infecções por nematódeos, a resposta imunológica observada durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* foi do tipo Th2 evidenciada pelo aumento da eosinofilia, hiperplasia das células caliciformes e alterações da parede intestinal. A imunidade é mediada por mecanismos efetores humorais e celulares e a proteção pode ser transferida de um camundongo imune para outro não imunizado através do soro ou por células mesentéricas de nódulos linfáticos (DAWKINS; GROVE, 1981; GROVE, 1996).

A proteção imunológica contra parasitas nematódeos desencadeia respostas imunológicas Th2, que induzem a produção de IgG1 e IgE, mastocitose e eosinofilia. Na expulsão do nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, por exemplo, as principais citocinas Th2 envolvidas neste processo foram IL-4 e IL-13 (FINKELMAN et al., 2004; HASNAIN et al., 2011).

Em camundongos infectados pelo nematódeo *T. muris* ocorreu ativação de Th2, promovendo a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que, juntamente com outras células efectoras como os eosinófilos e os macrófagos, foram recrutados para os locais de infecção no

epitélio intestinal onde produziram quimiocinas. Citocinas induziram alterações no epitélio intestinal contribuindo para a expulsão do parasita (KRINGEL et al., 2006).

A resposta imunológica do tipo Th2 consistiu em pré-requisito na defesa do hospedeiro contra o *Strongyloides*, promovendo a ativação de diferentes células efectoras no tecido e no intestino, refletindo diferentes estratégias para morte e expulsão destes parasitas em diferentes locais (MINKA; David, 2016).

Além disso, as células Th2 também induziram hiperplasia das células caliciformes e contração da musculatura lisa intestinal. Estas respostas foram essenciais para a rápida expulsão do *N. brasiliensis* (FINKELMAN et al., 2004; HASNAIN et al., 2011).

5.3.1. Alterações das células caliciformes durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

A defesa da mucosa intestinal contra helmintos como *Nippostrongylus brasiliensis* e *Strongyloides* é mediada por diferentes mecanismos (NAWA; KORENAGA, 1983), entre eles a produção de muco pelas células caliciformes.

No intestino, as células caliciformes são encontradas na mucosa ao longo dos intestinos delgado e grosso e representam a principal fonte de mucina do intestino.

Mucinas são grandes glicoconjugados constituindo o principal componente do muco e que proporcionam uma barreira protetora para o epitélio subjacente (SPENCIAN; OLIVER, 1991). O conceito de camada de muco funcionando como uma barreira de proteção dinâmica foi sugerido por estudos que mostram alterações na mucina em condições inflamatórias do intestino em resposta às alterações nas células caliciformes e consequente aumento na produção de muco em resposta às infecções (KANDORI et al., 1996). Foi demonstrada hiperplasia das células caliciformes durante infecções por diversos nematódeos, como o *T. muris* (KHAN; RICHARD; AKIHO, 2003) e o *Strongyloides ratti* (CARROL; MAYHOFER; DAWKINS, 1984).

Células caliciformes da mucosa do jejuno sofreram hiperplasia e foram consideradas importantes células efectoras contra o nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* (WELLS, 1963; MILLER; NAWA, 1979). Alterações na produção de mucina também foram observadas durante expulsão do *N. brasiliensis* e o tratamento com Dexametasona inibiu significativamente a expulsão deste parasita, suprimindo as alterações e hiperplasia das células caliciformes (ISHIKAWA et al., 1994).

O presente estudo mostrou que ocorreu hiperplasia das células caliciformes da mucosa duodenal nos grupos infectados não tratados em resposta à infecção pelo *S. venezuelensis*.

Semelhantemente ao que ocorre no intestino, também houve hiperplasia das células caliciformes na fase pulmonar deste parasita (TEFÉ-SILVA et al., 2012), porém o tratamento com a Dexametasona inibiu drasticamente as alterações nestas células, inibindo a hiperplasia e a produção de muco. Houve drástica redução do número de células caliciformes inclusive nos controle tratados com Dexametasona em relação aos controles. Estes dados corroboram com a literatura e demonstra que a Dexametasona inibe significativamente a hiperplasia das células caliciformes (TEFÉ-SILVA et al., 2012). Sua influência contribuiu para o retardo na expulsão dos parasitas justamente pela sua função de imunossupressora.

5.3.2. Os eosinófilos durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

Os dados deste trabalho revelaram a presença de infiltrado eosinofílico em todos os dias estudados sendo o pico 5 dias após a infecção, período no qual as fêmeas adultas recentemente se instalaram na mucosa intestinal. A partir do 7º dia houve declínio do número de eosinófilos, porém ainda permaneceu maior que os controles. Como esperado, o tratamento inibiu drasticamente o número de eosinófilos recrutados aos locais de infecção. Estas células também estavam reduzidas nos controles tratados o que confirma os efeitos da Dexametasona na inibição da síntese de citocinas e eotaxinas responsáveis pelo recrutamento eosinofílico, inclusive na ausência de estímulos infecciosos. Lembrando que IL-5 é necessária para o recrutamento eosinofílico e colaboram com as células B para produzirem IgM específico contra o parasita (BRELOER; ABRAHAM, 2016) e esta é justamente umas das interleucinas cuja síntese é inibida pela Dexametasona.

Infecções por helmintos estão associadas com a presença de eosinofilia no sangue, tecidos, cavidade peritoneal e espaços alveolares (LAMBROZA; DANNENBERG, 1991). O *S. venezuelensis* também induz aumento da eosinofilia e de células mononucleares no sangue, cavidade peritoneal e lavado bronquealveolar (MACHADO et al., 2007; 2010). A eliminação dos neutrófilos e eosinófilos por tratamento com anticorpo monoclonal em camundongos resultou em aumento de sobrevivência do parasita (O'CONNELL et al., 2011) o que sugere que estas células participam ativamente na proteção do hospedeiro na resposta imunológica inata. Os granulócitos, entre eles os eosinófilos, foram cruciais para defesa precoce contra a migração de larvas do *S. rattii* em camundongos (WATANABE et al., 2000).

Os eosinófilos também podem ser recrutados diretamente pelas larvas de *S. Stercoralis* sem a necessidade de outras células do hospedeiro. Químioatrativos derivados da larva estimulam os mesmos receptores e segundos mensageiros utilizados para o recrutamento

eosinofílico através de quimiocinas endógenas do hospedeiro. Extrato solúvel liberado pelo parasita estimula múltiplos receptores na superfície dos eosinófilos, incluindo CCR3, CXCR2 e CXCR4, adicionado a isto, múltiplos fatores provenientes do parasita atuam recrutando eosinófilos, incluindo proteínas e a quitina. A redundância de fatores quimiotáticos produzidos pelo parasita e a múltipla estimulação dos receptores dos eosinófilos sugerem que os receptores destas células podem estar envolvidos em maior resposta protetora durante infecção pelo *S. stercoralis* (STEIN et al., 2009).

Considerando os dados obtidos na literatura e os nossos resultados podemos sugerir que o elevado número de eosinófilos encontrados nos animais infectados é o resultado da ação de quimiocinas endógenas e dos fatores quimiotáticos secretados pelo parasita e a presença, mesmo que reduzida destas células nos animais tratados com Dexametasona deve-se em grande parte aos mecanismos de atração eosinofílica pelo parasita, uma vez que as quimiocinas requeridas para esta atividade estão suprimidas pela Dexametasona.

5.3.3. Outros fatores envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro contra os *Strongyloides*

Outras células também estão envolvidas na imunidade do hospedeiro contra os *Strongyloides*. Os mastócitos revelam-se importantes células efetoras na mediação e expulsão do *S. ratti* e *S. venezuelensis* do intestino. Foram encontrados mastócitos no intestino delgado durante infecção pelo *S. ratti* e *S. venezuelensis* em camundongos (ABE et al. 1993) e ratos (SHINTOKU et al., 2013). A protease 1 (mMCP1) produzida especificamente pelos mastócitos da mucosa (REYNOLDS et al., 1990) foram detectadas no plasma de camundongos infectados pelo *S. venezuelensis* (SASAKI et al., 2005; ESCHBACH et al., 2010). Adicionado a isto, foram encontrados elevados teores de protease II, liberada pelo mastócito, no tecido intestinal de ratos infectados pelo *S. ratti* (BLEAY et al., 2007).

5.4. Alterações da musculatura lisa duodenal durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* e tratamento com a Dexametasona

Importantes alterações nas túnicas musculares, circular e longitudinal, foram encontradas nos intestinos dos modelos experimentais infectados pelo *S. venezuelensis*. Houve notável espessamento de ambas as camadas musculares em todos os dias estudados, porém mais evidentes no 14º dia e com pico no 21º dia de infecção. Novamente, o tratamento com Dexametasona impediu este espessamento.

Similarmente ao que ocorreu na musculatura lisa do intestino dos animais utilizados no presente estudo, na asma, o músculo liso brônquico sofre alterações semelhantes às encontradas durante a infecção pelo *S. venezuelensis*, como aumento da espessura e da contratilidade muscular e hiperplasia de células caliciformes. O tratamento com drogas anti-inflamatórias como os corticosteroides e broncodilatadores reduzem a morbidade e a mortalidade da asma (PEARCE et al., 2007).

O tratamento prévio de fibras musculares lisas isoladas dos brônquios humanos com TGF- β promoveu o aumento na abundância de α -actina. Posteriormente, o tratamento destas fibras com Dexametasona por 6 dias mostrou que houve redução da α -actina induzida pelo TGF- β . O tratamento com glicocorticoides reduziu a abundância de α -actina e sua incorporação em filamentos contráteis, levando aos seus efeitos funcionais que culminam na inibição do remodelamento brônquico na asma. Estes efeitos parecem ser em parte, mediados por inibição da tradução de RNA mensageiro e aumento na degradação proteica (GOLDSMITH et al., 2006).

Estudos utilizando modelo animal demonstraram que houve aumento da contratilidade da musculatura intestinal durante infecção pelo nematódeo *T. spiralis* (VALLANCE; BLENNERHASSEIL; COLLINS, 1997). Durante infecção pelo nematódeo *N. brasiliensis* a capacidade de resposta do músculo liso intestinal foi alterada. Segmentos isolados do intestino de ratos infectados revelaram aumento da resposta máxima à acetilcolina. Em parte, a capacidade de resposta foi reforçada pela hipertrofia do músculo liso intestinal. Além disso, houve um aumento de quase duas vezes na tensão desenvolvida por unidade de área da secção transversal, indicando a que a capacidade contrátil do músculo também foi aumentada (FARMER, BROWN, POLLOCK, 1983). Também foi observado aumento nas proteínas actina e miosina durante infecção pelo *T. spiralis* (WEISBRODTH et al., 1994).

Houve aumento da espessura camada muscular bronquiolar em animais inoculados com larvas L3 do *S. venezuelensis* iniciando no 3º dia após a infecção, pico no 5º dia e retorno aos parâmetros dos controles no 14º dia. Os animais infectados e tratados com Dexametasona apresentaram menor aumento da espessura quando comparados aos animais infectados não tratados (TEFÉ-SILVA et al., 2012).

Os dados disponíveis na literatura corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. O aumento da espessura das túnicas musculares sugere aumento da contratilidade intestinal em resposta à infecção pelo *S. venezuelensis* na tentativa de expulsar o parasita do intestino. Em contrapartida, a Dexametasona minimizou a resposta do hospedeiro à infecção, o que acarretou no retardo da resolução da infecção.

A causa das alterações na parede muscular do intestino, durante a infecção pelo *S. venezuelensis*, provavelmente está intimamente relacionada com fatores inflamatórios. Foi observado aumento da propulsão intestinal após desnervação extrínseca de segmentos do intestino infectados por *T. spiralis* (ALIZADEH; CASTRO, WEEMS et al, 1987). Estes achados mostram que a melhora na motilidade é, em parte, intrínseca à parede intestinal, implicando assim nos nervos entéricos e músculos.

Novos trabalhos relacionam o aumento da espessura da musculatura lisa com a atuação direta da IL-4 e IL-13. Estas interleucinas expressas pelas células Th2 são citocinas-chave na patogênese da asma (BRIGHTLING; SYMON, BIRRING et al., 2002; ROBINSON; HAMID; YING, 1992). Ambas, IL-4 e IL-13 estão envolvidas com processos inflamatórios agudos e alterações das vias aéreas. Em camundongos, contribuem para respostas inflamatórias caracterizadas por hipertrofia das células epiteliais e acúmulo de macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (RANKIN, PICARELLA, GEBA, 1996). Também induzem a hiperresponsividade das vias aéreas, hiperplasia das células caliciformes, eosinofilia e hipersecreção de muco (WILLS-KARP et al., 1998; MATTES, YANG, MAHALINGAM, 2002).

No intestino IL-4 e IL-13 também atuam na parede intestinal e no aumento da hipercontratilidade. Células musculares do intestino isoladas e expostas às citocinas IL-4 e IL-13 apresentaram hipercontratilidade de maneira similar àquela encontrada na doença de Crohn. Estas alterações não ocorreram nas células tratadas com Leflunomide, que é um imunossupressor. Estudos mostraram que a IL-4 e IL-13 reduziram a contração induzida pelo Carbachol, um agonista muscarínico (AKIHO et al., 2002), sugerindo que estas citocinas têm alta afinidade pelos receptores muscarínicos. Em quadros inflamatórios, como na asma, a afinidade dos receptores muscarínicos está alterada e pode ser modulada por citocinas Th2 (FRYER et al., 1999).

Durante infecções intestinais por nematódeos diversas citocinas são produzidas. Embora IL-4 exerça papel chave na resposta imunológica do tipo Th2, estudos recentes revelam que outra citocina também está intimamente relacionada à estas respostas, a IL-13. Outros trabalhos da literatura descrevem a importância do papel de IL-4 e IL-13 na geração da contratilidade intestinal em camundongos infectados pelo *N. brasiliensis* e *Heligiosomoides lygyrus* (ZHAO; MCDERMOTT; URBAN, 2003).

Camundongos deficientes do receptor de cadeia IL-4R α e parte dos receptores de IL-4 e IL-13 mostraram atraso na erradicação do *S. venezuelensis* (NEGRÃO-CORREA et al., 2006). A expressão de IL-4R α nos linfócitos não foi essencial para o término da infecção pelo

S. venezuelensis, enquanto ratos deficientes de IL-4R α em células não hematopoiéticas apresentaram atraso na expulsão completa deste mesmo parasita. Impacto semelhante da sinalização IL-4R α em células não hematopoiéticas foram observados no controle da infecção intestinal pelo nematódeo *N. brasiliensis*, possivelmente através da ativação das células musculares lisas ou epiteliais do intestino, que expressam IL-4R α . (FINKELMAN et al. 2004).

O aumento da espessura das túnicas musculares lisas, obtido neste estudo através da infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* provavelmente está acompanhado de aumento da contratilidade através da ação de IL-4 e IL-13 nas fibras musculares.

IL-4 e IL-13 compartilham o receptor IL-4 de cadeia α (IL-4R α) que, uma vez ocupado, resulta na ativação do transdutor de sinal e ativador do fator de transcrição 6 (STAT 6) através da fosforilação das Janus Quinase 1 e 3. Uma vez ativadas, as proteínas STAT 6 formam dímeros e se translocam para o núcleo, onde se ligam a regiões promotoras que regulam a transcrição de genes, incluindo CD23 e do complexo principal de histocompatibilidade classe II em células B, a IL-4 e IL-13 em células T, e eotaxina em fibroblastos. Foi detectada a expressão de RNAm para o receptor de IL-4 no músculo de murinos (AKIHO et al, 2002). Provavelmente IL-4 e IL-13 agem diretamente nas células musculares, via STAT 6, mediando a hipercontratilidade muscular observada na doença de Crohn (KHAN et al., 2001).

Nos modelos experimentais a ruptura do gene de STAT 6 inibiu a hiperresponsividade, eosinofilia e inflamação das vias aéreas durante a asma (BLEASE et al, 2002).

Estudos usando camundongos com deficiência de STAT 6 indicaram o papel crítico da via STAT 6 na diferenciação de células *T helper* em células do tipo Th2 (TAKEDA et al., 1996).

Outros trabalhos revelaram que a via STAT 6 é crítica no desenvolvimento da hipercontratilidade da musculatura intestinal durante infecção pelo *T. spiralis* (KHAN et al., 2001). Houve importante atraso na expulsão dos parasitas *T. spiralis* do intestino em camundongos deficientes de STAT 6 com relação aos controles. Entretanto praticamente todos os parasitas foram expulsos do intestino nos animais STAT 6⁺ no 21º dia após a infecção. Animais com presença de IL-4⁺ e STAT 6⁺ apresentaram hipercontratilidade desde o 7º dia de infecção até o 21º dia e esta hipercontratilidade foi significativamente alterada nos animais IL-4⁻ e não foi evidenciada hipercontratilidade nos animais deficientes de STAT 6. Além disso, também foi observada atenuação na contração induzida pelo Carbachol nestes animais e a presença de IL-4 e IL-13 na camada muscular externa durante infecção primária por *T.*

spiralis. (KHAN; COLLINS, 2004). STAT 6 também parece exercer papel essencial na hiperplasia das células caliciformes durante infecção por nematódeos. Camundongos com deficiência de STAT 6 e infectados por *T. spiralis* não apresentaram hiperplasia das células caliciformes em resposta à infecção (KHAN et al., 2001).

Durante infecção pelo *S. venezuelensis*, o número de parasitas encontrados no intestino dos camundongos deficientes de IL-4 e STAT 6 foi maior do que os obtidos nos controles, mesmo após o 14º dia após a infecção, dia no qual os parasitas já estavam quase que completamente eliminados nos animais controles (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

A análise da expressão gênica de STAT 6 através da técnica de PCR em tempo real revelou expressivo aumento da expressão de STAT 6 nos animais infectados com 21 dias, enquanto os animais infectados e tratados com Dexametasona mantiveram praticamente inalterada a expressão deste gene durante todo o período estudado e não apresentaram diferença significativa quando comparados aos controles. Estes resultados concordam com aqueles obtidos na morfometria da túnica muscular onde, igualmente, o pico ocorreu no 21º dia. Além disso, o pico da transcrição de STAT 6 coincidiu com a abrupta redução do número de parasitas no 21º dia nos animais infectados, o que pode demonstrar o provável papel da via JAK-STAT 6 no auxílio à expulsão do parasita durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis*. A infecção pelo *S. venezuelensis* induziu a expressão gênica de STAT 6, provavelmente através da ação das citocinas IL-4 e IL-13 nas fibras musculares das camadas musculares lisas: circular e longitudinal. Provavelmente a elevação da taxa de expressão gênica iniciou-se mais tardiamente porque as proteínas STAT 6 normalmente presentes no citoplasma estavam sendo utilizadas e, na medida em que foi necessária a reposição desta proteína para prosseguir com sua função na resposta do hospedeiro contra o parasita, foi iniciada a expressão do gene para provável síntese de mais proteína STAT 6. Relacionando estes achados com o que descreve a literatura podemos sugerir que o provável papel da STAT 6 no aumento da espessura da musculatura intestinal contribuiu para o controle da infecção com vistas à elucidação da mesma. Contrariamente, o tratamento com a Dexametasona, provavelmente, retardou a expulsão dos parasitas e inibiu as alterações da parede intestinal.

6. CONCLUSÕES

O aumento da espessura das túnicas musculares, circular e longitudinal, e a hiperplasia das células caliciformes demonstradas durante infecção pelo *Strongyloides venezuelensis* provavelmente ocorrem, em parte, pela ativação da via JAK – STAT 6. Contrariamente o tratamento com a Dexametasona inibiu todas as alterações da parede intestinal, possivelmente postergando a expulsão dos parasitas e, conseqüentemente, a resolução da infecção.

7. REFERÊNCIAS

ABE, T.; NAWA, Y. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti*-infected nude mice. **Immunology**, V. 63, p. 181, 1988.

ABE, T. et al. Induction of the expulsion of *Strongyloides ratti* and retention of *Nippostrongylus brasiliensis* in athymic nude mice by repetitive administration of recombinant IL-3. **Immunology**, V. 76, p. 10, 1992.

ABE, T. et al. Intestinal protection against *Strongyloides ratti* and mastocytosis induced by administration of interleukin-3 in mice. **Immunology**, V. 80, p. 116–121, 1993.

AKIHO, H.; BLENNERHASSETT, P.; COLLINS, S. M. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, V. 282, p. 226–232, 2002.

ALIZADEH, H.; CASTRO, G. A.; WEEMS, W. A. Intrinsic jejunal propulsion in the guinea-pig during parasitism with *Trichinella spiralis*. **Gastroenterology**, V. 93, p. 784-790, 1987.

ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, V. 7, p. 975-987, Dec. 2007.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science (London)**, V. 94, p. 557–572, 1998.

BASILE, A. ET AL. DISSEMINATED *STRONGYLOIDES STERCORALIS*: HYPERINFECTION DURING MEDICAL IMMUNOSUPPRESSION. **JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY**, V. 63, p. 896-902, Nov. 2010.

BLEASE, K. et al. STAT6-deficient mice develop airway hyperresponsiveness and peribronchial fibrosis during chronic fungal asthma. **American Journal of Pathology**, V. 160, p. 481–490, 2002.

BLEAY, C. et al.. Density dependent immune responses against the gastrointestinal nematode *Strongyloides ratti*. **International Journal for Parasitology**, V. 37, p. 1501–1509, 2007.

BOGOMOLETZ, W. Avantages de la coloration par le rouge sirius de lamyloide et des eosinophiles. **Arch. Anat. Cytol. Pathol.**, V. 28, p. 253-253, 1980.

BREOLOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology**, p. 1-21, Jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016000111>>. Acesso em: 09 may 2015.

BRIGHTLING, C. E. et al. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, V. 110, p. 899-905, 2002.

CAROLL, S. M. et al. Kinetics of intestinal lamina propria mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes, goblet cells and eosinophils in murine strongyloidiasis. **International Archives of Allergy and Immunology**, V. 74, p. 311-317, 1984.

CARVALHO, E. M.; DA FONSECA, P. A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunology**, V. 26, p. 487-497, Nov. 2004.

CONCHA, R.; HARRINGTON JR, W.; ROGERS, A.I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, V. 39, p. 203-211, Mar. 2005.

DAWKINS, H. J.; GROVE, D. I. Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. **International Journal for Parasitology**, V. 11, p. 89–96, 1981.

DUTCHER, J. P. et al. Disseminated Strongyloidiasis With Central Nervous System Involvement Diagnosed Antemortem in a Patient With Acquired Immunodeficiency Syndrome and Burkitts Lymphoma. **Cancer**, V. 66, p. 2417-2420, Dec. 1990.

ESCHBACH, M. L. et al. Strongyloides ratti infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice. **Parasite Immunology**, V. 32, p. 370–383, 2010.

FARMER, S. G.; BROWN, J. M.; POLLOCK, D. Increased responsiveness of intestinal and vascular smooth muscle to agonists in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 263, P. 217-227, 1983.

FINKELMAN, F. D. et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, V. 201, p. 139-155, 2004.

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 5, p. 345-355, Oct. 1992.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Reviews of Infectious Diseases**, V. 11, p. 755-767, Sept. 1989.

GIORGOS, B. et al. Strongyloides hyperinfection syndrome presenting as enterococcal meningitis in a low-endemicity area. **Virulence**, V. 1, p. 468-470, Sept. 2010.

GOLDSMITH, A. M. et al. Regulation of airway smooth muscle-actin expression by glucocorticoids. **American Journal of Physiology, Lung Cellular Molecular Physiology**, V. 292, p. 99–106, 2007.

HASNAIN, S. Z. et al. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. **The Journal of Experimental Medicine**, V. 208, p. 893-900, 2011.

IBURG, T. et al. A time course study of immunological responses in *Trichuris suis* infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden.

International Journal for Parasitology, V. 36, p. 915-924, 2006.

IGRA-SIEGAMN, U. et al. Syndrome of hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*.

Reviews of Infectious Diseases, V. 3, p. 397-407, 1981.

ISHIKAWA, N. et al. Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminths:

T-cell-independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damaged' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites. **Immunology**, V. 81, p. 480-486, 1994.

KANDORI, H. et al. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics

of intestinal goblet cells of germ-free and conventional mice. **Experimental Animals**, V. 45, p. 155-160, 1996.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiolgy Reviews**, V. 17, p. 208-217, Jan. 2004.

KHAN, W. I. et al. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. **Infection and Immunity**, V. 71, p. 2430-2438, 2003.

KHAN, W. I. et al. Critical role for signal transduction and activation of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in *Trichinella spiralis*-infected mice. **Infection and Immunity**, V. 69, p. 838–844, 2001.

KHAN, W. I.; COLLINS, S. M. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. **Parasite Immunology**, V. 26, p. 319–326, 2004.

KHAN, W. I. et al. Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. **Parasite Immunology**, V. 23, p. 39–42, 2001.

KIMURA, E. et al. A second peak of egg excretion in *Strongyloides ratti*-infected rats: its origin and biological meaning. **Parasitology**, V. 119, p. 221-226, Aug. 1999.

KRISHNAN, S.; BARGER, G.; CHANDRASEKAR, P. Recurrent *Strongyloides stercoralis* Hyperinfection Syndrome: Case Report and a Brief Review. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, V. 14, p. 240-243, July 2006.

LAMBROZA, A.; DANNENBERG, A. J. Eosinophilic ascites due to hyperinfection with *Strongyloides stercoralis* . **American Journal of Gastroenterology**, V. 86, p. 89–91, 1991.

LINK, K.; ORENSTEIN, R. Bacterial complications of strongyloidiasis: *Streptococcus bovis* meningitis. **Southern Medical Journal**, V. 92, p. 728-731, July 1999.

LODO, M. et al. Prevalência de enteroparasitas na cidade de Bom Jesus dos Perdões. **Crescimento e Desenvolvimento Humano**, V. 20, p. 769-777, set. 2010.

LUQUE, E.H.; MONTES, G. S. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. **The Anatomical Record**, V. 223, p. 257-265, Mar. 1989.

LUZI, G. et al. Are glucocorticoids a consistent risk factor for infections in rheumatoid arthritis patients under treatment with methotrexate and etanercept? **Clinical Therapeutics**, V. 160, p. 121–123, 2009.

MACHADO, E. R. et al. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, V. 29, p. 549-557, Nov. 2007.

MACHADO, E. R. et al. Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, V. 59, p. 18-32, June 2010.

MACHADO, E. R. et al. Dexamethasone Effects in the *Strongyloides venezuelensis* Infection in A Murine Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V. 84, p. 957-966, 2011.

MAHMOUD, A. A. Strongyloidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, V. 23, p. 949-952, Nov. 1996.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, V. 3, p. 733-744, Sept. 2003.

MARCOS, L. A. et al. Strongyloides hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, V. 102, p. 314-318, Apr. 2008.

MILLER, H. R. P.; NAWA, Y. Immune regulation of intestinal goblet cell differentiation. Specific induction of nonspecific protection against helminths? **Nouv. Rev. Fr. D'Hematol**, V. 21, p. 31, 1979.

MOLINARO, E.; CAPUTTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009. 5 v.

MONTEIRO, C. A. **Velhos e novos males da saúde no Brasil**: A evolução do País e de suas doenças. São Paulo: Hucitec, 1995. 139 p.

MONTEIRO, C. A. et al. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985 - I – Aspectos epidemiológicos, características sócio-econômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, V. 20, p. 435-445, jun. 1986.

NAGASE, H. et al. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils . **International Archives of Allergy and Immunology**, V. 125, p. 29–32, 2001.

NAWA, Y.; KORENAGA, M. Mast and goblet cell responses in the small intestine of rats concurrently infected with *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides ratti*. **Journal of Parasitology**, V. 69, p. 1168, 1983.

NEGRAO-CORREA, D. et al. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, V. 36, p. 1185–1195, 2006.

O'CONNELL, A. E. et al. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity** V. 79, p. 2770–2778, 2011.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, V. 138, p. 1331-1340, Sept. 2011.

PEARCE, N. et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, V. 62, p. 758–766, 2007.

PINATELLE, P.; DE MONBRISON, F.; BEDOCK, B. Disseminated strongyloidiasis with parasitemia in a patient under corticosteroid treatment. **Médecine et Maladies Infectieuses**, V. 39, p. 267–269, 2009.

RANKIN, J. A. et al. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 93, p. 7821–7825, 1996.

REYNOLDS, D. S. et al. Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V. 87, p. 3230–3234, 1990.

ROBINSON, D. S. et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **The New England Journal of Medicine**, V. 326, p. 298–304, 1992.

RODRIGUES, M. A. et al. Invasive enteritis by *Strongyloides stercoralis* presenting as acute abdominal distress under corticosteroid therapy. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, V. 56, p. 103–106, 2001.

RUANO, A. L. et al. Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by *Strongyloides venezuelensis* in mice treated with dexamethasone. **Acta Tropica**, V. 152, p. 90-95, Dec. 2015.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. A new technique for the isolation of nematode larvae from feces; modification of Baermann's method. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, V. 14, p. 5-8, 1954.

SASAKI, Y. et al. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, V. 202, p. 607–616, 2005.

SCHAD, G. A. Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis*. In: GROVE, D. I. (Ed.). **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**. London, UK: Taylor and Francis, 1989. p. 85-104.

SEGARRA-NEWNHAM, M. Manifestations, diagnosis and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **Annals of Pharmacotherapy**, V. 41, p. 1992-2001, Dec. 2007.

SHINTOKU, Y. et al. Intestinal mast cells and eosinophils in relation to *Strongyloides ratti* adult expulsion from the small and large intestines of rats. *Parasitology*, V. 140, p. 626–631, 2013.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, V. 33, p. 1040-1047, Oct. 2001.

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: GROVE, D. I (Ed.). **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**. London, UK: Taylor and Francis, 1989. p. 11-84.

SPECIAN, R. D.; OLIVER, M. G. Functional biology of intestinal goblet cells. **American Journal of Physiology**, V. 260, p. 183-193, 1991.

STEIN, L. et al. Eosinophils utilize multiple chemokine receptors for chemotaxis to the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Innate Immunity**, V. 1, p. 618–630, 2009.

STEPHENSON, L. S.; LATHAM, M. C.; OTTESEN, E. A. Malnutrition and parasitic helminth infections. **Parasitology**, V. 121, p. 23-38, 2000.

TAKEDA, K. et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. **Nature**, V. 380, p. 627–630, 1996.

TEFÉ-SILVA, C; SOUZA, D.I.; UETA, M.T.; FLORIANO, E. M.; FACCIOLI, L.H., RAMOS, S.G. Interference of dexamethasone in the pulmonary cycle of *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Am J Trop Med Hyg.** 79 (4), p. 571-578, Out, 2008.

TEFÉ-SILVA, C. Dexamethasone reduces bronchial wall remodeling during pulmonary migration of *Strongyloides venezuelensis* larvae in rats. **Parasitology**, V. 61, p. 425-430, Sept. 2012.

TRAJMAN, A.; MACDONALD, T. T.; ELIA, C. C. INTESTINAL IMMUNE CELLS IN STRONGYLOIDES STERCORALIS INFECTION. **JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY**, V. 50, P. 991-995, DEC. 1997.

VADLAMUDI, R.S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, V. 4, May, 2006. Disponível em: <<http://clinicalmolecularallergy.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-7961-4-8>> Acesso em: 8 de maio de 2016.

VALLANCE, B. A.; BLENNERHASSEI, P. A.; COLLINS, S. M. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode infected mice. **American Journal of Physiology**, V. 35, p. 321-327, 1997.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. Strongyloides spp. **WormBook**, 23 May 2007. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 08 May 2016.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. The Biology of Strongyloides spp. **WormBook**, 16 July 2015. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 08 May 2016.

VITALLE, M. S. S. **Prevalência de anemia carencial ferropriva, parasitoses intestinais e estado nutricional em pacientes assistidos no Centro de Atendimento e Apoio ao Adolescente.** 2003. Disponível em: <<http://www.brazilpednews.org.br/marc2003/bnp05103..htm>> . Acesso em: 02 fevereiro 2016

WALDMAN, E.A.; SILVA, L. J.; MONTEIRO, C. A. Trajetórias das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à introdução da cólera. In: MONTEIRO, C. A. (Org.). **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças.** São Paulo: Hucitec/Núcleo de Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde, Universidade de São Paulo, 2000. p. 195-244.

WATANABE, K. et al. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. **Parasitology Research**, V. 86, p. 188–193, 2000.

WEISBRODT, N. W. et al. Structural and molecular changes in intestinal smooth muscle induced by *Trichinella spiralis* infection. **American Journal of Physiology**, V. 266, p. 856–862, 1994.

WELLS, P. D. Mucin-secreting cells in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Experimental Parasitology**, V. 14, p. 15, 1963.

WILLS-KARP, M. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258–2261. Mattes J, Yang M, Mahalingam S, et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, V. 195, p. 1433–1444, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of intestinal parasitic infections report of a WHO Expert Committee**. Geneva, 1987.(technical report series, 749).

ZHAO, A. et al. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **Journal of Immunology**, V. 171, p. 948–954, 2003.

ANEXO A - Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 188/2009, sobre o projeto intitulado “*Ciclo pulmonar da infecção por Strongyloides venezuelensis: estudo sobre a imunomodulação da Dexametasona no remodelamento da parede brônquica e do parênquima pulmonar*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Simone Gusmão Ramos** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **14 de dezembro de 2009**.

(We certify that the protocol nº 188/2009, about “*Pulmonary cycle by Strongyloides venezuelensis infection: study on the immunomodulation of Dexamethasone in the remodeling of bronchial wall and pulmonary parenchyma*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 12/14/2009 meeting.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B - Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Fixação do material: formol tamponado (neutro) 10%

Cortes: em parafina, 5 microns.

1. Procedimento:

- Desparafenizar (Xilol I 30', Xilol II 30', Xilol III 30') e hidratar com álcool (100%, 90%, 80% e 70% - mergulhar 2 vezes em cada um) e água destilada;
- Oxidar na solução de ácido periódico durante 5 minutos;
- Enxaguar em água destilada;
- Deixar escorrer bem a água;
- Colocar no Reativo de Schiff de Coleman por 15 minutos ou até os cortes ficarem cor de rosa. Manter em geladeira;
- Lavar em água corrente durante 10 minutos, ou até a água sair limpa e os cortes rosa (parecido com o rosa do HE);
- Contrastar com a solução de Hematoxilina de Harris durante 15 minutos, ou a Hematoxilina de Harris durante 6 minutos.
- Lavar com água corrente durante 15 minutos;
- Desidratar (70%, 80%, 90%, 100%) e diafanizar, Xilol I, Xilol II e Xilol III (mergulhar 2 vezes em cada um);
- Montar a lâmina.

2. Resultados:

Núcleos: azul;

Glicogênio, mucina e algumas membranas basais, de roxa a púrpura;

Fungos; de roxo a púrpura.

3. Solução Ácido Periódico 5%

Ácido Periódico.....	0,5g
Água destilada.....	100ml

4. Solução de Ácido Clorídrico 1N (p/500ml)

Ácido Clorídrico concentrado densidade 1,19 e concentração 36,7%41,25ml

Água destilada.....458,75 ml

5. Reativo de Schiff de Coleman

Pronto: Reativo de Schiff 1.09033.0500 – Merck

Se for necessário fazer:

Fucsina básica.....1,0g

Água destilada, esquentar a 60 °C.....200ml

Levá-la a ponto de ebulição. Deixar esfriar e em seguida acrescentar:

Metabissulfito de potássio.....2,0g (filtrar)

Ácido clorídrico 1N.....10ml

Guardar a solução vedada em lugar escuro por 24h. A solução deverá ficar transparente ou cor de palha. Caso fique cor de palha, filtrar com carvão ativado.

Carvão ativado.....0,5g

Agitar durante 1 minuto, logo filtrá-lo utilizando papel filtro grosso. Repetir a filtração até que a solução fique incolor. Mantenha em geladeira.

Observação: Para testar a eficácia da técnica, colocar um pouco de formol bruto 40 % em um recipiente, e em seguida pingar algumas gotas do reativo: terá que reagir na hora e ficar vermelho - púrpura.

ANEXO C - *Sirius Red* pH 10,2 (Para Eosinófilos)

1. Soluções:

▪ Corante

- Dissolver 0,5g de Sirius Red em 45mL de água destilada;
- Acrescentar 50 ml de álcool absoluto;
- Adicionar NaOH 0,1N até atingir o pH 10,2*
- Dissolver sob agitação, 3ml de Cloreto de Sódio a 20%**

* O NaOH deve ser **gotejado**, sob **agitação**, no pHmetro; após atingir o pH desejado, a solução deverá descansar por 2h antes da adição da solução de Cloreto de Sódio.

****Gotejar lentamente o Cloreto de Sódio a 20% sob luz forte até aparecer o precipitado.**

Esta solução dura, em média, 1 mês à temperatura ambiente. Pode ser guardada por mais tempo a 4°C (geladeira), neste caso deve-se aumentar o tempo de exposição da lâmina.

2. Método

- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada;
- Corar por 4 minutos pela Hematoxilina de Mayer (cortes com 3 µm);
- Lavar em água corrente por 5 minutos;
- Lavar em água destilada por 2 minutos;
- Passar pelo álcool 70% por 3 minutos;
- Corar pela solução de Sirius Red por 3 horas;
- Lavar em água corrente por 5 minutos;
- Desidratar, clarificar e montar.

Figuras 14 e 15 (acima): representativas de eosinófilos marcados pela coloração *Sirius Red*.

As setas pretas indicam os eosinófilos com citoplasmas corados em vermelho e granulação nuclear em azul, enquanto as setas vermelhas indicam osneutrófilos com citoplasmas corados em azul claro.

- BOGOLOMETZ, 1980; LUQUE; MONTES (1989); MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010 apud FIOCRUZ.

ANEXO D – Hematoxilina e Eosina (HE)

Fixação do material: formol tamponado (neutro) 10%

Cortes: em parafina, 5 microns.

6. Procedimento:

- Desparafenizar as lâminas em Xilol, 3 vezes, por 15 minutos cada;
- Submergir a lâmina em diferentes concentrações de álcool: 100% - durante 3 minutos; 90% - 3 minutos; 80% - 3 minutos e 70% por 3 minutos;
- Lavar em água corrente por 10 min;
- Incubar na hematoxilina de Harris por 5 min;
- Lavar água corrente por 5 min ou até sair o excesso de corante;
- Mergulhar rapidamente no álcool ácido (para diferenciar);
- Lavar água corrente por 3 min, e adicionar 3 gotas de amônia (para azular os núcleos das células);
- Submergir rapidamente no álcool 70%;
- Corar na eosina por 25 segundos;
- Mergulhar rapidamente, por duas vezes, no álcool 80%, 90% e 100%;
- Mergulhar rapidamente no Xilol, por 3 vezes, durante 5 minutos cada.
- Montar a lâmina.