

HIPERPLASIA E MORTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSE)
DE MASTÓCITOS DE MUCOSA (MMC) NO INTESTINO DELGADO
DE RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM

Hymenolepis diminuta

WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia - Câmpus de Ilha Solteira, da
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho", como parte das
exigências para participar do Concurso
Público de Títulos e Provas para obtenção
do Título de Livre Docente.

ILHA SOLTEIRA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 2001

1210001360



360



**HIPERPLASIA E MORTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSE)
DE MASTÓCITOS DE MUCOSA (MMC) NO INTESTINO
DELGADO DE RATOS EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS COM *Hymenolepis diminuta***

WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia do Câmpus de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte das exigências para participar do Concurso Público de Títulos e Provas para obtenção do Título de Livre Docente.

Proc. 053/2003 - NPD 025/03

UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"	
SERVIÇO TÊC. DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE CHEGADA	DATA DE TOMBO
26.02.03	31.03.03
PL	TÍTULO
Ailza	Te. 1360
AQUISIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Ilhaçõ Ant 28.10.00	B992h

1210001360



Co Sys - 185668
Sys 54737

ILHA SOLTEIRA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 2001

BCpIS - FEIS - UNESP

AGRADECIMENTOS

Dedico

Ao meu esposo Salatiér pelo amor,
carinho e estímulo e aos meus filhos Bruno e Ariel
por serem a razão da minha vida.

Ao Departamento "Comparative Biochemistry of the University of Wisconsin-Madison", Estados Unidos pela oportunidade de realização deste treinamento.

Ao Departamento de Biologia e Zootecnia e pela UNESP pelas providências tomadas viabilizando a realização deste Concurso de Livre Docência.

A professora Dra. Maria Conceição Zecoller pela amizade sincera e por ter contribuído substancialmente a disciplina de Zoologia durante meu afastamento integral.

Ao Dr. Murray Clayton pelas análises estatísticas.

A FAPESP pelo concessão da Bolsa de Pós-Doutorado.

***"I have touched a star
of unmatched brilliance shining.***

Ao Instituto Nacional de Saúde ("National Institute
of Health") pela ajuda no desenvolvimento deste projeto.

***I have touched that star before
and I will touch it again.***

***I have been blessed for I have touched the
unreachable".***

A Zeneide Ribeiro Campos, Auxiliar Acadêmica do Departamento de Zoologia, pela ajuda na configuração deste trabalho.

F. Krull

A todos que direta e indiretamente participaram na execução deste trabalho e na viabilização deste Concurso de Livre Docência.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. John Adams Oaks pela oportunidade de realização deste trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos, pelo apoio, paciência e amizade durante minha permanência nos Estados Unidos.

Ao Departamento “Comparative Biosciences of the University of Wisconsin-Madison”, Estados Unidos pela oportunidade de realização deste treinamento.

Ao Departamento de Biologia e Zootecnia e pela UNESP pelas providências tomadas viabilizando a realização deste Concurso de Livre Docência.

À professora Dra. Maria Conceição Zocoller pela amizade sincera e por ter contribuído ministrando a disciplina de Zoologia durante meu afastamento integral.

Ao Dr. Murray Clayton pelas análises estatísticas.

À FAPESP pela concessão da Bolsa de Pós Doutorado.

Ao Instituto Nacional da Saúde (“National Institute of Health”) por ter financiado parte deste projeto.

À Zeneide Ribeiro Campos, Auxiliar Acadêmica do Departamento de Biologia e Zootecnia pela ajuda na configuração deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente participaram na execução deste trabalho e na viabilização deste Concurso de Livre Docência.



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1. <i>Hymenolepis diminuta</i>	03
2.2. Imunofisiologia da mucosa intestinal e sua relação com o parasitismo	04
2.3. Mastócitos.....	08
2.3.1. Características morfológicas, fisiológicas, histoquímicas, desenvolvimento, proliferação e papel no parasitismo.....	08
2.3.2. Apoptose	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Infecção experimental dos animais com <i>H. diminuta</i> e local	18
3.1.1. Manutenção de cisticercóides em besouros.....	18
3.1.2. Infecção dos animais	18
3.2. Tratamento das amostras de tecidos.....	18
3.3. Coloração histoquímica dos mastócitos.....	19
3.4. Coloração imunohistoquímica de mastócitos de mucosa (MMC) pelo RMCP II... ..	19
3.5. Quantificação de mastócitos na fase S do ciclo celular pela coloração imunohistoquímica de MMC pelo anti-BrdU	20
3.5.1. Determinação do período ideal para marcação de MMC pelo BrdU (experimento preliminar)	20
3.5.2. Quantificação de MMC em divisão celular na mucosa intestinal de ratos infectados com <i>H. diminuta</i>	21
3.6. Estudo de MMC em processo de apoptose	22
3.6.1. Grupo experimental	22
3.6.2. Identificação e quantificação de MMC em apoptose.....	22
3.6.3. Análise morfométrica	23

3.7. Análise estatística	23
4. RESULTADOS	25
4.1. Especificidade do azul de Astra para identificar MMC	25
4.2. Estudo de MMC em divisão celular (fase S do ciclo celular) pelo BrdU	26
4.2.1. Determinação do tempo ideal para marcação e detecção de MMC em divisão celular	26
4.2.2. Identificação e quantificação de MMC total e de MMC BrdU+	29
4.3. MMC em processo de apoptose.....	33
4.4. Morfometria das camadas do íleo.....	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

após a injeção de BrdU

TABELA 4: Número médio de MMC total e de MMC em apoptose (APO) nas
camadas do íleo de ratos não infectados (C), infectados com
Hymenolepis diminuta nos 32 DAI (I) e nos (T1), dos (T2), nos (T3)
e quatro (T4) semanas após o tratamento de ratos infectados nos 32
DAI com piraziquantel

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Número total de MMC/UVC e MMC BrdU+/UVC no duodeno e no íleo de ratos não infectados	26
TABELA 2: Número médio de MMC total e de MMC BrdU+ em ratos infectados com <i>Hymenolepis diminuta</i> e em ratos não infectados no duodeno e no íleo 72 horas após a injeção de BrdU (n = 3 animais).....	31
TABELA 3: Número médio de MMC total e de MMC BrdU+ no duodeno e no íleo de ratos infectados com <i>Hymenolepis diminuta</i> aos 32 DAI, uma hora após a injeção de BrdU	32
TABELA 4: Número médio de MMC total e de MMC em apoptose (APO) nas camadas do íleo de ratos não infectados (C), infectados com <i>Hymenolepis diminuta</i> aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento de ratos infectados aos 32 DAI, com praziquantel.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1:** Fotomicrografia da região do íleo (vilo) mostrando a coloração dupla e em sequência (setas) pelo azul de Astra, específica para MMC (coloração dos grânulos citoplasmáticos em azul) e pela imunohistoquímica através do anticorpo anti-RMCP II, específico para protease de MMC de ratos (coloração imunoenzimática em marrom). Os demais núcleos encontram corados em róseo pelo “Nuclear Fast Red” 25
- FIGURA 2:** Número médio de MMC total/UVC e de MMC BrdU+/UVC no duodeno de ratos não infectados ($n = 3$) em diferentes horas após a injeção de BrdU. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade 27
- FIGURA 3:** Número médio de MMC total /UVC e de MMC BrdU+/UVC no íleo de ratos não infectados ($n = 3$) em diferentes horas após a injeção de BrdU. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 27
- FIGURA 4:** Número médio de MMC BrdU+ na submucosa (SM), na cripta (C), no vilo (V) e no UVC tanto do duodeno (D) como do íleo (I) de ratos não infectados (controle). $N = 3$. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a nível de 5% de probabilidade 28
- FIGURA 5:** Número médio de MMC total /UVC e de MMC BrdU+/UVC no duodeno, 72 horas após a injeção de BrdU em ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 6, 15 e 32 DAI e não infectados (0 DAI). $N = 3$. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 30
- FIGURA 6:** Número médio de MMC total /UVC e de MMC BrdU+/UVC no íleo, 72 horas após a injeção de BrdU em ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 6, 15 e 32 DAI e não infectados (0 DAI). $N = 3$. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade 30
- FIGURA 7:** Fotomicrografia da região do vilo e da cripta do íleo mostrando um MMC em divisão celular (seta vermelha) corado pelo azul de Astra (grânulos citoplasmáticos em azul) e pelo anti-BrdU (núcleo corado em marrom). BrdU foi injetado em um rato infectado com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI e sacrificado uma hora após. Observa-se também os enterócitos da camada epitelial da cripta em divisão celular (setas pretas). Os demais núcleos estão corados em vermelho pelo “Nuclear Fast Red”. Há também alguns MMCs BrdU- 32

FIGURA 8: Número médio de MMC total na camadas do íleo dos ratos não infectados (C), infectados aos 32 DAI com *Hymenolepis diminuta* (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento dos ratos aos 32 DAI, com praziquantel. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 35

FIGURA 9: Número médio de MMC em apoptose na camadas do íleo dos ratos não infectados (C), infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento dos ratos aos 32 DAI, com praziquantel. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 35

FIGURA 10: Número médio de MMC total e de MMC apoptótico e percentagens de MMC apoptótico em cada UVC do íleo de ratos não infectados (C), infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento dos ratos aos 32 DAI, com praziquantel. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 36

FIGURA 11: Fotomicrografia da lâmina própria (vilo) do íleo mostrando: um MMC apoptótico (seta azul) demonstrado pela técnica TUNEL (núcleo na cor marrom) e pela coloração histoquímica pelo azul de Astra (grânulos citoplasmáticos na cor azul) e outros MMCs não apoptóticos (setas pretas) corados apenas pelo azul de Astra. Nota-se que algumas células também encontram-se em apoptose (núcleos marrons e setas vermelhas). Demais núcleos encontram-se corados pelo “Nuclear Fast Red”..... 38

FIGURA 12a-d: Demonstração de MMC em apoptose. As secções teciduais destas figuras são da mucosa do íleo (vilo) colhidas aos 32 DAI da infecção por *Hymenolepis diminuta* 39

FIGURA 13: Alterações morfométricas nas camadas do íleo de ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* antes e após a remoção do parasita pelo praziquantel 40

FIGURA 14: Dimensões das camadas do íleo realizadas antes e após a remoção de *Hymenolepis diminuta* pelo praziquantel nos ratos não infectados (C), infectados aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade..... 41

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetilcolina (**Ach**);
Apoptose (**APO**);
Benzildimetiltetradecilamonio (**BAC**);
Bromodesoxiuridine (**BrdU**);
Complexo de avidina – biotina (**ABC**);
Desoxirribonucleotídeo citidina trifosfato (**dCTP**);
Desoxinucleotidil terminal transferase (**TdT**);
Desoxirribonucleotídeo uridine trifosfato (**dUTP**);
Dias após a infecção (**DAI**);
Fator de atração de plaquetas (**TAF**);
Fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos/macrófagos (**GM-CSF**);
Fator estimulador da célula tronco (“stem cell factor”) (**SCF**);
Fator de necrose tumoral (**TNF**);
Fator transformador do crescimento (**TGF**);
Glicosaminoglicana (**GAG**);
5-Hidroxotriptamina (**5-HT**);
Imunoglobulina A, G, E e M (**IgA, IgG, IgE e IgM**);
Interferon (**IFN**);
Interleucina (**IL**);
Linfócito T “helper 1”(**Th1**);
Linfócito T “helper 2”(**Th2**);
Mastócito de mucosa (**MMC**);
Mastócito de tecido conjuntivo (**CTMC**);
Óxido nítrico (**NO**);
Peptídeo vasoativo intestinal (**VIP**);
Praziquantel (**PZQ**);
Prostaglandina (**PGE**);
Protease de mastócitos de rato I e II (**RMCP I e II**);
1 a 4 semanas após o tratamento (**T1, T2, T3 e T4**);
Substância P (**SP**);



Salina tamponada de fosfato (PBS);

“TdT-mediated dUTP nick end labeling” (TUNEL);

Unidade formadora de colônia (CFU);

Unidade de vilo-crípta (UVC).

RESUMO

O helminto adulto *Hymenolepis diminuta* é um parasita não invasor da mucosa intestinal, mas é capaz de causar em ratos hiperplasia de mastócitos de mucosa (MMC), alterações da motilidade intestinal e de promover a hiperplasia e a hipertrofia da musculatura lisa intestinal. A dinâmica de aumento populacional e da resolução da hiperplasia de MMC foi estudada utilizando-se ratos Sprague-Dawley experimentalmente infectados com *H. diminuta*. Para o estudo da hiperplasia de MMC utilizou-se, como marcador de núcleos de MMC em divisão celular, o nucleossídeo modificado bromodesoxiuridina (BrdU). O intervalo entre a injeção de BrdU e o aparecimento dos núcleos marcados (em divisão celular) de MMC no intestino delgado foi determinado colhendo-se amostras de tecidos do duodeno e do íleo de ratos controles não infectados às 0, 1, 24, 48 e 72 horas após a injeção de BrdU. Para detecção de MMC em divisão celular, utilizou-se a técnica histoquímica pelo azul de Astra e a técnica imunohistoquímica pelo anti-BrdU para a coloração simultânea de grânulos citoplasmáticos e de núcleos de MMC, respectivamente. Nos animais controles, os MMCs positivos (MMC⁺BrdU⁺) não foram detectados à uma hora, mas, 1,3% e 0,1% às 24; 3,8% e 3,9% às 48 e 4,2% e 4,1% às 72 horas, após a injeção de BrdU, foram detectados no duodeno e no íleo, respectivamente. A falta de MMC marcados à uma hora indicou a falta de precursoras de MMC migratórias ou de MMC residentes capazes de entrar em divisão e diferenciarem-se no intestino normal de ratos não infectados. O aumento de MMCs BrdU⁺ presentes entre 24 e 72 horas indicou o tempo de trânsito necessário para MMCs da medula óssea ou do sangue alcançarem o intestino. Já os ratos infectados entre o 6^o e o 15^o DAI e que receberam duas doses de BrdU 72 horas antes de serem necropsiados não mostraram diferenças significativas em relação aos não infectados. Entretanto, aqueles infectados aos 32 DAI apresentaram as taxas de MMC⁺BrdU⁺ de 11,5% no duodeno e de 14,0% no íleo. Quando BrdU foi injetado nos animais infectados aos 32 DAI, com uma única dose, uma hora antes dos tecidos intestinais serem colhidos, a porcentagem de núcleos de MMC BrdU⁺ foi de 0,8% e 0,6% no duodeno e no íleo, respectivamente. Com estes dados chegou-se à conclusão

HIPERPLASIA E MORTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSE) DE MASTÓCITOS DE MUCOSA (MMC) NO INTESTINO DELGADO DE RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Hymenolepis diminuta*

RESUMO

O helminto adulto *Hymenolepis diminuta* é um parasita não invasor da mucosa intestinal, mas é capaz de causar em ratos hiperplasia de mastócitos de mucosa (MMC), alterações da motilidade intestinal e de promover a hiperplasia e a hipertrofia da musculatura lisa intestinal. A dinâmica do aumento populacional e da resolução da hiperplasia de MMC foi estudada utilizando-se ratos Sprague-Dawley experimentalmente infectados com *H. diminuta*. Para o estudo da hiperplasia de MMC utilizou-se, como marcador de núcleos de MMC em divisão celular, o nucleosídeo modificado bromodesoxiuridine (BrdU). O intervalo entre a injeção de BrdU e o aparecimento dos núcleos marcados (em divisão celular) de MMC no intestino delgado foi determinado colhendo-se amostras de tecidos do duodeno e do íleo de ratos controles não infectados à(s) 0, 1, 24, 48 e 72 horas após a injeção de BrdU. Para detecção de MMC em divisão celular, utilizou-se a técnica histoquímica pelo azul de Astra e a técnica imunohistoquímica pelo anti-BrdU para a coloração simultânea de grânulos citoplasmáticos e de núcleos de MMC, respectivamente. Nos animais controles, os MMCs positivos (MMCs BrdU+) não foram detectados à uma hora, mas, 1,3% e 0,4% às 24; 3,8% e 3,9% às 48 e 4,2% e 4,1% às 72 horas, após a injeção de BrdU, foram detectados no duodeno e no íleo, respectivamente. A falta de MMC marcados à uma hora indicou a falta de precursores de MMC migratórios ou de MMC residentes capazes de entrarem em divisão e diferenciarem-se no intestino normal de ratos não infectados. O aumento de MMCs BrdU+ presentes entre 24 e 72 horas indicou o tempo de trânsito necessário para MMCs da medula óssea ou do sangue alcançarem o intestino. Já os ratos infectados entre o 6º e o 15º DAI e que receberam duas doses de BrdU 72 horas antes de serem necropsiados não mostraram diferenças significativas em relação aos não infectados. Entretanto, aqueles infectados aos 32 DAI apresentaram as taxas de MMC BrdU+ de 11,5% no duodeno e de 14,0% no íleo. Quando BrdU foi injetado nos animais infectados aos 32 DAI, com uma única dose, uma hora antes dos tecidos intestinais serem colhidos, a percentagem de núcleos de MMC BrdU+ foi de 0,8% e 0,6% no duodeno e no íleo, respectivamente. Com estes dados chegou-se à conclusão

de que a hiperplasia de mastócitos ocorrida aos 32 DAI pode não somente ser em decorrência da migração de precursores de mastócitos da medula óssea ou da corrente sangüínea (72 horas), mas também da proliferação de mastócitos maduros oriundos do intestino ou de suas proximidades (uma hora). O estudo da resolução da hiperplasia de mastócitos induzida pelo cestódeo e das alterações morfométricas da parede intestinal foi realizado após a remoção do parasita dos animais pelo tratamento com o anti-helmíntico praziquantel (PZQ). Este experimento foi conduzido utilizando-se a técnica histoquímica para identificação de MMC pelo azul de Astra e a técnica modificada TUNEL (“TdT-mediated dUTP nick end labeling”) de marcação *in situ* de DNA fragmentado para identificação de MMC em apoptose. Os tecidos do íleo de ratos infectados aos 32 DAI com *H. diminuta* foram colhidos a uma, duas, três e quatro semanas após o tratamento com PZQ. Os grupos controles foram os ratos não infectados ou os infectados com *H. diminuta* aos 32 DAI, mas não tratados com PZQ. Desta forma, observou-se que as alterações da população de MMC foram correlacionadas com as alterações funcionais e morfológicas do intestino após a remoção dos parasitas adultos. Observou-se um declínio na contagem de MMC na mucosa e na submucosa após a remoção do parasita, onde os números de MMCs aproximaram-se inicialmente aos níveis do grupo controle não infectado quatro semanas após o tratamento. Da mesma forma, o número de MMC em apoptose foi máximo nos animais infectados (32 DAI) e na segunda semana após a remoção do parasita, mas simultaneamente ao declínio de MMC, MMC apoptótico também declinou, havendo portanto, uma correlação positiva. Além disso, as camadas da musculatura lisa intestinal hipertrofiadas pela infecção e as estruturas da mucosa começaram a atrofiar neste mesmo período. MMCs em apoptose não foram visualizados na submucosa e nem na muscularis externa. Assim, concluiu-se que *H. diminuta* provoca hiperplasia de MMC e espessamento da mucosa e da muscularis externa e estas alterações começam a declinar e retornar aos valores normais três semanas após a retirada do parasita, sugerindo que, apoptose pode ter um grande papel na involução da hiperplasia de MMC induzida pelo cestódeo.

Palavras-chave: *Hymenolepis diminuta*, mastócitos, TUNEL, BrdU, apoptose, motilidade intestinal.

HYPERPLASIA AND PROGRAMMED CELLULAR DEATH (APOPTOSIS) OF MUCOSAL MAST CELL (MMC) IN THE SMALL INTESTINE OF EXPERIMENTALLY INFECTED RATS WITH *Hymenolepis diminuta*

SUMMARY

The non-invasive adult tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, is associated with mucosal mast cell (MMC) hyperplasia, alterations of intestinal motility and smooth muscle cell hypertrophy and hyperplasia in its rat host. The dynamics of MMC population and the resolution of MMC hyperplasia after chemical removal of the tapeworm was studied in Sprague-Dawley rat experimentally infected with *H. diminuta*. The dynamic of MMC hyperplasia was studied using double staining: chemical staining by Astra blue for identification of cytoplasmatic granules of MMC and nuclear immune staining by anti-BrdU for identification of MMC in cellular division. The interval between nuclear labeling by BrdU injections and the appearance of labeled, fully differentiated MMC in the intestine was assessed by collecting samples of duodenum (D) and ileum (I) from uninfected control rats at 0, 1, 24, 48 and 72 hours after BrdU injection and determining the ratio of MMC with BRDU+ nuclei vs total MMC per crypt-villus-unit (CVU). Labeling was not detectable at 1 hour, but was 1.3% (D) and 0.4% (I) at 24 hours; 3.8% (D) and 3.9% (I) at 48 hours, and 4.2% (D) and 4.1% (I) at 72 hours. The lack of labeled MMC at 0 and 1 hr indicate the lack of MMC precursors capable of division and subsequent differentiation in normal intestine. The increase of BrdU + MMC present between 24 and 48 hours is indicative of the bone marrow stem cell division and blood transit time required to reach the intestine. Rats infected 6 and 15 days post infection (dpi) and injected with BrdU 72 hours before tissue collection showed no difference from those uninfected rats. However, rats infected 32 dpi and injected with BrdU 72 hours before tissue collection had MMC ratios of 11.5% (D) and 14.0% (I). If the BrdU was injected only 1 hr before tissue collection at 32 dpi, the ratio of labeled MMC nuclei was 0.8 and 0.6% (D and I, respectively). These data suggest that the majority of the increased numbers of MMC appearing in the intestine at 32 dpi are from the bone marrow or blood stream (72 hours), but those labeled after only 1 hour originate in or near the intestine. The dynamics of the resolution of both tapeworm-induced MMC hyperplasia and tissue changes during the period following removal of the tapeworm with praziquantel (PZQ) was assessed

by chemical identification of MMC by Astra blue and morphometric techniques. As a possible mechanism of MMC population regulation, MMC apoptosis was examined over the same experimental period using an *in situ* nick end labeling of fragmented DNA (TUNEL-“TdT-mediated dUTP nick end labeling”). Shifts in MMC numbers were correlated with functional and morphological changes of the intestine following removal of the adult stage tapeworm. Ileal tissues from rats infected 32 days with *H. diminuta* (the beginning of plateau phase of tapeworm-induced chronic mastocytosis) were harvested one, two, three and four weeks after the PZQ treatment. Control ilea were obtained from rats which were either never infected and never treated with PZQ or from rats infected with *H. diminuta* for 32 days but not treated with PZQ. The decline of MMC occurred in the mucosa and submucosa. MMC numbers first approached to uninfected control levels at four weeks post-treatment. Coincident with the decline in mucosal MMC numbers, the rate of MMC entering apoptosis also declined. Simultaneously, ileal smooth muscle layers, hypertrophied by infection, and mucosal structures began the process of involution and atrophy showing a positive correlation. Apoptosis of MMC in the submucosa and muscularis mucosa was not detected. In conclusion, *H. diminuta*-elicited hyperplasia of MMC and increased thickness of both mucosa and muscularis externa begin a decline toward control values after three weeks or tapeworm removal. These data are consistent with the lack of MMC mediation of altered motility, and the decline in the rate of MMC apoptosis at three weeks post PZQ suggest that apoptosis may play an important role in the involution of tapeworm-induced mastocytosis.

Key words: *Hymenolepis diminuta*, mast cell, TUNEL, BrdU, apoptosis, intestinal motility.

1. INTRODUÇÃO

O cestódeo adulto, *Hymenolepis diminuta*, um parasita não invasivo específico do intestino delgado de ratos, causa uma infecção crônica, não é rejeitado e é capaz de sobreviver por muito tempo no hospedeiro definitivo. Além disso, este parasita, apresenta dimensões consideráveis, reside apenas no lúmen intestinal e apresenta um ciclo migratório diurno, da região oral para a caudal, no jejuno/íleo (HOPKINS, 1970). Apesar deste parasita não ser invasivo e não penetrar na mucosa intestinal, DWINELL et al. (1994) constataram alterações nos padrões de contratibilidade intestinal em ratos cronicamente infectados com este cestódeo. Uma das alterações mioelétricas da contratibilidade intestinal compreendia a diminuição no padrão dos ciclos interdigestivos nos animais parasitados. Desta forma, DWINELL et al. (1995) observaram o trânsito alimentar diminuído e sugeriram que isto poderia facilitar as migrações diurnas, aumentar o tempo de absorção de nutrientes luminais em benefício ao parasita e prevenir a sua expulsão pelo hospedeiro. As alterações na contratibilidade intestinal, a partir do oitavo dia da infecção experimental, eram frequentemente encontradas no íleo, a região do intestino do rato onde a mastocitose da mucosa intestinal e a hipertrofia da camada muscular intestinal circular e longitudinal eram mais proeminentes (DWINELL et al. 1998). O aumento da população de mastócitos e os níveis de IgE também foram observados por FEATHERSTON & COPERMAN (1990) e FEATHERSTON et al. (1992).

No entanto, a relação dos mastócitos com as alterações morfológicas e mioelétricas ainda não é compreendida. As observações acima sugerem que a presença física do parasita e talvez a presença de sinais moleculares secretados por eles são necessários para induzir a quimiotaxia de células inflamatórias, a alteração da contratibilidade intestinal e a hipertrofia muscular. Embora nas infecções parasitárias, a população de mastócitos e a concentração de IgE aumentam, o padrão da resposta imune e inflamatória de cada infecção é diferente e desta forma sugere-se que a população de mastócitos é capaz de iniciar, ativar ou moderar sua resposta. Entretanto, não é entendido como os mastócitos podem responder de diferentes maneiras a fim de estimular vários elementos do sistema mioentérico causando mais do que um padrão de contratibilidade muscular.

Como Sprague-Dawley é uma cepa de rato considerada permissiva à infecção por *H. diminuta* e uma vez que este parasita sobrevive neste hospedeiro por vários meses, apesar da

significante mastocitose verificada em todo o período da infecção, este cestódeo foi um modelo útil para investigar os mecanismos regulatórios das funções intestinais, particularmente os mecanismos de comunicação do lúmen intestinal com a lâmina própria e o músculo liso entérico.

O presente trabalho baseou-se na hipótese de que o aumento da população inicial de mastócitos, no intestino de ratos infectados por helmintos, pode ser em decorrência não somente de precursores endógenos de mastócitos, os quais se diferenciam em células maduras na parede intestinal após estimulação por infecções parasitárias, como também devido à divisão imediata de precursores hematopoiéticos na medula óssea ou migração de mastócitos do sangue. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar se mastócitos após a diferenciação e a maturação na medula óssea sofrem migração e proliferação no intestino delgado induzidos pela infecção intestinal parasitária e da sua relação com a hipertrofia e motilidade intestinal, seja para expulsão ou para manutenção dos parasitas no hospedeiro. Além disso, objetivou-se também verificar se após a remoção química do parasita através do anti-helmíntico específico, o praziquantel, ocorreria uma involução da população de mastócitos e se esta involução estaria associada com a morte programada celular, a apoptose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Hymenolepis diminuta*

Hymenolepis diminuta é um parasita cestódeo, espécie-específico de ratos, estritamente luminal que não é rejeitado pelo hospedeiro definitivo e nem está associado com infecção clínica no intestino delgado. Dentro do lúmen do intestino delgado, este parasita migra da região proximal do jejuno para o íleo em um ciclo diurno correspondendo ao período alimentar do hospedeiro (CHAPPELL et al., 1970). Estudos de ratos infectados com *H. diminuta* têm demonstrado que a contratibilidade do intestino pode alterar-se (SUKHDEO, 1992). Desta forma, DWINELL et al. (1994) estudando as alterações mioelétricas em ratos cronicamente infectados com *H. diminuta*, determinaram que a atividade mioelétrica intestinal estava profundamente alterada durante a infecção, onde a contratibilidade estava aumentada mas o movimento de propulsão estava diminuído. Estas alterações mioelétricas começavam consistentemente oito dias após a infecção e era contínua por todo o período analisado. Os autores concluíram que esta interação entre o parasita e o hospedeiro poderia prevenir a expulsão do parasita do intestino delgado favorecendo a sua permanência no hospedeiro mas facilitando a sua migração dentro do intestino. Em seguida, DWINELL et al. (1995) verificaram que estas alterações eram abolidas após o tratamento com o antihelmítico praziquantel, pois 24 horas após o tratamento os padrões elétricos voltavam ao normal. Continuando os estudos, DWINELL et al. (1997) verificaram que este parasita causava atraso no trânsito de líquidos e diminuía população da flora aeróbica mas sem estimular o crescimento bacteriano anaeróbico, indicando que o trânsito alimentar poderia também ser atrasado, permanecendo mais tempo dentro do intestino. DWINELL et al. (1998) detectaram espessamento da muscularis externa e da cripta de Lieberkühn de todo o intestino delgado aos 20 dias após a infecção experimental. Além disso, a população de mastócitos de mucosa começava a aumentar 26 dias após a infecção (DWINELL et al., 1998) mas não estava relacionada com a alteração da contratibilidade intestinal. Posteriormente, STARKE & OAKS (2001) verificaram além da mastocitose e do aumento do número de eosinófilos na lâmina própria, também o aumento do número de células caliciformes na camada epitelial do íleo, mas que não foram suficientes para desencadear o mecanismo de expulsão do parasita pelo hospedeiro. Os autores sugeriram que este

parasita no rato poderia estimular as células efectoras a secretarem substâncias que tivessem ações mais diretamente relacionadas com a manutenção da homeostasia ou com a reparação de lesões. Nesta mesma linha de raciocínio, McKAY et al. (1991) observaram que o cestódeo *H. diminuta* era capaz de alterar a capacidade funcional e imunológica intestinal do hospedeiro provocando alterações nos níveis de peptídeos intestinais em camundongos infectados, onde os níveis de enteroglucagon e substância P (SP) estavam elevados, mas os de neurotensin (NT), peptídeo histidina isoleucina (PHI) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) estavam diminuídos nos animais infectados em relação aos controles não infectados. Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores (REARDON et al., 2001) verificou que a infecção por este cestódeo era capaz de reduzir a severidade de colitis em camundongos pela recuperação do transporte de íons através do epitélio. Os autores confirmaram que o parasita por si só ou os seus produtos biológicos poderiam ser benéficos aos hospedeiros por participar no reparo de algumas lesões, na homeostasia e na plasticidade intestinal.

2.2. Imunofisiologia da mucosa intestinal e sua relação com o parasitismo

As superfícies de mucosas são portas de entrada para muitos patógenos e para evitar que isto aconteça o sistema imunológico deve estar bastante desenvolvido e preparado para manter uma barreira contra a entrada destes patógenos para a corrente sanguínea. Na mucosa intestinal, as respostas imunes são iniciadas em pontos importantes que incluem as placas de Peyer e os linfonodos. Inicialmente, as amostras do conteúdo do lúmen são reconhecidas por células epiteliais especializadas, as células M, e em seguida são transportadas para o tecido linfóide adjacente. Desta forma, as células M estão envolvidas no transporte de antígenos solúveis e particulados para dentro das placas de Peyer. Além disso, muitas citocinas, células do sistema imune, imunoglobulinas como IgA e IgE e a migração de células linfóides para a lâmina própria e para o epitélio também constituem em eventos importantes para a imunidade da mucosa. O linfócito “helper” Th2 está associado com a resposta de IgA, mas, o linfócito Th1 é importante para a defesa de parasitas intracelulares. O balanço entre as respostas de Th1 e de Th2 vai depender principalmente da célula apresentadora de antígeno e das citocinas produzidas; células dendríticas parecem preferencialmente estimular Th2 enquanto macrófagos de promover a ativação de Th1 (SIMECKA, 1998). Desta maneira, a proteção contra parasitas intracelulares é geralmente promovida pelas citocinas de Th1, como IFN- γ , mas inibida pela ação de citocinas como a IL-4 (LOCKSLEY & REINER, 1995), enquanto a proteção contra nematódeos gastrintestinais é promovida pelas citocinas de Th2, como

IL-4, IL-9 e IL-13, mas inibida pelo IFN- γ (FINKELMAN et al., 1998 e URBAN et al., 1998).

A entrada de um material antigênico para dentro da lâmina própria intestinal pode, portanto, resultar no desencadeamento de uma resposta inflamatória aguda que limitará futuramente a entrada de tais antígenos e evitará que eles alcancem a circulação sistêmica. Por outro lado, mastócitos e macrófagos residentes da lâmina própria podem atuar como “células de alarme”. Quando sensibilizadas ou ativadas pela presença de substâncias estranhas, estas células são capazes de liberar um conjunto de mediadores inflamatórios e citocinas que podem alterar o fluxo de sangue da mucosa e aumentar o recrutamento de granulócitos para dentro da área afetada. Como em qualquer tecido, a inflamação é capaz não somente de defender, mas também de lesar a mucosa (WALLACE & GRANGER, 1996). No entanto, outras substâncias produzidas durante o processo inflamatório tem a função de antagonizar os efeitos adversos da inflamação. Desta forma, as prostaglandinas, produzidas pela maioria das células, são potentes inibidores da liberação de mediadores de mastócitos, incluindo fator de ativação de plaquetas (PAF), a histamina e o fator de necrose de tumor (TNF) (HOGABOAM et al., 1993b). Além disso, o óxido nítrico (NO), sintetizado por mastócitos, células endoteliais e epiteliais, pode também modular mediadores liberados de mastócitos (HOGABOAM et al., 1993a), possivelmente contribuindo em benefício aos efeitos prejudiciais exercidos na mucosa, pois aumenta o fluxo sanguíneo, inibe a aderência e a agregação de radicais livres e de plaquetas, promove a secreção ácida, a produção de muco e a reparação de tecidos (Macnaughton et al., 1989 e Whittle et al., 1990, citados por WALLACE & GRANGER, 1996).

Com relação às infecções helmínticas, a mucosa gastrointestinal está associada com a indução de hipersensibilidade imediata (JARRETT & MILLER, 1982). Onde através da IgE, os mastócitos liberam mediadores inflamatórios no hospedeiro tentando produzir um ambiente desfavorável ao estabelecimento de parasitas (MURRAY, 1972). Além disso, as células caliciformes através da produção de muco, possivelmente via reação anafilática, podem atuar também como barreira física prevenindo o estabelecimento de parasitas extracelulares intestinais (LEE & OGILVIE, 1982).

Além disso, antígenos de parasitas na mucosa intestinal estimulam a secreção de cloro causando alterações na contratilidade intestinal. Estes agentes incluem serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT) (COOKE & CAREY, 1984), bradicinina (CUTHBERT & MARGOLIUS, 1982), histamina (COOKE et al., 1984), e neurotransmissores entéricos, tais como o VIP (SCHWARTZ et al., 1974), substância P (SP) (WALLING et al., 1977) e acetilcolina (Ach) (TAPPER et al., 1978). Assim, muitos experimentos foram realizados, principalmente usando a

infecção por nematódeos como modelo experimental, para comprovar quais mediadores inflamatórios eram secretados durante uma resposta inflamatória contra parasitas. HARARI et al (1987) e CASTRO et al. (1987) verificaram que o antígeno de *Trichinella spirallis* inoculado em jejuno de ratos previamente sensibilizados pela infecção por este nematódeo invasivo provocava uma anafilaxia local que era manifestada pela secreção de íons cloro e de fluido para o lúmen intestinal. Além disso, foi ressaltado também que a secreção de Cl^- e a de fluido eram eventos mediados pelo anticorpo IgE e eram inibidos pela ação combinada de difenidramina e indometacina. Estes agentes bloqueavam respectivamente a ação de histaminas e de prostaglandinas sintetizadas por mastócitos ativados pelos antígenos de *T. spirallis* (ZHANG et al., 1991).

Por outro lado, o sistema nervoso entérico também está relacionado com os eventos imune/inflamatórios desencadeados na mucosa. Desta forma, CASTRO & ARNTZEN (1993) analisaram eletrofisiologicamente o comportamento neurológico do intestino delgado e grosso de hamsters sensibilizados pelo antígeno de *T. spirallis*. Neste caso, verificaram que o antígeno pôde estimular os neurônios do glânglio mioentérico aumentando a sua excitabilidade.

Em adição aos efeitos epiteliais e neurais, as reações imunológicas locais regulam as contrações do músculo liso. PALMER & CASTRO (1986), através de estudos anafiláticos, verificaram que as substâncias liberadas por células inflamatórias e imunológicas (por ex., linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos) podiam alterar a fisiologia do músculo liso por efeito direto sobre o mesmo ou por via neural. Estas substâncias poderiam ser Ach, SP, 5-HT, VIP, histamina, prostaglandinas e leucotrienos (BACH, 1982 e BURKS, 1981).

De acordo com BIENENSTOCK (1992), há um integrado mecanismo de fisiologia das mucosas, incluindo o sistema imune, nervoso e endócrino, adicionando-se aos efeitos dos elementos teciduais estruturais, como o epitélio, fibroblastos, células endoteliais e musculares neste sistema. Há evidências de que mastócitos em mucosas podem atuar como um sistema de comunicação sensorial bi-direcional, com o sistema nervoso. Mastócitos sensibilizados por antígenos e quando expostos a eles na mucosa do trato respiratório e gastrointestinal podem liberar mediadores, os quais podem comunicar com o sistema nervoso. Desta forma, mastócitos poderiam estar atuando como receptores sensoriais para antígenos ambientais nos tecidos epiteliais, onde tais interações poderiam estar inicialmente acontecendo. Desta forma, os reflexos axoniais poderiam ser iniciados e afetar a estrutura das células, tais como: músculos, fibroblastos e epitélio (BIENENSTOCK, 1992).

Recentemente, FRIELING et al. (1994) verificaram que a histamina pode ser um sinal parácrino de comunicação entre os mastócitos de mucosa e o sistema nervoso entérico nas

respostas anafiláticas do colon aos antígenos sensibilizantes e nas infecções com nematódeos parasitas (por exemplo: *Nippostrongylus brasiliensis* e *T. spirallis*) iniciando uma mastocitose em ratos (BEFUS & BIENENSTOCK, 1979). Desta forma, uma remodelação de nervos/mastócitos ocorre no intestino onde aproximadamente 77% de mastócitos foram observados próximos às fibras nervosas e muitos deles ou apresentavam contato íntimo membrana/membrana entre os processos axônicos ou encontravam-se migrando em direção aos neurônios (STEAD et al., 1987, 1989 e 1991). Esta comunicação bidirecional entre mastócitos e nervos representa uma unidade homeostática na regulação da fisiologia e da plasticidade do intestino e na defesa do hospedeiro.

Com relação às alterações estruturais morfológicas decorrentes do parasitismo entérico, IIOH et al. (1999) confirmaram que a infecção pelo nematódeo *N. brasiliensis* em ratos induzia uma atrofia do vilo e uma hiperplasia da cripta. Esta atrofia estava associada com o elevado número de enterócitos em processo de apoptose na ponta do vilo e com a intensa proliferação celular ao nível de cripta. Estas alterações retornavam à normalidade após a expulsão do parasita pelo hospedeiro. No entanto, apesar do elevado número de MMC e de RMCP II nestes animais, estas alterações morfológicas não estavam associadas com os mediadores desta célula, pois os animais geneticamente manipulados, ou seja, sem mastócitos, apresentaram as mesmas taxas elevadas de apoptose no vilo e de hiperplasia na cripta.

Em uma revisão recente realizada por PALMER & MEERVELD (2001) foram discutidas as funções gastrintestinais neuroimunomodulatórias durante o parasitismo entérico e a possibilidade de inversão, de parasitismo para comensalismo (CASTRO, 1992), na relação dinâmica entre os helmintos entéricos e os hospedeiros mamíferos. O hospedeiro pode expressar uma resposta adaptativa e fisiológica na presença do parasita no trato gastrointestinal para poder escapar do estress do parasitismo, ou pelo menos diminuir seus efeitos sobre a homeostasia nutricional e ao seu bem estar. Da mesma maneira, os helmintos que são participantes ativos na relação hospedeiro/parasita têm a capacidade de organizar estratégias subversivas, evasivas ou defensivas contra as defesas do hospedeiro. A implementação destas estratégias de interação hospedeiro/parasita dentro do trato gastrointestinal vai depender da ecologia desta interação, por exemplo, se os parasitas penetram ou não na mucosa, se a inflamação é aguda ou crônica. A troca mútua de um arsenal de mensageiros químicos entre o parasita e o hospedeiro dentro de um microambiente entérico é que direcionaria e determinaria a evolução destas estratégias quer seja para a manifestação da doença, à proteção e a cura ou à adaptação do parasita e a sua evasão à resposta imunológica do hospedeiro (PRITCHARD, 1986; CASTRO, 1989; PALMER & MEERVELD, 2001).

2.3. Mastócitos

2.3.1. Características morfológicas e fisiológicas, origem, desenvolvimento, proliferação e papel no parasitismo

Mastócitos foram inicialmente descritos por ERLICH (1979) como células granulares que se coram metacromaticamente com corantes básicos. Desde de então os métodos para identificação desta célula não tiveram muitos avanços. O princípio de que os componentes básicos formam ligações iônicas com glicosaminoglicanas sulfatadas e protéicas nos grânulos de mastócitos foi a base para a maioria dos procedimentos de detecção histoquímica de mastócitos. A lista de corantes empregados incluem aqueles que se coram metacromaticamente (p.ex. azul de toluidina) ou ortocromaticamente (p.ex. acridina laranja, sulfato de berberine). Nem todos os métodos histoquímicos são inteiramente específicos para mastócitos e a maioria não é adequada para ser usada com os fixadores mais comumente usados. Por outro lado, a técnica imunohistoquímica através da utilização de anticorpos anti-proteases específicos de mastócitos conjugados às enzimas (fosfatases ou peroxidases), à avidina ou aos compostos fluorescentes também têm sido empregada. Os avanços na efetividade destes métodos têm aumentado o seu uso em investigações de mastócitos. O primeiro anticorpo monoclonal específico anti-triptase, uma protease presente nos grânulos de mastócitos foi desenvolvido primeiramente por SCHWARTZ (1985). Em seguida, WALLS et al. (1990) identificaram imunohistoquimicamente mastócitos em tecidos fixados em formaldeído usando anticorpos monoclonais específicos para triptase em pulmão, colon, mucosa gástrica, glândula ptuitária e pele de camundongos e do homem. Comparando-se com os procedimentos de coloração com azul de toluidina, os autores verificaram que o método imunohistoquímico resultou em uma coloração mais intensa e permitiu a identificação de um número bem maior de mastócitos presentes em tecidos fixados com formaldeído quando comparados com os métodos histoquímicos. No entanto, em ratos, triptase foi isolada em baixa concentração nas células intestinais (CHEN et al., 1993).

Existem subpopulações de mastócitos estrutural, biológica e funcionalmente distintas. Em espécies de roedores a mucosa gastrointestinal e outras mucosas contém um fenótipo de mastócito que é funcional e biologicamente diferente dos mastócitos encontrados em outros tecidos conjuntivos, assim como os da pele e peritônio. Em ratos, estes dois tipos celulares são comumente denominados de mastócitos de mucosa (MMC) e de mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) (ENERBACK & NORBY, 1990). Existem diferenças fenotípicas entre estas

células, como por exemplo o tamanho; os CTMC são bem maiores (10 a 20 μm) que os MMC (5 a 10 μm). Os MMC aumentam consideravelmente nas respostas imunes dependentes de linfócitos T como em certas infecções por parasitas intestinais e possuem a protease RMCP II (MAYRHOFFER & FISHER, 1979). Em contraste, os CTMC mostram pouca ou nenhuma dependência de linfócitos T, pois o número de mastócitos é semelhante tanto nos ratos atímicos como nos normais (ALDENBORG & ENERBACK, 1985). A quantidade de histamina e serotonina (5 HT) é bem mais elevada no CTMC do que no MMC. Somente os MMC contém prostaglandinas e leucotrienos. Somente o CTMC é degranulado pelo composto 48/80 e SP e, possuem a protease RMCP I (METCALFE et al., 1997). Os grânulos metacromáticos de mastócitos de ratos são compostos de glicosaminaglicana (GAG) e grandes proteínas. Estes dois componentes granulares além de formar a matriz granulocítica são responsáveis pela conexão entre os componentes de baixo peso molecular, como a histamina e a serotonina (ENERBACK & NORBY, 1990). Além disso, diferentes tipos de mastócitos humanos já foram isolados e estes também exibem variações em suas características, assim como no tamanho e estruturas citoplasmáticas dos grânulos, quantidades de mediadores estocados, sensibilidade à estimulação por várias substâncias e susceptibilidade às várias drogas. Talvez a principal diferença entre as subpopulações de mastócitos humanos seja a protease contida nos grânulos. Há evidências da presença de dois tipos de proteases. Alguns mastócitos humanos contém altos níveis de triptase e quimase (MCTC), outros contém somente a triptase (MCT) (HIRANI et al., 1989).

WINGREN & ENERBACK (1983) verificaram que a integridade estrutural dos grânulos de ambos CTMC e MMC dependia das ligações iônicas. Desta forma, a adição de sal em fixadores a base de formaldeído de baixa concentração abolia completamente a coloração de MMC e reduzia a coloração de CTMC. Os grânulos eram preservados em pH = 2, indicando que os agrupamentos sulfatados melhor do que as carboxilas eram a contribuição aniônica da glicosaminoglicana para a ligação com os fixadores.

ARIZONO et al. (1987) observaram mudanças fenotípicas de mastócitos em pulmão e em jejuno de ratos infectados com *N. brasiliensis* usando a marcação com bromodesoxiuridine (BrdU). Neste estudo, através da incorporação de BrdU na fase S do ciclo celular, os autores verificaram que os mastócitos marcados estavam presentes em número maior no intestino e no pulmão, 12 a 13 dias após a infecção, mas retornavam ao nível normal aos 21 dias. Desta forma, foi sugerido que estas células proliferaram somente por um curto período de tempo no pulmão e também no intestino. Além disso, as mudanças citoquímicas e imunocitoquímicas observadas em uma única linhagem celular indicaram a ocorrência de mudança fenotípica entre os mastócitos (entre CTMC e

MMC), provavelmente regulado por fatores microambientais.

Posteriormente, ARIZONO & NAKAO (1988) verificaram que a meia vida de mastócitos na muscularis era de 40 dias e na mucosa de 32 dias. Neste estudo, foi mostrado que a hiperplasia de mastócitos ocorria após a infecção com o nematódeo *N. brasiliensis* não somente na mucosa do intestino delgado, mas também na muscularis e na subserosa. Os mastócitos da muscularis não degranularam após a injeção intravenosa do composto 48/80, como os mastócitos de pele. Além disso, dentro de 12 semanas após a infecção com *N. brasiliensis*, os mastócitos da muscularis eram fenotipicamente similares aos da mucosa intestinal (MMC). Na subserosa, o número de mastócitos aumentava durante o mesmo período mas não diminuía em 12 semanas. Estes mastócitos eram inicialmente do tipo MMC mas, após 12 semanas, muitos deles mostravam ligação com sulfato de berberine e coloração pela safranina, indicando serem do tipo CTMC e novamente com evidências de alteração fenotípica. Em seguida, OSINSKI et al. (1993) detectaram hiperplasia e mudanças fenotípicas subsequentes à ablação mioentérica e extrínscica do segmento do jejuno do rato. Os plexos mioentéricos e nervos extrínscicos foram bloqueados através da aplicação na serosa de cloreto de benzildimetiltetradecilamonio (BAC). O número de mastócitos aumentou quatro vezes na musculatura lisa intestinal, de 15 a 90 dias após este tratamento. Mas, nenhum aumento foi observado na unidade vilo-crípta do jejuno. A detecção de heparina no conteúdo de mastócitos pelo sulfato de berberine fluorescente demonstrou que a alteração no fenótipo destes mastócitos ocorreu entre 20 e 90 dias após a denervação. Os resultados deste trabalho sugeriram que a hiperplasia e as mudanças fenotípicas dos mastócitos estavam relacionadas com os nervos e com os processos de reparação da parede intestinal. Estudando as causas do desaparecimento e do repovoamento de mastócitos da mucosa intestinal após a irradiação, SEDGWICK & FERGUSON (1994) demonstraram que os mastócitos reapareceram na mucosa do intestino após três semanas, mas em número baixo e inferior ao controle. O processo que levou ao desaparecimento de MMC após a irradiação não foi atribuído à degranulação que normalmente ocorre nas anafilaxias (KING & MILLER, 1984). As células foram vistas mortas na lâmina própria e a enzima RMCP II desapareceu do soro dos animais irradiados. Os autores sugeriram que as células poderiam ter morrido por apoptose envolvendo a clivagem de cromatina e a fragmentação nuclear e citoplasmática.

Estudando a proliferação celular, ARIZONO et al. (1990) utilizaram BrdU para marcar mastócitos em divisão celular na mucosa intestinal de ratos infectados ou não com *N. brasiliensis*. Desta forma, os autores verificaram intensa proliferação de MMC, 13 a 15 após a infecção, onde 40% destas células estavam marcadas com uma única dose de BrdU. Como os animais foram



mortos apenas uma hora após a injeção de BrdU, foi sugerido que a maioria dos mastócitos marcados era proveniente da própria mucosa intestinal e não precursores migratórios da corrente sanguínea. Outro dado interessante deste trabalho, é que nos ratos atímicos e parasitados não ocorria esta hiperplasia de mastócitos, demonstrando que fatores dependentes de linfócitos T (IL-3) eram necessários para esta proliferação celular. Já em ratos normais não infectados, mas atímicos, a proliferação de mastócitos ocorria normalmente, demonstrando mecanismos linfócito T-independentes.

Mastócitos são células hematopoiéticas, como os eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Mas, à exceção de mastócitos, todas as outras células deixam a medula óssea após a sua diferenciação (GALLI, 1990). Células precursoras de mastócitos deixam a medula óssea, migram para a corrente sanguínea, invadem tecidos conjuntivos e mucosas e em seguida diferenciam-se em mastócitos identificáveis. Para provar esta hipótese, KASUGAI et al. (1995) utilizaram culturas de mastócitos em metilcelulose contendo citocinas de linfócito T, como a IL-3, e fator de crescimento da célula tronco (SCF- "stem cell factor"). Ficou definido como unidade formadora de colônia de mastócitos ou mastócitos-CFU, as células precursoras que formavam colônias neste tipo de meio de cultura. Os autores retiravam as células mononucleadas da medula óssea, do sangue periférico e do intestino delgado de ratos infectados ou não com *N. brasiliensis*. Desta forma, verificaram que a concentração de mastócitos-CFU caía para 21% na corrente sanguínea, aumentava sete vezes na mucosa do intestino delgado, mas não alterava na medula óssea, uma semana após a infecção. A proporção de mastócitos-CFU na fase S do ciclo celular permanecia também baixa na medula óssea e no sangue durante a infecção, mas aumentava significativamente no intestino delgado. Estes resultados sugeriram que a infecção com *N. brasiliensis* induzia a invasão de mastócitos-CFU da corrente sanguínea para os intestinos. Concordantemente, SMITH & WEIS (1996) relataram que mastócitos poderiam expressar receptores de adesão na superfície celular, os quais poderiam permitir que os mastócitos extravasassem da corrente sanguínea para os tecidos apropriados. Dentro dos tecidos, os precursores poderiam maturar e proliferar sob a influência de citocinas, mas não poderiam retornar à corrente sanguínea.

Os mastócitos estão amplamente distribuídos através de todo o corpo e muitos potentes mediadores da inflamação estão estocados dentro de seus grânulos citoplasmáticos (SCHWARTZ & AUSTEN, 1984). A liberação destes mediadores pode levar a destruição local de tecidos por proteases (PATRICK et al., 1988), alterações vasculares por liberação de histamina (ROBERTSON & GREAVES, 1978) ou por recrutamento de eosinófilos e plaquetas (CAPRON et al., 1978). Esta degranulação resulta não somente em reações de hipersensibilidade mediada por

IgE, mas também por agentes farmacológicos, estímulos físicos e neurais ou fatores derivados de linfócitos T (CASTRO & ARNTZEN, 1993).

Uma outra característica dos mastócitos é a presença de receptores com alta afinidade por IgE (FcεRI). Além dos mediadores inflamatórios, os mastócitos contém ou secretam outros compostos com ações biológicas diversas (ENERBACK & NORBY, 1990). Os mastócitos sintetizam citocinas como as interleucinas (IL): IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e o fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos/macrófagos (GM-CSF) (STEVENS & AUSTEN, 1989). A IL-3 e o GM-CSF são as principais citocinas que promovem a proliferação e a diferenciação de mastócitos. A IL-3 parece ser importante na proliferação precoce de mastócitos, enquanto GM-CSF, que é produzida pela célula tronco na medula óssea, atuam na diferenciação e maturação destas células (METCALFE et al., 1997). Além disso, IL-3 é uma importante citocina que está diretamente relacionada com respostas de mastócitos nas infecções parasitárias. Desta forma, quando anti-IL-3 era aplicada em camundongos parasitados com *N. brasiliensis* antes e durante a infecção experimental, ocorria uma redução de 40 a 50 % na população de mastócitos da mucosa intestinal, indicando a importância de IL-3 na proliferação destas células durante a infecção parasitária (MADDEN et al., 1991). Já a IL-4, BROWN & HURAL (1997) associaram a sua presença nos tecidos inflamados, com o importante papel em regular a produção de anticorpos, a hematopoiese, a inflamação e as respostas imunes efectoras. Além de IL-4 estar relacionada com alergias, crescimento de tumores e susceptibilidade a certas doenças infecciosas, também pode exercer papel protetor na imunidade a alguns parasitas extracelulares (BROWN & HURAL, 1997). Além disso, IL-4 causa um aumento da adesão de linfócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio capilar resultando em uma migração transendotelial para o local inflamado. IL-4 é um fator quimiotático para mastócitos e induz a expressão de receptores IgE nestas células. Além disso, mastócitos produzem IL-4 em baixos níveis, estocando-a em seus grânulos secretórios. Após a ativação pela IgE, mastócitos aumentam a sua produção e as liberam para o meio extracelular (BROWN & HURAL, 1997). Mastócitos estão amplamente distribuídos pelo corpo e estrategicamente localizados em proximidade direta com muitos alvos da ação desta citocina. Estes alvos incluem células endoteliais, brônquios, musculatura lisa, tecido conjuntivo e nervos. Desta forma, mastócitos podem exercer um papel central na iniciação e no comando das respostas de hipersensibilidades imediata e tardia (GORDON et al., 1990), onde IL-4 tem um importante papel neste processo. Mastócitos, por outro lado, permanecendo fixos em tecidos e podendo proporcionar alta concentração desta potente citocina,

desempenham uma função central nas respostas imunes (BROWN & HURAL, 1997).

Os efeitos biológicos de IL-4 são mediados pela sua ligação a receptores de alta afinidade (IL-4R) encontrados na maioria das células da linhagem hematopoiética, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos B e T e basófilos, assim como da linhagem não hematopoiética (LOWENTHAL et al., 1988). Além disso, estudos in vitro têm mostrado que IL-4 estimula a secreção e a liberação de citocinas de linfócito Th2 (IL-4, IL-9 e IL-13 com ação contra nematódeos gastrintestinais) e isto ocorre através da sua ligação ao IL-4R que proporciona a ativação da molécula STAT6 (LE GROS et al., 1990; CROFT & SWAIN, 1995; KAPLAN et al., 1996 e TAKEDA et al., 1996) aumentando a transcrição do gene para produção de IL-4 (KOTANIDES & REICH, 1996 e SZABO et al., 1997) e que induz células CD4+ a diferenciarem-se em Th2. De acordo com FINKELMAN et al. (2000) a molécula STAT6 também é necessária para a sobrevivência das células Th2 de memória. Trabalhos recentes realizados com *T. spirallis* e *N. brasiliensis* em camundongos revelaram que a expulsão destes parasitas era dependente de IL-13 e IL-4, da presença de IL-4R, e da ativação da molécula STAT6 (URBAN et al., 1998 e MCKENZI ET AL., 1998).

Devido ao acúmulo de MMC na mucosa intestinal, durante o período de expulsão de nematódeos do trato intestinal, acredita-se que estas células contribuem para este processo (ROTHWELL, 1989). A expulsão de nematódeos foi inicialmente observada em infecção experimental de ratos adultos por TALIAFERRO & SARLES (1939). Em uma infecção primária com *N. brasiliensis*, aproximadamente todos os parasitas adultos foram espontaneamente expelidos do jejuno entre os dias 14 e 16 após a infecção. Em infecções subseqüentes, os parasitas foram expelidos muito mais rapidamente. TALIAFERRO & SARLES (1939) foram portanto os primeiros pesquisadores a observar um aumento populacional de MMC na mucosa associado à infecção parasitária. Em outro trabalho com ratos, MILLER & JARRET (1971) verificaram que a infecção por *N. brasiliensis* provocava uma mastocitose na mucosa intestinal, que era máxima por ocasião da expulsão dos parasitas. Além disso, durante este estágio os MMC migraram para o epitélio intestinal (MILLER & JARRETT, 1971). Por outro lado, BEHNKE et al. (1993) verificaram que quando camundongos eram simultaneamente infectados com *T. spirallis* e *Heligmosomoides polygyrus*, a expulsão de *T. spirallis* pelos hospedeiros era altamente afetada, devido a redução da mastocitose e da presença de baixos níveis de proteases de mastócitos no soro dos animais. Este estudo demonstrou que *H. polygyrus* era capaz de modular seletivamente a secreção de citocinas pelos linfócitos Th2 no interior de nódulos linfáticos mesentéricos e consequentemente deprimir as respostas inflamatórias agudas para favorecer a sobrevivência e a manutenção do parasita dentro do

hospedeiro. *H. polygyrus* deprime a imunidade homóloga e heteróloga e facilita a permanência de outros nematódeos intestinais (BARRIGA & MYSER, 1987). No entanto, algumas espécies de helmintos gastrointestinais induzem a proliferação e o recrutamento de células efectoras, como mastócitos e eosinófilos, para o local parasitado, mas os parasitas não são expelidos pelos hospedeiros. Exemplo disso, são os parasitas *H. polygyrus* e *Trichuris muris* em camundongos (FINKELMAN et al., 1997), *H. diminuta* em ratos (STARKE & OAKS, 2001). Da mesma forma, em bovinos, a infecção por *Ostertagia ostertagi* tem sido associada com acúmulo de eosinófilos na mucosa do abomaso, mas sem associação direta com proteção do hospedeiro contra este parasita (CLAEREBOU & VERCRUYSSSE, 2000).

Recentemente, verificou-se que a droga imunossupressiva ciclosporin A (CsA) bloqueava a resposta funcional de linfócito T e inibia a proliferação de MMC (RYFFELL, 1993). Desta forma, em ratos infectados com *N. brasiliensis* e tratados subcutaneamente com CsA, foi verificada uma concomitante diminuição do número de MMC e dos níveis de RMCP-II no soro e no jejuno com a redução da permeabilidade da mucosa (CUMMINS et al., 1988), mas a expulsão do parasita não foi afetada. Já com camundongos tratados com esta droga ocorreu uma inibição ou um atraso na expulsão de *T. spirallis* (GARSIDE et al., 1992). Tentando entender o efeito de CsA na expulsão do parasita, McLAUCHLAN et al. (1999) estudaram a dinâmica de MMC intestinal e o nível de protease em camundongos (MMCP-I) infectados com *H. diminuta* ou *H. microstoma* e tratados com esta droga. Os autores observaram que na infecção por *H. diminuta*, a droga CsA inibia a expulsão do parasita e permitia que alguns deles alcançassem a maturidade além de bloquear a proliferação de mastócitos e a produção e liberação de MMCP-I. No entanto, a infecção por *H. microstoma* persistiu por 64 dias apesar da expressiva mastocitose nos tecidos intestinais e nos dutos biliares acompanhada por um alto nível de MMCP-I nos tecidos e no soro. Estes dados proporcionaram claras evidências de que mastócitos apresentavam respostas variáveis às infecções gastrointestinais e que a evasão dos parasitas à ação de mastócitos dependia também do local de parasitismo. O uso de CsA revelou que nas infecções helmínticas, ocorrem ambos os mecanismos: linfócito T-dependente incluindo a proliferação e a ativação de mastócitos e linfócito T-independente.

2.3.2. Apoptose

O termo apoptose, também reconhecido por morte celular programada (PCD), foi proposto inicialmente por KERR et al. (1972), o qual apresenta um papel complementar mas



oposto a mitose para regular o aumento da população celular. As características morfológicas que ocorrem no processo de apoptose indicam ser este processo um fenômeno ativo e programado que pode ser iniciado ou inibido por uma variedade de estímulos fisiológicos e patológicos. À microscopia eletrônica, as alterações estruturais acontecem em dois estágios discretos. O primeiro compreende condensação nuclear e citoplasmática e o rompimento da célula em fragmentos ultraestruturalmente bem preservados e envolvidos por membranas, denominados por corpos apoptóticos. No segundo estágio, estes corpos apoptóticos são eliminados pelas superfícies epiteliais ou por células fagocíticas, onde sofrem uma série de alterações assemelhando-se uma autólise dentro de fagossomas e que são rapidamente degradados por enzimas lisossomais destas células fagocíticas.

A apoptose está envolvida na reconstituição natural de tecidos sadios de adultos e é responsável pela eliminação de células durante o desenvolvimento embriológico. Ela ocorre espontaneamente em neoplasmas malignos não tratados e em alguns casos de regressão terapêutica de tumores. A apoptose implica também na involução e atrofia de vários tecidos e órgãos e pode também ser desencadeada por agentes nocivos em animais adultos e no embrião (KERR et al., 1972).

Em revisão bibliográfica realizada por WYLLIE et al. (1980), ficou caracterizada a diferença morfológica entre necrose e apoptose. Segundo os autores, necrose é uma dissociação celular seguida pelo colapso da homeostasia interna. Os eventos morfológicos da apoptose vistos ao microscópio eletrônico incluem: encolhimento e retração do núcleo, condensação da cromatina à margem do núcleo, condensação geral ou de natureza cromofílica do citoplasma e fragmentação do núcleo e do citoplasma. Associada com a condensação da cromatina ocorre a fragmentação do DNA por enzimas endonucleases específicas, resultando na fragmentação do DNA em zonas distintas (POTTEN, 1997). Em geral é difícil distinguir *in situ* pela microscopia óptica células em apoptose. Mas, a fragmentação do DNA pode ser observada, não somente em células apoptóticas, já em fase bem definida histologicamente, como também em células iniciando este processo. Desta forma, GAVRIELI et al. (1992) descreveram um método para marcar, *in situ*, no núcleo, rupturas de DNA, em tecidos processados por métodos histológicos rotineiros. Este método foi baseado na ligação específica da enzima terminal desoxinucleotidil-transferase (TdT) à ponta 3'-OH do DNA fragmentado, promovendo neste ponto a síntese de um polímero polinucleotídico. Como os nucleotídeos usados eram marcados com biotina, esta ligação era detectada pelo complexo avidina-biotina-peroxidase permitindo a sua visualização pelo microscópio óptico. Este método

foi denominado por TUNEL (“TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling”).

A apoptose requer elementos genéticos na regulação da morte individual das células. O estudo de como o processo de apoptose interage com a proliferação celular é extremamente importante para novas tentativas de terapias contra o câncer e outras doenças proliferativas. No trato gastrointestinal, a apoptose pode ser detectada na cripta do camundongo e do homem saudáveis e este processo é mais significativo no intestino delgado do que no grosso. Experimentos com o camundongo e com o homem tem indicado que o gene anti-apoptótico *bcl-2*, tende a se expressar mais na base da cripta do colon. Quando este gene é transgenicamente deletado, os níveis de apoptose espontânea aumentam significativamente no colon (POTTEN, 1997). Outro gene envolvido em apoptose do intestino é o *bax*. A expressão deste gene está aumentada em células senis da ponta do vilo intestinal. Os genes relacionados à família *bcl-2* codificam proteínas relacionadas à sobrevivência da célula e os genes *bax* codificam proteínas relacionadas à morte celular. Muitas proteínas estão associadas direta e indiretamente no processo de proliferação e de sobrevivência celular. Muitos genes participantes destes processos codificam proteínas da matriz extracelular e intracelular como o E-cadherin/ β -catenin (genes *apc*) e as relacionadas ao ciclo das enzimas ciclooxigenases (genes *cox 1* e *cox 2*), nos quais as prostaglandinas são sintetizadas (POTTEN, 1997).

Em uma revisão realizada por ZHIVOTOVSKY et al. (1996) foi discutido o papel das proteases no processo de apoptose. Como as proteases pertencentes à família da enzima interleucina-convertase (“interleukin 1 β - converting”- ICE) de mamíferos foi detectada em níveis aumentados, nas culturas de células em processo de apoptose, foram consideradas como enzimas chaves na morte programada celular (YUAN et al., 1993). No entanto, há evidências de que outras proteases podem estar envolvidas em um processo em cascata de ativação. Desta forma, recentemente, um grupo de enzimas denominado por caspase foi identificado como ter importante papel na ativação em cascata do processo de apoptose onde a ICE foi classificada como caspase-1 (GOLSTEIN, 1997). As proteínas alvos destas enzimas, levando à morte celular, estão no citoplasma e subsequentemente estas proteases ganham acesso ao núcleo. A ação destas caspases pode ser controlada por fatores associados com a membrana mitocondrial e que podem ser amplificados pela translocação de citocromo c (enzima mitocondrial) e outros fatores mitocondriais ao citoplasma. Em mamíferos, o gene *bcl-2* previne a translocação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma e a perda do potencial da membrana mitocondrial (GOLSTEIN, 1997).

Com relação a mastócitos, duas citocinas são conhecidas por promoverem a

proliferação e/ou a maturação de mastócitos, a IL-3 e o SCF (IHLE et al., 1983); ANDERSON et al., 1990; SWIETER et al., 1992; TSAI et al., 1992; GALLI et al., 1995). Se IL-3 é retirada do meio de cultura, os mastócitos entram em processo de apoptose. Mas, mesmo na ausência de IL-3, quando SCF é adicionada neste meio, a apoptose não progride, sugerindo que SCF tem o efeito de salvar as células do processo de apoptose pela sua ligação ao receptor c-kit tirosina-quinase (MEKORI et al., 1993). SCF apresenta funções de afetar o desenvolvimento e as funções de sobrevivência de mastócitos, de promover a quimiotaxia, a proliferação ou a maturação, de alterar o fenótipo e de promover a degranulação e a secreção de mediadores (GALLI et al., 1995). Além disso, quando IL-3 era retirada do meio de cultura, coincidentemente, ocorria uma diminuição da expressão de mRNA para *bcl-2* e os mastócitos sofriam apoptose. SCF, por outro lado, quando adicionada ao meio de cultura sem IL-3, não induzia a expressão deste gen. Estes resultados demonstraram que a apoptose induzida pela remoção de IL-3 era dependente apenas parcialmente da molécula p53 (molécula supressora de tumores) e que o efeito de SCF em prevenir a apoptose não estava associada com a indução da expressão de *bcl-2* (YEE et al., 1994), indicando outros fatores envolvidos. Os mecanismos regulatórios da apoptose em mastócitos ainda são pouco esclarecidos.

Mais recentemente, FRIEND et al. (2000), estudando a infecção de camundongos por *T. spirallis*, na fase de recuperação, verificaram que após a expulsão dos parasitas ocorria uma involução da mastocitose e da população de eosinófilos em nível de mucosa intestinal. A diminuição na população destas células ocorria: a) inicialmente por processo de apoptose, mas em pequena percentagem (cerca de 3 %) e, b) pela migração dos eosinófilos para os linfonodos mesentéricos e dos mastócitos para o baço. No baço, estes mastócitos apresentavam o núcleo segmentado possivelmente devido ao processo de envelhecimento celular, para serem em seguida, destruídos por macrófagos. Por outro lado, a maioria dos eosinófilos era encontrada nos linfonodos sofrendo o processo de apoptose e sendo em seguida era fagocitado por macrófagos.

3.2. Tratamento das amostras de tecido

Para as necropsias, os animais foram inicialmente anestesiados com éter amílico intraperitoneal (intraperitônio). A cavidade abdominal foi aberta e os intestinos foram cuidadosamente lavados com solução salina estéril (0,9% de NaCl/0,7% de KCl e 14,4% de glicose).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Infecção experimental dos animais com *H. diminuta* e local

3.1.1. Manutenção de cisticercóides em besouros

Para a infecção de besouros da farinha (*Tenebrio molitor*), exemplares adultos de *H. diminuta* foram colhidos do trato intestinal de ratos experimentalmente infectados e as proglótides terminais ou grávidas foram seccionadas e deixadas em placas de Petri para os besouros alimentarem-se das mesmas. Os besouros infectados foram mantidos no laboratório em caixas plásticas contendo flocos de aveia e fatias de batata, segundo a técnica de DWINELL et al. (1994).

3.1.2. Infecção dos animais

Após 16 dias da infecção dos besouros, estes foram dissecados e as larvas cisticercóides foram removidas. As larvas em número de aproximadamente 36 foram suspensas em uma solução salina a 0,85% de cloreto de sódio e administradas diretamente no estômago dos ratos com auxílio de uma seringa acoplada a uma cânula. Os ratos foram previamente anestesiados com o anestésico volátil halothane.

Para este experimento foram utilizados ratos brancos pesando aproximadamente 250 a 300g, machos, da raça Sprague-Dawley, provenientes da UW-Madison.

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de pesquisa do Professor Dr. John Adams Oaks, "Department of Comparative Biosciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA".

3.2. Tratamento das amostras de tecido

Para as necropsias, os animais foram inicialmente sacrificados com super dosagem de anestésico (halothane). A cavidade abdominal foi aberta, os intestinos foram removidos, colocados em bandejas contendo solução salina tamponada (1,93g de NaHCO_3 ; 0,37g de KCl e 14,4g de

NaCl) onde fragmentos de aproximadamente 0,5 cm do duodeno e/ou do íleo foram seccionados no sentido longitudinal e colocadas com a face serosa voltada sobre um pedaço de papel branco para em seguida serem mergulhados nos fixadores apropriados.

Os tecidos colhidos do intestino dos animais foram fixados e conservados de duas formas diferentes: a) com solução a 4% de paraformoldeído tamponado para fixar tecidos que seriam utilizados pela técnica TUNEL e, b) fixador de Carnoy (10% de ácido acético, 60% de etanol absoluto e 30% de clorofórmio) para fixar tecidos utilizados pela técnica de coloração imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal anti-BrdU. Estes tecidos foram deixados nestes fixadores por aproximadamente três horas e em seguida enxaguados três vezes em álcool etílico a 70%. Os tecidos permaneceram em etanol até serem emblocados em parafina.

3.3. Coloração histoquímica dos mastócitos

Para a coloração histoquímica de mastócitos de mucosa usou-se o azul de Astra 6GLL (Sigma Chemical Company, USA) de acordo com DUFFY et al. (1993). A solução final deste corante continha: 2 g de cloreto de magnésio hidratado e 1 g de pararosaniline dissolvidos em 80 ml de etanol a 95%, 9 ml de ácido clorídrico a 12 N, 1 g de azul de Astra diluído em 10 ml de água destilada. As demais estruturas teciduais foram coradas com "Nuclear Fast Red" C.I. 60760 (Sigma Chemical Company, USA) ou com hematoxilina de Mayer (Hemalum, Sigma Chemical Company, USA).

Para o exame morfológico, outras secções intestinais foram coradas com hematoxilina e eosina.

3.4. Coloração imunohistoquímica de mastócitos de mucosa (MMC) pelo RMCP II

Para confirmar se o método de coloração de mastócitos desenvolvido por DUFFY et al. (1993) era específico para corar grânulos de MMC, foi realizada a coloração dupla e sequencial destas células, inicialmente histoquimicamente com azul de Astra e em seguida imunohistoquimicamente com o anticorpo monoclonal anti-protease II de mastócitos de ratos (anti-RMCP II), específico para MMC (anticorpo cedido pelo Dr. Paul Bass da Escola de Farmácia da Universidade de Wisconsin-Madison). O procedimento foi realizado da seguinte maneira: As secções teciduais foram previamente hidratadas em passagens sucessivas em xilol e álcool etílico e coradas com azul de Astra (pH = 0,5). Em seguida prosseguiu-se com a coloração



imunohistoquímica usando-se o procedimento indireto através do anticorpo secundário conjugado à biotina e o sistema avidina-biotina complexado à peroxidase para detecção da reação imunológica. Para isto, inicialmente, a enzima peroxidase endógena foi bloqueada usando-se a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,3% diluído em 0,01 M de solução salina fosfatada tamponada (PBS) e as reações inespecíficas do anticorpo secundário foram inibidas usando-se o soro normal de jumento na diluição de 1/50. O anticorpo primário, o monoclonal anti-RMCP II produzido em coelho (0,43 mg/ml na diluição final de 1/1000) foi incubado sobre o tecido intestinal em uma câmara úmida a 4° C por aproximadamente 12 horas. Após os apropriados enxágües em PBS, o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho (molécula inteira, H+L, biotinilado, adsorvido em soro de rato, 1,1 mg/ml; Jackson Immune Research Laboratories Inc., Pennsylvania, USA) foi usado na diluição de 1/500 (2,2 µg/ml) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após outros enxágües em PBS, o complexo "Avidin-Biotin Peroxidase" (Vectstain ABC Kit; Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) foi adicionado nas secções teciduais por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram imersas por sete minutos em uma solução preparada a fresco de 20% de tetracoloro diaminobenzidina-DAB (Sigma Chemical Company) e 0,03% de H_2O_2 em PBS. Após um enxágüe em água destilada, os tecidos foram corados pela hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula. O controle negativo consistiu deste procedimento mas sem o anticorpo primário ou o secundário. As células que coraram tanto pelo azul de Astra como pelo anticorpo anti-RMCP II foram identificadas e contadas.

3.5. Quantificação de MMC na fase S do ciclo celular pela coloração imunohistoquímica de MMC pelo anti-BrdU

3.5.1. Determinação do período ideal para marcação de MMC pelo BrdU (experimento preliminar)

O nucleosídeo modificado, bromodesoxiuridine (BrdU, Sigma, Co, USA) foi usado nesta pesquisa para marcar mastócitos na fase S do ciclo celular, ou seja, período onde o DNA começa a duplicar-se entrando no processo de divisão celular, de acordo com o protocolo desenvolvido por ARIZONO et al. (1987), mas com algumas modificações.

Este experimento preliminar foi realizado com a finalidade de se conhecer a melhor época para a injeção de BrdU e a marcação do maior número possível de mastócitos em processo de



divisão celular. Desta maneira, foram injetados intraperitonealmente duas doses, com intervalo de 30 minutos, 60 mg de BrdU/kg de peso vivo (PV) diluídos em solução salina estéril a 0,85% de cloreto de sódio, duas vezes com intervalos de 30 minutos entre cada aplicação. Os animais foram sacrificados à(s) 1, 24, 48 e 72 horas após a última injeção. Os tecidos do duodeno e do íleo destes animais foram coletados fixados em fixador de Carnoy, corados histoquimicamente com azul de Astra e em seguida imunohistoquimicamente com o anticorpo monoclonal anti-BrdU. Os mastócitos que reagiram com anti-BrdU foram identificados e contados. 72 horas após a última injeção de BrdU foi o período em que maior número de mastócitos foram identificados como estando na fase S do ciclo celular (Tabela 1) e desta forma adotou-se para o próximo experimento este período (72 horas) como padrão para quantificação de mastócitos. Além desse experimento, outro foi conduzido, onde os animais foram sacrificados uma hora após a injeção de uma única dose de 100mg/kg de PV de BrdU para verificar se mastócitos endógenos, ou seja, já presentes na mucosa intestinal, também encontravam-se em divisão celular.

3.5.2. Quantificação de MMC em divisão celular na mucosa intestinal de ratos infectados com *H. diminuta*

Quatro grupos de ratos (n = 3), infectados experimentalmente, foram sacrificados 72 horas após a injeção de BrdU (conforme descrito acima) nos dias 0, 6, 15 e 32 após a infecção experimental com *H. diminuta*. Segmentos teciduais do duodeno e do íleo foram colhidos, fixados em fixador de Carnoy e emblocados em parafina, como já descrito anteriormente. Os tecidos foram em seguida cortados não seriamente a 5:μm, hidratados e corados com azul de Astra conforme DUFFY et al. (1993). A solução ácida (pH = 0,5) do azul de Astra foi usada não somente para corar especificamente mastócitos de mucosa como também para a desnaturação do DNA para facilitar a detecção da incorporação de BrdU ao DNA destes mastócitos. A incorporação do BrdU foi detectada através da técnica imunohistoquímica incubando-se os tecidos com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-BrdU (25 μg/ml; Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA), na diluição de 1/100 a 4° C durante 12 horas. Os procedimentos seguintes da técnica imunohistoquímica foram semelhantes aos descritos no Ítem 3.4.

Os MMCs positivos (MMC BrdU+), ou seja, aqueles com os grânulos citoplasmáticos corados em azul e o núcleo corado em marrom pela reação da peroxidase/DAB foram identificados com o auxílio do microscópio óptico no aumento de 400X. Os MMCs presentes na lâmina própria do



vilo e da cripta do duodeno e do íleo foram quantificados de acordo com o método de MILLER & JARRETT (1971), ou seja, contando-se 20 unidades de vilo-cripta (UVC) por animal (pelo menos 100 células foram contadas em cada lâmina). Mastócitos presentes na submucosa e muscular também foram contados. A quantificação foi realizada escolhendo-se as vilosidades que mais se igualavam em altura e largura. Para a submucosa e a camada muscular, contavam-se células de uma área que apresentava a mesma largura correspondente a do vilo e da cripta. Estas contagens foram realizadas a “duplo cego”.

3. 6. Estudo de MMC em processo de apoptose

3. 6.1. Grupo experimental

Este experimento foi conduzido para determinar se mastócitos de mucosa que proliferaram no íleo de ratos infectados experimentalmente com *H. diminuta* entravam em processo de apoptose após a remoção dos parasitas com anti-helmíntico. Para este experimento, os ratos infectados foram tratados com o anti-helmíntico praziquantel (PZQ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) aos 32 dias pós-infecção e quatro grupos de animais ($n = 4$ ou 5) foram sacrificados aos: a) uma semana (T1), b) duas semanas (T2), c) três semanas (T3) e d) quatro semanas após o tratamento com o anti-helmíntico (T4). Além destes grupos, dois outros adicionais ($n = 4$ ou 5) também fizeram parte deste experimento: a) o grupo controle, com animais não infectados (C) e, b) grupo infectado aos 32 dias após a infecção, mas não tratado com anti-helmíntico (I).

3.6.2. Identificação e quantificação de MMC em apoptose

Para identificar mastócitos de mucosa em processo de apoptose utilizou-se a técnica denominada TUNEL, segundo GAVRIELI et al. (1992), com algumas modificações. A modificação da técnica consistiu na substituição de dUTP pelo dCTP. Esta técnica consistiu basicamente da marcação *in situ* do DNA nuclear fragmentado usando a enzima desoxinucleotidil transferase (TdT), da seguinte forma: Lâminas contendo secções de íleo foram diafanizadas e hidratadas através de passagens sucessivas em xilol e álcool e subsequentemente coradas com azul de Astra (pH = 0,5) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Estes tecidos foram, após

enxágües em água destilada, tratados com uma solução a 0,3% de H_2O_2 em PBS (pH 7,5) à temperatura ambiente durante 30 minutos, para bloquear a ação da enzima peroxidase endógena. Após este período, as lâminas foram incubadas em solução de proteinase K (20mg/ml, GBCO-BRL, Life & Technologies-USA) em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente e enxaguadas três vezes em PBS. A solução marcadora da reação foi preparada em gelo picado e continha: TdT em tampão da reação (0,1M de cacodilato de potássio, pH 7,2 e 2mM de cloreto de cobalto), 25 μ M de Biotina-14 dCTP (GIBCO, BRL) e 0,01 unidades/1 μ l de TdT (GIBCO, BRL). Esta solução da reação preparada sem a enzima TdT foi utilizada como controle negativo da reação. Desta solução, 50 μ l foram aplicados sobre as lâminas e deixadas para incubar a 37 °C, por 30 minutos em câmara úmida. Todos os outros passos seguintes deste protocolo foram conduzidos em temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram enxaguadas três vezes em PBS, e a reação foi encerrada quando as lâminas foram transferidas para o tampão apropriado (300mM de cloreto de sódio e 30mM de citrato de sódio) por 15 minutos. Estas lâminas foram em seguida, enxaguadas em PBS por cinco minutos. Em uma solução aquosa a 2% de soro albumina bovina (BSA) por 10 minutos e finalmente em PBS por mais cinco minutos. Logo em seguida, os tecidos foram cobertos pela solução ABC na diluição 1/50, por 30 minutos, enxaguadas três vezes em PBS e incubados com uma solução preparada a fresco de DAB + 0,03% de H_2O_2 durante sete minutos. Após um enxágüe final em água destilada, os tecidos corados com uma solução a 1% de "Nuclear Fast Red", foram desidratados e montados entre lâmina e lamínula.

Os MMCs apoptóticos e não apoptóticos presentes na lâmina própria do vilo e da cripta do íleo foram identificados e quantificados como descrito no Ítem 3.5.2.

3.6.3. Análise morfológica.

As dimensões das camadas (a altura do vilo, a profundidade de cripta e a espessura da mucosa externa) de cada segmento ileal foi medida com o auxílio de um microscópio óptico e de uma ocular micrométrica.

3.7. Análise estatística.

Os números de mastócitos e as dimensões de cada camada tecidual foram analisados usando análise de variância. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com os dados



4.2. Estado de MMC em divisão celular (fase S do ciclo celular) pelo BrdU

4.2.1. Determinação do tempo ideal para marcação e detecção de MMC em divisão

4. RESULTADOS

4.1. Especificidade do azul de Astra para identificar MMC

Quando azul de Astra e anti-RMCP II foram usados para corar sequencialmente MMC, observou-se que a maioria das células apresentava os grânulos citoplasmáticos corados simultaneamente na cor azul e também na cor marrom (Figura 1). Desta maneira, 92 a 98 % de MMCs estavam positivos para RMCP II, tanto no grupo experimental infectado com *H. diminuta* como no grupo controle não infectado. Este resultado confirmou a especificidade da coloração histoquímica do azul de Astra para identificar MMC e, portanto, útil para detectá-lo em processo de divisão celular, pelo BrdU, ou em processo de apoptose pela técnica TUNEL modificada.

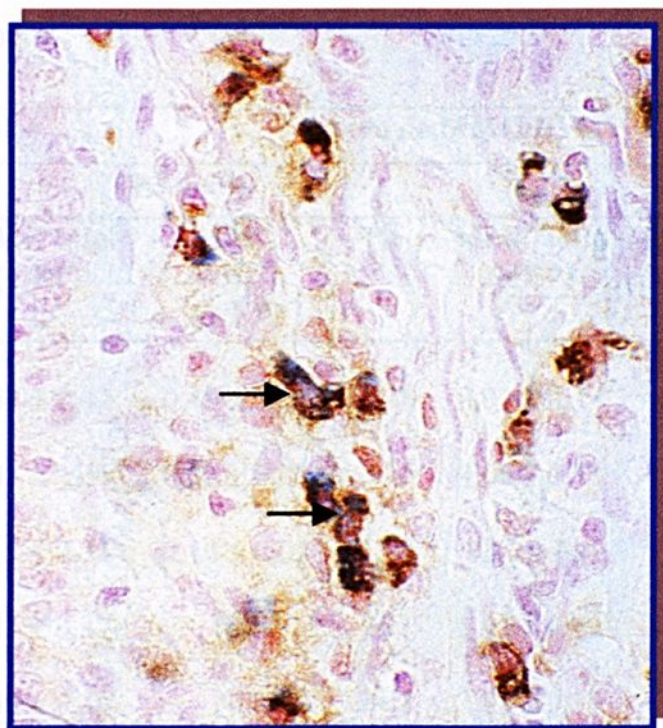


Figura 1: Fotomicrografia da região do íleo (vilo) mostrando a coloração dupla e em sequência (setas) pelo azul de Astra, específica para MMC (coloração dos grânulos citoplasmáticos em azul) e pela imunohistoquímica através do anticorpo anti-RMCP II, específico para protease de MMC de ratos (coloração imunoenzimática em marrom). Os demais núcleos encontram-se corados em róseo pelo “Nuclear Fast Red”.

4. 2. Estudo de MMC em divisão celular (fase S do ciclo celular) pelo BrdU

4.2.1. Determinação do tempo ideal para marcação e detecção de MMC em divisão celular

Este experimento foi conduzido com o intuito de conhecer o tempo ideal para marcação e detecção do maior número possível de MMC em divisão celular. Para isto, duas doses de uma solução de BrdU, com intervalos de 30 minutos, foram injetadas intradermicamente em ratos não infectados e os animais foram sacrificados às 0, 1, 24, 48 e 72 horas após a injeção. MMCs com núcleos positivos (MMC BrdU+) começaram a ser identificados já nas primeiras 24 horas (1,2% e 0,4% no duodeno e no íleo, respectivamente), mas o número destas células positivas continuou a elevar-se até atingir o máximo às 72 horas, onde 4,2% e 4,1% de MMC estavam positivos na UVC do duodeno e do íleo, respectivamente (Tabela 1 e Figuras 2 e 3).

Tabela 1: Número total de MMC/UVC e MMC BrdU + /UVC no duodeno e no íleo de ratos não infectados.

Número de MMC/UVC*						
DUODENO				ÍLEO		
Tempo pós-injeção de BrdU	MMC total (± EP)	MMC BrdU+ (± EP)	%	MMC total (± EP)	MMC BrdU+ (± EP)	%
72h	9,57 ± 0,42	0,40 ± 0,09	4,18	8,02 ± 0,35	0,33 ± 0,07	4,11
48h	9,33 ± 0,36	0,35 ± 0,07	3,75	9,00 ± 0,33	0,35 ± 0,08	3,89
24h	8,15 ± 0,35	0,10 ± 0,05	1,23	8,57 ± 0,4	0,03 ± 0,02	0,35
1h	7,35 ± 0,37	ND	ND	5,92 ± 0,22	ND	ND
Sem BrdU	7,30 ± 0,34	ND	ND	7,87 ± 0,37	ND	ND

ND = não detectável; EP = erro padrão das médias; * n = 3 animais

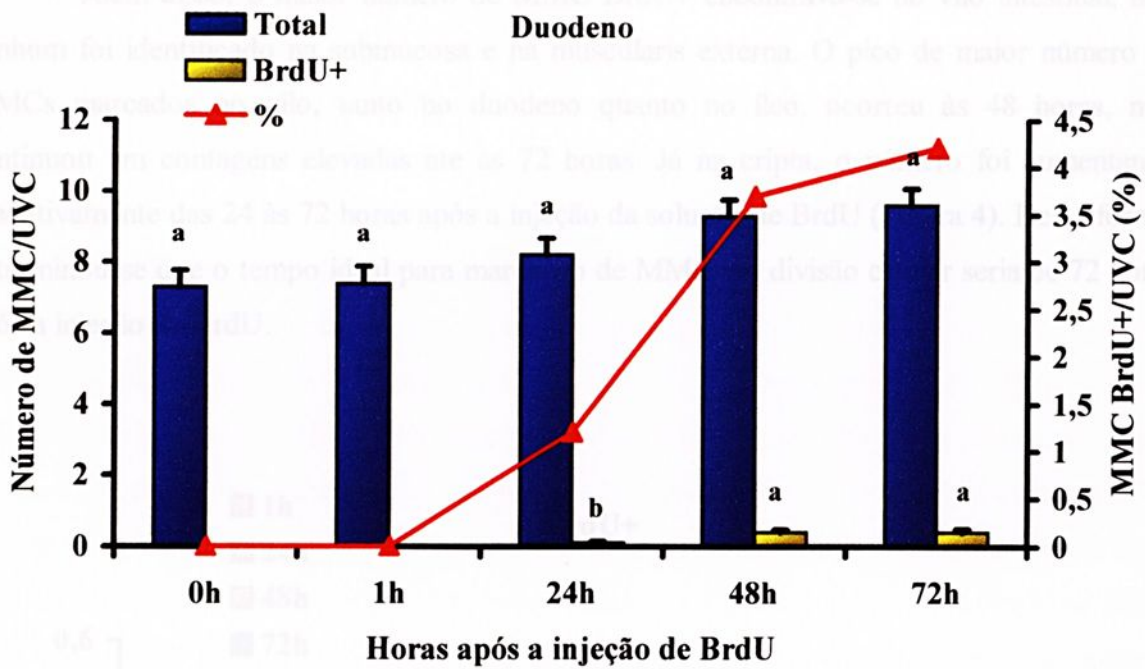


Figura 2: Número médio de MMC total/UVC e de MMC BrdU+/UVC no duodeno de ratos não infectados (n = 3) em diferentes horas após a injeção de BrdU. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

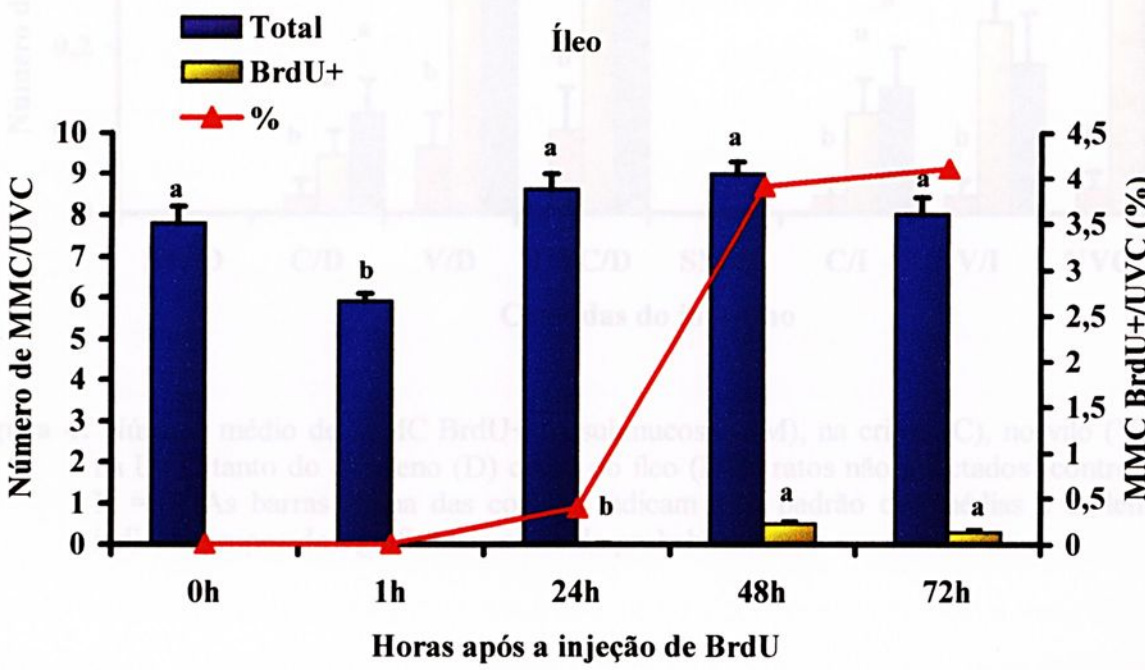


Figura 3: Número médio de MMC total/UVC e de MMC BrdU+/UVC no íleo de ratos não infectados (n =3) em diferentes horas após a injeção de BrdU. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

Além disso, o maior número de MMC BrdU+ encontrava-se no vilo intestinal, mas nenhum foi identificado na submucosa e na muscularis externa. O pico de maior número de MMCs marcados no vilo, tanto no duodeno quanto no íleo, ocorreu às 48 horas, mas continuou em contagens elevadas até às 72 horas. Já na cripta, o número foi aumentando gradativamente das 24 às 72 horas após a injeção da solução de BrdU (Figura 4). Desta forma, determinou-se que o tempo ideal para marcação de MMC em divisão celular seria de 72 horas após a injeção de BrdU.

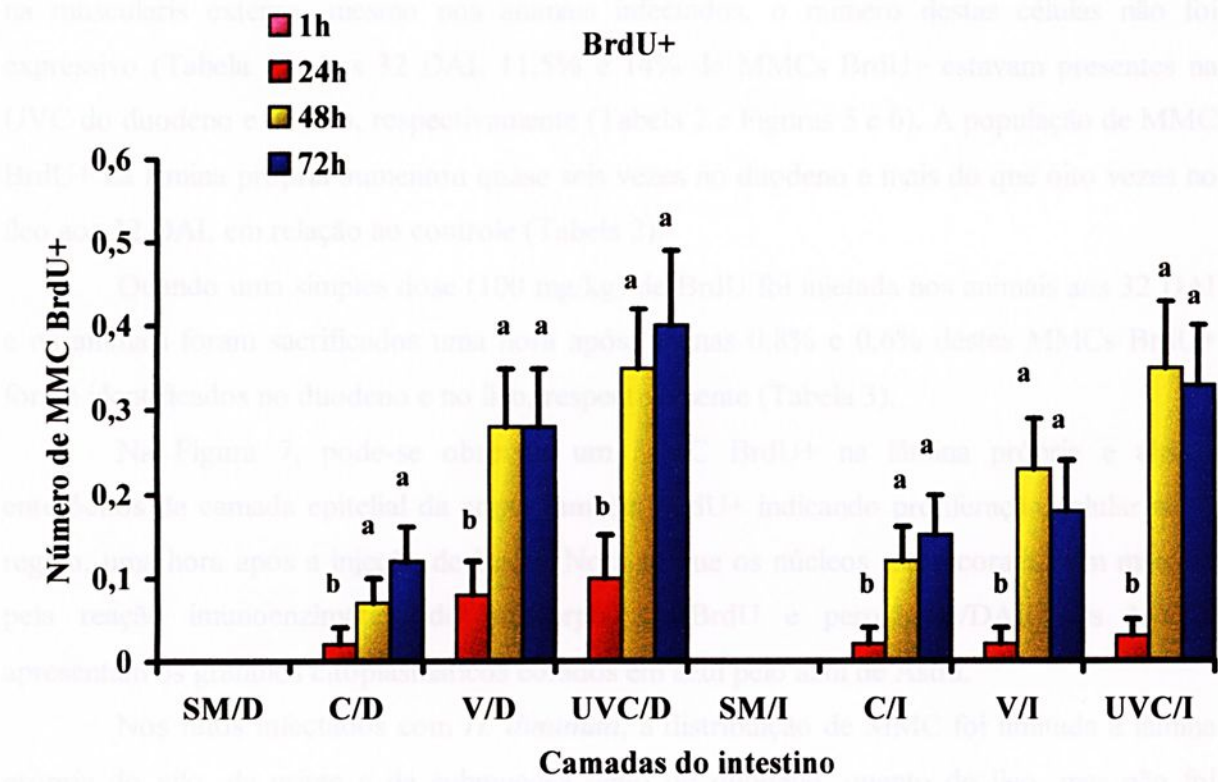


Figura 4: Número médio de MMC BrdU+ na submucosa (SM), na cripta (C), no vilo (V) e na UVC tanto do duodeno (D) como do íleo (I) de ratos não infectados (controle). N = 3. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

4.2.2. Identificação e quantificação de MMC total e de MMC BrdU+

Após a determinação do tempo ideal para marcação de MMC, três grupos de ratos ($n = 3$) foram infectados e sacrificados aos 6, 15 e 32 dias após a infecção (DAI) e 72 horas após a injeção de BrdU. Um outro grupo, de animais não infectados ($n=3$), foi considerado o grupo controle do experimento. Em todos os grupos analisados, MMCs BrdU+ foram identificados nas amostras de tecidos da lâmina própria tanto do duodeno quanto do íleo. No entanto, a lâmina própria, principalmente, do vilo dos animais infectados, em relação ao animal controle, foi o local onde maior número destas células foi observado. Na submucosa e na muscularis externa, mesmo nos animais infectados, o número destas células não foi expressivo (Tabela 2). Aos 32 DAI, 11,5% e 14% de MMCs BrdU+ estavam presentes na UVC do duodeno e do íleo, respectivamente (Tabela 2 e Figuras 5 e 6). A população de MMC BrdU+ na lâmina própria aumentou quase seis vezes no duodeno e mais do que oito vezes no íleo aos 32 DAI, em relação ao controle (Tabela 2).

Quando uma simples dose (100 mg/kg) de BrdU foi injetada nos animais aos 32 DAI e os animais foram sacrificados uma hora após, apenas 0,8% e 0,6% destes MMCs BrdU+ foram identificados no duodeno e no íleo, respectivamente (Tabela 3).

Na Figura 7, pode-se observar um MMC BrdU+ na lâmina própria e alguns enterócitos da camada epitelial da cripta também BrdU+ indicando proliferação celular nesta região, uma hora após a injeção de BrdU. Nota-se que os núcleos estão corados em marrom pela reação imunoenzimática do anticorpo anti-BrdU e peroxidase/DAB. Os MMCs apresentam os grânulos citoplasmáticos corados em azul pelo azul de Astra.

Nos ratos infectados com *H. diminuta*, a distribuição de MMC foi limitada à lâmina própria do vilo, da cripta e da submucosa tanto do duodeno, quanto do íleo, mas não foi observada na muscularis externa. A serosa não foi analisada. O número de MMC encontrado nestas camadas da parede do duodeno e do íleo no 6º e no 15º DAI não foi estatisticamente diferente daquele encontrado no controle (dia 0). Entretanto, aos 32 DAI, o número de MMC aumentou em relação ao controle (Tabela 2 e Figuras 5 e 6) onde a maior quantidade estava presente no vilo. Esta hiperplasia de MMCs aos 32 DAI foi coincidente com o aumento de MMCs BrdU+, indicando proliferação celular dos MMCs já existentes na lâmina própria ou migração de precursores de MMCs da medula óssea ou da corrente sanguínea para a parede intestinal, em decorrência do estímulo antigênico provocado pelo parasita *H. diminuta*.

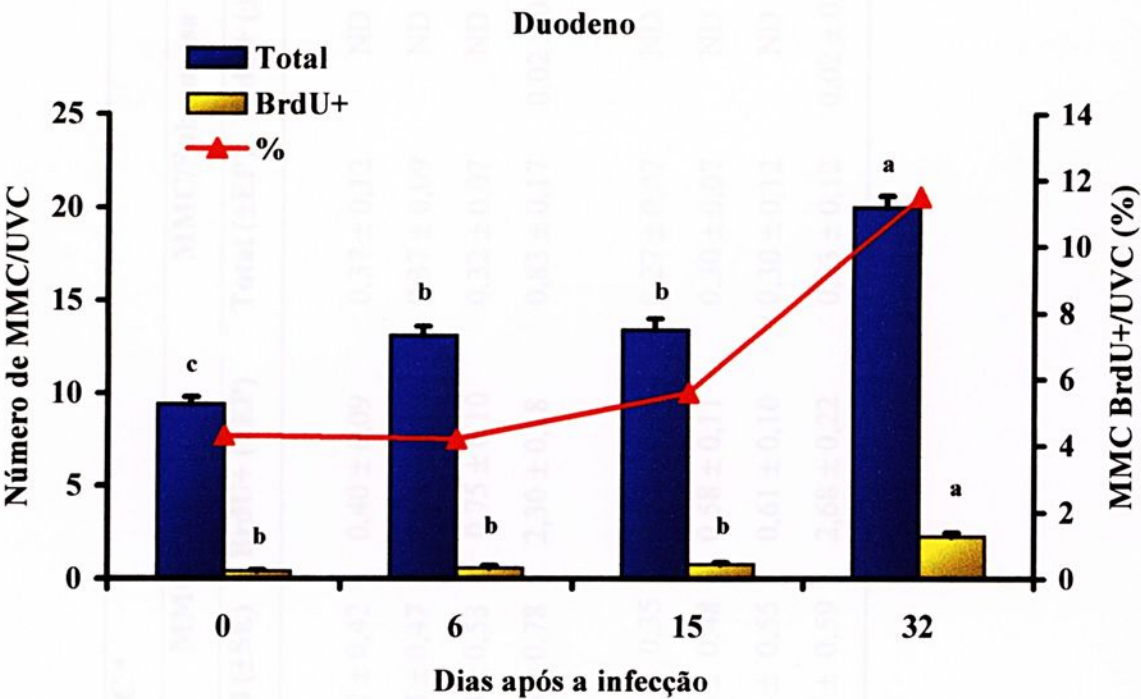


Figura 5: Número médio de MMC total/UVC e de MMC BrdU+ no duodeno, 72 horas após a injeção de BrdU em ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 6, 15 e 32 DAI e não infectados (0 dia). N = 3. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

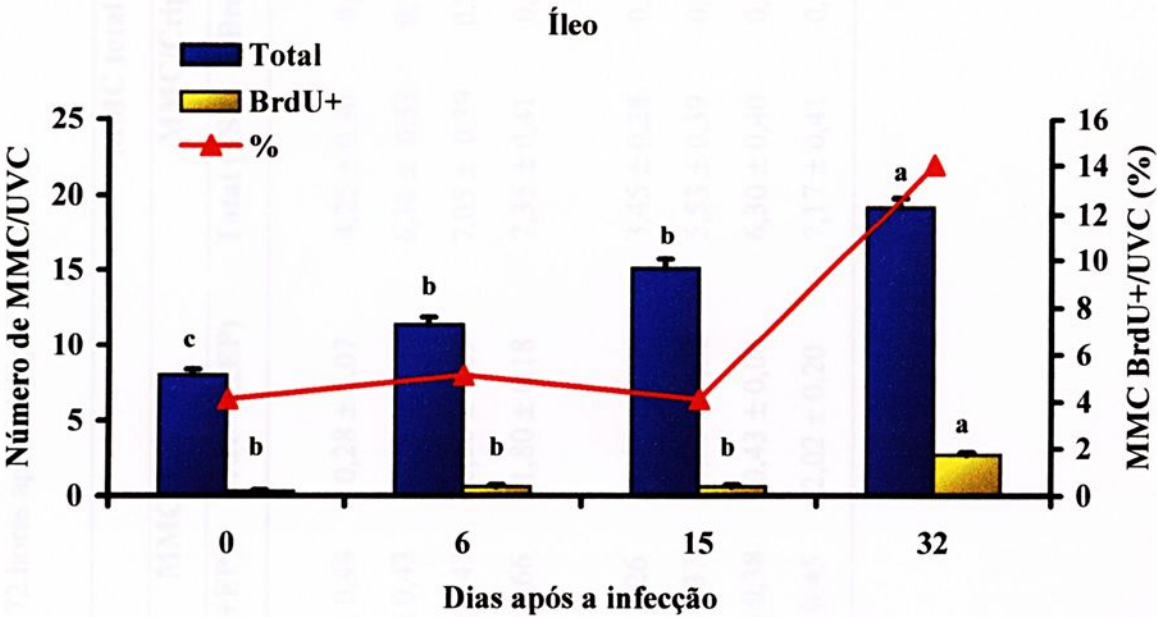


Figura 6: Número médio de MMC total/UVC e de MMC BrdU+/UVC no íleo, 72 horas após a injeção de BrdU em ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 6, 15 e 32 DAI e não infectados (0 dia). N = 3. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Número médio de MMC total e de MMC BrdU+ em ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* e em ratos não infectados, no duodeno e no íleo 72 horas após a injeção de BrdU.

MMC total e MMC BrdU+/UVC *									
MMC/Vilo				MMC/Cripta			MMC/UVC		
Dias p.i.	Total (±EP)	BrdU+ (±EP)	Total (±SE)	BrdU+ (±EP)	Total (±SE)	BrdU+ (±EP)	Total (±SE)	BrdU+ (±EP)	MMC/Submucosa
Duodeno									
0	5,17 ± 0,44	0,28 ± 0,07	4,25 ± 0,30	0,12 ± 0,04	9,42 ± 0,42	0,40 ± 0,09	0,37 ± 0,12	0,37 ± 0,12	ND
6	6,38 ± 0,43	0,45 ± 0,10	6,30 ± 0,33	0,10 ± 0,05	13,13 ± 0,47	0,55 ± 0,10	0,37 ± 0,09	0,37 ± 0,09	ND
15	6,38 ± 0,43	0,50 ± 0,09	7,05 ± 0,39	0,25 ± 0,07	13,43 ± 0,53	0,75 ± 0,10	0,32 ± 0,07	0,32 ± 0,07	ND
32	12,70 ± 0,66	1,80 ± 0,18	7,35 ± 0,41	0,50 ± 0,10	20,05 ± 0,78	2,30 ± 0,18	0,83 ± 0,17	0,83 ± 0,17	0,02 ± 0,02
Íleo									
0	4,56 ± 0,26	0,18 ± 0,08	3,45 ± 0,28	0,15 ± 0,05	8,01 ± 0,35	0,33 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,27 ± 0,07	ND
6	5,83 ± 0,37	0,33 ± 0,08	5,53 ± 0,39	0,25 ± 0,06	11,36 ± 0,48	0,58 ± 0,11	0,30 ± 0,07	0,30 ± 0,07	ND
15	8,77 ± 0,38	0,43 ± 0,08	6,30 ± 0,40	0,18 ± 0,07	15,07 ± 0,55	0,61 ± 0,10	0,30 ± 0,12	0,30 ± 0,12	ND
32	12,00 ± 0,45	2,02 ± 0,20	7,17 ± 0,41	0,67 ± 0,13	19,17 ± 0,59	2,68 ± 0,22	0,53 ± 0,12	0,53 ± 0,12	0,02 ± 0,02

ND=Não detectável

EP= Erro Padrão

* n = 3 animais



Tabela 3: Número médio de MMC total e de MMC BrdU+ no duodeno e no íleo de ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI, uma hora após a injeção de BrdU.

MMC total e MMC BrdU+/UVC *			
Órgão	MMC total (±EP)	MMC BrdU+ (±EP)	%
Duodeno	20,05 ± 0,78	0,16 ± 0,001	0,80
Íleo	19,17 ± 0,59	0,12 ± 0,004	0,63

EP = Erro Padrão
n = 3 animais

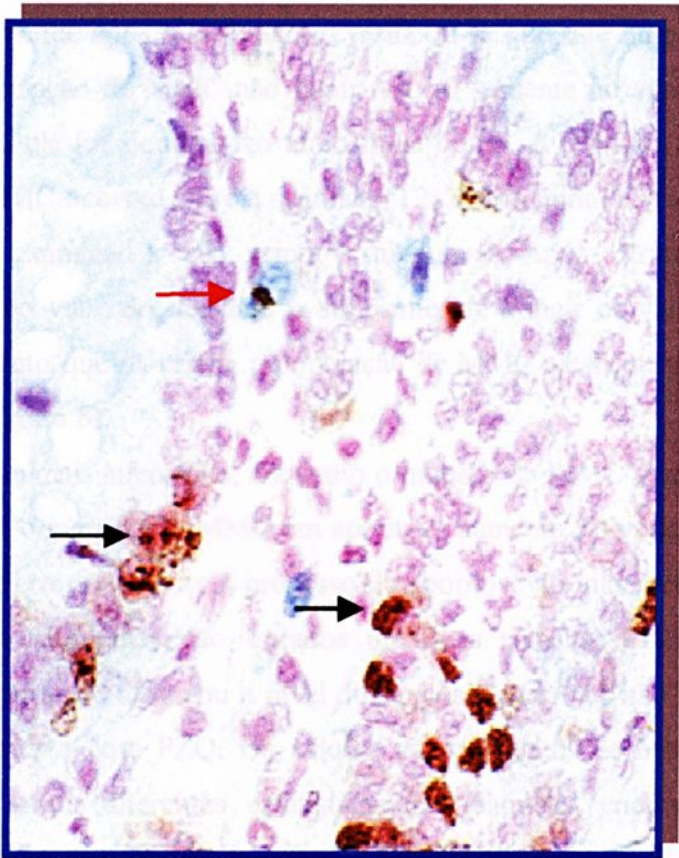


Figura 7: Fotomicrografia da região do vilo e da cripta do íleo mostrando um MMC em divisão celular (seta vermelha) corado pelo azul de Astra (grânulos citoplasmáticos em azul) e pelo anti-BrdU (núcleo corado em marrom). BrdU foi injetado em um rato infectado com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI e sacrificado uma hora após. Observa-se também os enterócitos da camada epitelial da cripta em divisão celular (setas pretas). Os demais núcleos estão corados em vermelho pelo “Nuclear Fast Red”. Há também alguns MMCs BrdU- .

4.3. MMC em processo de apoptose

Para o estudo de células em processo de apoptose, os tecidos foram colhidos apenas do íleo, uma vez que este é o local de eleição para o parasitismo de *H. diminuta*. Desta maneira, observou-se que a hiperplasia de mastócitos foi evidente nos ratos aos 32 DAI quando comparada com os animais não infectados (Tabela 4). Esta hiperplasia foi evidente tanto na mucosa ($UVC = \Sigma$ das contagens da cripta + as do vilo) e na submucosa, mas não na muscularis externa (Tabela 4 e Figura 8). MMC foi encontrado em maior número no vilo do que na cripta. Os dados apresentados aqui foram muito semelhantes aos já obtidos no experimento anterior (Item 4.2.2), onde a hiperplasia de mastócitos foi mais acentuada aos 32 DAI. Quando os animais foram tratados com PZQ aos 32 DAI e o número de MMC foi quantificado semanalmente, após o tratamento, verificou-se que este número declinou (Figura 8). O declínio na população de MMC não ficou restrito somente no vilo onde a mastocitose foi mais evidente, mas ele foi significativo também na cripta. A primeira redução significativa no número total de MMC ocorreu entre a segunda (T2) e a terceira (T3) semana para todos as três regiões teciduais examinadas: vilo, cripta e submucosa. Após o tratamento com PZQ, a população de MMC no vilo não declinou o suficiente até atingir os valores dos animais do grupo controle, enquanto que na cripta, a população de MMC alcançou valores inferiores aos normais (Tabela 4 e Figura 8).

No vilo dos animais infectados, enquanto o número de MMC aumentou quatro vezes, (Tabela 4 e Figura 8), o número de MMC em apoptose aumentou 10 vezes (Tabela 4 e Figura 9). Além disso, o número de MMC em processo de apoptose no vilo permaneceu semelhante aos dos animais infectados mas não tratados até duas semanas (T2), mas, em seguida diminuiu na terceira semana e alcançou o nível dos animais controles não infectados na quarta semana após o tratamento com PZQ. Os valores das contagens de MMC em apoptose na cripta entérica não foram diferentes estatisticamente daqueles encontrados nos animais controles (C) e infectados aos 32 dias da infecção (I) mas não tratados (Tabela 4); entretanto, houve um leve aumento (1,7 vezes) uma semana após o tratamento com PZQ (T1). Ainda na cripta, estes valores, imediatamente, retornaram aos valores normais duas semanas após o tratamento (T2), mas continuou a declinar até níveis não identificáveis na terceira e quarta semanas após o tratamento (T3 e T4). Na submucosa e na muscularis externa, as células em apoptose não foram visualizadas.

Tabela 4: Número médio de MMC total e MMC em apoptose (APO) nas camadas do íleo de ratos controles não infectados (C), infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI (I), uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento de ratos infectados aos 32 DAI, com praziquantel.

Número Médio* de MMC ± EP										
Grupo	Vilo		CRIPTA		UVC		SM		Músculo	
	Total	APO	Total	APO	Total	APO	Total	APO	Total	APO
C	3,01 ± 0,13	0,04 ± 0,02	6,41 ± 0,17	0,04 ± 0,02	9,42 ± 0,20	0,08 ± 0,02	0,36 ± 0,06	ND	0,02 ± 0,01	ND
I	12,77 ± 0,66	0,40 ± 0,15	6,45 ± 0,50	0,06 ± 0,06	19,32 ± 0,70	0,46 ± 0,16	0,62 ± 0,22	ND	0,01 ± 0,02	ND
T1	12,22 ± 0,39	0,47 ± 0,07	7,48 ± 0,66	0,10 ± 0,03	19,70 ± 0,83	0,57 ± 0,08	0,61 ± 0,09	ND	0,06 ± 0,04	ND
T2	10,81 ± 0,40	0,39 ± 0,07	6,80 ± 0,23	0,06 ± 0,03	17,60 ± 0,50	0,45 ± 0,06	0,63 ± 0,08	ND	0,11 ± 0,07	ND
T3	6,17 ± 0,22	0,24 ± 0,07	4,58 ± 0,19	ND	10,80 ± 0,26	0,24 ± 0,06	0,38 ± 0,08	ND	0,03 ± 0,02	ND
T4	4,76 ± 0,18	0,11 ± 0,04	4,20 ± 0,20	ND	8,88 ± 0,27	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,04	ND	ND	ND

n = 4 ou 5 animais

ND = Não detectável

EP = Erro Padrão

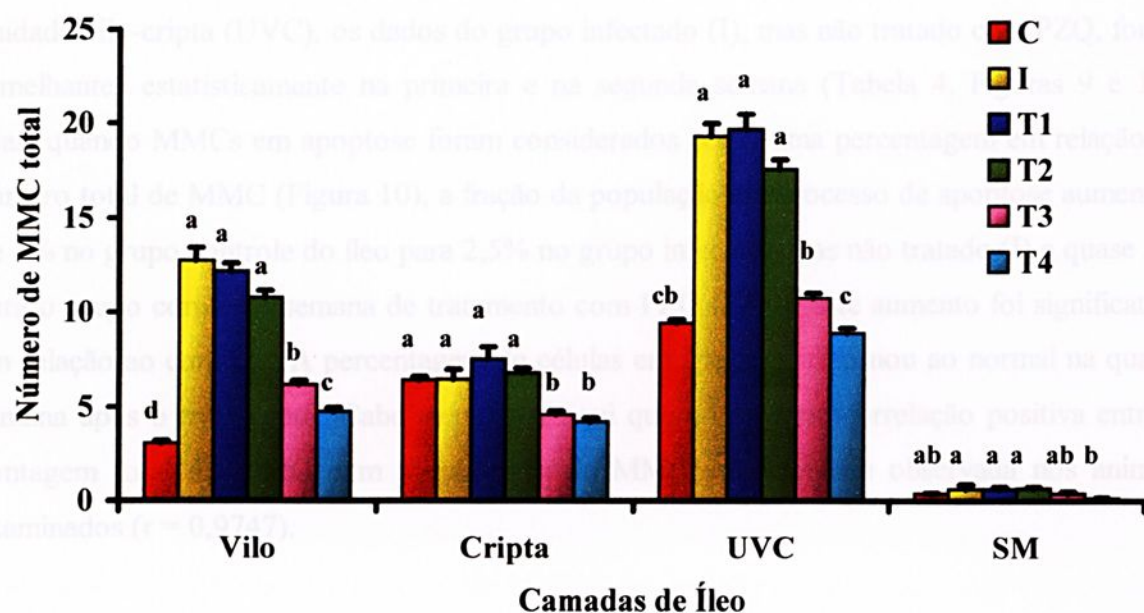


Figura 8: Número médio de MMC total nas camadas do íleo dos ratos não infectados (C), infectados aos 32 DAI com *Hymenolepis diminuta* (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro semanas (T4) após o tratamento dos ratos infectados aos 32 DAI, com praziquantel. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade

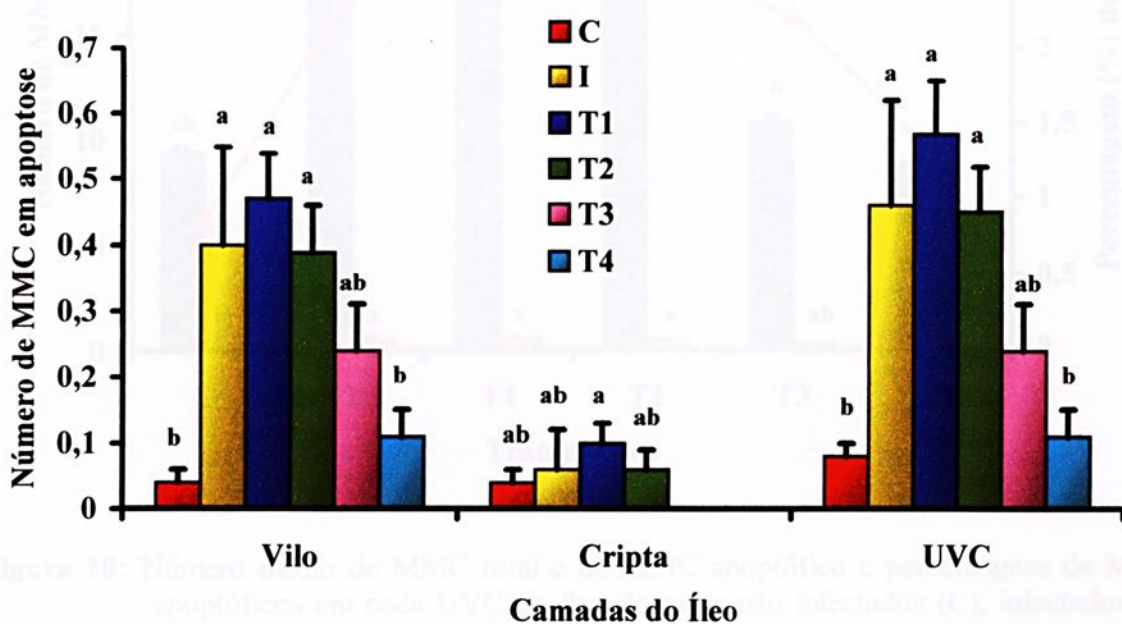


Figura 9: Número médio de MMC em apoptose nas camadas do íleo dos ratos não infectados (C), infectados com *Hymenolepis diminuta* aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento dos ratos aos 32 DAI com praziquantel. Barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupo de significância a 5% de probabilidade.

Quando as populações de MMC nas regiões da cripta e do vilo foram analisadas na unidade vilo-cripta (UVC), os dados do grupo infectado (I), mas não tratado com PZQ, foram semelhantes estatisticamente na primeira e na segunda semana (Tabela 4, Figuras 9 e 10). Mas, quando MMCs em apoptose foram considerados como uma porcentagem em relação ao número total de MMC (Figura 10), a fração da população em processo de apoptose aumentou de 1% no grupo controle do íleo para 2,5% no grupo infectado mas não tratado (I) e quase 3% para o grupo com uma semana de tratamento com PZQ (T1), e este aumento foi significativo em relação ao controle. A porcentagem de células em apoptose retornou ao normal na quarta semana após o tratamento. Cabe mencionar aqui que houve uma correlação positiva entre a contagem total de MMC com a contagem de MMC em apoptose observada nos animais examinados ($r = 0,9747$).

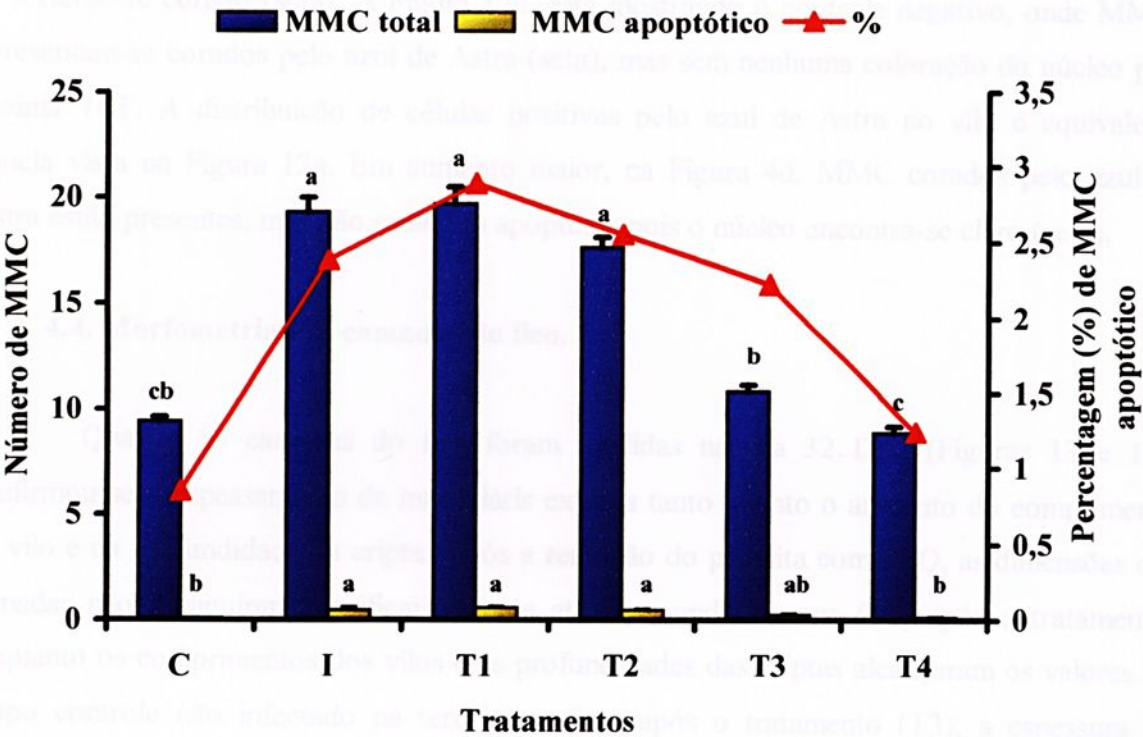


Figura 10: Número médio de MMC total e de MMC apoptótico e percentagens de MMCs apoptóticos em cada UVC do íleo de ratos não infectados (C), infectados com *Hymenolepis diminuta* (C) aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento dos ratos aos 32 DAI, com praziquantel. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

A ocorrência de núcleos de MMC com aparência de apoptose pela técnica da marcação *in situ* pela enzima TdT está evidenciada nas Figuras 11 e 12. Na Figura 11, evidencia-se: a) MMC com os grânulos citoplasmáticos corados em azul pelo azul de Astra e o núcleo corado em marrom pela reação da peroxidase/DAB, indicando MMC em apoptose, b) MMCs apenas corados pelo azul de Astra, mas não em apoptose (núcleos não corados na cor marrom) e, c) núcleos de outras células da lâmina própria também em processo de apoptose (núcleos fortemente corados em marrom). Na Figura 12, estão fotomicrografias de MMCs positivos em apoptose comparados com MMCs negativos, do controle negativo, ou seja, sem a presença da enzima TdT. Na Figura 12a, uma célula MMC (seta) e muitas outras células do epitélio da mucosa intestinal na ponta do vilo (cabeças de setas) estão em processo de apoptose. Este MMC em apoptose é também visto em aumento maior na Figura 12b, mostrando a diferença na coloração do citoplasma em relação ao núcleo, onde este encontra-se fortemente corado (seta). A Figura 12c, está mostrando o controle negativo, onde MMCs apresentam-se corados pelo azul de Astra (seta), mas sem nenhuma coloração do núcleo pela enzima TdT. A distribuição de células positivas pelo azul de Astra no vilo é equivalente àquela vista na Figura 12a. Em aumento maior, na Figura 4d, MMC corados pelo azul de Astra estão presentes, mas não estão em apoptose, pois o núcleo encontra-se claro (seta).

4.4. Morfometria das camadas do íleo.

Quando as camadas do íleo foram medidas no dia 32 DAI (Figuras 13 e 14), confirmou-se o espessamento da muscularis externa tanto quanto o aumento do comprimento do vilo e da profundidade da cripta. Após a remoção do parasita com PZQ, as dimensões das camadas não diminuíram significativamente até a segunda semana (T2) após o tratamento. Enquanto os comprimentos dos vilos e as profundidades das criptas alcançaram os valores do grupo controle não infectado na terceira semana após o tratamento (T3), a espessura da muscularis externa diminuiu abruptamente a partir da terceira semana (T3) e alcançou medidas semelhantes as do grupo controle não infectado na quarta semana (T4). A atrofia das camadas da mucosa ocorreu simultaneamente com a diminuição dos números de MMCs, enquanto, a muscularis externa demorou mais uma semana (Figuras 8 e 14).

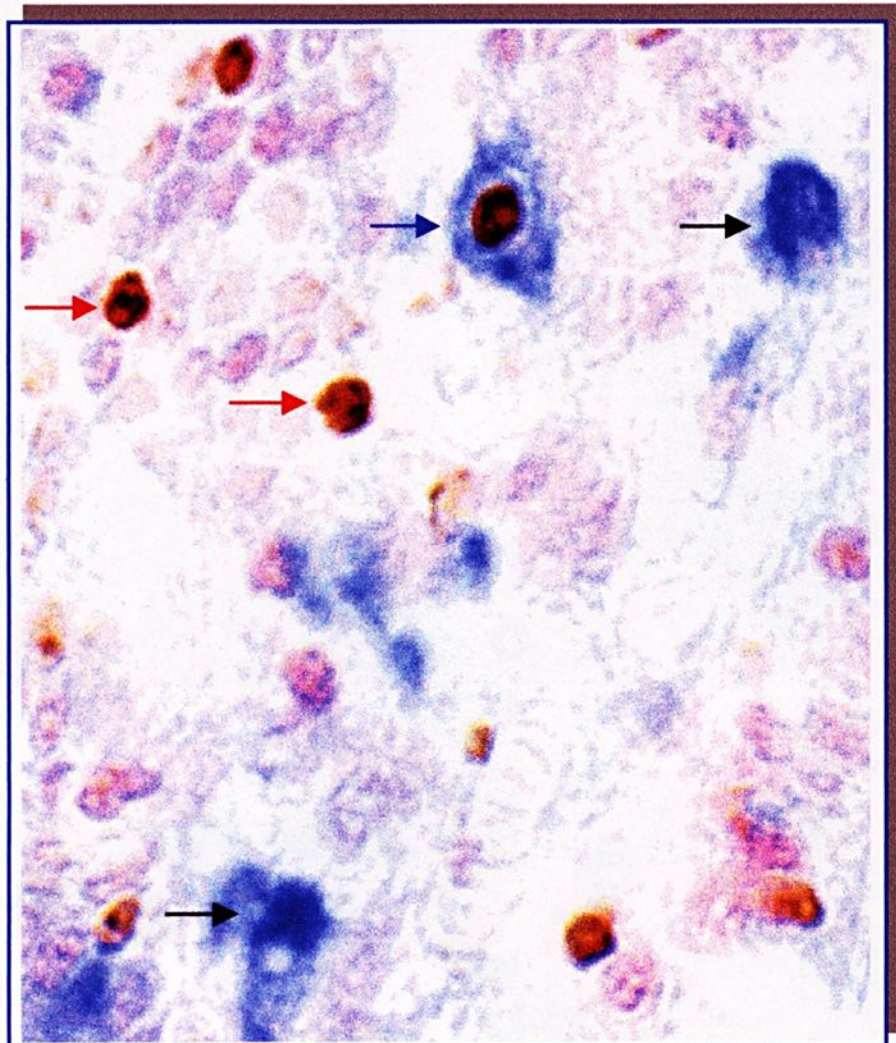


Figura 11: Fotomicrografia da lâmina própria (vilo) do íleo mostrando: um MMC apoptótico (seta azul) demonstrado pela técnica TUNEL (núcleo na cor marrom) e pela coloração histoquímica pelo azul de Astra (grânulos citoplasmáticos na cor azul) e outros MMCs não apoptóticos (setas pretas) corados apenas pelo azul de Astra. Nota-se que algumas células também encontram-se em apoptose (núcleos na cor marrom e setas vermelhas). Os demais núcleos encontram-se corados pelo “Nuclear Fast Red”.

Figura 12: Controle negativo demonstrado pela ausência de núcleos corados em qualquer célula, mas muitos AIFs encontram-se presentes na lâmina própria do centro do vilô (setas). A escala representa 50 μ m. Figura 13: Exemplo de um MMC não apoptótico não positivo para azul de Astra e o marca representa 10 μ m.

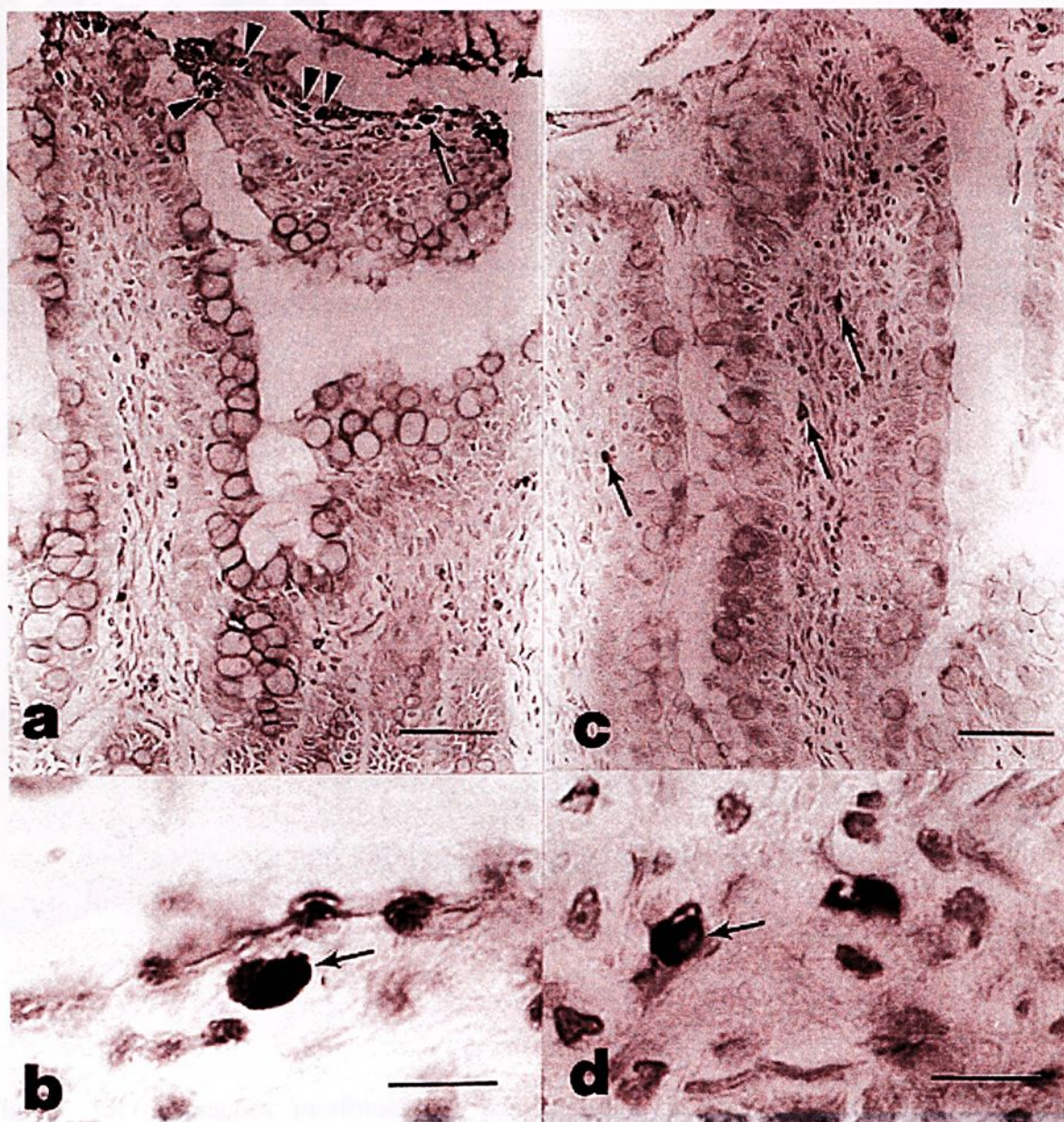


Figura 12a-d. Demonstração de MMC em apoptose. As secções teciduais destas figuras são da mucosa do íleo (vilo) colhidas aos 32 DAI da infecção por *Hymenolepis diminuta*. Figura 12a: indica as características da fragmentação do DNA pela presença do núcleo escuro. Tanto os núcleos (pontas de setas) dos enterócitos do epitélio como dos MMCs (setas) da lâmina própria estão em apoptose (a marca representa 50 μ m). Figura 12b: Maior aumento da Figura 12a e a marca representa 10 μ m. Figura 12c: Controle negativo demonstrado pela ausência de núcleos escuros em qualquer célula, mas muitos MMCs encontram-se presentes na lâmina própria do centro do vilo (setas). A marca representa 50 μ m. Figura 12d: Exemplo de um MMC não apoptótico mas positivo para azul de Astra e a marca representa 10 μ m.

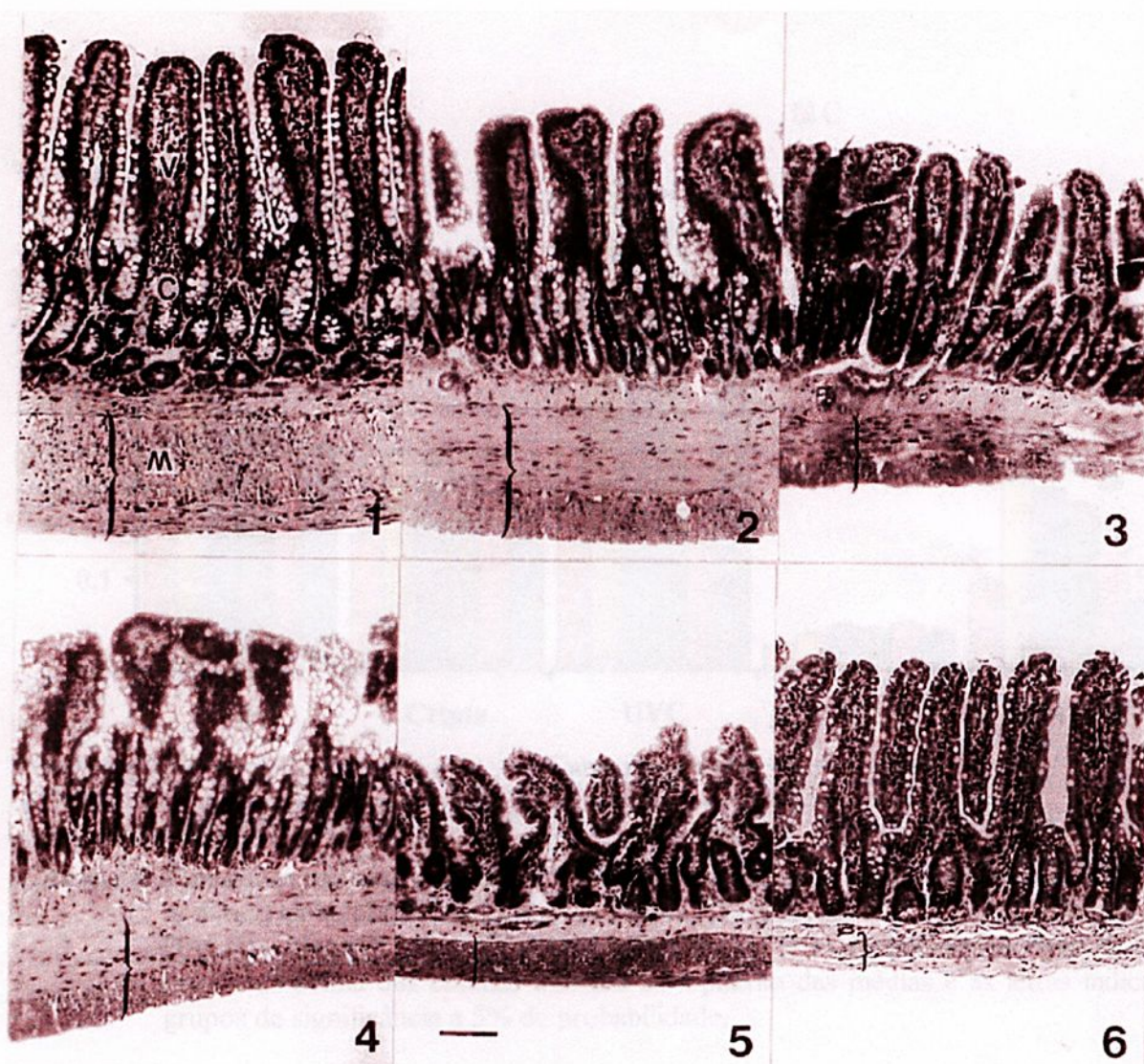


Figura 13: Alterações morfométricas nas camadas do íleo de ratos infectados com *Hymenolepis diminuta* antes e após a remoção do parasita pelo praziquantel. A fotomicrografia 1 representa o íleo aos 32 DAI. As fotomicrografias 2-5 representam o íleo, uma a quatro semanas (T1 a T4) após a remoção do parasita. A fotomicrografia 6 representa o íleo de um rato não infectado (controle). Após o tratamento com PZQ, o comprimento do vilo (V), a profundidade da cripta (C) e a espessura da muscularis externa (M e {) não alteraram estatisticamente na primeira e na segunda semana (T1 e T2), mas estas camadas diminuíram significativamente durante a terceira e a quarta semana (T3 e T4). As dimensões destas camadas retornam ao nível do controle (C) na quarta semana após o tratamento. Todas as secções foram coradas por H&E. A marca na foto 5 representada 100 μ m e é a mesma para todas as figuras.

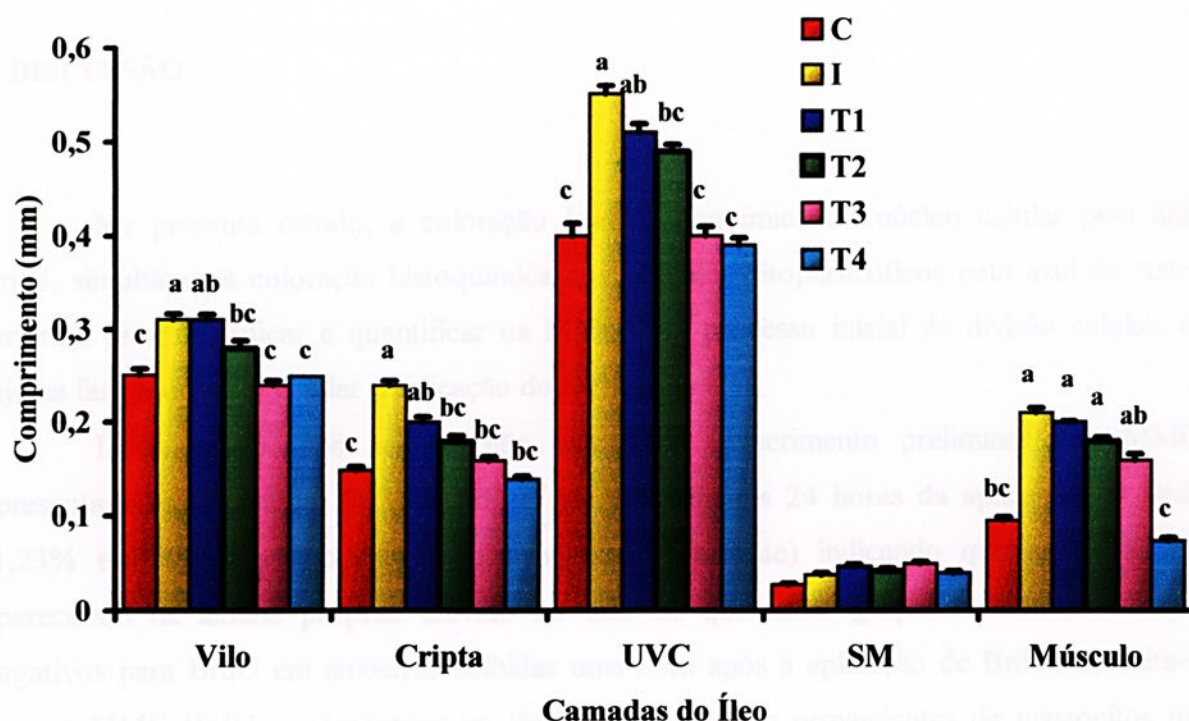


Figura 14: Dimensões das camadas do íleo realizadas antes e após a remoção de *Hymenolepis diminuta* pelo praziquantel nos dos ratos não infectados (C), infectados aos 32 DAI (I) e uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) semanas após o tratamento. As barras acima das colunas indicam erro padrão das médias e as letras indicam grupos de significância a 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a coloração imunohistoquímica do núcleo celular pelo anti-BrdU, simultânea à coloração histoquímica dos grânulos citoplasmáticos pelo azul de Astra, serviram para identificar e quantificar os MMCs em processo inicial de divisão celular, ou seja na fase S do ciclo celular (replicação do DNA).

Deste modo, nos animais não infectados (experimento preliminar), os MMCs apresentaram-se positivos (MMC BrdU+) já nas primeiras 24 horas da aplicação de BrdU (1,23% e 0,35% no duodeno e no íleo, respectivamente) indicando que novos MMCs apareceram na lâmina própria. Devido ao fato de que neste grupo, os MMCs estavam negativos para BrdU em amostras colhidas uma hora após a aplicação de BrdU, acredita-se que os MMC BrdU+ encontrados na lâmina própria eram provenientes de mastócitos que estavam proliferando e que poderiam ser derivados de precursores em divisão antes de entrarem e diferenciarem-se no intestino. Entretanto, devido ao pico de MMC BrdU+ ocorrer entre 48 e 72 horas, poderia representar o período médio e o tempo de trânsito de precursores migrando da medula óssea e/ou da corrente sangüínea para o intestino. Suportando esta idéia, KITAMURA e colaboradores estabeleceram em uma série de experimentos explorando camundongos geneticamente mutantes e deficientes em mastócitos e seus descendentes normais, que mastócitos eram células derivadas de precursores os quais originavam da medula óssea e migravam através da corrente sangüínea (KITAMURA et al., 1978; KITAMURA & GO, 1979; KITAMURA et al., 1979 e 1989).

Posteriormente, FRIEND et al. (1996) verificaram, em camundongos infectados com *T. spirallis*, um aumento da população de mastócitos na cripta e na base do vilo no estágio inicial na infecção, mas, à medida que a infecção progredia, o número destas células aumentava em torno de 25 vezes e atingia todo o vilo e a camada de tecido epitelial. Rapidamente após o pico, a população de MMC regredia progressivamente após a expulsão do parasita. Estas observações sugeriram que mastócitos provenientes de precursores migratórios ou presentes na lâmina própria migravam da cripta para o vilo e desapareciam, ou por envelhecimento e morte natural para em seguida serem perdidos para o lúmen, ou fagocitados pelas células fagocíticas presentes na lâmina própria, ou por perda de seus

grânulos e desta forma não mais identificáveis. Com relação ao parasita *H. diminuta*, os dados aqui apresentados mostraram que a lâmina própria do vilo foi o local com a maior concentração de MMC, sugerindo que esta migração da cripta para o vilo pode também ocorrer na infecção por este cestódeo.

SMITH & WEIS (1996) propuseram dois modelos para explicar o processo migratório de mastócitos para os tecidos apropriados: O primeiro modelo sugeriu que as células precursoras eram rapidamente removidas da corrente sangüínea e eram acumuladas em áreas definidas em função da atração exercida pelas citocinas presentes no local criando um microambiente favorável para a sobrevivência e a diferenciação dos mastócitos. O segundo modelo, sugeriu que a expressão seqüencial de moléculas de adesão sobre a superfície da célula poderia favorecer os mastócitos extravasarem da corrente sangüínea e migrarem para os tecidos apropriados após a interação específica de receptores, como acontece similarmente com linfócitos. Dentro destes tecidos, mastócitos poderiam maturar após sinais oriundos de citocinas e, sob apropriadas condições, proliferarem. Se este último modelo está correto, a alteração na expressão de receptores poderia permitir a mudança de mastócitos de um microambiente para outro, ocasionar mudanças no seu fenótipo mas não retornar à corrente sangüínea. Várias moléculas promovem o aumento da proliferação de mastócitos: IL-3, IL-4, IL-9; IL-10, NGF, mas outras como IFN- γ e TGF- β inibem a diferenciação e a proliferação (METCALFE, et al., 1996). As citocinas não foram avaliadas na presente pesquisa, mas é possível que citocinas como IL-3 e IL-4 podem ter sido sintetizadas por linfócitos Th em decorrência da infecção por *H. diminuta*.

Em ratos infectados com *H. diminuta* e mortos 72 horas após a injeção de BrdU, verificou-se um número baixo de MMC BrdU+/UVC entre os dias 0 e 15 após a infecção, mas entre os dias 15 e 32 este número aumentou abruptamente, pois 11,47% e 13,98% no duodeno e no íleo, respectivamente, eram MMCs BrdU+. Este aumento de MMC em divisão celular foi consistente com o aumento de MMC total na lâmina própria do intestino. Estes resultados indicaram que este cestódeo estritamente luminal foi capaz de estimular a migração e a diferenciação de precursores de mastócitos para o local infectado e também de ativar a proliferação de MMCs já presentes na mucosa. Similarmente, em infecção por nematódeos, ARIZONO et al. (1990) verificaram que quando os ratos eram infectados com *N. braziliensis*, grande proliferação de MMC acontecia entre o 13º e o 15º DAI no tecido pulmonar, neste período, 19% de MMCs estavam marcados com uma única injeção de BrdU. Mas, aos 21 DAI, a população aumentada de MMC retornava ao normal, sugerindo que a maioria de MMC proliferava rapidamente na mucosa durante um curto período de tempo. Os dados aqui

apresentados, mostraram que nos animais controles, foi necessário mais do que apenas uma hora para os precursores de MMCs entrarem e diferenciarem-se no intestino, já nos animais infectados com *H. diminuta*, este tempo foi menor, pois 0,6% a 0,8% destas células encontravam-se marcadas pelo BrdU uma hora após a injeção desta substância, sugerindo que nos animais infectados, as células presentes na mucosa intestinal também foram capazes de entrar na fase S do ciclo celular. KASUGAI et al. (1995) com o objetivo de pesquisar os precursores de mastócitos obtiveram células mononucleadas da medula óssea, do sangue periférico e do intestino delgado de ratos infectados ou não com *N. brasiliensis*. Estas células foram cultivadas em metilcelulose e definidas como mastócito-CFU, ou seja, unidade de formação de colônia. Desta forma, os autores determinaram a concentração de mastócito-CFU e verificaram uma semana após a infecção que: a) não houve alteração na população destas células na medula óssea, b) houve redução de 21% no sangue e, c) houve aumento de até sete vezes no intestino delgado. Da mesma forma, a proporção de mastócito-CFU na fase S do ciclo celular permaneceu em baixos níveis na medula óssea e no sangue após a infecção, mas aumentou significativamente no intestino delgado. Concordantes com a presente pesquisa, este estudo sugeriu que *N. brasiliensis* induziu a invasão de precursores de mastócitos do sangue e subsequente proliferação dos mesmos no intestino.

Da mesma forma, em ratos infectados com *H. diminuta*, foi observada uma hiperplasia de MMC na mucosa do duodeno e do íleo, na cripta e no vilo. O número destas células começou a elevar-se a partir de 15 DAI e foi aumentando até atingir o pico aos 32 DAI, principalmente no íleo. Estes dados de hiperplasia de mastócitos foram concordantes com os resultados de DWINELL et al. (1998). No entanto, DWINELL et al. (1988), devido às diferenças temporais entre o aparecimento da mastocitose e as alterações morfológicas da parede intestinal, sugeriram que os mastócitos não eram responsáveis pelas alterações na contratilidade mioelétrica intestinal anteriormente observada aos 8 DAI, pelo espessamento da musculatura lisa (hipertrofia muscular) e nem pela alterações na profundidade da cripta aos 20 DAI. Em outro estudo com *H. diminuta*, HINDSBO et al. (1982) identificaram hiperplasia de MMC em ratos infectados e confirmaram que o cestódeo poderia induzir uma resposta imune tanto celular quanto humoral. Entretanto, FEATHERSTON et al. (1992) verificaram que apesar da infecção por *H. diminuta* provocar hiperplasia de MMC ao redor de 30 a 60 DAI, os níveis de RMCP II no soro dos animais não estavam elevados, sugerindo que estas células poderiam não estar participando diretamente das alterações mioelétricas entéricas observadas por DWINELL et al. (1994 e 1995). Este dados podem inferir, no entanto, que mastócitos, além das funções bem conhecidas como potentes mediadores inflamatórios,

estariam exercendo também atividades moduladoras da infecção. Além disso, as alterações mioelétricas ocorridas em ratos normais não infectados, desencadeadas por infusão intraluminal de frações homogeneizadas de *H. diminuta* sugeriram que o cestódeo poderia ser capaz de modular diretamente a resposta do hospedeiro sintetizando e liberando substâncias no lúmen intestinal (DWINELL et al., 1998).

Desta maneira, o cestódeo *H. diminuta*, na cepa de ratos usada neste trabalho, causou uma infecção crônica e não foi expulso pelo hospedeiro como normalmente ocorre com outros parasitas gastrintestinais, demonstrando que MMC não contribuiu para este fato. Entretanto, o cestódeo ocupa uma grande extensão do lúmen intestinal, ou seja, aproximadamente 1% do peso vivo do hospedeiro (ROBERTS, 1961) e pode estar associado com obstruções intestinais e/ou lesões traumáticas. No entanto, apesar das alterações da contratilidade intestinal observada por DWINELL et al. (1994 e 1995) não serem suficientes para expelir o parasita, os cestódeos encontravam-se em grandes dimensões e o número de MMC encontrava-se aumentado até quatro vezes aos 32 DAI quando comparado com o grupo controle. É interessante notar que esta infecção por *H. diminuta* é de caráter crônico, onde os ratos vivem em boas condições de saúde e ganham peso, indicando um processo adaptativo à infecção. KEVIN & WALLACE (1996) demonstraram que à medida que os antígenos de parasitas eram sendo administrados em quantidades crescentes ou em repetidas doses, havia uma diminuição na liberação de RMCP-II, mas sem ocorrer uma diminuição na população de mastócitos no intestino. Os autores sugeriram que isto poderia representar uma resposta adaptativa para minimizar os efeitos deletérios à repetitiva exposição do sistema imune aos antígenos. Esta adaptação poderia ocorrer ao nível de mastócitos, porque os MMCs respondiam ao desafio com anti-IgE sugerindo um processo adaptativo aos antígenos sensibilizantes. Sabe-se que mastócitos atuam como fonte de citocinas, com IL-3, GM-CSF, IL-4 e IL-5 que apresentam importantes funções na regulação da hematopoiese, produção de anticorpo e eosinofilia (MARSHALL & BIENENSTOCK, 1990). Mastócitos, por outro lado, interagem com outras células, intensificando a proliferação, a diferenciação e a secreção destas citocinas (ENERBACK & NORRBY, 1990). GALLI (1990) discutiu importantes aspectos acerca da regulação microambiental no desenvolvimento da mastocitose. De acordo com este autor, os processos inflamatórios e imunológicos poderiam induzir alterações transitórias no microambiente e afetar as respostas dos mastócitos residentes na área afetada. Em certos microambientes, como os locais da inflamação contendo grande número de eosinófilos, poderia também conter alta concentração de moléculas (p.ex. IgE e antígenos específicos) suficiente para alterar o fenótipo celular como consequência da indução da

degranulação de mastócitos.

O número de mastócitos nos tecidos é constante sob condições normais (GARRIGA et al.,1988). No entanto, durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta, a manutenção da homeostasia do sistema celular é conseguido pelo balanço entre a taxa de proliferação e a perda celular. A perda celular muitas vezes ocorre em determinadas condições pelo processo de morte celular programada ou apoptose (KERR et al., 1972). Devido ao fato de que mastócito reside principalmente em tecidos extravasculares, é razoável assumir que a regulação de sua população pode estar relacionada ao controle local de proliferação e/ou apoptose. Na presente pesquisa, como já foi discutido anteriormente, existe na mucosa intestinal de ratos uma população constante de mastócitos, porém, induzida pela infecção pelo *H. diminuta*, esta população dobra no duodeno e no íleo aos 32 DAI. No entanto, quando o anti-helmintico PZQ, específico para cestódeo, foi administrado nos ratos infectados aos 32 DAI, ocorreu principalmente no vilo do íleo uma redução leve na segunda semana após a medicação, mas bastante acentuada na terceira, alcançando o nível do controle não infectado na quarta semana. Desta forma, observou-se após a remoção do parasita um controle e uma recuperação do índice populacional normal de MMC na mucosa intestinal. Partindo-se da hipótese de que esta regressão no número de mastócitos poderia ser em decorrência do processo de apoptose no próprio local da mucosa intestinal, o presente experimento foi conduzido para se testar esta hipótese. Desta forma utilizou-se do método de GAVRIELI et al. (1992) para a marcação *in situ* de DNA fragmentado, para identificar MMC em processo de apoptose. Os resultados aqui apresentados mostraram que havia um nível basal de 1% de MMC em apoptose em relação ao total de MMC identificados nos animais controles não infectados. Esta taxa de apoptose nos animais não infectados representa um controle natural da proliferação celular ou da entrada de precursores de MMCs para dentro da mucosa do íleo provenientes da corrente sangüínea para a manutenção da homeostasia tecidual. Verificou-se no presente trabalho, que na UVC esta taxa aumentou de 1% de MMC em apoptose (grupo controle) para 3% aos 32 DAI. Apesar de que, em relação ao grupo controle, enquanto o número total de MMC apenas dobrou (9,42 para 19,32), o aumento de MMC em apoptose, embora numericamente bastante baixo (0,08 para 0,46), foi superior a 400%. Entretanto, estes dados sugeriram que durante a infecção provocada por este cestódeo, embora a taxa de apoptose esteve aumentada, o influxo de precursores de MMC da corrente sangüínea ou a proliferação dos já existentes excederam à taxa de apoptose. Desta forma, elaborou-se a hipótese que este desequilíbrio entre a entrada de precursores de MMC para o íleo e o aumento do número de células em apoptose era responsável pela hiperplasia de MMC

e isto poderia ser a base para a resposta mastocística do hospedeiro na prevenção parasitária. O aumento na taxa apoptótica observada neste trabalho aos 32 DAI pode estar relacionado ao aumento do fluxo de precursores de MMC ou às mitoses de MMC nos tecidos do íleo, o que permitiu a ocorrência de uma elevação não muito acentuada no número de MMC entre o 21º e o 32º após a infecção, como verificado por DWINELL et al.(1998).

Durante a infecção aumenta a taxa de MMC em apoptose tanto quanto aumenta o número de MMC na mucosa e na submucosa, mas não na muscularis externa do intestino. Dentro da mucosa do íleo, aos 32 DAI, as maiores alterações no número de MMC total e no número de MMC em apoptose foram observadas no vilo e não na cripta. FRIEND et al. (1996) mostraram uma distribuição similar de MMC ocorrida na infecção por *T. spirallis* relacionada à entrada de MMC imaturos para dentro da mucosa via vasos sanguíneos localizados na cripta, com diferenciação do fenótipo destes novos MMC e subsequente migração para dentro do vilo. Consistente com os dados do presente trabalho, FRIEND et al. (1996) também verificaram índices superiores de apoptose no vilo em relação à cripta. Desta forma, é possível que a apoptose compensa a aumentada taxa de migração e o acúmulo de MMC para dentro do vilo.

A diminuição da população total de MMC após a remoção do cestódeo *H. diminuta* não foi imediata. No vilo, a população de MMC permaneceu inalterada na primeira e na segunda semana após o tratamento, com números bastante semelhantes aos do controle infectado mas não tratado. Ao contrário, o número de MMC na cripta de ratos infectados, não aumentou suficientemente para atingir níveis superiores aos do controle durante todos os períodos analisados, mas caiu para níveis abaixo do controle na terceira e na quarta semana, após o tratamento com PZQ. Comparando-se estes dados com a apoptose, a taxa de MMC em apoptose não caiu para valores próximos do controle até quatro semanas após, enquanto a taxa de apoptose na cripta caiu para níveis indetectáveis na terceira e na quarta semana. A taxa de apoptose declinou com a queda do número de MMC total em ambas as regiões da mucosa sugerindo que o influxo e a divisão mitótica de MMC precursores também diminuiu. O lento declínio da taxa de apoptose na remoção do parasita sugere que apoptose pode ser um importante componente no mecanismo da depressão da regulação da mastocitose. Vale ressaltar aqui que houve uma correlação positiva entre o número total de MMC e o número de MMC em apoptose: a elevação e a diminuição na taxa de MMC em processo de morte celular programada coincidiu com a elevação e a diminuição no número de MMC em ambas as regiões do tecido conjuntivo da mucosa.

Apoptose é um processo programado de morte celular controlado geneticamente e

bioquimicamente o qual pode ser iniciado ou inibido por uma variedade de estímulos fisiológicos e patológicos. Este processo envolve a retração e a diminuição do volume da célula e do núcleo, com a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. A consequência deste processo é a transformação de células apoptóticas em “corpos apoptóticos”, que em animais vertebrados, são rapidamente fagocitados pelas células mononucleadas fagocíticas, células epiteliais ou outras (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). As características morfológicas, como descritas acima, são somente visualizadas à microscopia eletrônica, mas no presente trabalho, esta técnica não foi utilizada.

Através de investigações recentes sobre os mecanismos controladores da manutenção do número normal de MMC sob condições homeostáticas ou patológicas ficou estabelecido que o processo de apoptose em mastócitos é regulado por citocinas. A IL-3, produzida por linfócitos T e também por mastócitos, parece ter um importante papel na proliferação destas células (IHLE et al., 1983; KIRSHENBAUM et al., 1989; RAZIN et al., 1984) enquanto SCF produzida por fibroblastos e queratócitos pode servir como fator de diferenciação e maturação (ANDERSON et al., 1990; WELKER et al., 1995). MEKORI et al. (1993) demonstraram que mastócitos de medula óssea em cultura, sofriam apoptose quando IL-3 era retirada. Entretanto, este processo era inibido quando SCF era adicionado no meio de cultura. As observações “*in vivo*”, no presente trabalho e as de DWINELL et al. (1998) sugerem que este parasita ativa a hematopoiese de mastócitos da medula óssea e este mesmo sistema é deprimido após a remoção do cestódeo com o anti-helmíntico. O aumento populacional de MMC intra-ileal durante a fase crônica da infecção pelo cestódeo é consistente com o aumento da produção de citocina, particularmente, IL-3. Entretanto, o aumento da taxa de apoptose sugere uma diminuição local na concentração desta citocina, pois sabe-se que mastócitos sofrem apoptose quando IL-3 é retirada do meio de cultura (MEKORI et al., 1993) coincidentemente com a diminuição da expressão do gen *bcl-2* relacionado com a sobrevivência da célula (POTTEN, 1997). Como a presença de SCF não está diretamente relacionada com a indução da expressão do gene *bcl-2*, acredita-se que outros mecanismos regulatórios na tradução de sinais intracelulares possam estar envolvidos no processo de bloqueio da apoptose de mastócitos pela SCF, na ausência de IL-3 (WELHAM & SCHRADER, 1992). Além disso, a apoptose destas células pode ser regulada também pela ação de outras citocinas; TNF- β 1, por exemplo, inibe o efeito de SCF na ausência mas não na presença de IL-3 (MEKORI & METCALFE, 1994). Desta forma, é possível que TNF- β 1 e outras citocinas adicionais podem ter um importante papel na regulação do número de mastócitos nos tecidos inflamados sem a necessidade de alterar o número de precursores

provenientes da medula óssea e dos vasos sangüíneos e linfáticos (METCALFE et al., 1997).

Devido ao fato da mastocitose estar classicamente associada às infecções helmíticas entéricas, os MMCs são classificados como células efetoras na resposta imune a estes parasitas (JARRETT & MILLER, 1982). Por outro lado, mastócitos podem ser capazes de estimular a hipertrofia de musculatura lisa intestinal (OWENS & GRISHAM, 1993). Levando em conta, a relação cestódeo/hospedeiro, MMC pode ter um importante papel nas alterações morfológicas da mucosa do íleo e da muscularis externa os quais podem ocorrer durante a infecção. DWINELL et al. (1998) mostraram que durante a infecção por *H. diminuta*, a hipertrofia do músculo e o aumento da profundidade da cripta ocorriam já aos 17 DAI, entretanto, a remoção do cestódeo pelo PZQ, na presente pesquisa, causou uma involução nas dimensões da mucosa e da muscularis externa simultaneamente com a diminuição da população de MMC. De acordo com KERR et al. (1972) and WYLLIE et al. (1980), a apoptose pode estar relacionada com a involução e a atrofia de vários tecidos e órgãos. A ativação e a depressão da mastocitose podem estar envolvidas na remodelação e na plasticidade do tecido entérico que ocorre durante e após a infecção por *H. diminuta*. No entanto, os mecanismos fisiológicos mediadores destas alterações não estão ainda verdadeiramente entendidos e necessitam maiores estudos.

Além disso, DWINELL et al. (1994) verificaram alterações nas atividades mioelétricas do intestino delgado, principalmente do íleo, que iniciavam-se a partir do 8º DAI e continuava por todo o período da infecção. No entanto, quando o parasita era removido do intestino pelo PZQ, as atividades mioelétricas retornavam ao normal (DWINELL et al., 1995). Os dados de DWINELL et al. (1994 e 1995) da abolição das atividades mioelétricas alteradas e da regressão da hiperplasia de mastócitos e das dimensões das camadas do intestino delgado, no presente trabalho, podem significar que a falta de mediadores de MMC, em função desta regressão da hiperplasia, poderia contribuir para que as funções intestinais retornassem à normalidade após a remoção do parasita. Cabe ressaltar aqui também, que em infecções intestinais por nematódeos, geralmente acontece uma atrofia do vilo e uma hiperplasia da cripta (PERDUE et al., 1989 e HYOH et al., 1999). No presente trabalho, o cestódeo induziu hiperplasia tanto do vilo quanto da cripta, como pode ser constatado pelas dimensões aumentadas, significativamente, destas duas regiões. Além disso, HYOH et al. (1999) verificaram elevado número de células epiteliais do vilo em apoptose e intensa proliferação celular na cripta para compensar a perda celular do vilo. Os mecanismos pelos quais isto acontece não foi esclarecido neste trabalho e os autores não associaram os efeitos de mediadores de mastócitos às estas alterações.

Uma função adicional, mas também importante de MMC, seria a regulação do sistema nervoso entérico (BIENENSTOCK et al., 1991). MASSON et al. (1996) mostraram uma sensibilidade reduzida aos produtos neuroquímicos e a redução da liberação/produção destas substâncias após a expulsão de *N. brasiliensis*, sugerindo que o parasita pode ativar os mecanismos dos hospedeiros para prevenção dos efeitos deletérios da contínua ativação do sistema imune, como em uma infecção crônica. Esta interação é conhecida ter importante papel nas respostas funcionais entéricas às infecções por nematódeos (ARIZONO et al., 1990) e pode também ter importante papel na manutenção da homeostasia dentro dos tecidos normais (MARSHALL & BIENENSTOCK, 1990) e nas infecções por cestódeos (DWINELL et al., 1998) e na presente pesquisa.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENBORG, F.; ENERBACK, L. Histamine content and mast cell numbers in tissues of mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Agents Actions*, v.17, p.454-9, 1985.

6. CONCLUSÕES

Os dados da presente pesquisa permitiram as seguintes conclusões:

6.1. A infecção pelo cestódeo *H. diminuta* é capaz de estimular a migração de precursores MMC da corrente sanguínea e/ou medula óssea para a lâmina própria ou estimular a proliferação de MMC no local do parasitismo, principalmente aos 32 DAI.

6.2. Após a remoção química do parasita *H. diminuta*, a apoptose ocorreu como um mecanismo da regressão da hiperplasia de mastócitos.

6.3. Após a remoção química do parasita *H. diminuta*, ocorreu uma atrofia das camadas do íleo, retornando às dimensões dos animais do grupo controle.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDENBORG, F.; ENERBACK, L. Histamine content and mast cell numbers in tissues of normal and athymic rats. **Agents Actions**, v.17, p.454-9, 1985.

ANDERSON, D.M.; LYMAN, S.D.; BAIRD, A.; WIGNALL, J.M.; EISENMAN, J.; RAUCH, C.; MARCH, C.J.; BOSWELL, H.S.; GIMPEL, S.D.; COSMAN, D.; WILLIAMS, D.E. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. **Cell**, Cambridge, v. 63, p.235-243, 1990.

ARIZONO, N.; KORETO, O.; NAKAO, S.; IWAI Y.; KUSHIMA, R.; TAKEOKA, O. Phenotypic changes in mast cells proliferating in the rat lung following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 54, p.1-7, 1987.

ARIZONO, N.; NAKAO, S. Kinetics and staining properties of mast cells proliferating in rat small intestine tunica muscularis and subserosa following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. **APMIS**, Copenhagen, v.96, p.964-970, 1988.

ARIZONO, N.; SHIOTA, T.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, Y.; YOSHIKAWA, H.; MATSUDA, S; TEGOSHI, T. Bromodeoxyuridine labeling studies on the proliferation of intestinal mucosal mast cells in normal and athymic rats. **APMIS**, Copenhagen, v.98, p.369-376, 1990.

BACH, M.K. Mediators of anaphylaxis and inflammation. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.36, p.371-413, 1982.

BARRIGA, O.O.; MYSER, W.C. Effects of irradiation on the biology of the infective larvae of *Toxocara canis* in the mouse. **Journal Parasitology**, Lancaster, v.73, n.1, p.89-94, 1987.

BEFUS, A.D.; BIENENSTOCK, J. Immunologically mediated intestinal mastocytosis in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. **Immunology**, Oxford, v.38, p.95-101, 1979.

BEHNKE, J.M.; WAHID, F.N.; GRENCIS, R.K. Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): downregulation of

specific cytokine secretion (IL-9 and IL-10) correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms. **Parasite Immunology**, Oxford, v.15, p.415-421, 1993.

BIENENSTOCK, J. Cellular communication networks. Implications for our understanding of gastrointestinal physiology. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.664, p.1-9, 1992.

BIENENSTOCK, J.; MACQUEEN, G.; SESTINI, P.; MARSHALL, J.S.; STEAD, R.H.; PERDUE, M. H. Mast cell/nerve interactions *in vitro* and *in vivo*. **American Review Respiratory Disease**, New York, v. 143, n.3 pt 2, p.S55-S58, 1991.

BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Critical Reviews Immunology**, Boca Raton, v.17, n.1, p.1-32, 1997.

BURKS, T.F. Actions of drugs on gastrointestinal motility. In: JOHNSON, L.R. (Ed.) **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven, 1981. p.495-516.

CASTRO, G. A. Immunophysiology of enteric parasitism. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.5, p.11-19, 1989.

CASTRO, G. A. Intestinal physiology in the parasitized host: integration, disintegration, and reconstruction of system. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.664, p.369-379, 1992.

CASTRO, G. A.; ARNTZEN, C. Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system. **American Journal Physiology**, Baltimore, v.265, p.G599-G610, 1993.

CASTRO, G. A.; HARARI, Y.; RUSSELL, D. Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.253, p.540-548, 1987.

CAPRON, M.; ROUSSEAUX, J.; MAZINGUE, C.; BAZIN, H.; CAPRON, A. Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to *Schistosoma mansoni*

shistosomula. **Journal Immunology**, Baltimore, v.121, p.2518-2525, 1978.

CHAPPELL, L. H.; ARARI, H. P.; DIKE, S. C.; READ, C. P. Cicardian migration of *Hymenolepis* (Cestoda) in the intestine-I. Observations on *Hymenolepis diminuta* in rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Elmsford, v.34, p.31-46, 1970.

CHEN, Z.; IRARI, A.A.; BRADFORD, T.R.; CRAIG, S.S.; NEWLANDS, G.; MILLER, H.; HUFF, T.; SIMMONS, W.H.; SCHWARTZ, L.B. Localization of rat tryptase to a subset of the connective tissue type of mast cell. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, Baltimore, v.41, n.7, p.961-969, 1993.

CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSE, J. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. **Parasitology**, Cambridge, v.120, p.S25-42, 2000.

COOKE, H.J.; CAREY, H.V. The effects of cisapride on serotonin-evoked mucosal responses in guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v.98, n.1, p.147-148, 1984.

COOKE, H.; NEMETH, P.R.; WOOD, J.D. histamine action on guinea pig ileal mucosa. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 246, p. G372-G377, 1984.

CROFT, M.; SWAIN, S.L. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. **Journal Immunology**, Bethesda, v.154, p.4269, 1995.

CUMMINS, A.G.; MUNRO, G.H.; MILLER, H.R.; FERGUSON, A. Association of maturation of the small intestine at weaning with mucosal mast cell activation in the rat. **Immunology Cell Biology**, Adelaide, v.66, p.417-422, 1988.

CUTHBERT, A.W.; MARGOLIUS, H. S. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. **British Journal Pharmacology**, London, v.75, n.4, p.587-98, 1982.

DWINELL, M. B.; BASS, P.; OAKS, J. A. Intestinal myoelectric alterations in rats chronically

infected with the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. **American Journal Physiology: Gastro. Liver Physiology**, Bethesda, v.267, p.G851-8, 1994.

DWINELL, M. B.; BASS, P.; OAKS, J. A. Praziquantel treatment normalizes intestinal myoelectric alterations associated with *Hymenolopis diminuta* -infected rats. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v.8, p.979-984, 1995.

DWINELL, M.B.; BASS, P.; SCHAEFER, D.M.; OAKS, J.A. Diminished intestinal transit and decreased aerobic bacterial populations in tapeworm infected rats. **American Journal of Physiology: Gastro, Liver Physiology**, Betheda, v.373, p.G480-G485, 1997.

DWINELL, M.B.; BASS, P.; WISE, R.M.; OAKS, J.A. Mucosal mastocytosis and intestinal smooth muscle hypertrophy in tapeworm infected rats. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.89, p.92-102, 1998.

ENERBACK, L.; NORRBY, K. The mast cells. **Current Topics Pathology**, Berlin, v.79, p.169-204, 1990.

ERLICH, P. Contribution to the theory and practice of histological staining. In: HIMMELWEIT, R. (Ed.). **The collected papers of Paul Erlich**. New York: Pergamon Press, 1979, p. 65-98.

FEATHERSTON, D. W.; COPEMAN, C. N. Mucosal mast cells in Sprague-Dawley rats infected with *Hymenolepis diminuta* tapeworms. **International Journal for Parasitology**, Elmsford v.20, p.401-403, 1990

FEATHERSTON, D. W.; WALKELIN, D.; LAMMAS, A. Inflammatory responses in the intestine during tapeworm infections, mucosal mast cells and mucosal mast cell protease in Sprague-Dawley rats infected with *Hymenolepis diminuta*. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v. 22, p.961-966, 1992.

FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Interferon- γ regulates the isotypes of immunoglobulin secreted during in vivo humoral immune response. **Journal Immunology**, Baltimore, v.140, p.1022, 1988.

FINKELMAN, F.D.; MORRIS, S.C.; OREKHOVA, T.; MORI, M.; DONALDSON, D.; REINER, S.L.; REILLY, N.L.; SCHOPF, L.; URBAN, J.F.Jr. Stat6 regulation of *in vivo* IL-4 responses. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.164, p.2303-2310, 2000.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A., MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN, J.F.Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodents models. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.15, p.505-533, 1997.

FRIELING, T.; COOKE, H.J.; WOOD, J.D. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen. **American Journal Physiology**, Bethesda, v.267, p.G1087-G1093, 1994.

FRIEND, D.S.; GHILDYAL, N.; AUSTEN, K.F.; GURISH, M.F.; MATSUMOTO, R. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spirallis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.135, p.279-290, 1996.

FRIEND, D.S.; GURISH, M.F.; AUSTEN, K.F.; HUNT, J.; STEVENS, R.L. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocate to the spleen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.165, p.344-352, 2000.

FRIEND, D.S.; GURISH, M.F.; AUSTEN, K.F.; HUNT, J.; STEVENS, R.L. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocate to the spleen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.165, p.344-352, 2000.

GALLI, S. J. New insignia into "the riddle of the mast cells": Microenvironment regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v.62, p.5-33, 1990.

GALLI, S.J.; TSAI, M.; WERSHIL, B.K.; TAM, S.-Y.; COSTA, J.J. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the

c-kit receptor. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.107, p.51-53, 1995.

GARRIGA, M.M.; FRIEDMAN, M.; METCALFE, D.D. A survey of the number and distribution of mast cells in the skin of patients with mast cell disorders. **Journal Allergy Clinical Immunology**, St. Louis, v.82, p. 425-430, 1988.

GARSIDE, P.; GRENCIS, R.K.; MOWAT, A.M. T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v.14, n.2, p.217-225, 1992.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.119, p.493-501, 1992.

GOLSTEIN P. Cell death: TRAIL and its receptors. **Current Biology**, London, v. 7, n.12, p.R750-R753, 1997.

GORDON, J.R.; BURD, P.R.; GALLI, S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunology Today**, Cambridge, v.11, p.458-464, 1990.

HARARI, Y.; RUSSELL, D.A.; CASTRO, G.A. Anaphylaxis-mediated epithelial CI-secretion and parasite rejection in rat intestine. **Journal Immunology**, Bethesda, v.138, p.1250-1255, 1987.

HINDSBO, O.; ANDREASSEN, J.; RUITENBERG, J. Immunological and histopathological reactions of the rat against the tapeworm *Hymenolepis diminuta* and the effects of anti-thymocyte serum. **Parasite Immunology**, Oxford, v.4, p.59-76, 1982.

HOGABOAM, C.; BEFUS, A.D.; WALLACE, J.L. Modulation of rat mast cell reactivity by IL-1 beta. Divergent effects on nitric oxide and platelet-activating factor release. **Journal Immunology**, Bethesda, v.151, n.7, p.3767-3774, 1993a.

HOGABOAM, C.M.; BISSONNETTE, E.Y.; CHIN, B.C.; BEFUS, A.D.; WALLACE, J.L.

Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.104, n.1, p.122-129, 1993b.

HOPKINS, C. A. Diurnal movement of *Hymenolepis diminuta* in the rat. **Parasitology**, Cambridge, v.60, p.255-271, 1970.

HYOH, Y.; NISHIDA, M.; TEGOSHI, T.; YAMADA, M.; UCHIKAWA, R.; MATSUDA, S.; ARIZONO, N. Enhancement of apoptosis with loss of cellular adherence in the villus epithelium of the small intestine after infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, p. 199-207, 1999.

IHLE, J.N.; KELLER, J.; OEROSZLAN, S.; HENDERSON, L.E.; COPELAND, T.D.; FITCH, F.; PRYSTOWSKY, M.B.; GOLDWASSER, E.; SCHRADER, J.W.; PALASZYNSKI, E.; DY, M.; LEBEL, B. Biologic properties of homogenous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth-factor activity, mast cell growth-factor activity, P cell-stimulating factor activity and histamine-producing factor activity. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.131, p.282-287, 1983.

IRANI, A.M.A.; BRADFORD, T.R.; KEPLEY, C.L.; SCHECHTER, N.M.; SCHWARTZ, L.B. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-trypase and anti-chymase antibodies. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 37, p. 1509-1515, 1989.

JARRETT, E.E.E.; MILLER, H.R.P. Production and activities of IgE in helminth infection. **Progress in Immunology**, v.31, p.178-233, 1982.

KAPLAN, M.H.; SCHINDLER, U.; SMILE, S.; GRUSBY, M. Stat6 is required for mediating response to IL-4 and for development of Th2 cells. **Immunity**, Cambridge, v.4, p.313, 1996.

KASUGAI, T.; TEI, H.; OKADA, M.; HIROTA, S.; MORIMOTO, M.; YAMADA, M.; NAKAMA, A.; ARIZONO, N.; KITAMURA, Y. Infection with *Nippostrongylus brasiliensis* induces invasion of mast cell precursors from peripheral blood to small intestine. **Blood**, Washington, v.85, p.1334-1340, 1995.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.26, p.239-257, 1972.

KEVIN, P. R.; WALLACE, J. L. Long-term antigen challenge results in progressively diminished mucosal mast cell degranulation in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.111, p.1516-1523, 1996.

KING, S.J.; MILLER, H.R. Anaphylactic release of mucosal mast cell protease and its relationship to gut permeability in *Nippostrongylus*-primed rats. **Immunology**, Oxford, v.51, n.4, p.653-660, 1984.

KIRSHENBAUM, A.S.; GOFF, P.; DRESKIN, S.C.; IRANI, A.M.; SCHWARTZ, L.B. IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mast-like cells from human bone marrow. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.142, p.2424-2429, 1989.

KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.7, p.59-76, 1989.

KITAMURA, Y., GO, S. Decreased production of mast cells in Sl/Sl^d anemic mice. **Blood**, Washington, v.53, p.492-497, 1979.

KITAMURA, Y.; GO, S.; HATANAKA, S. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. **Blood**, Washington, v.52, p.447-452, 1978.

KITAMURA, Y.; HATANAKA, K.; MURAKAMI, M.; SHIBATA, H. Presence of mast cell precursors in peripheral blood of mice demonstrated by parabiosis. 1979. **Blood**, Washington, v.53, p.1085-1088, 1979.

KOTANIDES, H.; REICH, N.C. Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p. 25555-25561, 1996.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4) producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.172, p.921, 1990.

LEE, G.B.; OGILVIE, B.M. The intestinal mucus barrier to parasites and bacteria. **Advanced Experimental Medical Biology**, v.144, p.247-248, 1982

LOCKSLEY, R.M.; REINER, S.L. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.13, p.151, 1995.

LOWENTHAL, J.W.; RANSOM, J.; HOWARD, M.; ZLOTNIK, A. Up-regulation of interleukin 4 receptor expression on immature (Lyt-2-/L3T4-) thymocytes. **Journal Immunology**, Baltimore, v.140, n.2, p.474-478, 1988.

MADDEN, K.B.; URBAN, J.F.Jr.; ZILTENER, H.J.; SCHRADER, J.W.; FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. **Journal Immunology**, Bethesda, v.147, p.1387-1391, 1991.

MARHSALL, J. S.; BIENENSTOCK, J. Mast cell. **Springer Seminar in Immunopathology**, New York, v.12, p.191-201, 1990.

MASSON, S.D.; McKAY, D.M.; STEAD, R.H.; AGRO, A.; STANISZ, A.; PERDUE, M.H. *Nippostrongylus brasiliensis* infection causes neuronal abnormalities and altered neurally regulated ion secretion in rat jejunum. **Parasitology**, Cambridge, v.113, p.173-182, 1996.

MAYRHOFER, G.; FISHER, R. Mast cells in severely T-cell depleted rats and the response to infestation with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, Oxford, v.37, p.145-155, 1979.

McKAY, D.M.; HALTON, D.W.; JOHNSON, C.F.; SHAW, C.; FAIRWEATHER, I.; BUCHANAN, K.D. *Hymenolepis diminuta*: changes in the levels of certain intestinal regulatory peptides in infected C57 mice. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.73, p.15-26, 1991.

McKENZIE, G.J.; BANCROFT, A.; GRENCIS, R.K.; McKENZIE, A.N. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune response. **Current Biology**, London, v.8, p.339, 1998.

McLAUCHLAN, P.E.; ROBERTS, H.C.; LOXTON, N.J.; WASTLING, J.M.; NEWLANDS, G.F.J.; CHAPPELL, L.H. Mucosal mast cell response and release of mast cell protease-I in infections of mice with *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma*: modulation by cyclosporin A. **Parasite Immunology**, Oxford, v.21, p.151-161, 1999.

MEKORI, Y.A.; METCALFE, D.D. Transforming growth factor- β prevents stem cell factor-mediated rescue of mast cells from apoptosis after IL-3 deprivation. **Journal Immunology**, Bethesda, v.153, p.2194-2203, 1994.

MEKORI, Y.A.; OH, C.K.; METCALFE, D.D. IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3: Prevention of apoptosis by c-kit ligand. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.151, p.3775-3784, 1993.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.77, p.1033-1079, 1996.

MILLER, H. R. P.; JARRETT, W. F. H. Immune reactions in mucous membranes I. Intestinal response during helminth expulsion in the rat. **Immunology**, Oxford, v.20, p.277-288, 1971.

MURRAY, M. Immediate hypersensitivity effector mechanism II. *In vivo* reactions. In: SOULSBY, E.J.L. (ed.). **Immunity to animal parasites**. New York: New York Academic Press, 1972. p.155-190.

OSINSKI, M, A.; DAHL, J.L.; BASS, P. Proliferation of mast cells in the smooth muscle of denervated rat jejunum. **Journal of the Autonomic Nervous System**, Amsdertan, v.45, n.2, p.164-174, 1993.

OWENS, M.W.; GRISHAM, M.B. Cytokines increase proliferation of human intestinal smooth muscle cells: Possible role in inflammation-induced stricture formation. **Inflammation**, New York, v.17, p.481-487, 1993.

PALMER, J. M.; CASTRO, G. A. Anamnestic stimulus-specific myoelectric responses associated with intestinal immunity in the rat. **American Journal Physiology**, Bethesda, v.250, p.266-273, 1986.

PALMER, J.M.; MEERVELD, B.G.V. Integrative neuroimmunomodulation of gastrointestinal function during enteric parasitism. **Journal Parasitology**, Kansas, v.87, p.483-504, 2001.

PATRICK, M.K.; DUNN, I.J.; BURET, A.; MILLER, H.R.; HUNTLEY, J.F; GIBSON, S.; GALL, D.G. Mast cell protease release and mucosal ultrastructure during intestinal anaphylaxis in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.94, n.1, p.1-9, 1988.

PERDUE, M.H.; RAMAGE, J.K.; BURGET, D.; MARSHALL, J.; MASSON, S. Intestinal mucosal injury is associated with mast cell activation and leukotriene generation during *Nippostrongylus*-induced inflammation in the rat. **Digestive Disease Science**, v. 34, p. 724-731, 1989.

POTTEN, C.S. Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis. **The American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, p.G253-G257, 1997.

PRITCHARD, D.I. Antigens of gastrointestinal nematodes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.80, p.728-734, 1986.

RAZIN, E.; IHLE, J.N.; SELDIN, D.; MENCIA-HUERTA, J.M.; KATZ, H.R.; LEBLANC, P.A.; HEIN, A.; CAULFIELD, J.P.; AUSTEN, K.F.; STEVENS, R.L. Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.132, p.1479-1486, 1984.

REARDON, C.; SANCHEZ, A.; HOGABOAM, C.M.; McKAY, D.M. Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, p.4417-4423, 2001.

ROBERTS, L.S. The influence of population density and patterns and physiology of growth

- in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae) in the definitive host. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.11, p.332-371, 1961.
- ROBERTSON, I., GREAVES, M.W. Responses of human skin blood vessels to synthetic histamine analogues. **British Journal Clinical Pharmacology**, Oxford, v.5, p.319-322, 1978.
- ROTHWELL, T. L. W. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.19, p.139-168, 1989.
- RYFFELL, B. Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.46, p.1-12, 1993.
- SCHWARTZ, L.B. Monoclonal antibodies against human mast cell tryptase demonstrate shared antigenic sites on subunits of tryptase and selective localization of the enzyme to mast cells. **Journal Immunology**, Bethesda, v.134, p.526-531, 1985.
- SCHWARTZ, L.B.; AUSTEN, K.F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Progress in Allergy, Basel**, v.34, p.271-321, 1984.
- SCHWARTZ, L.B.; KIMBERG, D.V.; SHEERIN, H.E.; FIELD, M.; SAID, S.I. Vasoactive intestinal peptide stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa. **Journal Clinical Investigation**, New York, v.54, p.536-544, 1974.
- SEDGWICK, D.M.; FERGUSON, A. Dose-response studies of depletion and repopulation of rat intestinal mucosal mast cells after irradiation. **International Journal Radiation Biology**, London, v.65, n.4, p.483-495, 1994.
- SIMECKA, J.W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.34, p.235-259, 1998.
- SMITH, T. J.; WEIS, J. H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. **Immunology Today**, Cambridge, v.17, n.2, p.60-63, 1996.
- STARKE, W.A.; OAKS, J. A. Ileal mucosal mast cell, eosinophil, and goblet cell populations

during *Hymenolepis diminuta* infection of the rat. **The Journal of Parasitology**, Kansas, v.87, n.7, p. 1220-1225, 2001.

STEAD, R.H.; DIXON, M.F.; BRAMWELL, N. H.; RIDDELL, R.H.; BIENENSTOCK, J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucous. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.97, p.575-585, 1989.

STEAD, R.H.; KOSECKA-JANISZEWSKA, U.; OESTREICHER, A.B.; DIXON, M.F.; BIENENSTOCK, J. Remodeling of B-50(GAP-43) and NSE-immunoreactive mucosal nerves in the intestines of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Journal of Neurosciences**, Cary, v.11, p.3809-3821, 1991.

STEAD, R.H.; TOMIOKA, M.; QUINONEZ, G.; SIMON, G.T., FELTEN, S.Y.; BIENENSTOCK, J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proceeding of the National Academic Science of the United States**, Washington, v.84, p.2975-2979, 1987.

STEVENS, R.L.; AUSTEN, K.F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. **Immunology Today**, Cambridge, v.10, p.381-383, 1989.

SUKHDEO, M.V. Intestinal contractions and migration behavior in *Hymenolepis diminuta*. **International Journal of Parasitology**, Elmsford, v.22, n.6, p.813-817, 1992.

SWIETER, M.; MERGENHAGEN, S.E.; SIRAGANIAN, R.P. Microenvironmental factors that influence mast cell phenotype and function. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Maeden, v.199, p.22-33, 1992.

SZABO, S.J.; BLIMCHER, H.; HO, I.C. Genes that regulate interleukin expression in T cells. **Current Opinion in Immunology**, London, v.9, p.776, 1997.

TAKEDA, K.; TANAKA, T.; SHI, W.; MATSUMOTO, M.; MINAMI, M.; KASHIWAMURA, S.; NAKANISHI, K.; YOSHIDA, N.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Essential role of Stat6 in IL-4 signaling. **Nature**, London, v.380, p.627, 1996.

TALIAFERRO, W.H.; SARLES, M.P. The cellular reactions in the skin, lungs and intestine of normal and immune rats after infection with *Nippostrongylus muris*. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v.64, p.157-192, 1939.

TAPPER, E.J.; POWELL, D.W.; MORRIS S.M. Cholinergic-adrenergic interactions on intestinal ion transport. **American Journal Physiology**, Bethesda, v.235, n.4, p.E402-E409, 1978

TSAI, M.; SHIH, L.S.; NEWLANDS, G.F.J.; TAKEISHI, T.; LANGLEY, K.E.; ZSEBO, K.M.; MILLER, H.R.P.; GEISSLER, E.N.; GALLI, S.J. The rat *c-kit* ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells *in vivo*: analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. **Journal Experimental Medicine**, New York, v.174, p.125-131, 1992.

URBAN, J.F.Jr.; NOBEN-TRAUTH, N.; DONALDSON, D.D.; MADDEN, K.B.; MORRIS, S.C.; COLLINS, M.; FINKELMAN, F.D. IL-13, IL-4R α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunity**, Cambridge, v.8, p.255, 1998.

WALLACE, J.L.; GRANGER, D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, p. 731-740, 1996.

WALLING, M.W.; BRASITUS, T.A.; KIMBERG, D.V. Effects of calcitonin and substance P on the transport of Ca, Na and Cl across rat ileum *in vitro*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.73, n.1, p.89-94, 1977.

WALLS, A.F.; JONES, D.B.; WILLIAMS, J.H.; CHURCH, M.K.; HOLGATE, S.T. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. **Journal of Pathology**, W. Sussex, v.162, n.2, p.119-126, 1990.

WELHAM, M.J.; SCHRADER, J.W. Steel factor-induced tyrosine phosphorylation in murine mast cells: common elements with IL-3 induced signal transduction pathways. **Journal Immunology**, Bethesda, v.149, p.2772-2778, 1992.

WELKER, P.; GRABBE, J.; CZARNETZKI, B.M. Human keratinocytes release mast cell differentiation factors other than stem cell factor. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.107, p.139-141, 1995.

WINGREN, U.; ENERBACK, L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. **Histochemistry Journal**, London, v.15, n.6, p.571-582, 1983.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, San Diego, v.68, p.251-306, 1980.

YEE, N.S.; PEAK, I.; BESMER, P. Role of *c-kit* ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells. Basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutants. **Journal Experimental Medicine**, New York, v.179, p.1777-1787, 1994.

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. The *C. Elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. **Cell**, Cambridge, v.75, p.641-652, 1993.

ZHANG, S.; MYERS, S.; CASTRO, G.A. Inhibition of anaphylaxis-evoked intestinal fluid secretion by the dual application of an H1 antagonist and cyclooxygenase inhibitor. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.100, p.922-928, 1991

ZHIVOTOVSKY, B.; BURGESS, D.H.; ORRENIUS, S. Proteases in apoptosis. **Experientia**, Basel, v.52, p.968-978, 1996.



