



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito de múltiplas infecções com *Strongyloides venezuelensis* no
desenvolvimento da encefalite autoimune experimental

David Bui Van

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Fernanda Chiuso Minicucci

Botucatu - SP

2009



David Bui Van

Efeito de múltiplas infecções com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento da encefalite autoimune experimental

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Fernanda Chiuso Minicucci

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Bui Van, David.

Efeito de múltiplas infecções com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento da encefalite autoimune experimental / David Bui Van. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Fernanda Chiuso Minicucci

1. Encefalite - Aspectos imunológicos - Estudos experimentais

Palavras-chave: Encefalite autoimune experimental; Esclerose múltipla; Hipótese da higiene; Ratos Lewis; *Strongyloides venezuelensis*

À Minha Família e Amigos.

*(Que promovem de fato a mudança que queremos para o mundo, em
especial o meu.)*

Agradecimentos

Por mais atencioso que se possa ser ao realizar um agradecimento, fatalmente estaremos fadados ao status de ingrato. Seria necessária uma tese apenas para agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e até para aqueles que não tiveram relação alguma com o mesmo, mas que me permitiram estar aqui tentando homenageá-los. No entanto, a vida por vezes é injusta e não é sempre que temos a oportunidade de dizer um simples obrigado. Sendo assim, o título desse capítulo deveria ser “alguns agradecimentos” ou até “tentativa de agradecimento”. Tentarei então realizar essa obsequiosa tarefa na esperança de que aqueles não contemplados perdoem a minha medíocre memória.

Nesse ínterim, vamos então a uma humilde gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus. Nada disso seria possível sem a Sua vontade. Que a fé no Criador continue nos inspirando na busca por um mundo muito mais solidário e justo.

Gostaria de agradecer ao apoio e dedicação de minha tutora, Alexandrina Sartori, inspiração fundamental nessa longa caminhada acadêmica pela qual estou passando. Foi quem me iluminou esse mundo vasto e por vezes complexo que é a imunologia. Sem os seus intensos esforços no auxílio desse projeto, nada teria sido possível. Aqui a minha eterna gratidão.

À Fernanda, pelos seus imensos esforços ao me auxiliar nas mais diversas atividades laboratoriais. Pela sua infinita paciência ao me transmitir seus conhecimentos. Por ter me mostrado que a vida é muito mais do que apenas acertos, mas também é cheia de “perlatices”. Fer, sou grato por tudo que você me ensinou.

Aos meus ilustríssimos companheiros de laboratório Sofia, Fernanda, Thaís, Larissa (Dutra), Larissa (Akú) e Panda. Esse ano com vocês me ensinou que estar inserido num ambiente de trabalho nos dá muitos mais do que colegas de trabalho, mas sim amigos que podemos contar para todas as horas. Obrigado pelas inúmeras horas de risos e conversas que pude vivenciar ao longo do ano. Sou grato a todos vocês.

A todo o pessoal do departamento de Microbiologia/Imunologia. Aos funcionários, professores e alunos dos laboratórios vizinhos que, por vezes, melhoraram nossos dias seja com uma boa conversa ou com um singelo sorriso.

Aos parceiros Luís e “Lula”. Agradeço não somente pela imensa ajuda, mas pela amizade sincera. Por nossas conversas sobre os mais variados temas, sempre terminando com um tom cômico.

À minha turma, Bio-XLI, vulgo “Giseli”. Desnecessário seria dizer que com esse pessoal passei os melhores momentos de minha vida. Agradeço a todos vocês pelos conselhos, conversas e gargalhadas que demos nesses últimos cinco anos. Sou grato a vocês, que muito mais do que colegas, se tornaram meus irmãos e irmãs, e como tais, jamais serão esquecidos.

Aos inúmeros parceiros que encontrei durante essa longa caminhada, aos eternos amigos e às pessoas que muitas vezes não percebem o verdadeiro valor que damos a elas, aqui também vai a minha gratidão.

À FAPESP, por nos ter fornecido auxílio financeiro (Processo: 2009/50747-0).

Por fim, gostaria de agradecer à minha família. Deixei-os por último por acreditar que assim estaria encerrando essa seção com “chave-de-ouro”. A meus pais, André e Célia, por seu infinito amor e compreensão a um filho que ainda está por aprender muito sobre a vida. A minha irmã Clarisse, que me ensina a cada dia como é ser uma pessoa de caráter. Aos meus parentes, cuja dedicação pelo bem maior de toda a família nos inspira a cada dia.

E a você, caro leitor, minha eterna gratidão.

"A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência."

Charles Darwin

RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), considerada a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens e está associada a substanciais custos econômicos, pessoais e sociais. Como não existe cura para a doença, estratégias profiláticas e/ou terapêuticas são necessárias. A encefalite autoimune experimental (EAE) em ratos Lewis é considerada um modelo adequado para a investigação destas estratégias. Nos últimos anos observou-se um aumento na incidência de doenças autoimunes e alérgicas em países desenvolvidos. A Hipótese da Higiene propõe que o contato com determinados antígenos ambientais (helmintos, micobactérias e lactobacilos) pode diminuir ou até impedir as manifestações clínicas dessas doenças. Neste contexto, o objetivo desta investigação foi avaliar o efeito de múltiplas infecções prévias com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento (características clínicas, imunológicas e histopatológicas) da EAE em ratos Lewis. Foram então realizadas quatro infecções com 4000 L3 em ratos Lewis fêmeas, utilizando-se a via subcutânea. Cerca de quinze dias após a última infecção, foi realizada a indução da EAE por imunização com proteína básica de mielina associada ao adjuvante completo de Freund contendo *Mycobacterium butyricum*. Vinte dias após a indução da doença, os animais foram submetidos à eutanásia e avaliados quanto ao peso, escore clínico da doença, quantificação de anticorpos anti-mielina e anti- *S. venezuelensis* e dosagens de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-10). Foi realizada ainda uma análise histopatológica de diferentes regiões do SNC (cérebro, medula cervical, torácica e lombar).

O protocolo de múltiplas infecções determinou elevada produção de anticorpos IgG1 específicos, sugerindo o estabelecimento de um padrão Th2. Considerando os vários indicadores de intensidade da EAE, a estratégia de múltiplas infecções não impediu o pleno desenvolvimento desta patologia.

Projetos futuros empregando modelos alternativos de EAE e outras espécies de helmintos poderão complementar esta abordagem preliminar.

Palavras Chave: Esclerose Múltipla, *Strongyloides venezuelensis*, Encefalite Autoimune Experimental, Hipótese da Higiene, Ratos Lewis, Imunorregulação e Autoimunidade.

Sumário

Resumo

1. Introdução	10
1.1 Esclerose Múltipla.....	10
1.2 Encefalite Autoimune Experimental.....	11
1.3 Gênero <i>Strongyloides</i> : Ciclo Biológico, infecções e resposta imune.....	12
1.4 Hipótese da Higiene: Efeito imunomodulador das infecções helmínticas e incidência da EM/EAE.....	13
2. Objetivo	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Infecção experimental.....	18
3.3 Monitoramento da infecção.....	18
3.4 Indução de EAE e avaliação do escore clínico.....	19
3.5 Cultura de células.....	19
3.6 ELISA para detecção de citocinas.....	19
3.7 Obtenção de Antígeno Solúvel de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	20
3.8 ELISA para detecção de anticorpos (anti- <i>Strongyloides venezuelensis</i> e anti-mielina).....	20
3.9 Análise histopatológica.....	21
4. Análise Estatística	21
5. Protocolo Experimental e Resultados	22
5.1 Protocolo Experimental.....	22
5.2 Dinâmica das infecções primárias com <i>S. venezuelensis</i> e resposta imune humoral.....	23
5.3 Efeito da infecção por <i>S. venezuelensis</i> no desenvolvimento clínico da EAE.....	24
5.4 Efeito da infecção por <i>S. venezuelensis</i> no processo inflamatório do SNC.....	26
5.5 Efeito da infecção por <i>S. venezuelensis</i> na resposta imune anti-mielina.....	31
6. Discussão	36
7. Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1 Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizada por inflamações multicêntricas e destruição da mielina (Trapp *et al.*, 1998). No SNC, os axônios são revestidos por uma bainha composta de mielina produzida por células especializadas chamadas oligodendrócitos. Na EM, ocorre uma deterioração contínua dessa camada de mielina o que pode acarretar numa diminuição ou perda da função neuronal. Sintomas como paralisia, perturbações sensoriais, falta de coordenação e deficiência visual são características comuns da doença (Conlon *et al.*, 1999). Podem ocorrer episódios de recuperação total, seguindo-se de recidivas, entrando então num período crônico progressivo (Conlon *et al.*, 1999; Compston, 2004). Além disso, especula-se que a EM possui duas fases, sendo uma primeira de inflamação seguida por outra caracterizada por degeneração (Dyment *et al.*, 2004) e mediada por um padrão de resposta imune do tipo Th1 (Sospedra e Martin, 2005). Além disso, foi descrito recentemente que uma nova população de células de defesa chamada Th17 desempenha importante papel na patogênese da doença (Aranami e Yamamura, 2008). As características histológicas da doença são a formação de placas e de infiltrado celular (macrófagos e células T) ao longo do tecido nervoso (cérebro e medula) culminando com a destruição da bainha de mielina (Luchinetti *et al.*, 2000).

Apesar dos intensos estudos na área, as causas e fatores que contribuem para a heterogeneidade da EM ainda são desconhecidos (Wingerchuk *et al.*, 2001). Todavia, descobertas epidemiológicas têm sustentado hipóteses de influências ambientais e genéticas na suscetibilidade e decurso da doença (Wingerchuk *et al.*, 2001). A Hipótese da Higiene será abordada posteriormente.

Esta é uma doença que tem apresentado custos pessoais, sociais e econômicos substanciais (Imitola *et al.*, 2005). O número global de pacientes afetados chega a 2,5 milhões (Compston, 2006), o que incentiva o aumento de estudos com relação a essa patologia (Figura 1).

World Distribution of Multiple Sclerosis

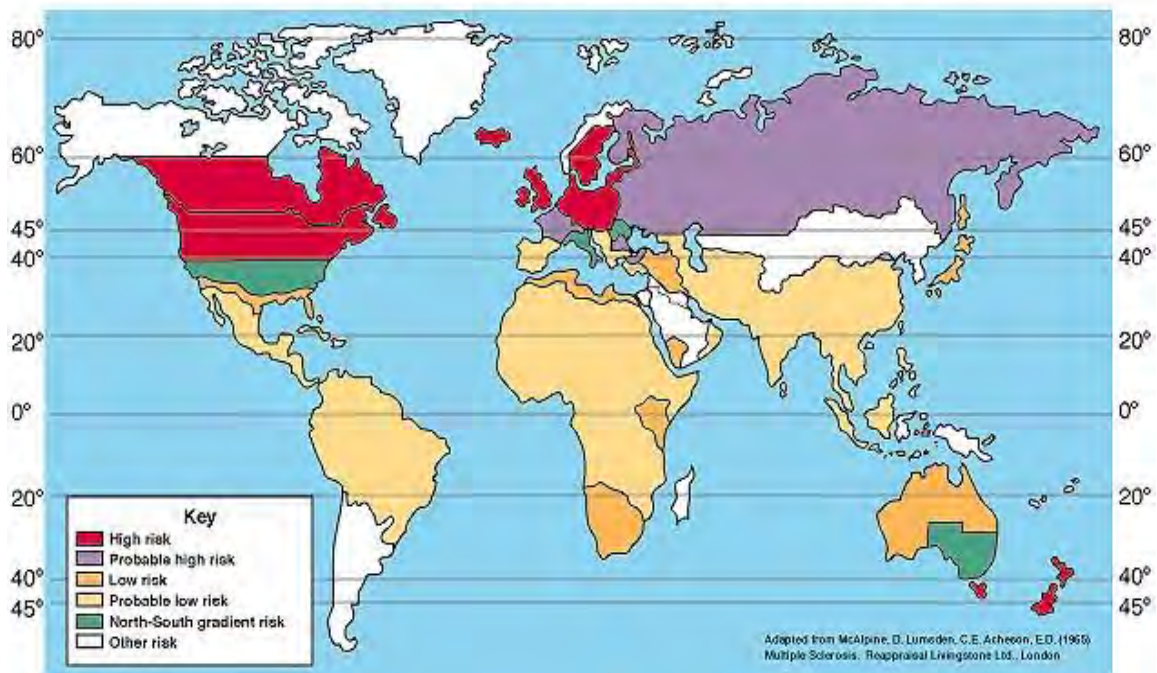


Figura 1- Distribuição Mundial da Esclerose Múltipla. Notar a maior incidência da doença nos países desenvolvidos em relação aos países restantes, em especial da América Latina, África e Ásia. Disponível em: http://library.med.utah.edu/kw/ms/mml/ms_worldmap.html

1.2 Encefalite Autoimune Experimental

A encefalite autoimune experimental (EAE) é, como o nome sugere, um modelo de EM. Esta doença experimental é induzida por inoculação de antígenos derivados de mielina (*myelin basic protein* – MBP, *proteolipid protein* - PLP, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* - MOG) associadas ao Adjuvante Completo de Freund (ACF). Alternativamente, pode também ser desencadeada pela transferência adotiva de células T específicas para mielina (Namer *et al.*, 1998). Assim como a EM, a EAE é uma doença neurodegenerativa mediada por um padrão Th1 de resposta na qual linfócitos ativados contra neuroantígenos infiltram-se no SNC mediando o desenvolvimento de lesões inflamatórias, podendo ainda causar desmielização de axônios e paralisia progressiva (Becher *et al.*, 2002). Ela é mediada por células do tipo CD4⁺ específicas para antígenos do SNC (Zamvil e Steinman, 1990). Nos últimos 30 anos, a EAE em ratos e camundongos tem sido exaustivamente utilizada para investigar a patogênese da EM (Swamborg, 1995).

No caso específico dos ratos Lewis esta doença experimental caracteriza-se por ser uma doença aguda e monofásica, cuja recuperação ocorre espontaneamente.

Este modelo experimental de EM em ratos Lewis tem sido utilizado em nosso laboratório para investigar o potencial profilático de algumas formulações no desenvolvimento desta patologia.

1.3 Gênero *Strongyloides*: Ciclo Biológico, infecções e resposta imune

O Filo Nematoda é um grupo taxonômico que engloba os vermes cilíndricos. Estão inseridos nesse grupo os vermes do Gênero *Strongyloides*. Esse gênero é composto por várias espécies, sendo que várias delas causam a doença denominada estrogiloidíase, que acomete diversos tipos de hospedeiros. Atualmente, cerca de trinta milhões de pessoas estão infectadas em setenta países (Siddiqui e Berk, 2001), sendo que a espécie infectante em humanos é o *Strongyloides stercoralis*.

O ciclo de vida do *Strongyloides* pode compreender tanto estágios de vida livre quanto parasitário (Keiser e Nutman, 2004). As fêmeas adultas podem parasitar o intestino humano liberando ovos na mucosa intestinal por partenogonia dos quais eclodem larvas rabditiformes que são liberadas nas fezes. Dependendo das condições ambientais, provavelmente temperatura e umidade, as larvas podem evoluir para formas de vida livre adulta ou parasitária. Só nas formas de vida livre é que ocorre a reprodução sexual (Neva, 1986). Já no estágio parasitário, são formadas fêmeas filarióides (L3). Essas larvas acabam infectando o hospedeiro por via subcutânea. Após a penetração, essas migram até o intestino delgado, passando por um estágio no pulmão. Nessa via, o parasita entra na corrente sanguínea sendo levado até os pulmões, chegando à árvore traqueobrônquica e entrando no trato gastrointestinal (Keiser e Nutman, 2004). Pode haver ainda auto-infecção através do epitélio intestinal, completando o ciclo.

A espécie *Strongyloides venezuelensis* é um parasita original de *Rattus norvegicus* (Nakai e Amarante, 2001). Esse verme tem sido amplamente utilizado como modelo para diversos estudos que vão desde pesquisas sobre biologia, imunologia, morfologia, características bioquímicas, mecanismos de expulsão e atividade anti-helmíntica (Matsuda et. al., 2003). Estudos mostraram que esses hospedeiros conseguem expulsar os nematódeos, geralmente num período de até cinco semanas (Silveira et al., 2002).

Infecções helmínticas caracterizam-se por indução de respostas celulares tipo Th2, as quais geralmente resultam em eosinofilia, hiperplasia de células caliciformes e mastócitos da mucosa e produção de anticorpos não-fixadores de complemento (Gause et al., 2003). Neste

caso predomina a produção de IgG1, IgG4 e IgE, tipicamente mediada pelo efeito da IL-4 (Loukas e Prociv, 2001) além de IL-13, IL-5, IL-3 e IL-10 (Silveira et. al., 2002).

Os mastócitos são células extremamente importantes no processo de defesa contra parasitas, podendo interagir com os mesmos na região de mucosa e submucosa (Niborski *et al.*, 2004). Tais células carregam diversos grânulos com histamina, heparina, proteases e secretam ainda citocinas como IL-4 e IL-5, além de leucotrienos e quimiocinas. A ativação clássica de tais células dá-se pela ligação do anticorpo IgE com o mastócito, via FcεR (De Veer *et al.*, 2007). Entretanto, estudos recentes indicam que a ativação e degranulação dos mastócitos podem ocorrer de forma direta por interação com antígenos helmínticos (Niborski *et al.*, 2004).

Os eosinófilos, por sua vez, são descritos como o componente mais importante da resposta imune contra infecções por helmintos (Korenaga *et al.*, 1991). Essas células contêm grânulos carregados de proteínas catiônicas e podem liberar várias citocinas tais como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e TGF α/β (Rothenberg e Hogan, 2006), quimiocinas e mediadores lipídicos, sendo, portanto potentes células efetoras (De Veer *et al.*, 2007). Com a liberação dessas moléculas, há geração de efeitos pro – inflamatórios, incluindo indução de moléculas de adesão, modulação do tráfego celular, ativação e regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição suave da musculatura (Rothenberg & Hogan, 2006).

Ultimamente tem aumentado o interesse no entendimento da relação entre helmintos e a resposta imune de seus hospedeiros. Isto tem ocorrido principalmente porque estas infecções têm o potencial de modular imunologicamente quadros alérgicos e de autoimunidade (Helmbly e Bickle, 2006).

1.4 Hipótese da Higiene: Efeito imunomodulador das infecções helmínticas e incidência da EM/EAE

Em 1989 o pesquisador David Strachan publicou o que viria a ser conhecido coloquialmente como a Hipótese da Higiene. Em seu artigo intitulado “Hay Fever, Hygiene, and Household size”, Strachan observou que crianças de famílias mais numerosas tinham uma incidência menor de reações alérgicas, como “febre do feno” e eczema, do que aquelas de famílias menos numerosas (de apenas um filho). Ele propôs que infecções por certos agentes, geradas pelo contato entre os irmãos ou no período pré-natal pela mãe infectada, podiam gerar proteção às alergias.

Atualmente, essa hipótese vem sendo amplamente verificada e, graças a diversos estudos, expandida para novos modelos de infecção como bactérias e outros microorganismos (Rook e Brunet, 2005). Além disso, novos parâmetros como idade, condições sanitárias e polimorfismo genético têm contribuído para reforçar esta hipótese (Bufford e Gern, 2005).

Segundo a Hipótese da Higiene, indivíduos submetidos a condições sanitárias mais precárias, o que pode estar associado a outros fatores ambientais como poluição (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002), têm uma incidência de doenças alérgicas e auto-ímmunes menor do que aqueles inseridos numa condição “germ-free” (Yazdanbakhsh e Matricardi, 2004; Wilson e Maizels, 2004) . Algumas observações corroboram com essa idéia. Em países desenvolvidos, alergias são consideradas pandemias e quase metade da população sofre com atopia, asma ou outros quadros alérgicos. Além disso, há incidência de outras doenças como diabetes dependente de insulina, doenças inflamatórias intestinais, doenças de tecidos conectivos e esclerose múltipla. Já nos países em desenvolvimento, a incidência de alergias e doenças auto-ímmunes é mais baixa (Fleming e Fabry, 2007).

A Hipótese da Higiene propõe uma possível explicação para a presença ou não dessas doenças entre os países com diferentes condições socioeconômicas. Segundo esta hipótese, a ocorrência de várias infecções em países em desenvolvimento, devido à falta de saneamento, vacinação e uso de antibióticos durante as diferentes fases da vida (infância principalmente) pode modular o sistema imune de forma que este pode montar redes regulatórias potentes que podem ser a chave para o controle das doenças alérgicas (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002).

Evidências recentes têm demonstrado o papel desempenhado pelas Tregs nas alergias e respostas auto-ímmunes. Estudos epidemiológicos e imunológicos vêm reforçando a plausibilidade desta teoria e um dos aspectos mais proeminentes desta área é justamente a possibilidade de se modular a atividade destas células reguladoras (Figura 2).

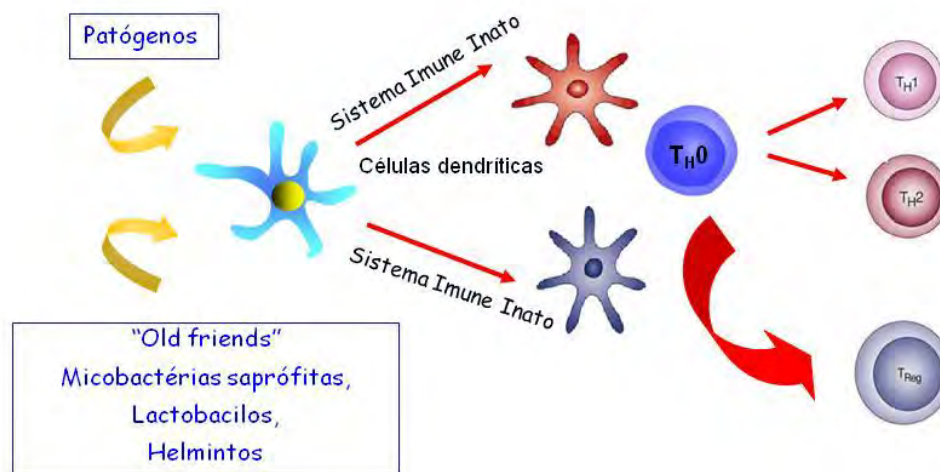


Figura 2 – Modulação do sistema imune pela interação com antígenos ambientais.

Rook *et al.*, 2004. (Modificado)

Nesse sentido, tem sido constatada a deficiência na atividade destas células em casos de alergia e autoimunidade (Randolph e Fathman, 2006). Ainda mais interessante e promissor é a observação, em modelos experimentais, de que a exposição a determinados agentes infecciosos ou produtos derivados dos mesmos, induz células Tregs com capacidade de regular processos inflamatórios, incluindo doenças autoimunes (Kitagaki *et al.*, 2006; Fallon e Alcami, 2006). Pelo menos dois tipos de células T reguladoras estão envolvidos, as Tregs “naturais” e as “adaptativas”. Tem sido sugerido que as Tregs naturais são responsáveis pela manutenção da auto-tolerância enquanto as adaptativas limitam as respostas imunes em andamento (Helmbly e Bickle, 2006).

A relação entre helmintos e doenças autoimunes tem sido estudada dado o possível efeito modulador que estes parasitas teriam na resposta imune. Por exemplo, vários estudos foram conduzidos relacionando a infecção por helmintos como *Schistosoma* em quadros de EM ou seu modelo experimental de encefalite (Sewell et al, 2003; La Flamme *et al.*, 2003). Nesses trabalhos foi constatada uma correlação inversa entre a infecção com esse verme e o quadro clínico da doença. Além disso, foi observado que modelos como ratos e camundongos mantidos sob condições germ-free tem desenvolvido quadros mais graves de EAE (Zorzella *et al.*, 2007).

Apesar de várias evidências corroborarem com a Hipótese da Higiene, alguns aspectos ainda não estão claros. Primeiramente, o declínio das doenças infecciosas, graças ao uso de

antibióticos, melhoria nos cuidados da casa e melhor tratamento de água, ocorreu muitos anos antes das epidemias de doenças autoimunes Th1/Th2. Existem algumas críticas quanto aos mecanismos de regulação propostos pela Hipótese da Higiene na autoimunidade. Por exemplo, no caso da EM alguns autores têm apontado que estudos sobre a incidência diferencial dessa doença entre os países com diferentes condições sócio-econômicas são altamente questionáveis pelas mais diversas razões. Uma delas é a área de estudo que pode não ser representativa. Estudos em diferentes cidades da Itália têm mostrado que as populações possuem diferentes graus de incidência de EM (a doença tem incidência crescente ou não) mesmo quando estão expostas aos mesmos tipos de antígenos ambientais (helmintos, bactérias de áreas rurais). Outro questionamento é que existem países europeus onde, num mesmo intervalo de tempo, ocorreu um decréscimo do número de casos de EM, mas um aumento pronunciado nos casos de alergia (Romagnani, 2004).

Neste contexto, mais estudos são necessários, em especial, na relação entre Hipótese da Higiene e autoimunidade na busca da elucidação de diversas questões que tal hipótese ainda apresenta.

2. **Objetivo**

Avaliar o efeito de múltiplas infecções prévias com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento (características clínicas, imunológicas e histopatológicas) da EAE em ratos Lewis.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Lewis (fêmeas) com 4-6 semanas de idade, provenientes do CEMIB-UNICAMP, com peso corporal entre 150 e 200g. Os animais foram alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum*. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu.

3.2 Infecção experimental

As infecções foram realizadas com uma cepa de *S. venezuelensis* mantida em ratos Wistar no Departamento de Parasitologia-Instituto de Biociências-UNESP-Botucatu desde seu isolamento no início da década de 80. Larvas infectantes (L3) foram produzidas em cultura usando fezes de cavalo esterilizadas como substrato. Fezes de ratos infectados foram homogeneizadas com o substrato, umedecidas e mantidas em placa de Petri em estufa a 25°C. Após três dias de incubação, as larvas infectantes (L3) foram recuperadas por filtragem e decantação em água destilada utilizando-se aparelho de Baermann. As larvas recuperadas foram lavadas várias vezes com PBS e quantificadas. Para determinação do número de larvas obtidas, alíquotas de 10 µl de suspensão larval foram contadas em dez replicatas. Após o ajuste do volume, os ratos foram inoculados por via subcutânea com 4000 larvas infectantes em 0,1 mL de *S. venezuelensis* (Amarante e Oliveira-Siqueira, 2002). No total foram realizadas quatro infecções em intervalos de uma semana.

3.3 Monitoramento da infecção

A intensidade da infecção foi monitorada pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) semanalmente durante seis semanas. A quantificação de ovos por grama de fezes foi realizada através da técnica de McMaster modificada (Gordon e Whitlock, 1939). Para a colheita das amostras fecais, cinco animais foram distribuídos em caixas com fundo telado onde permaneceram por 3 horas e foram feitas contagens de ovos em *pool* de fezes.

3.4 Indução de EAE e avaliação do escore clínico

Ratos Lewis fêmeas normais ou previamente infectados com *S. venezuelensis* foram imunizados com 50 µL de uma emulsão contendo volumes iguais de proteína básica de mielina (MBP- Sigma) diluída em salina (25µg) e adjuvante completo de Freund contendo 5mg/ mL de *Mycobacterium butiryicum* (Difco). Estes dois grupos experimentais foram submetidos à indução da doença 15 dias após a última dose de *S. venezuelensis*. Os animais foram diariamente pesados e inspecionados quanto aos sinais clínicos da doença. A gravidade da doença foi definida segundo a seguinte escala: 0 = normal; 1 = cauda parcialmente frouxa; 2 = cauda frouxa; 3 = paraparesia moderada, perda da tonicidade do movimento; 4 = paraplegia; 5 = moribundo ou morte. A eutanásia dos animais foi realizada 20 dias após a imunização com mielina.

3.5 Cultura de células

Baço e linfonodos regionais (poplíteos e inguinais) foram coletados para o preparo de culturas celulares. Os órgãos foram divulsionados e as células centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI contendo gentamicina, soro bovino fetal e L-glutamina. As células de baço (5×10^6 células/mL) e de linfonodo ($2,5 \times 10^6$) foram distribuídas em placas de cultura e estimuladas com mielina (10µg/ mL de cultura) e concanavalina A (5µg/ mL de cultura). Após incubação por 72 horas, a 37°C, em estufa de CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -70°C para posterior dosagem de citocinas (IFN-γ, TNFα e IL-10).

3.6 ELISA para detecção de citocinas

Os sobrenadantes das culturas de baço e linfonodo foram avaliados quanto à produção de IFN-γ, TNFα e IL-10. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN-γ, anti-TNF-α ou anti-IL-10 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS na concentração 2 µg/ mL, 4 µg/ mL e 4 µg/ mL, respectivamente. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%) foi adicionada 300 µL da solução

de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por duas horas, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas por duas horas, a temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou anti-IL-10 de rato biotinizados na concentração de 150 ng/ mL, 100 ng/ mL e 100 ng/ mL, respectivamente, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a incubação com estreptoavidina diluída 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma) e H₂O₂. A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 2N e a leitura realizada em 492 nm. O nível de detecção das citocinas foi de 19,5 pg/ mL para o IFN- γ ; 31,25 para o TNF- α e IL-10.

3.7 Obtenção de Antígeno Solúvel de *Strongyloides venezuelensis*

O preparo deste antígeno foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Negrão-Corrêa *et al.* 2004, modificada. Larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis* (produzidas conforme descrito no item infecção experimental) foram submetidas a vários ciclos de lavagem com PBS e ressuspendidas em meio RPMI contendo um coquetel inibidor de proteases (Complete-Mini, Roche). Em seguida, as larvas foram rompidas por mistura com pérolas de vidro e agitação em vórtex (5 ciclos de 1 minuto) e depois submetidas à sonicação (10 ciclos de 1 minuto). O material insolúvel foi removido por centrifugação e a concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA - Ácido Bicinonínico, com a utilização de um kit comercial (Bicinchoninic Acid Kit for protein determination-Sigma). O antígeno solúvel obtido foi estocado a -80 °C.

3.8 ELISA para detecção de anticorpos (anti-*S. venezuelensis* e anti-mielina)

Para a detecção de anticorpos específicos anti-*S. venezuelensis* e anti-mielina, placas de 96 poços foram recobertas com 100 μ L/poço do antígeno de *S. venezuelensis* (100 μ g/ mL) ou mielina (5 μ g/ mL), diluídos em tampão de ligação (Na₂CO₃ 17mM, NaHCO₃ 9,6 mM, pH 9,6) e incubadas a 4°C, durante uma noite. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween 20 0,05% e bloqueadas com 300 μ L por poço de PBS / Tween 20 0,05% e

soro fetal bovino 10%. As placas foram incubadas por uma hora, a 37°C e lavadas novamente. As amostras de soro foram diluídas 1/10 (*S. venezuelensis*) e 1/1000 (mielina) em tampão de bloqueio e incubadas a 4°C, por uma noite. As placas foram novamente lavadas e depois incubadas por mais uma noite, a 4°C com 100µL por poço de anticorpo biotilado anti-IgG1 ou anti-IgG2b de rato (Oxford Biotechnology) diluído em tampão de bloqueio na concentração de 500 ng/ mL e 250 ng/ mL, respectivamente. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100µL por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB - Dako Corporation) diluído em tampão de bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, a temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100µL por poço de solução de OPD (Sigma) e H₂O₂, e a reação interrompida com a adição de 50µL por poço de H₂SO₄ a 2N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

3.9 Análise histopatológica

Cérebro e medula espinhal (cervical, torácica e lombar) foram coletados para avaliação histopatológica 20 dias após a imunização com mielina. A seguir foram fixados em solução de formol tamponado 10%, embebidos em parafina. Cortes de 5 micras foram obtidos e corados com hematoxilina/ eosina (H&E) segundo procedimento padrão. As análises foram analisadas em um microscópio Nikon.

A comparação do processo inflamatório no SNC foi feita através de inspeção visual. O critério utilizado para a escolha da região a ser documentada fotograficamente foi a de ser a mais inflamada em toda a lâmina a qual continha quatro cortes.

4.0 Análise estatística

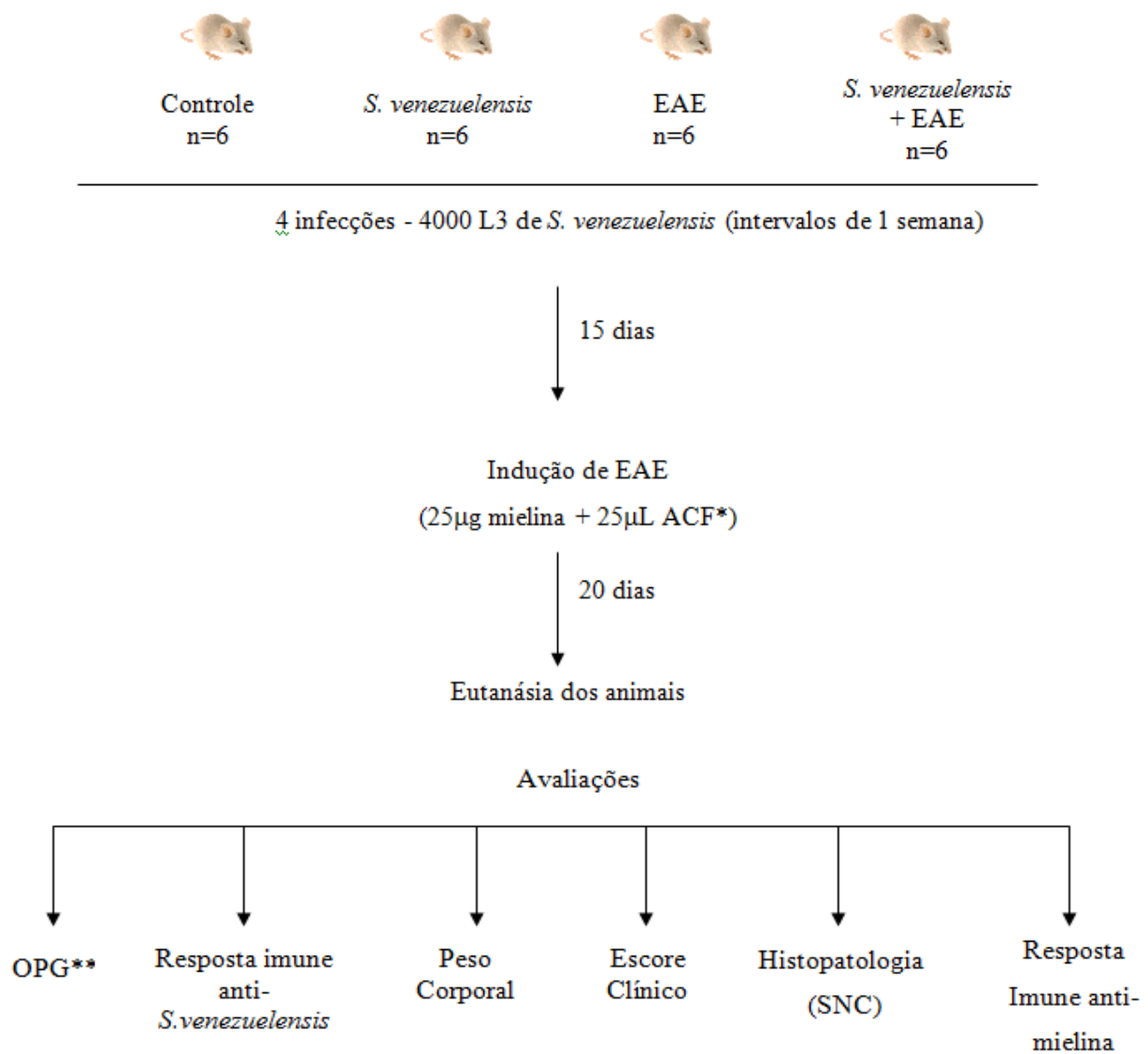
Para as variáveis paramétricas, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste comparativo Holm-Sidak. Para as variáveis não paramétricas, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

5. Protocolo Experimental e Resultados

5.1 Protocolo Experimental

Objetivo: Avaliar o efeito de múltiplas infecções com *S. venezuelensis* no desenvolvimento da EAE.



* ACF- Adjuvante Completo de Freund

** OPG- Número de Ovos por grama de fezes

5.2 Dinâmica da infecção com *S. venezuelensis* e resposta imune humoral específica

Ovos de *S. venezuelensis* foram encontrados no 7º, 13º, 20º e 27º dias após a primeira infecção. No 34º dia não foram encontrados ovos neste material (Figura 3).

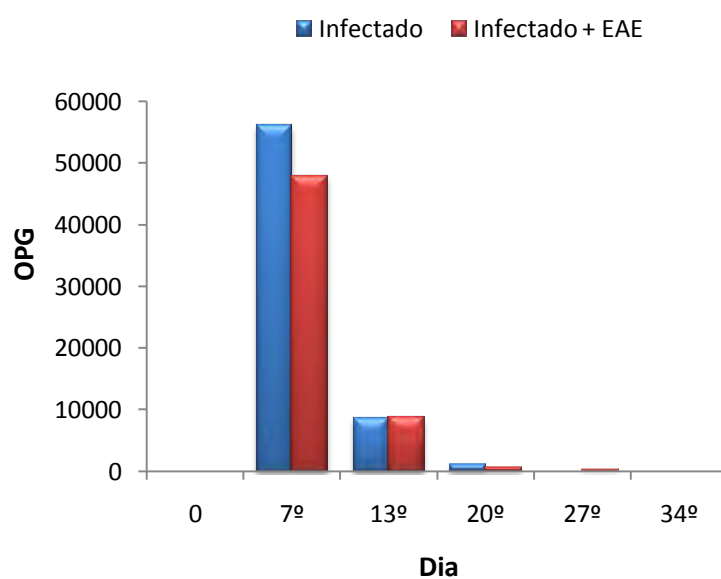


Figura 3 – Contagem de ovos por grama de fezes em *pool* de 5 animais por grupo.

Os animais infectados produziram níveis significativamente elevados de anticorpos anti-*S. venezuelensis* quando comparados ao grupo controle. Esse aumento foi verificado para a subclasse IgG1 mas não para IgG2b (Figura 4).

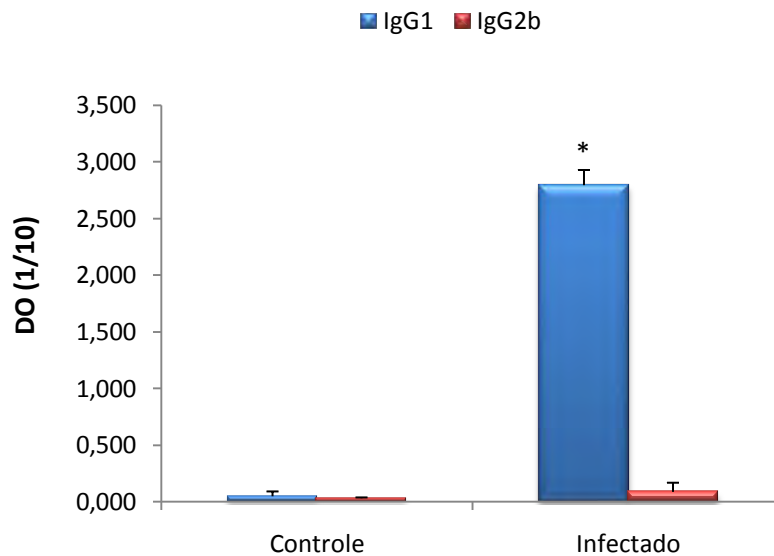


Figura 4 - Produção de anticorpos anti-*S. venezuelensis* em ratos Lewis infetados com *S. venezuelensis*. Os resultados da produção de IgG1 e IgG2b representam a média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

5.3 Efeito da infecção por *S. venezuelensis* no desenvolvimento clínico da EAE

Não houve diferença significativa no peso e no escore clínico dos grupos EAE e infectado/EAE. Tais animais começaram a perder peso no 11º dia após a imunização com mielina (Figura 5a). Dos cinco animais com EAE, três evoluíram até o escore 4, um evoluiu até o escore 3 e o último até o escore 1. Já no grupo EAE que foi previamente infectado com o helminto, dos cinco animais quatro evoluíram para o escore 4 e o último chegou até o escore 3 (Figura 5b).

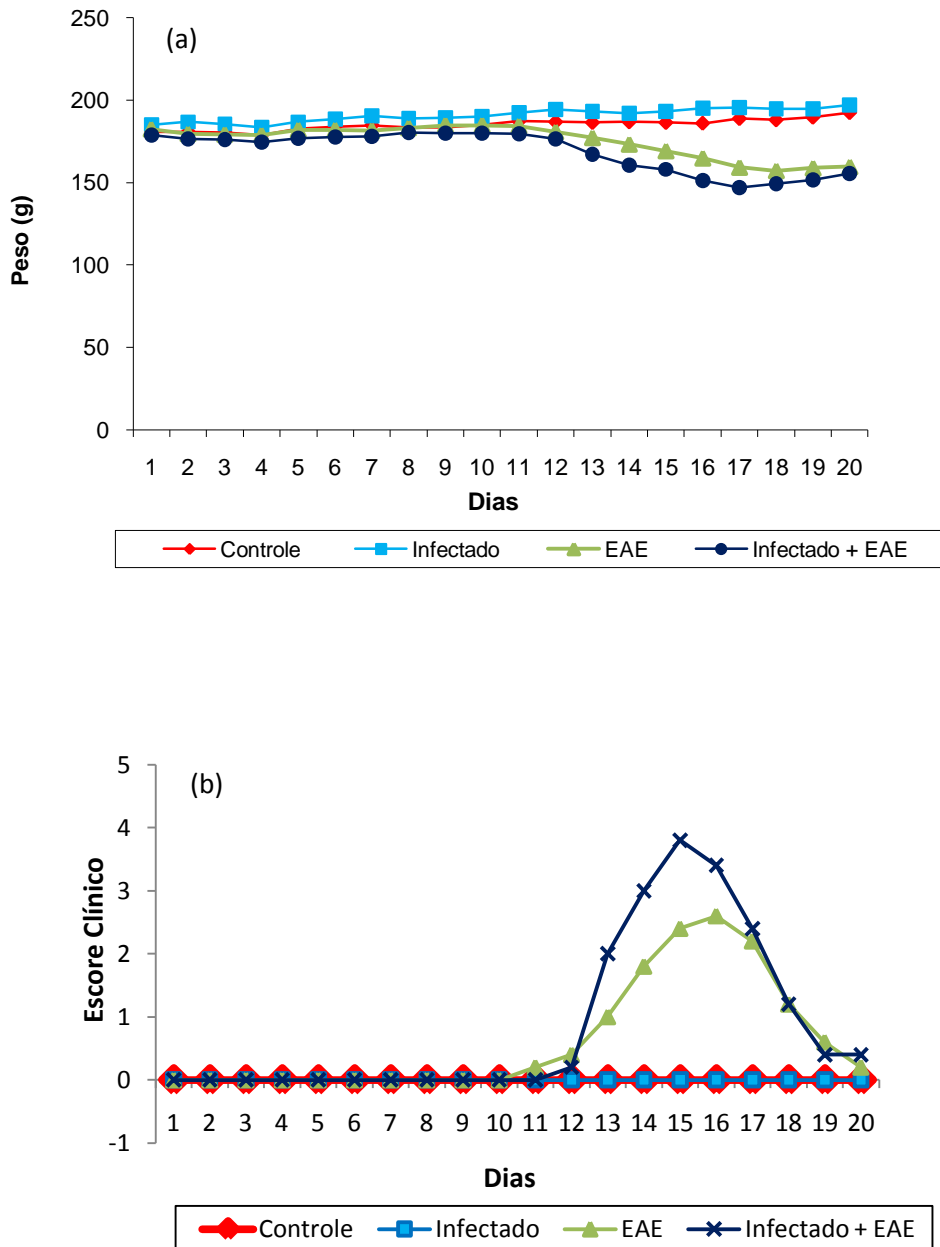


Figura 5 – Efeito da infecção por *S. venezuelensis* na evolução clínica de animais submetidos à indução da EAE. (a) Peso corpóreo e (b) escore clínico. Resultados representam a média de 5 animais por grupo.

5.4 Efeito da infecção por *S. venezuelensis* no processo inflamatório do SNC

Observou-se que, tanto no grupo EAE, quanto no grupo infectado/EAE, os cérebros dos animais apresentaram focos inflamatórios típicos da doença, localizados ao redor de pequenos vasos (Figura 6b e 6d, respectivamente). No cérebro e nas outras três regiões do SNC que foram analisadas (porções cervical, torácica e lombar da medula espinhal), os processos inflamatórios observados parecem ser de intensidade similar. Cortes correspondentes a estas três regiões da medula são mostrados nas figuras 7, 8 e 9. Tanto os animais do grupo apenas infectado quanto do controle (sem desenvolvimento da EAE), não apresentaram focos inflamatórios perivascularares em todas as porções analisadas (cérebro e porções da medula espinhal).

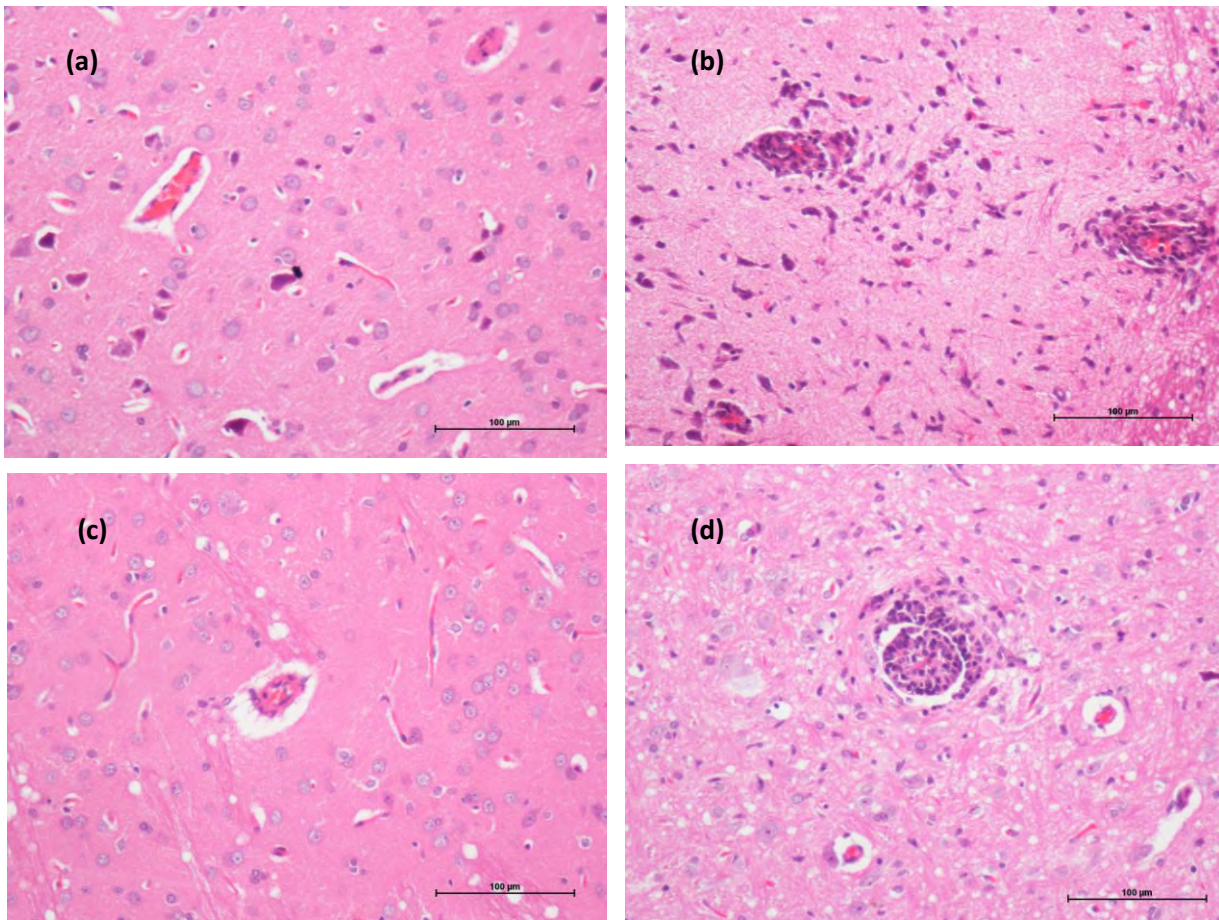


Figura 6 – Análise histopatológica de cérebro de animais previamente infectados com *S. venezuelensis* e submetidos à indução da EAE. (a) animal controle, (b) animal EAE, (c) animal apenas infectado e (d) animal EAE previamente infectado. Cortes de 5µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

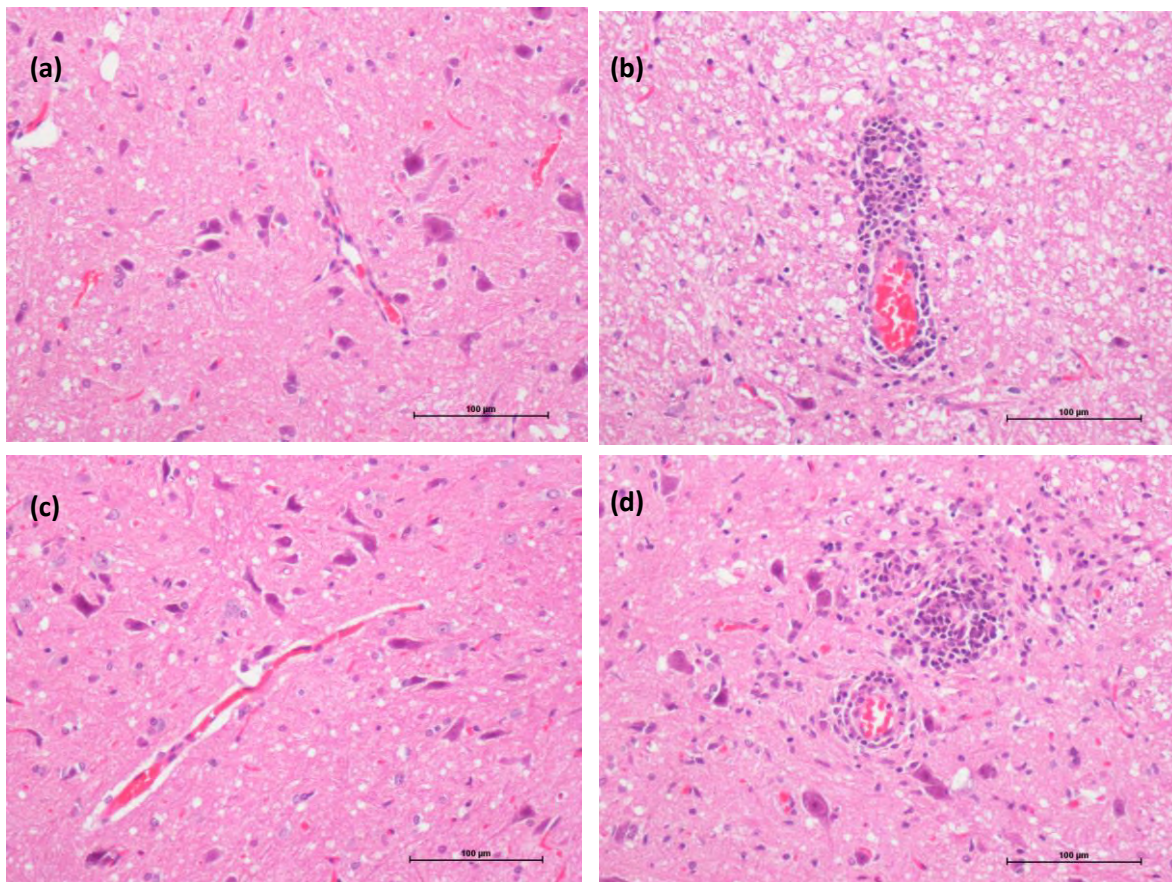


Figura 7 – Análise histopatológica da porção cervical da medula espinhal de animais previamente infectados com *S. venezuelensis* e submetidos à indução da EAE. (a) animal controle, (b) animal EAE, (c) animal apenas infectado e (d) animal EAE previamente infectado. Cortes de 5µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

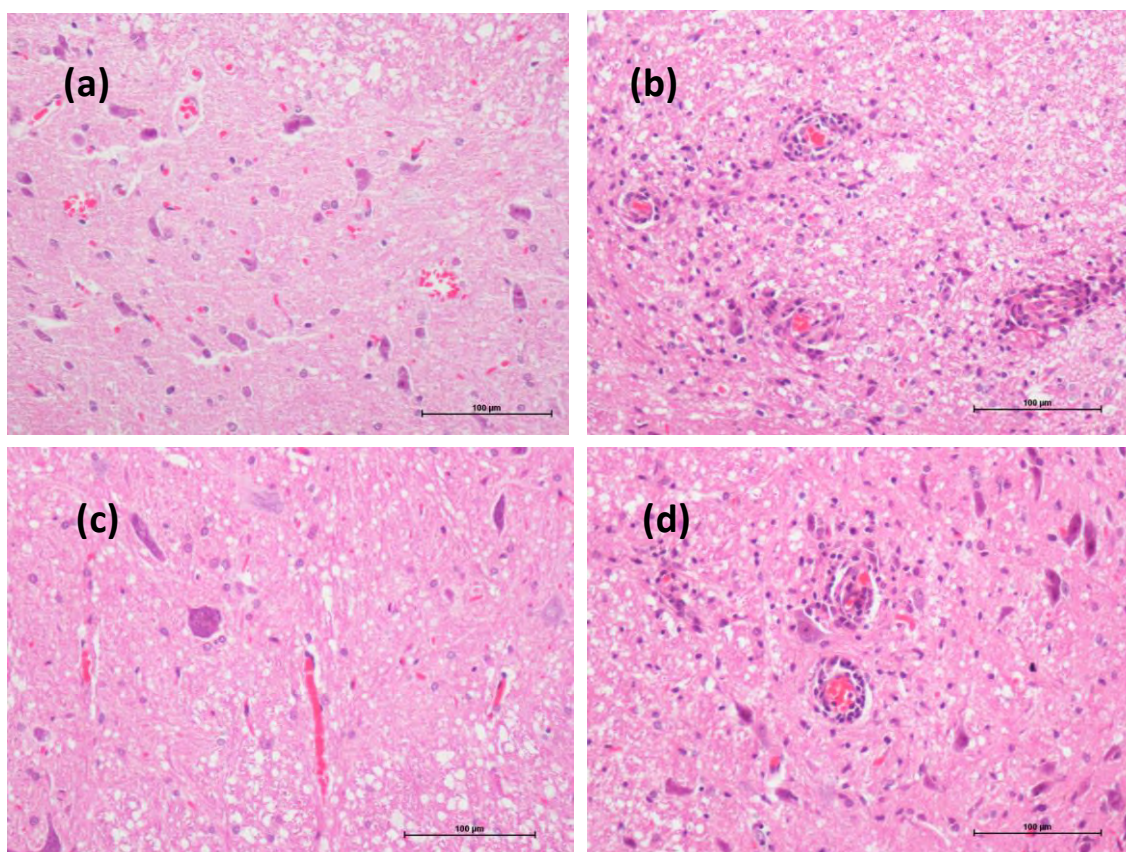


Figura 8 – Análise histopatológica da porção torácica da medula espinhal de animais previamente infectados com *S. venezuelensis* e submetidos à indução da EAE. (a) animal controle, (b) animal EAE, (c) animal apenas infectado e (d) animal EAE previamente infectado. Cortes de 5µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

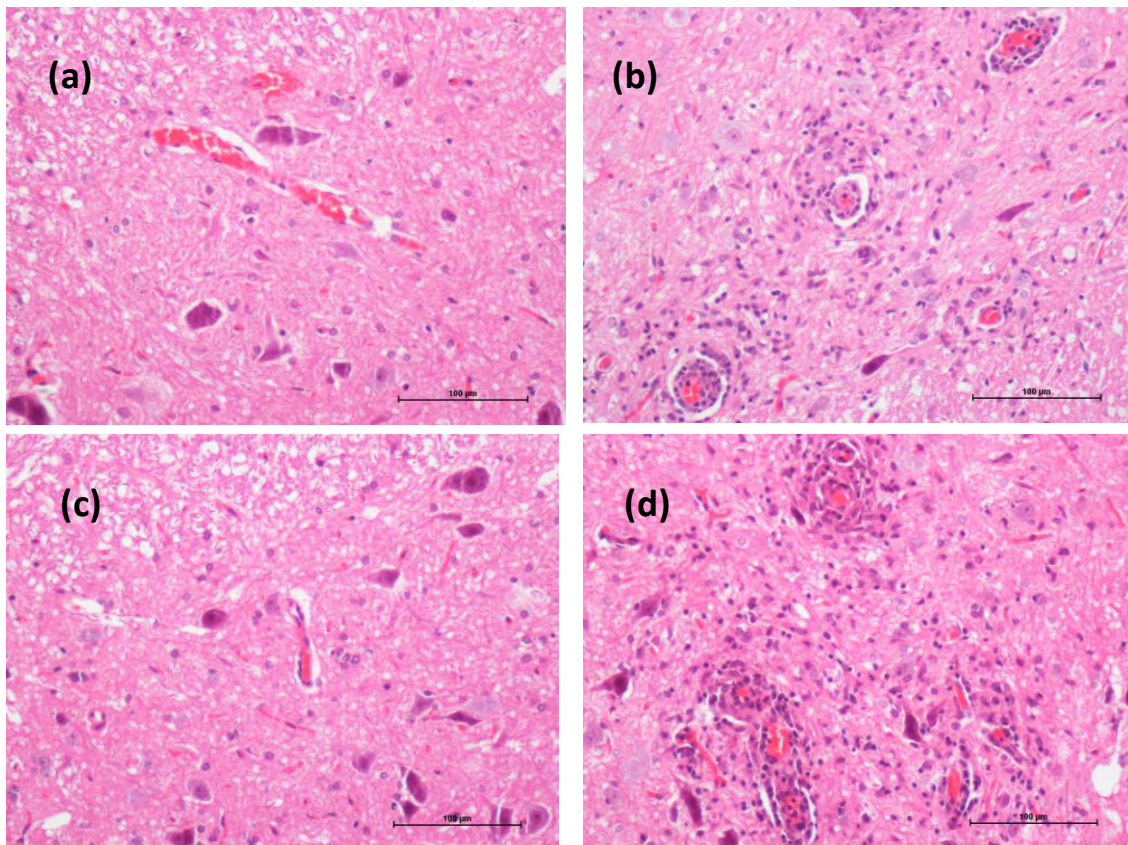


Figura 9 – Análise histopatológica da porção lombar da medula espinhal de animais previamente infectados com *S. venezuelensis* e submetidos à indução da EAE. (a) animal controle, (b) animal EAE, (c) animal apenas infectado e (d) animal EAE previamente infectado. Cortes de 5µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

5.5 Efeito da infecção por *S. venezuelensis* na resposta imune anti-mielina

Os animais submetidos à indução de EAE por imunização com mielina associada ao ACF produziram como esperado, níveis significativamente elevados de IgG1 e IgG2b específicos em comparação com o grupo controle. Os níveis de IgG1 foram mais elevados (sem diferença estatística) do que os níveis de IgG2b. A infecção prévia com *S. venezuelensis* não afetou a produção de IgG1 e de IgG2b anti-mielina (Figura 10).

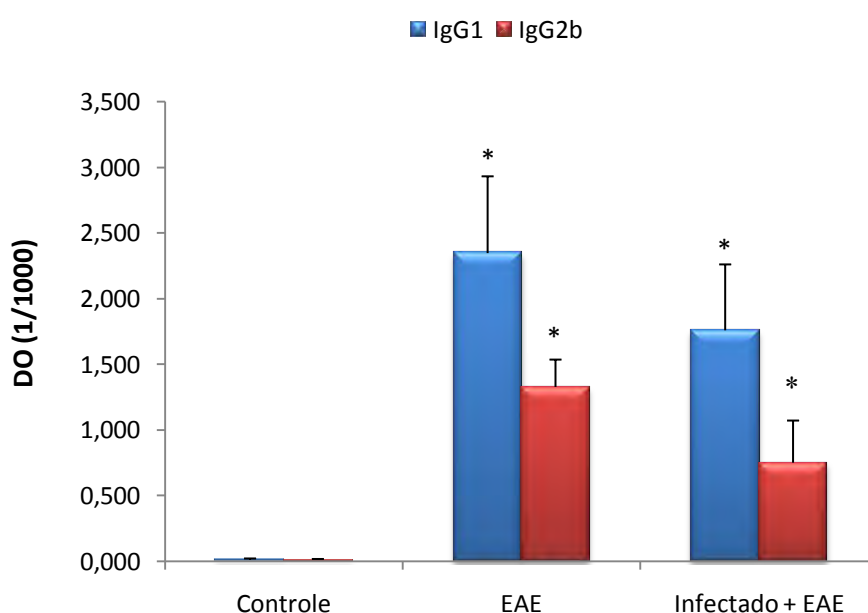


Figura 10 – Efeito da infecção com *S. venezuelensis* na produção de anticorpos anti-mielina em ratos Lewis com EAE. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/1000. Os resultados da produção de IgG1 e IgG2b representam a média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Não houve diferença na produção de IFN- γ pelas células esplênicas dos animais previamente infectados, reestimuladas *in vitro* com mielina, em relação aos animais que foram apenas submetidos à indução da doença (figura 11a). O mesmo foi observado nas células de linfonodo (figura 11b). Os animais do grupo controle (inoculados com salina) não produziram IFN- γ em resposta ao estímulo com mielina (dados não mostrados).

A produção de IFN- γ após estímulo com ConA foi mais elevada nos 2 grupos com EAE comparativamente ao grupo controle (figuras 11c e 11d). O grupo com EAE que foi previamente infectado produziu níveis ligeiramente superiores (sem diferença estatística) que o grupo EAE.

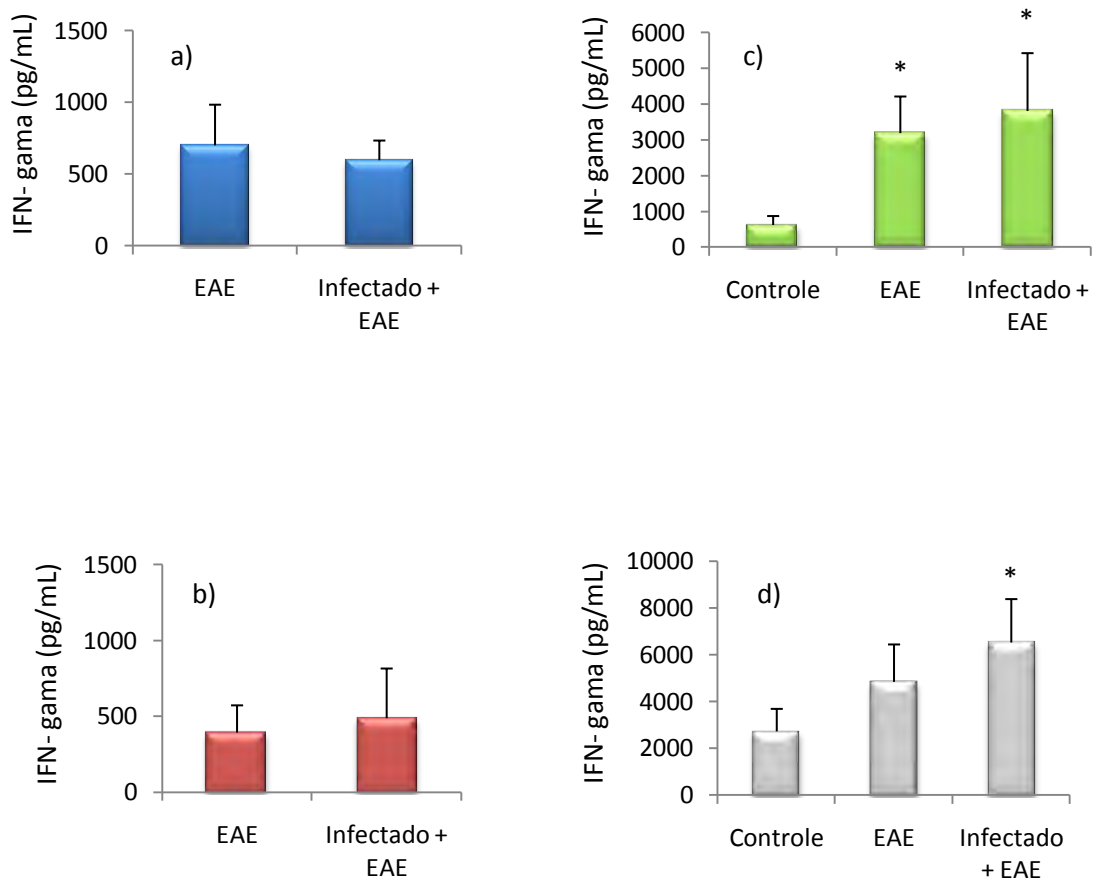


Figura 11 – Produção de IFN- γ por ratos Lewis com EAE: efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis*. Células esplênicas (a) e de linfonodo (b) estimuladas *in vitro* com mielina. Células esplênicas (c) e de linfonodo (d) estimuladas *in vitro* com con A. os valores das culturas controle (com adição só de meio de cultura) ficaram abaixo do nível de detecção da curva padrão (não mostrado na figura). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Controle.

As células esplênicas e de linfonodos não produziram TNF- α quando foram estimuladas *in vitro* com mielina (dados não mostrados). A produção de TNF- α em culturas de baço estimuladas com Con A foi similar nos grupo controle e EAE. Entretanto estava significativamente reduzida no grupo infectado/ EAE em relação aos dois grupos anteriores (figura 12a). Nas células de linfonodo, a produção de TNF foi significativamente reduzida nos animais com EAE em relação ao controle (figura 12b).

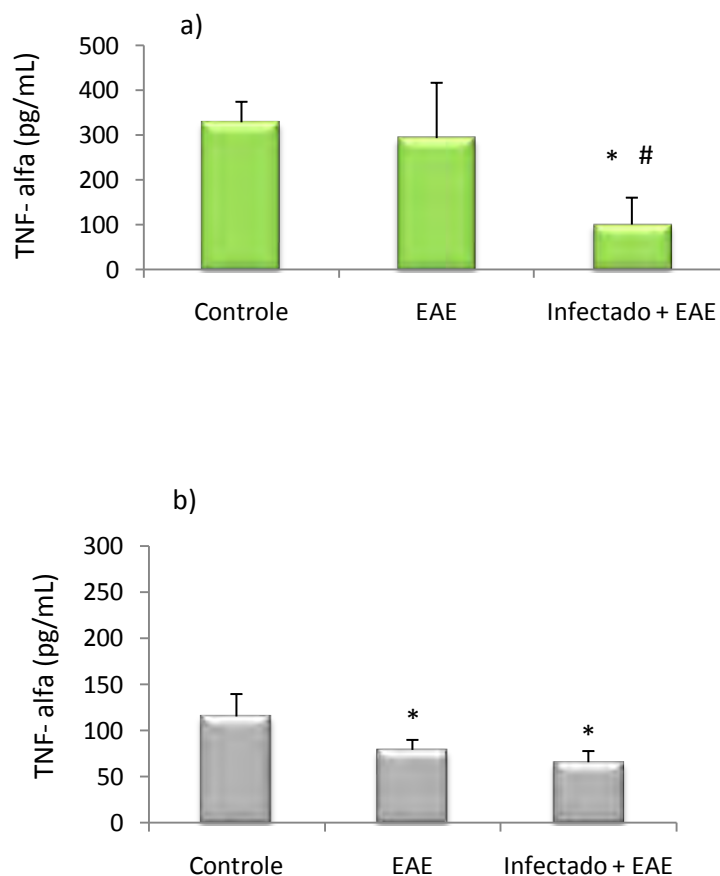


Figura 12 – Produção de TNF- α por ratos Lewis com EAE: efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis*. Células esplênicas (a) e de linfonodo (b) estimuladas *in vitro* com con A. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo EAE.

A produção de IL-10 só foi avaliada em culturas de células oriundas de linfonodos. Após estímulo com mielina, a produção desta citocina foi similar nos grupos EAE e infectado/EAE e significativamente mais elevada em relação ao grupo controle (sem produção, dados não mostrados).

Nas culturas estimuladas com Con A, a produção desta citocina também foi significativamente mais elevada nos grupos EAE e infectado/EAE, sem diferença entre os mesmos (Figura 13b).

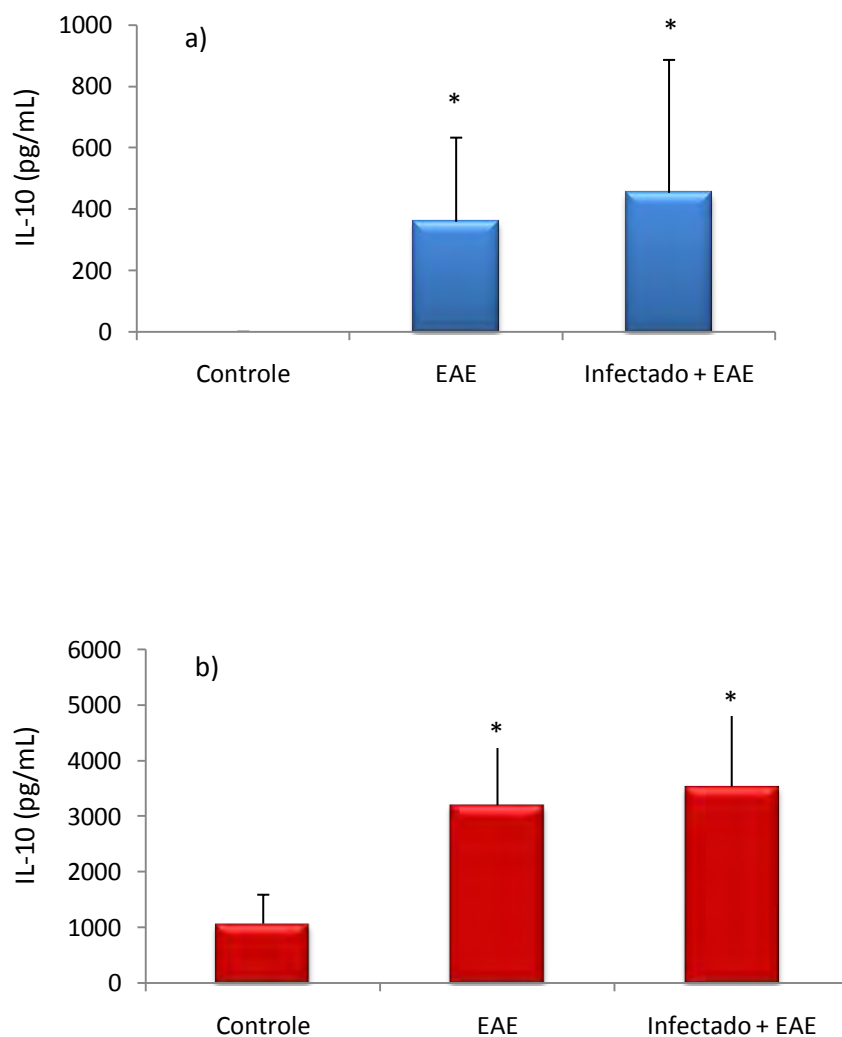


Figura 13 – Produção de IL-10 por ratos Lewis com EAE: efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis*. Células de linfonodo estimuladas *in vitro* com mielina (a) e com con A (b). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

6. Discussão

6.1 Considerações iniciais

Primeiramente, gostaria de pedir a permissão para escrever com um estilo um tanto quanto mais livre, sem a necessidade daquele tom mais catedrático que a academia por vezes exige. Estando esta permissão concedida, tentarei levantar aqui pontos que considerarei relevantes quando da realização desse projeto.

Quando da apresentação à minha colossal ignorância, confesso que me entusiasmei bastante, a idéia de um possível efeito modulador do sistema imune por infecções pelos mais diversos patógenos. A idéia de que bactérias, helmintos e tantos outros agentes tão bem adaptados à vida parasitária poderiam, de alguma forma, modular os efeitos que nosso sistema imune exerce e, assim, controlar o aparecimento de diversas doenças, em especial as alergias e males autoimunes, é a meu ver uma afronta ao nosso senso comum. O que haveria de ser mais natural seria o tão consolidado conceito ecológico de que o parasitismo apenas gera benefício àquele que o pratica, ou seja, que realiza o ato de parasitar. Nada mais antitético observar que tal relação ecológica poderia, um dia, gerar benefícios a ambas as partes envolvidas. Mas, como já diria Rubem Alves em seu famoso ensaio “Filosofia da Ciência”, a aprendizagem da ciência só se dá pelo desenvolvimento progressivo do senso comum. É justamente a partir desses pensamentos que tentarei relacionar os resultados obtidos nesse protocolo experimental, partindo das idéias de senso comum até as postulações da Hipótese da Higiene ou Hipótese dos “velhos amigos”. Na realidade irei aqui expor a minha singela interpretação, pois, como diria Nietzsche: “Contra o positivismo, que pára perante os fenômenos e diz: „Há apenas fatos”, eu digo: „Ao contrário, fatos é o que não há; há apenas interpretações””.

6.2 Análise dos Resultados

No presente trabalho foi avaliado o efeito de múltiplas infecções com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento da encefalite autoimune experimental (EAE). Tal investigação baseou-se na premissa da Hipótese da Higiene. Em estudos anteriores de nosso grupo, já foi avaliado o efeito de uma única infecção por esse helminto no desenvolvimento

dessa patologia (Chiuso-Minicucci *et al.*, 2009). Nossa hipótese de trabalho partiu do pressuposto que com múltiplas infecções um possível efeito modulador seria potencializado graças ao contato contínuo e persistente do parasita com o sistema imune. O verme utilizado era, a princípio um bom modelo, pois é parasita natural de roedores. Além disso, ele pertence ao mesmo gênero do *Strongyloides stercoralis*, que é parasita natural de seres humanos. Seguindo esse raciocínio, uma vez constatado um efeito modulador de *S. venezuelensis* sobre a EAE induzida em roedores, poderia se fazer uma extrapolação para um possível efeito regulador de doenças imunomediadas que acometem o homem.

Como descrito na seção Resultados, as larvas infectantes efetivamente se estabeleceram nos ratos, o que foi confirmado pela presença de ovos nas fezes desses animais. A metodologia utilizada para a quantificação desses ovos nas fezes foi a determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG). A contagem máxima de OPG se deu no 7º dia após a primeira infecção. A contínua queda da quantidade desses ovos nas fezes ao longo das semanas após as várias infecções experimentais já era previsível visto que ratos tem a capacidade de montar uma resposta imune capaz de expulsar os parasitas. Esse fato é evidenciado em vários trabalhos (Silveira *et al.*, 2002; Korenaga *et al.*, 1991; Takamura, 1995)). No 34º dia após a primeira infecção, não foram mais detectados ovos nas fezes dos animais infectados.

Os resultados referentes à produção de anticorpos específicos sugerem um padrão de resposta predominantemente Th2, pois anticorpos deste isotipo são sintetizados em decorrência de produção de IL-4. Esses achados são similares a estudos prévios realizados por nosso grupo (Chiuso-Minicucci *et al.*, 2009). Sendo assim, esperávamos encontrar algum efeito protetor, uma vez que a EAE é uma doença de padrão tipicamente Th1 (Becher *et al.*, 2002).

Todavia, a análise de diversos parâmetros (peso, escore clínico e análise histopatológica do SNC) não indicou efeito protetor contra essa patologia. Além dessa não interferência das múltiplas infecções no desenvolvimento da EAE, as dosagens de algumas citocinas não apontaram diferenças significativas entre o grupo EAE e o grupo *S. venezuelensis*/EAE. Por exemplo, quando comparamos as dosagens de IFN- γ , produzido por células esplênicas estimuladas com mielina, entre o grupo apenas com EAE e o grupo previamente infectado e induzido com a doença, não constatamos diferenças relevantes. Resultado similar foi observado quando analisamos as concentrações dessa citocina produzida em culturas de linfonodos, nas mesmas condições. Essa similaridade entre os dois grupos tornou-se ainda mais perceptível quando alteramos o estímulo em culturas contendo o mesmo

material celular. Sob estímulo de Con A, houve apenas diferença significativa na produção de IFN- γ por células esplênicas *in vitro*, entre os grupos imunizados com mielina e o controle. Já entre os dois grupos principais não houve diferença novamente. As dosagens de IL-10 indicaram um padrão similar ao do IFN- γ . Não houve diferença significativa entre os grupos tratados, apenas quando estes foram comparados ao grupo controle. A alteração do estímulo utilizado (mielina ou Con A) também não alterou significativamente o perfil de produção de IL-10. A presença de níveis similares de IL-10 nos grupos EAE e *S. venezuelensis*/ EAE foi, a princípio, não esperada pois tem sido experimentalmente demonstrado que os helmintos são capazes de induzir diferenciação de células T reguladoras capazes de produzir IL-10 (Hesse *et al.*, 2004).

No entanto, encontramos diferenças significativas no que se refere às dosagens de TNF- α . Nas culturas de células esplênicas estimuladas com Con A, animais previamente infectados e estimulados *in vitro* com mielina produziram níveis significativamente mais baixos dessa citocina em relação ao grupo apenas imunizado e ao controle. Isso pode ter ocorrido devido à presença do helminto. A infecção pelo parasita pode ter direcionado a resposta nos hospedeiros para um padrão Th2 mais acentuado, levando a uma regulação negativa de TNF- α , a qual é uma citocina típica de padrão Th1 de resposta (Shibuya *et al.*, 1998).

No seu conjunto, os resultados obtidos indicam que nenhum efeito modulador expressivo foi encontrado nas condições nas quais foi realizado este experimento. Contextualizando-se a Hipótese da Higiene nessa realidade, algumas hipóteses podem ser levantadas a fim de explicar essa ausência aparentemente total de proteção. Algumas destas possibilidades giram em torno do modelo escolhido, a começar pela doença e animais utilizados. Em ratos Lewis, ocorre recuperação espontânea dessa doença. A mesma se caracteriza por ser aguda seguindo-se estabelecimento de resistência mediada pela indução de células T reguladoras (O'Connor e Anderton, 2008). Outros modelos talvez sejam mais adequados a esse estudo, como por exemplo, a utilização de EAE induzida em camundongos C57BL/6 por inoculação de MOG, uma vez que esta doença é caracterizada por ser crônica, recidivante e mimetizar melhor a Esclerose Múltipla em humanos (Gold *et al.*, 2006). Somando-se a esse fator temos ainda a utilização do *S. venezuelensis* como agente modulador do sistema imune. Estudos recentes têm apontado que ratos adquirem uma imunidade protetora eficiente contra esse parasita após um contato inicial resultando numa rápida expulsão dos vermes em infecções posteriores e na diminuição da contagem de ovos nas fezes

(Baek *et al.*, 2003). Isso explicaria os resultados obtidos pois observamos que mesmo re-infectando os animais com o parasita, houve uma contínua queda na contagem do OPG nas fezes até a eliminação total. Talvez, devido a essa expulsão do parasita, não tenha havido uma modulação imune eficiente e significativa que pudesse gerar alguma proteção contra a EAE.

Na literatura, vários são os trabalhos que alertam para o efeito imunomodulador das infecções por helmintos. Apesar disso, esse efeito parece depender de uma série de fatores como, por exemplo, cronicidade, intensidade e cinética das infecções (Smits *et al.*, 2007). Além disso, a imunomodulação por helmintos parece apresentar uma determinada especificidade local. Neste sentido tem sido observado que este tipo de infecção pode proteger contra inflamação alérgica das vias respiratórias, mas não contra dermatite atópica (Hartmann *et al.*, 2009).

A pesquisa nessa área, relacionando efeitos moduladores de parasitas frente a diversas moléstias, se mostra extremamente promissora. Apesar de ainda incipiente e com muitos pontos para esclarecer, a mesma representa uma grande esperança de estratégias terapêuticas adicionais para o futuro. Talvez chegue o dia em que tomaremos comprimidos contendo extratos de seres que sempre julgamos, nessa nossa visão antropocêntrica, como inferiores e maléficos à nossa tão preciosa vida salutar. Falta, talvez, a nós, seres tão especiais, um olhar mais atento das relações naturais de forma que possamos compreender aquilo que, muitas vezes, ocorre dentro de nós mesmos. Pois como já diria Victor Hugo: “É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve”.

7. Referências Bibliográficas

ALVES, R. *Filosofia da Ciência: Introdução ao jogo e suas regras*. Editora Brasiliense. São Paulo. 1981. 190 p.

AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA-SIQUEIRA, T.C.G. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.273-278, 2002.

ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 Cells and Autoimmune Encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergology International*, v.57, p.115-120, 2008.

BAEK, B.K.; ISLAM, M.K.; KIM, B.S.; LIM, C.W.; HUR, J.; OLUOCH, A.O.; KIM, C.H.; KAKOMA, I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Veterinary Parasitology*, v.113, p.217–227, 2003.

BECHER, B.; DURELL, B.G.; NOELLE, R.J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.*, v.110, p.493–497, 2002.

BUFFORD, J.D.; GERN, J.E. The Hygiene Hypothesis Revisited. *Immunol. Allerg. Clin. N. Am.*, v.25, p.247– 262, 2005.

CHIUSO-MINICUCCI, F.; MARRA, N.M.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.G.; FRANÇA, T.G.D.; ISHIKAWA, L.L.W.; AMARANTE, M.R.V.; *et al.* Recovery from *Strongyloides venezuelensis* infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response. *Parasite Immunol*, 2009 (aceito para publicação).

COMPSTON, A. The basis for treatment in multiple sclerosis. *Acta. Neurol. Scand. Suppl.*, v.183, p.41-47, 2006.

- COMPSTON, A. The pathogenesis and basis for treatment in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v.106, p.246–248, 2004.
- CONLON, P.; OKSENBERG, J.R.; ZHANG, J.; STEINMAN, L. The Immunobiology of Multiple Sclerosis: An Autoimmune Disease of the Central Nervous System. *Neurobiology of Disease*, v.6, p.149–166, 1999.
- DE VEER, M.J.; KEMP, J.M.; MEEUSEN, E.N.T. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunol.*, v.29, p.1-9, 2007.
- DYMENT, D.A.; EBERS, G.C.; SADOVNICK, A.D. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.*, v.3, p.104-110, 2004.
- FALLON, P.G.; ALCAMI A. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends Immunol.*, v.27, p.470-476, 2006.
- FLEMING, J., FABRY, Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, v.61, p.85-89, 2007.
- GAUSE, W.C. ; URBAN, J.F. Jr.; STADECKER, M.J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol.*, v.24, p.269-277, 2003.
- GOLD R.; LININGTON C.; LASSMANN, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, v.129, p.1953-71, 2006.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Council. Sci. Ind. Res.*, v.12, p.50-52, 1939.
- HARTMANN, S.; SCHNOELLER, C.; DAHTEN, A.; AVAGYAN, A.; RAUSCH, S.; LENDNER, M.; *et al.* Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*, v.39, p.1585–96, 2009.

HELMBY, H.; BICKLE, Q. Immune modulation by helminth infections. *Parasite Immunol.*, v.28, p.479-481, 2006.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C.A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A.W.; SHEVACH, E.M.; WYNN, T.A. The Pathogenesis of Schistosomiasis is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and regulatory T Cells. *J. Immunol.*, v.172, p.3157-3166, 2004.

IMITOLA, J.; TANUJA, C.; KHOURY, S. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology & Therapeutics*, v.106, p.136-177, 2005.

KEISER, P.B.; NUTMAN, T.B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clin. Microbiol. Reviews*, v.17, p.208–217, 2004.

KITAGAKI, K.; BUSINGA, T.R.; RACILIA, D.; ELLIOT, D.E.; WEINSTOCK, J.V.; KLINE, J.N. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J. Immunol.*, v.177, p.1628-1635, 2006.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, K.; TADA, I. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology*, v.72, p.502-507, 1991.

LA FLAMME, A.C.; RUDDENKLAU, K.; BACKSTROM, B.T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect. Immun.*, v.71, p.4996-5004, 2003.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune Responses in Hookworm Infections. *Cli. Microbiol. Rev.*, v.14, p.689–703, 2001.

LUCCHINETTI, C.; BRUCK, W.; PARISI, J.; SCHEITHAUER, B.; RODRIGUES, M.; LASSMANN, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.*, v.47, p.707-717, 2000.

MATSUDA, K.; KIM, B.S.; WHANG, I.S.; LIM, C.W.; BAEK, B.K. Migration of *Strongyloides venezuelensis* in rats after oral inoculation of free- living infective larvae. *J. Vet. Med. Sci.*, v.65, p.971-975, 2003.

NAKAI, E.S.; AMARANTE, A.F.T. Experimental Infection in mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*) by *Stroglyoides venezuelensis*. *Brazil J. Vet. Parasitol.*, v.10, p.1-6, 2001.

NAMER, I.J.; STEIBEL, J.; KLINGUER, C.; TRIFILIEFF, E.; MOHR, M.; POULET, P. Magnetic resonance imaging of PLP-induced experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.*, v.92, p.22-28, 1998.

NEGRÃO-CORRÊA, D., SOUZA, D.G.; PINHO, V.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, A.L.S.; TEIXEIRA, M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* infected mice. *Infect. Immun.*, v.72, p.1135-1142, 2004.

NEVA, F.A. Biology and Immunology of Human Strongyloidiasis. *J. Infect. Diseas.*, v.153, p.397-406, 1986.

NIBORSKI, V.; VALLÉE, I.; FONSECA-LIÑÁN, R.; BOIREAU, P.; ENCISO, A.; ORTEGA-PIERRES, G.; YÉPEZ- MULIA, L. *Trichinella spiralis*: Stimulation of mast cells by TSL-1 antigens trigger cytokine mRNA expression and release of IL-4 and TNF through an Ig-independent pathway. *Experimental Parasitology*, v.108, p.101–108, 2004.

O'CONNOR R.A.; ANDERTON S.M. Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J. Neuroimmunol.*, v.193, p.1-11, 2008.

RANDOLPH, D.A.; FATHMAN, C.G. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu. Rev. Med.*, v.57, p.381-402, 2006.

- ROMAGNANI, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*, v.112, p.352–363, 2004.
- ROOK, G.A.W.; ADAMS, V.; HUNT, J.; PALMER, R.; MARTINELLI, R.; BRUNET, L.R. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin. Immunol.*, v.25, p.237-255, 2004.
- ROOK, G.A.W.; BRUNET, L.R. Old friends for breakfast. *Clin. Exp. Allergy*, v.35, p.841–842, 2005.
- ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The Eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.*, v.24, p.147–174, 2006.
- SEWELL, D.; QING, Z.; REINKE, E.; ELLIOT D.; WEINSTOCK, J.; SARDOR, M.; FABRY, Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int. Immunol.*, v.15, p.59-69, 2003.
- SHIBUYA, K.; ROBINSON, D.; ZONIN, F.; HARTLEY, S.B.; MACATONIA, S.E.; SOMOZA, C.; HUNTER, C.A.; MURPHY, K.M.; O'GARRA, A. IL-1 α and TNF- α are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN- γ in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J. Immunol.* v.160, p.1708-1716, 1998.
- SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin. Infect. Dis.*, v.33, p.1040-1047, 2001.
- SILVEIRA, M.R.; NUNES, K.P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORREA, A. JR; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORREA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect. Immunol.*, v.70, p.6263-6272, 2002.
- SMITS, H.H.; HAMMAD H.; VAN NIMWEGEN, M.; SOULLIE, T.; WILLART, M.A.; LIEVERS, E.; *et al.* Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway

inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.120, p.932-40, 2007.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* v.23, p.683–747, 2005.

STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Medj.*, v.299, p.1259-1260, 1989.

SWANBORG, R.H.. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.77, p.4-13, 1995.

TAKAMURE, A. Migration Route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *Int. J. Parasitol.*, v.25, p. 907-911, 1995.

TRAPP, B.D.; PETERSON, J.; RANSOHOFF, R.M.; RUDICK, R.; MÖRK, R.; BÖ, L. Axonal transection in the lesions of Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, v.338, p278-285, 1998.

WILSON, M.S.; MAIZELS. R.M. Regulation of Allergy and Autoimmunity in Helminth Infection. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, v.26, p.35-50, 2004.

WINGERCHUK, D.M.; LUCCHINETTI, C.F.; NOSEWORTHY, J.H. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab. Invest.*, v.81, p.263–281, 2001.

YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P.G.; VAN REE, R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science*, v.296, p.490-494, 2002.

YAZDANBAKHSI, M.; MATRICARDI, P.M. Parasites and the Hygiene Hypothesis. Regulating the Immune System? *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, v.04, p.15–24, 2004.

ZAMVIL, S.S.; STEINMAN, L. The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.*, v.8, p.579-621, 1990.

ZORZELLA, S.F.G.; SEGER, J.; MARTINS, D.R.; PELIZON, A.C.; SARTORI, A.
Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis development in Lewis rats from
conventional animal facility. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102, p.931-936, 2007.