

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeito da infecção prévia com *Strongyloides venezuelensis* no
desenvolvimento do diabetes experimental do tipo 1**

Raphael Sanches Peres

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Fernanda Chiuso Minicucci

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

Botucatu - SP
2009

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Maristela, pois são as pessoas que mais amo na minha vida e que sem eles, nunca teria chegado até este momento. Muito obrigado por tudo, pelos ensinamentos, carinho e atenção dispensada em todos os momentos!

Agradecimentos

À minha vó Aide e minha tia Eliane, que sempre me apoiaram e contribuíram muito para minha formação. Agradeço muito pela dedicação e pelo amor que sempre recebi de vocês. Sempre estarei do lado de vocês em todos os momentos possíveis.

Ao meu vô Waldecir (*in memoriam*), por todo seu companheirismo e dedicação dispensada na minha criação. Sua pessoa ficará eternamente guardada nas minhas lembranças.

À minha orientadora, Dra. Alexandrina Sartori, pelos seus ensinamentos e atenção dispensada durante a realização deste trabalho. Sua contribuição para a minha formação profissional foi inexplicável, tenho a certeza que você foi uma das principais responsáveis em me mostrar o caminho a seguir em minha vida. Muito obrigado pela oportunidade. Adorei trabalhar ao seu lado.

À minha co-orientadora, Fernanda Chiuso Minicucci. Não tenho nem palavras para agradecê-la, sou muito grato pelo que fez por mim. Muito obrigado pela atenção, pelos ensinamentos e pela imensurável ajuda na execução deste trabalho. Estarei sempre à disposição para o que precisar, seu pupilo deve muito a você!

À Thaís, Sofia, Larissa (Dutra), Larissa (Akú) e David por me ajudarem em diversas situações e por tornarem o ambiente de trabalho o mais agradável possível. Com vocês do meu lado, me senti seguro para enfrentar os desafios.

Ao Alexandre Dominguez, pelo seu valioso auxílio e contribuição na execução deste trabalho. Muito obrigado pela atenção dispensada em todos os momentos.

Aos professores e funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia, principalmente ao prof. José Maurício, pelos seus conselhos e ideais transmitidos durante a minha graduação, e ao Lula, pela sua amizade e ajuda com as atividades no biotério.

Aos meus amigos e irmãos Marcos (Minu), Renan (Kumbuka), Bruno (Pelanka) e Rafael (Dori), pela amizade e companheirismo durante todos esses anos de faculdade. Vai ser muito difícil ficar longe de vocês, mas tenho a certeza que estaremos sempre juntos no coração de cada um. Amo muito vocês!

Ao meu grande companheiro Vinicius (Bagaço), pela sua amizade sincera e fiel. Companheiro de "loucuras" e também um ombro mais do que amigo nas mais horas complicadas. Valeu Vinicinho!

Aos integrantes da República Só-kanela, Bruno (Funga), João (Xiba), Alexandre (Pênis), Gabriel (Lacrimoso), Felipe (Borra), Lucas (Bogomiu), Guilherme (Sula). Considero vocês como parte da minha família, muito obrigado pelos ótimos momentos que passamos juntos. Vocês todos são pessoas formidáveis e diferenciadas. Contem comigo para o que precisar!

A todos com quem trabalhei no Encontro Nacional de Biomedicina. Foi neste evento, que eu ajudei a organizar por 3 anos, que descobri a importância do trabalho em equipe e de como se relacionar profissionalmente com as pessoas.

Aos meus amigos de Araraquara – SP, pela harmoniosa e diferenciada amizade que perdura durante todos esses anos. Vocês sempre estiveram e tenho certeza que estarão sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao prof. Alessandro Amarante, do departamento de Parasitologia, que gentilmente nos forneceu a cepa de *Strongyloides venezuelensis* para a realização do trabalho.

A FAPESP, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

A Deus, por todas as bênçãos concedidas e por me proporcionar conhecer e conviver com essas pessoas especiais listadas acima!

SUMÁRIO

Resumo.....	6
1. Introdução.....	7
1.1 Diabetes mellitus do tipo 1(T1D).....	7
1.2 Modelo experimental de T1D.....	9
1.3 Gênero <i>Strongyloides</i> : ciclo biológico e resposta imune.....	10
1.4 Hipótese da Higiene e potencial protetor dos helmintos no T1D.....	11
1.5 Racional da proposta de investigação.....	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Material e Métodos.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Infecção experimental e monitoramento.....	16
3.3 Cultura de células.....	17
3.4 Leucograma.....	17
3.5 Obtenção de antígeno de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	17
3.6 Indução e análise da progressão do T1D.....	18
3.7 Análise histopatológica do pâncreas e <i>score</i> de lesões.....	18
3.8 Ensaio Imuno-enzimático (ELISA).....	19
3.8.1 Para dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura..	19
3.8.2 Para dosagem de anticorpos em soro.....	20
3.9 Análise estatística.....	20
4. Protocolos experimentais e Resultados.....	21
4.1 Protocolo Experimental I.....	21
4.1.1 Resultados do Protocolo Experimental I.....	22
A. Dinâmica da infecção primária com <i>S. venezuelensis</i>	22
B. Resposta imune na fase de recuperação da infecção primária com <i>S. venezuelensis</i>	23

4.2 Protocolo Experimental II.....	32
4.2.1 Resultados do Protocolo experimental II.....	33
A. Peso corpóreo.....	33
B. Níveis glicêmicos.....	34
C. Análise histopatológica do pâncreas.....	35
D. Produção de citocinas.....	39
5. Discussão.....	45
6. Referências Bibliográficas.....	49

RESUMO

O diabetes mellitus do tipo 1 (T1D) é uma doença autoimune cujo tratamento é parcialmente eficaz. A terapia existente visa apenas controlar a progressão da patologia através da injeção diária de insulina exógena, portanto, uma alternativa terapêutica ou profilática para a doença é necessária. A indução do T1D por administração de estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6 é considerada um modelo bastante adequado para a investigação dessas estratégias. Além disto, vários trabalhos demonstram que o contato com antígenos ambientais pode diminuir ou impedir as manifestações clínicas do T1D e de outras doenças autoimunes. Assim, o objetivo geral desta investigação foi avaliar o efeito da infecção prévia com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento do T1D. Inicialmente, acompanhamos a dinâmica da infecção em camundongos C57BL/6 para a determinação da resposta imune estabelecida na fase de recuperação da infecção, e posteriormente, avaliamos o efeito da infecção no T1D. Durante a fase de recuperação, caracterizada pelo desaparecimento de ovos nas fezes, ocorreu uma resposta imune de padrão misto (Th1/Th2) com predomínio de Th2, caracterizado pela presença de IgG1 e produção significativa de IL-4, IL-5 e IL-10. Este padrão de resposta determinou um efeito protetor discreto no desenvolvimento do T1D, caracterizado por diminuição do percentual de ilhotas com inflamação mais acentuada. Estes resultados mostram, portanto, que a infecção prévia com *S. venezuelensis* não impediu, de forma significativa, o desenvolvimento de insulite em modelo experimental de diabetes induzido por STZ.

Palavras-chave: imunomodulação, diabetes do tipo 1, infecção, *Strongyloides venezuelensis*, autoimunidade.

1.Introdução

1.1-Diabetes mellitus do tipo 1 (T1D)

O diabetes mellitus do tipo 1 (T1D) é uma doença autoimune em que uma resposta imune celular destrói as células β do pâncreas, sendo que os linfócitos Th1 $CD4^+$ são responsáveis pela ativação dos macrófagos, enquanto que os linfócitos Tc $CD8^+$ exercem citotoxicidade direta nas células β . Citocinas como $IFN-\gamma$, $TNF-\beta$ e $IL-1$ são produzidas localmente e também são responsáveis pela lesão celular, induzindo apoptose das células β (Bach & Chatenoud, 2001). Mais recentemente, a possível contribuição de células Th_{17} na patogênese do T1D também tem sido investigada (Jain et al., 2008).

Esse processo poderia ser desencadeado pela liberação de autoantígenos por infecções virais, outros tipos de estresse local ou até mesmo pelo *turnover* celular. Na figura 1, pode se observar um dos esquemas propostos para explicar a imunopatogênese desta doença. Inicialmente, estes autoantígenos seriam capturados por células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como macrófagos (M) e células dendríticas (CD) e transportados aos linfonodos regionais que drenam o pâncreas. Células T $CD4^+$ autorreativas as quais circulam no sangue e nos órgãos linfóides, incluindo os linfonodos pancreáticos, reconheceriam peptídeos próprios das células β associados com moléculas de histocompatibilidade. Uma vez ativadas estas células Th e Tc migrariam ao órgão alvo (pâncreas) e destruiriam as células β através da ativação de macrófagos por citocinas e citotoxicidade direta, respectivamente.

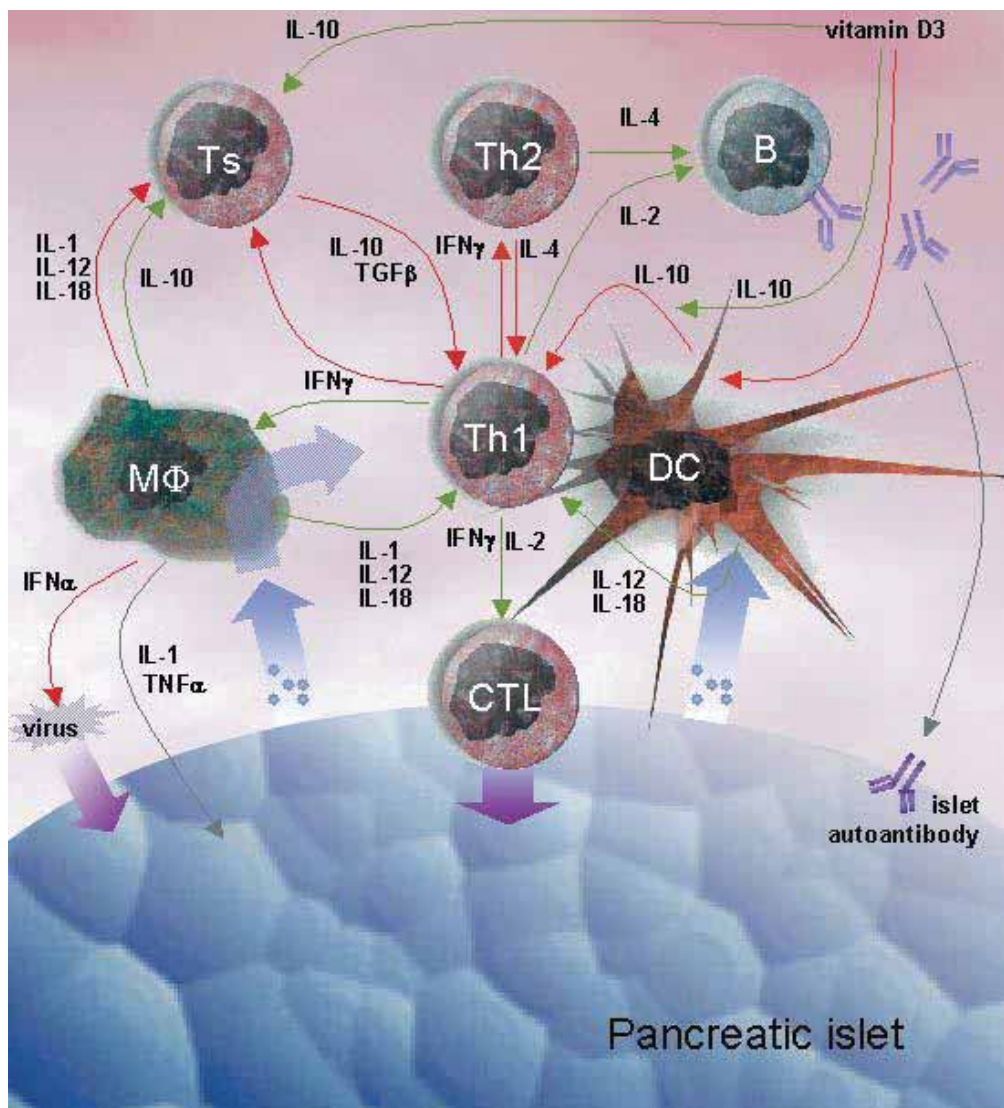


Figura 1- Imunopatogênese do diabetes tipo 1 (Roep, 2003).

A alteração mais típica do diabetes do tipo 1 é a hiperglicemia marcante que é originada pela insuficiência na produção de insulina, o hormônio responsável pela entrada de glicose nas células de todos os tecidos. Caso o T1D não seja controlado com a administração diária de insulina exógena, a doença pode progredir e acarretar complicações no paciente, como insuficiência renal crônica, cegueira e amputações não-traumáticas dos membros inferiores (Zhu et al., 2008).

Mais de 140 milhões de pessoas são afetadas pela doença no mundo, com previsões de que esse número dobre até o ano 2025, tornando-se assim, uma das doenças não-contagiosas mais comuns na atualidade (Zimmet et al., 2001). A suscetibilidade genética é um dos fatores que contribuem para o surgimento e

evolução da doença, e está relacionada principalmente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), em especial com as moléculas de classe II no cromossomo 6p21 (HLA-D) (McDevitt, 2001). Cerca de 95% dos caucasianos com T1D apresentam HLA-DR3, DR4 ou ambos, em contraste com apenas 40% das pessoas normais; e 40% a 50% dos pacientes são heterozigotos DR3/DR4, contra apenas 5% dos indivíduos sadios (Pugliese et al., 1995). Influências ambientais, tais como estilo de vida e contato com agentes infecciosos também são fatores importantes para o aparecimento do T1D (Kurreja & Maclaren, 2002). Essa contribuição será abordada posteriormente, na seção Hipótese da Higiene (1.4).

1.2-Modelo experimental de T1D

Entre os modelos usuais utilizados para o estudo do T1D se destaca o camundongo NOD (*nonobese diabetic mice*). O NOD compartilha várias das características da doença com pacientes humanos. Vários aspectos imunológicos desta doença também são descritos em modelo experimental murino de diabetes induzido por estreptozotocina [STZ, 2-deoxi,2(3-(metil-3-nitrososureido)-D-glucopiranosose] (Nicoletti et al., 2000), que é um antibiótico de amplo espectro, sintetizado pelo *Streptomyces achromogenes* (Szkudelski, 2001).

Atualmente, a indução do diabetes mellitus por STZ em roedores se faz por meio de múltiplas doses em baixas concentrações, variando entre 30 - 40 mg/Kg, durante 5 dias consecutivos. Tal tratamento é realizado preferencialmente em camundongos C57BL/6 e a indução do diabetes é caracterizada pela ação de mecanismos imunológicos e citotóxicos contra células β do pâncreas (Kantwerk-Funke et al, 1991). Em camundongos C57BL/6 a seguinte cinética de alterações tem sido caracterizada: degranulação de células β que ocorre após 2 ou 3 injeções, insulite sem hiperglicemia que se observa no 5º e 6º dias após as inoculações e finalmente quadro típico de diabetes que ocorre alguns dias após. A insulite induzida desta forma é caracterizada por necrose de células β com infiltração de macrófagos e linfócitos (Lenzen, 2008). Estudos de Müller et al (2002) revelaram que, após a administração de múltiplas doses de STZ em camundongos C57BL/6, o aumento da síntese de citocinas do padrão Th1 observado nas ilhotas do pâncreas é acompanhado também pela inibição de citocinas do padrão Th2, condição esta observada em humanos e relacionada a

uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do T1D. Foi demonstrado também que a síntese de citocinas Th2 IL-4 e IL-10 previne o T1D, antagonizando os efeitos das citocinas de padrão Th1 normalmente produzidas durante o decurso da doença (Cameron et al, 1997).

1.3-Gênero *Strongyloides*: ciclo biológico e resposta imune

A infecção por nematódeos é altamente prevalente em humanos e representa um grave problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos. Os nematódeos que colonizam o trato gastrointestinal, como o *Strongyloides stercoralis*, são responsáveis pela infecção de mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, causando milhares de casos clínicos (Fernandes et al, 2008).

Strongyloides spp. apresenta um ciclo de vida livre e um ciclo parasitário. A fase parasitária se caracteriza pela presença de fêmeas partenogênicas no intestino delgado, as quais produzem ovos larvados por partenogênese. Após a eclosão, as larvas podem desenvolver-se em machos e fêmeas adultos de vida livre, o que pode ser seguido por uma sucessão de gerações de vida livre. Entretanto, sob certas condições, provavelmente relacionadas com temperatura e umidade, formam-se as larvas infectantes (L3) que podem infectar o hospedeiro por penetração cutânea ou ingestão. Então, migram via sistema venoso para pulmões e traquéia. São posteriormente deglutidas e alcançam o intestino delgado onde se transformam em fêmeas partenogênicas (Urquhart et al, 1998).

Strongyloides venezuelensis é um parasita de roedores, naturalmente encontrado em ratos. Este parasita tem sido utilizado como modelo experimental para estudos de biologia, imunologia, mecanismos de expulsão de parasitas, características bioquímicas e atividade anti-helmíntica. Na infecção por *S. venezuelensis*, larvas infectantes de terceiro estágio penetram através da pele e migram para o pulmão onde ocorre muda para larva de quarto estágio. Dessa forma atingem o intestino delgado onde finalmente se transformam em parasitas adultos (Tindall & Wilson, 1988).

A resposta imune contra *Strongyloides* spp. é caracterizada por uma eosinofilia sistêmica e presença de mastócitos intestinais, produção de citocinas do padrão Th2, como IL-4 e IL-5, e também pela produção de anticorpos IgA,

IgE, IgG e IgM (Machado et al, 2007). O período patente da infecção, isto é, o período em que se encontram ovos de *S. venezuelensis* nas fezes dos animais é variável em ratos e em camundongos, sendo que em ratos Wistar varia de 70-79 dias, e em camundongos, consiste de 6-9 dias (Nakai & Amarante, 2001). Segundo Amarante & Oliveira-Sequeira (2002), dentre as linhagens de camundongo, a linhagem C57BL/6 é mais susceptível à infecção por *S. venezuelensis*, pois apresentou a maior contagem de ovos por grama nas fezes (OPG) do que as demais linhagens, o que indica ser esta uma interessante linhagem para o estudo da infecção por *S. venezuelensis* em camundongos.

Recentemente, tem aumentado o interesse em investigar infecções por helmintos, em especial porque tem sido sugerido que as mesmas tenham potencial imunomodulador contra doenças autoimunes e alergias. Este potencial tem sido atribuído ao desvio da resposta imune para um padrão Th₂ e também a possível indução de células T reguladoras (Helmbj & Bickle, 2006).

1.4–Hipótese da Higiene e potencial protetor dos helmintos no T1D

A Hipótese da Higiene postula que o aumento recente na incidência de alergias e doenças autoimunes (como por exemplo, artrite, esclerose múltipla e diabetes) em países mais desenvolvidos, seria decorrente da ausência de infecções ou de contato com determinados agentes infecciosos durante a infância (Strachan, 1989; Cooper, 2004). Este menor contato ocorreria em função de melhores condições de vacinação, saneamento básico e uso de antibióticos (Zaccone et al., 2006). A tabela 1 ilustra a maior prevalência de diabetes em países mais desenvolvidos.

Tabela 1- Incidência de diabetes (tipo 1 e 2) no ano de 2003 em algumas regiões do mundo (Zacccone et al., 2006).

Região	População (milhões)	Nº de pessoas com diabetes tipo 1 e 2 (milhões)	Prevalência (%)
Europa	621	48,4	7,8
América do Norte	290	23	7,9
África	295	7,1	2,4
América do Sul e Central	252	14,2	5,6

Pelo menos em parte este fenômeno tem sido explicado pelo fato destes agentes terem um efeito imunorregulador sobre seus hospedeiros. É provável que este efeito regulador se traduza por indução e/ou ativação de células T reguladoras (Tregs).

Duas famílias de células Tregs têm sido descritas e nomeadas de Tregs naturais e Tregs adaptativas. Ambas são originadas no timo, mas o primeiro grupo alcança a sua maturação completa no próprio timo, enquanto que o segundo sofre maturação na periferia (Liotta et al., 2005). Nos últimos anos foi dada muita atenção para as Tregs naturais, as quais expressam a cadeia α de receptor de interleucina-2 (CD25⁺). Na maioria dos casos, estas células CD4⁺ CD25⁺ também expressam GITR, CTLA-4 e CD62L (Igarashi et al., 2008, Zheng et al., 2008, Mazzucchelli et al., 2008). Um gene chamado Foxp3, que codifica um fator de transcrição, é descrito como fundamental para controlar o desenvolvimento e expressão do fenótipo supressor em células Tregs (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003, Khattry et al., 2003). Mais recentemente, a expressão obrigatória de Foxp3 em células T humanas como exigência para conferir potencial supressor é controversa (Roncarolo & Gregori, 2008).

Os mecanismos de ação das Tregs ainda não estão totalmente esclarecidos. As possíveis vias de supressão poderiam ser divididas em três categorias: contato célula-célula, secreção de citocinas inibitórias e competição local por fatores de crescimento (Scheffold et al., 2007). A modulação dos níveis de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) nas células alvo causa inibição seletiva na produção de citocinas, principalmente IL-2 e IFN- γ , e isto tem sido

sugerido como uma via interessante de supressão (Minguet et al., 2005). TGF- β e IL-10 têm sido mais freqüentemente associados com a função efetora das Tregs (Asseman et al., 1999; Powrie et al., 1996). O número crescente de mecanismos de inibição atribuído a atividade das Tregs poderia sugerir que essas células utilizam uma estratégia multi-direcional para ter êxito na regulação da resposta imune. Sojka et al., 2008, sugeriram que a importância relativa de cada mecanismo de inibição esteja relacionada e modulada por ambos, o ambiente inflamatório e a extensão da resposta imune.

Em trabalhos recentes, tem sido constatada deficiência na atividade e/ou número de células Tregs em casos de alergia e autoimunidade (Randolph & Fathman, 2006). Ainda está sob investigação a possibilidade de que defeitos (atividade e quantidade) em células Tregs estejam diretamente envolvidos no desenvolvimento do T1D. Entretanto, foi demonstrado que a transferência adotiva de células Tregs foi eficaz tanto como profilaxia quanto como terapia no diabetes experimental (Jaeckel et al., 2008).

Nesse contexto, é muito interessante e promissora a constatação, em modelos experimentais, de que a exposição a determinados agentes infecciosos ou produtos derivados dos mesmos, tem a propriedade de induzir células Tregs capazes de regular processos inflamatórios, incluindo doenças autoimunes (Kitagaki et al., 2006; Fallon & Alcami, 2006). Por exemplo, tem sido constatado que a infecção ou imunização de camundongos com *Schistosoma mansoni* reduz a gravidade da encefalite autoimune experimental (EAE) (Sewell et al., 2002; Sewell et al., 2003; La Flamme et al., 2003). Também em modelos experimentais foi constatado por Lafaille, 1994 e mais recentemente por nosso grupo (Zorzella e cols, 2007) que animais mantidos em condições *germ-free* apresentam maior incidência e quadros mais graves de EAE.

A contribuição da Hipótese da Higiene para o controle do T1D tem sido bastante investigada em termos epidemiológicos, ou seja, existem evidências claras de associação causal entre decréscimo de determinadas infecções e aumento na incidência de T1D (Feillet & Bach, 2004; Luque et al., 2006). A contribuição dos helmintos como agentes imunomoduladores tem sido avaliada em várias patologias autoimunes, incluindo no T1D (Elliott et al., 2007). O contato com helmintos tem sido testado em vários modelos experimentais de

doenças autoimunes humanas e tem corroborado com os achados epidemiológicos. Exemplos típicos deste efeito protetor tem sido descrito em colite (Hunter et al., 2005) e encefalite autoimune experimental (La Flamme et al., 2003; Sewell et al., 2003). Exposição aos helmintos também previne o início do diabetes autoimune em camundongos NOD, os quais desenvolvem diabetes de forma espontânea. A infecção com *Schistosoma mansoni* ou exposição aos ovos ou antígenos derivados deste helminto determinaram proteção contra o diabetes espontâneo em camundongos NOD (Cooke et al., 1999; Zacccone et al., 2006).

1.5-Racional da proposta de investigação

O tratamento para o T1D visa apenas controlar a glicemia dos indivíduos para que a patologia não evolua e exponha os acometidos às suas complicações. Assim, novas alternativas terapêuticas e profiláticas para o T1D são evidentemente desejáveis. Em função dos dados da literatura que demonstram que o contato com antígenos ambientais diminuiu as manifestações clínicas do T1D, este projeto foi proposto para investigar o efeito da infecção prévia com *Strongyloides venezuelensis* no T1D em camundongo C57BL/6. Na primeira etapa será estudada a dinâmica da infecção com *Strongyloides venezuelensis* no camundongo C57BL/6 e em uma segunda etapa, será verificado o efeito da infecção prévia com o helminto no desenvolvimento do T1D, sendo que o T1D será induzido na fase de recuperação da infecção por inoculação de estreptozotocina (STZ).

Nossa hipótese de estudo é que a infecção com *S. venezuelensis* desencadeie uma resistência total ou parcial ao desenvolvimento do T1D, seja por acarretar uma resposta imune do padrão Th2, ou pela indução/ativação das células Tregs, ou por ambos os mecanismos.

2. Objetivos

2.1-Objetivo geral

Avaliar o efeito da infecção prévia com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento do diabetes experimental do tipo 1.

2.2-Objetivos específicos

A- Acompanhar a dinâmica da infecção por *S. venezuelensis* e a resposta imune induzida por este helminto em camundongo C57BL/6;

B- Avaliar o efeito da fase de recuperação da infecção primária por *S. venezuelensis* no desenvolvimento (características clínicas, imunológicas e histopatológicas) do diabetes experimental do tipo 1 induzido por STZ.

3. Material e métodos

3.1-Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, com 4-6 semanas de idade, provenientes do CEMIB-UNICAMP, com peso corporal entre 20 e 25g. Os animais foram alojados em caixas plásticas com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu.

3.2-Infecção experimental e monitoramento

A infecção foi feita com uma cepa de *S. venezuelensis* mantida em ratos Wistar no Departamento de Parasitologia-Instituto de Biociências-UNESP-Botucatu desde seu isolamento no início da década de 80. Larvas infectantes (L3) foram produzidas em cultura usando fezes de cavalo esterilizadas como substrato. Fezes de ratos infectados foram homogeneizadas com o substrato, umedecidas e mantidas em placa de Petri em estufa a 25°C. Após três dias de incubação, as larvas infectantes (L3) foram recuperadas por filtração e decantação em água destilada utilizando-se aparelho de Baermann. As larvas foram então lavadas várias vezes com PBS. Para determinação do número de larvas obtidas, alíquotas de 10 µl de suspensão larval foram contadas em dez replicatas. Após o ajuste do volume, os camundongos foram inoculados por via subcutânea com 2000 larvas infectantes de *S. venezuelensis* (0,1mL). Em um primeiro protocolo, os animais foram eutanasiados no 22º dia após a infecção e avaliados quanto à dinâmica da infecção e resposta imune. Em um segundo protocolo, os animais foram submetidos à indução do diabetes por STZ no 22º dia após a infecção. A escolha do 22º dia se deve a recuperação dos animais neste período de infecção, como foi descrito por Amarante & Oliveira-Sequeira (2002).

A intensidade da infecção foi monitorada pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) diariamente durante 22 dias. A quantificação de ovos por grama de fezes foi realizada através da técnica de McMaster modificada (Gordon & Whitlock, 1939). Para a colheita das amostras fecais, os animais foram

distribuídos em caixas com fundo telado onde permaneceram por 3 horas e foram feitas contagens de ovos em *pool* de fezes.

3.3-Cultura de células

Baço e linfonodos regionais (inguinais e poplíteos) foram coletados para o preparo de culturas celulares. Os órgãos foram divulsionados e as células obtidas após centrifugação da suspensão celular foram ressuspensas em meio RPMI contendo gentamicina, soro bovino fetal, L-glutamina. As células de baço (5×10^6 células/mL) e linfonodos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram estimuladas com antígeno solúvel de *S. venezuelensis* (100µg/ mL de cultura) e concanavalina A (10µg/ mL de cultura). A cultura de células dos linfonodos foi feita com *pool* de cada grupo experimental. Após incubação por 72 horas, a 37°C, em estufa de CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas (IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10).

3.4-Leucograma

O sangue coletado por punção cardíaca foi transferido para eppendorf contendo EDTA para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem total de leucócitos foi realizada com 10 µl das amostras de sangue diluída com 190 µl de líquido de Turk (diluição 1:20) e, aproximadamente 5 µl desta diluição foi colocada em câmara de Neubauer. As células foram contadas em microscópio óptico (aumento 20x). Foi realizado um esfregaço sanguíneo (sangue sem anticoagulante) para contagem diferencial de leucócitos. Este esfregaço foi corado com Eosina/Azul de metileno (segundo Leishman) por 10 minutos e logo após água destilada (pH 7,0) foi adicionada por mais 10 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e a contagem foi realizada em microscópio óptico (aumento 100x). Foram contadas 100 células e determinada a proporção de linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos.

3.5-Obtenção de antígeno de *Strongyloides venezuelensis*

O preparo deste antígeno foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Negrão-Corrêa et al. 2004, modificada. Larvas infectantes (L3) de *S.*

venezuelensis (produzidas conforme descrito no item infecção experimental) foram submetidas a vários ciclos de lavagem com PBS e ressuspendidas em meio RPMI contendo um coquetel inibidor de proteases (um tablete para cada 25 mL de meio RPMI; Complete-Mini, Roche). Em seguida, as larvas foram rompidas por mistura com pérolas de vidro e agitação em vórtex (5 ciclos de 1 minuto) e depois submetidas à sonicação (10 ciclos de 1 minuto). O material insolúvel foi removido por centrifugação e a concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA - Ácido Bicinconínico, com a utilização de um kit comercial (Bicinchoninic Acid Kit for protein determination-Sigma). O antígeno solúvel obtido foi estocado a -80 °C.

3.6-Indução e análise da progressão do T1D

O T1D foi induzido nos animais através da administração de 5 doses de STZ intra-peritoneal (i.p) (dias 0-5) na concentração 40 mg/kg de peso corpóreo/dia. A STZ foi dissolvida em tampão citrato (10M, pH 4,5) e foi utilizada até 10 minutos após a preparação (Thabet et al., 2008). A progressão do diabetes nos camundongos foi determinada pelo nível da glicose sanguínea (Glicosímetro Prestige Smart System). Níveis sanguíneos superiores a 200 mg/dL foram considerados positivos para o diagnóstico do diabetes. A coleta do sangue foi feita uma vez por semana, no período da manhã, através de punção retro-orbital.

3.7-Análise histopatológica do pâncreas e score de lesões

A eutanásia dos animais foi realizada no 21º dia após a quinta injeção de STZ para posterior avaliação histológica do pâncreas. Este órgão foi coletado e fixado em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 24 horas e, em seguida, submetido ao processo de desidratação em séries de etanol e xilol. O tecido foi incluído em blocos de Paraplast Plus (McCormick) e, em seguida, foram realizados cortes histológicos com 5µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico Nikon e as imagens adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio.

Para análise histológica do pâncreas, 10 ilhotas por lâmina foram analisadas e um sistema de *score* adotado para sua classificação: Grau 0 (ausência de infiltrado mononuclear), Grau 1 (infiltrado mononuclear pontual na periferia da ilhota), Grau 2 (infiltrado mononuclear moderado, disperso no interior da ilhota), Grau 3 (infiltrado mononuclear intenso e disperso no interior da ilhota, presença de células apoptóticas e perda de arquitetura normal das ilhotas).

3.8-Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)

3.8.1-Para dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram recobertas com solução contendo anticorpo de captura anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-5 ou anti IL-10 de camundongo, diluídos 1:1000 em tampão fosfato de sódio (pH 9,0). As placas foram incubadas a 4 °C, durante 12 h. Após cinco lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%), foi adicionada a solução de bloqueio, constituída de PBS com 10% de soro bovino fetal, com incubação por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas durante 12h, a 4 °C, com as amostras e com a curva padrão das citocinas, diluídas na base dois em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo biotilado anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-5 ou anti-IL-10 de camundongo diluído 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação foi revelada com o substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD[®] (ortho-phenilenodiamina) e interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 2N. A leitura da absorbância foi realizada em 492 nm em leitor de ELISA. O nível de detecção das citocinas foi de 31 pg/ mL para o IFN- γ ; 19 pg/mL para a IL-4; 19 pg/mL para a IL-5 e 39 pg/mL para a IL-10.

3.8.2-Para dosagem de anticorpos em soro

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com o antígeno solúvel de *S. venezuelensis* na concentração de 100 µg/mL diluído em tampão de ligação (Na₂CO₃ 17mM, NaHCO₃ 9,6 mM, pH 9,6) incubadas a 4°C, durante uma noite. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0,05% Tween 20 durante 1 hora, em temperatura ambiente. A essa etapa seguiu a adição das amostras de soro, incubando-se por 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo (PharMingen) conjugados à biotina, diluídos 1:1000, foram adicionados e as placas incubadas por 1 hora, a 37 °C. A reação foi revelada com o substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD[®] (ortho-phenilenediamina) e interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 2 N. A leitura da absorbância foi realizada em 492 nm em leitor de ELISA.

3.9-Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média ± desvio padrão e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *t* de Student. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

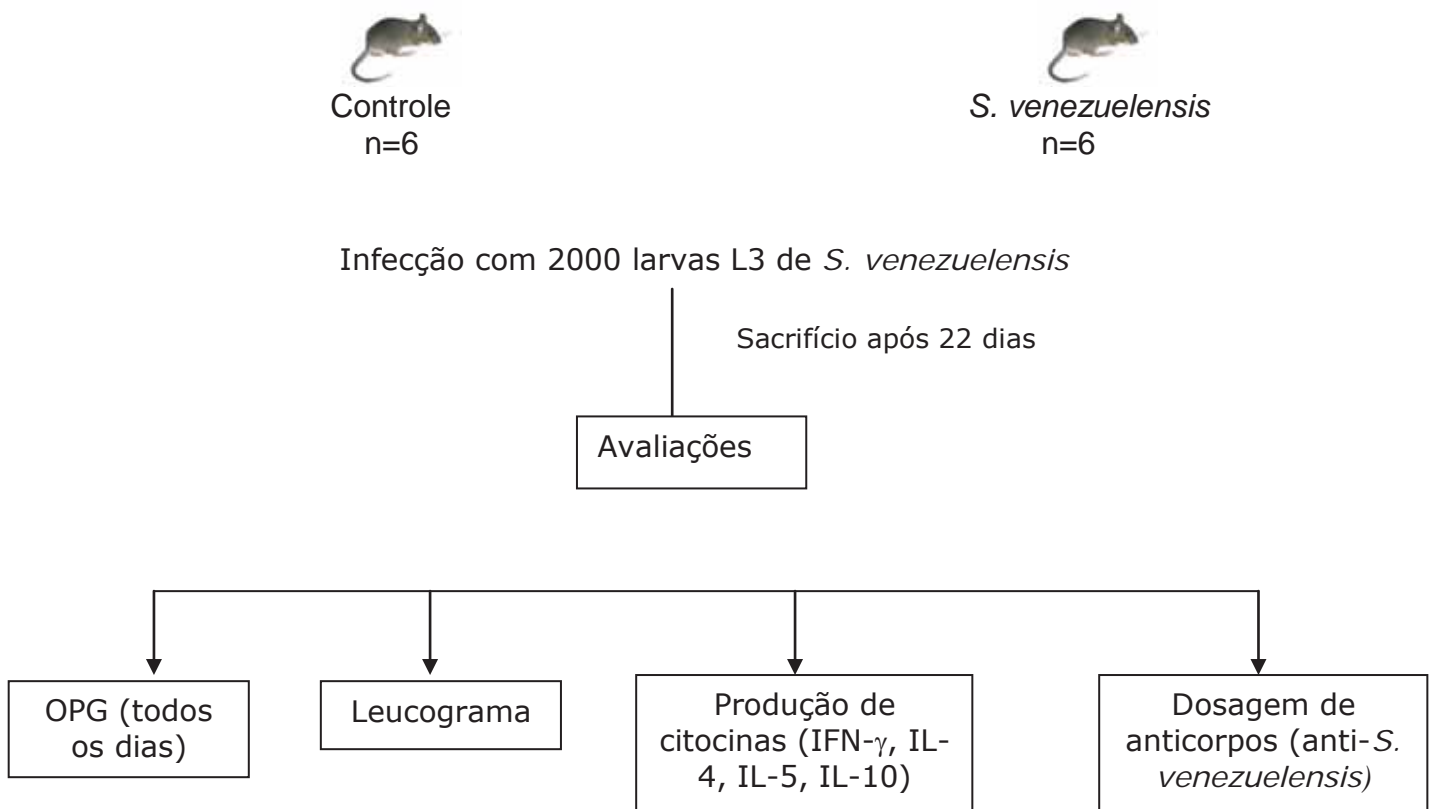
Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

4. Protocolos experimentais e resultados

Para atingir os objetivos definidos anteriormente, utilizamos os protocolos experimentais I e II esquematizados a seguir. Para facilitar a compreensão, os resultados obtidos serão sempre precedidos de seus respectivos protocolos.

4.1-Protocolo Experimental I

Objetivo: acompanhar a dinâmica da infecção por *S. venezuelensis* em camundongos C57BL/6 e determinar o padrão de resposta imune durante a fase de recuperação da infecção.



4.1.1 – Resultados do Protocolo Experimental I

A – Dinâmica da infecção primária com *S. venezuelensis*

Ovos de *S. venezuelensis* foram detectados nas fezes a partir do 5º dia após a infecção. O número máximo de ovos nas fezes foi detectado no 9º dia após a infecção (71900 OPG). A partir do 12º dia após a infecção a contagem de OPG foi 0. A dinâmica da infecção por *S. venezuelensis* está representada na figura 2.

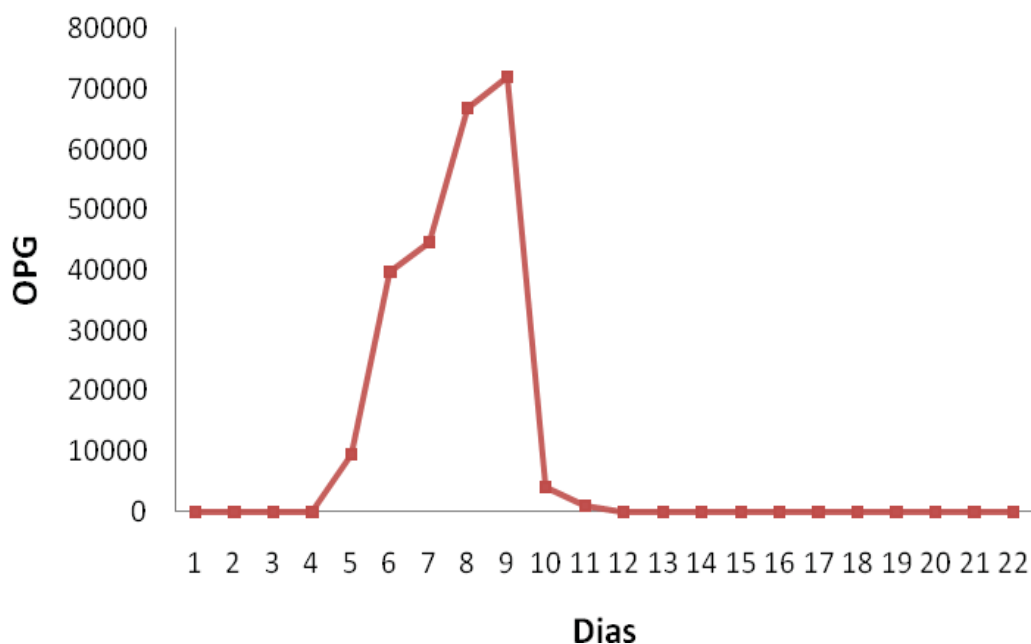


Figura 2 – Dinâmica da infecção primária por *S. venezuelensis* ao longo de 22 dias. A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada em *pool* de fezes de 6 animais por grupo.

B – Resposta imune na fase de recuperação da infecção primária com *S. venezuelensis*

A infecção com *S. venezuelensis* não determinou nenhuma diferença na contagem total de leucócitos dos animais infectados em comparação com o controle. A contagem diferencial também não indicou diferença no número de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos entre os dois grupos (figura 3).

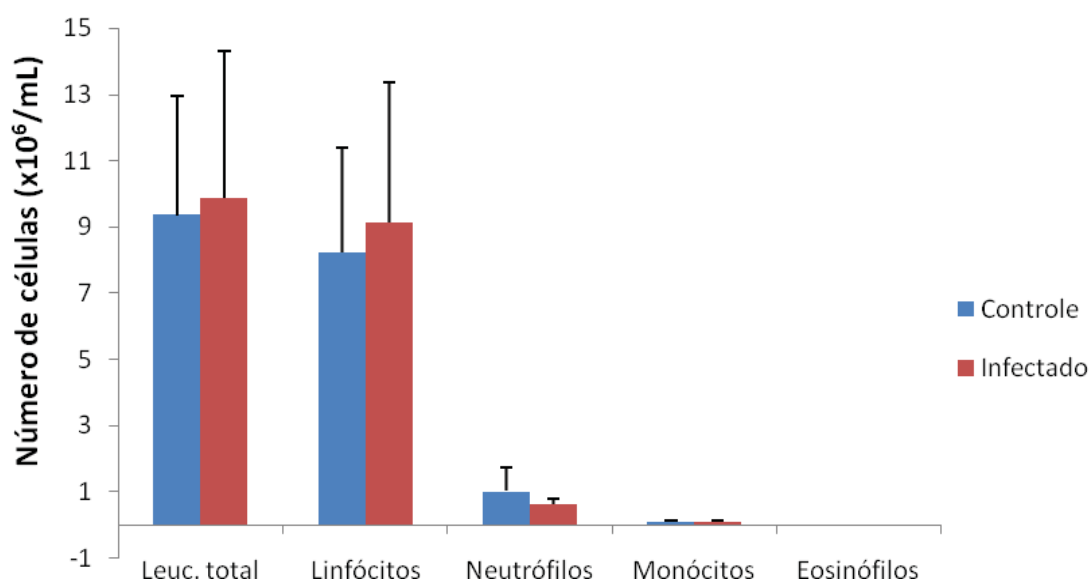


Figura 3 – Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

A produção de IgG1 (figura 4a) aumentou significativamente na fase de recuperação da infecção enquanto que a produção de IgG2a permaneceu baixa (figura 4b), ou seja, com níveis similares aos basais encontrados no grupo controle.

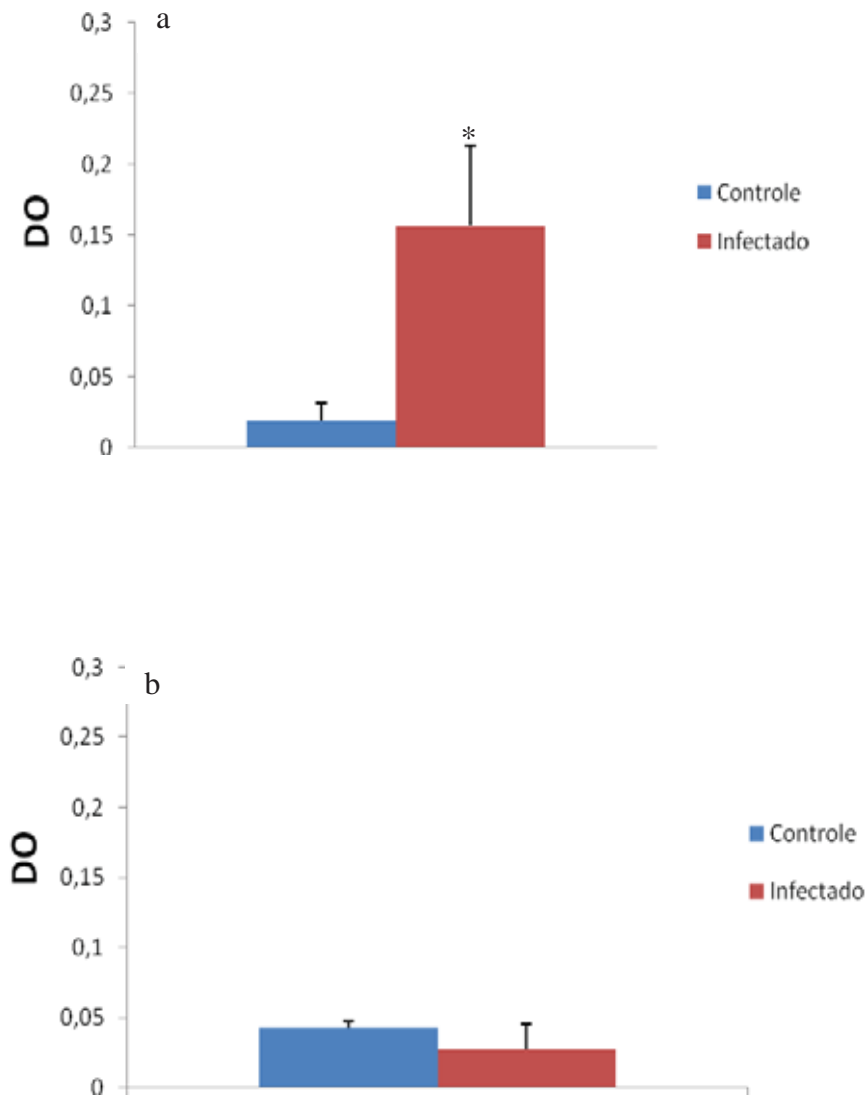


Figura 4 – Produção de anticorpos específicos em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. Os níveis de anticorpos específicos IgG1 (a) e IgG2a (b) representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Como esperado, o estímulo com o antígeno de *S. venezuelensis* na cultura de células de baço (figura 5a) induziu produção significativa de IFN- γ no grupo infectado. Entretanto, esta produção foi discreta no grupo controle e significativamente elevada no grupo infectado. As células esplênicas (figura 5b) dos grupos infectados e controle estimuladas *in vitro* com ConA produziram altos níveis de IFN- γ , sem diferença significativa entre os mesmos. Em relação à cultura de células de linfonodo (figura 5c) estimuladas *in vitro* com ConA, foi verificado um aumento na produção de IFN- γ do grupo infectado comparado ao grupo controle. No entanto, na cultura de células de linfonodo estimulada com o antígeno de *S. venezuelensis*, não foi verificada produção de IFN- γ em ambos os grupos (dados não mostrados).

Para maior clareza dos gráficos, optamos por não incluir nos mesmos os valores da produção de citocinas observadas nas culturas controle (não estimuladas), pois estes valores foram todos abaixo do limite de detecção da técnica.

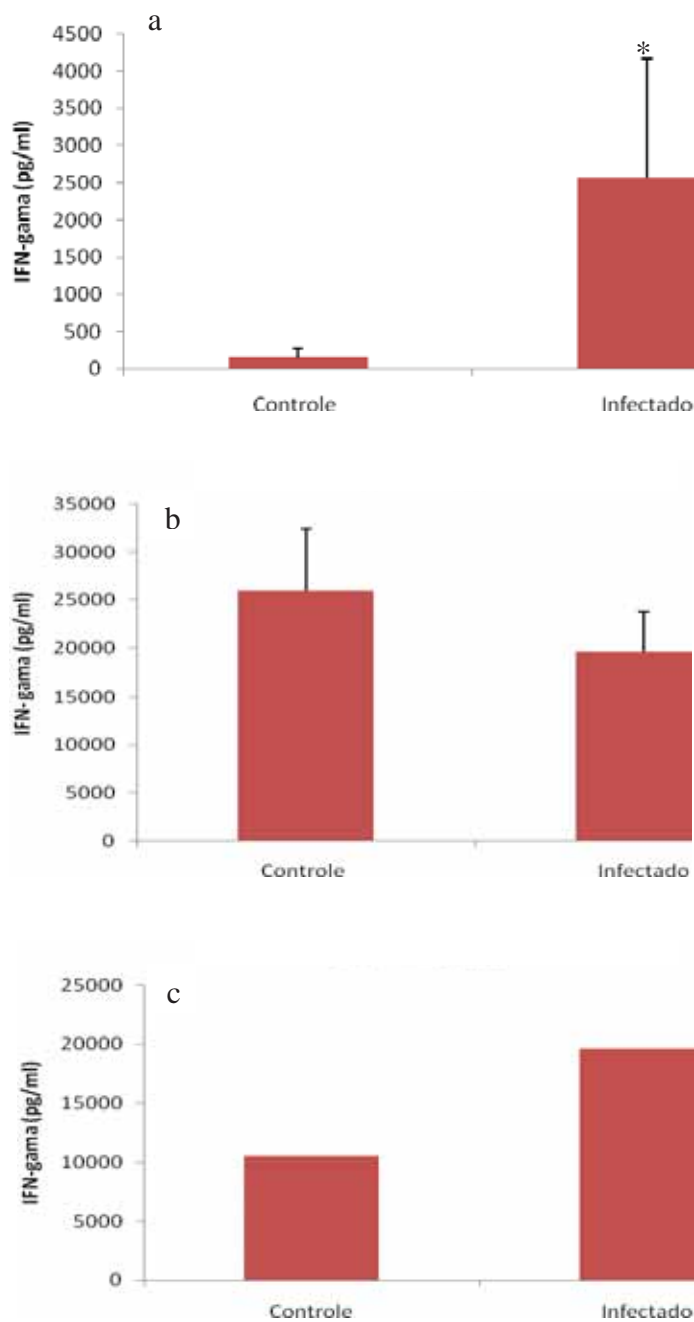


Figura 5- Produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). As células de linfonodo (c) foram estimuladas *in vitro* com ConA. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. Os resultados da produção de IFN- γ em linfonodo foram avaliados em *pool* de células.

Células de baço produziram concentrações maiores de IL-4 após estímulo com antígeno específico (figura 6a) e ConA (figura 6b). Entretanto estes dados não foram estatisticamente significantes. Nas células de linfonodo em cultura, estes estímulos não induziram produção de IL-4 (dados não mostrados).

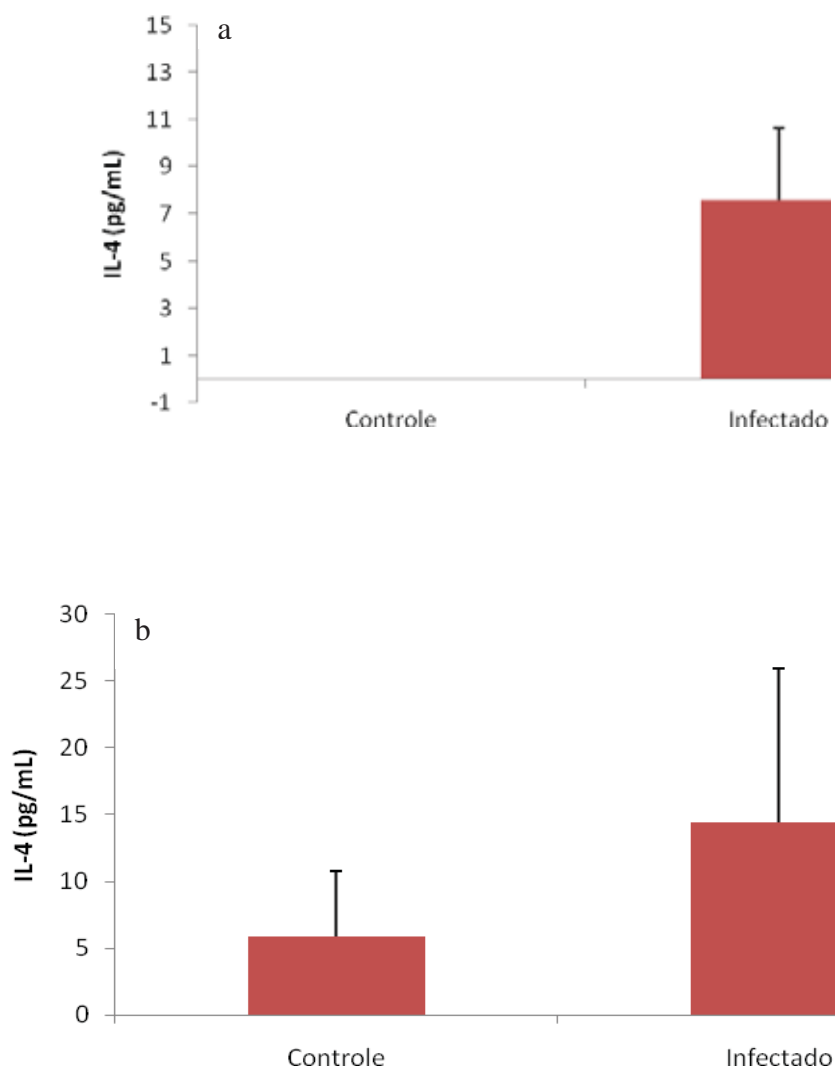


Figura 6 – Produção de IL-4 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo.

Tanto a estimulação *in vitro* com antígeno específico (figura 7a) quanto com ConA (figura 7b) induziram produção significativa de IL-5 pelas células esplênicas dos animais infectados comparados ao grupo controle. Os dois estímulos também induziram produção mais elevada de IL-5 nas culturas de células de linfonodo dos animais infectados (figura 8a e 8b).

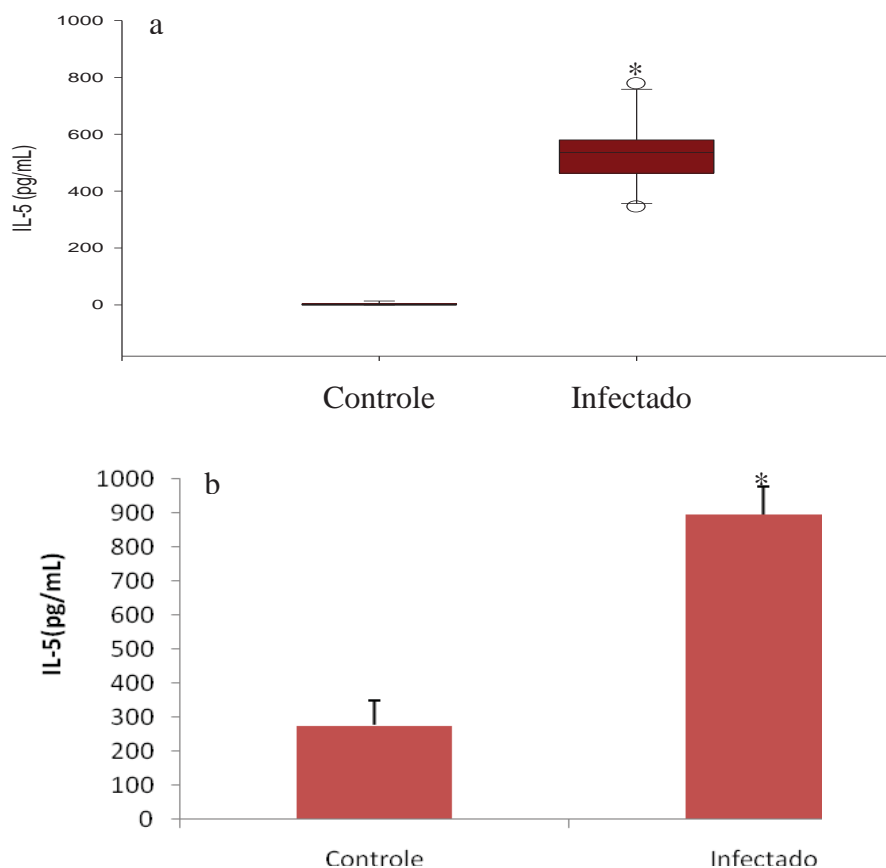


Figura 7 - Produção de IL-5 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados da produção de IL-5 pelas células de baço frente ao estímulo com antígeno (a) representam a mediana (25-75%) e com ConA (b) representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

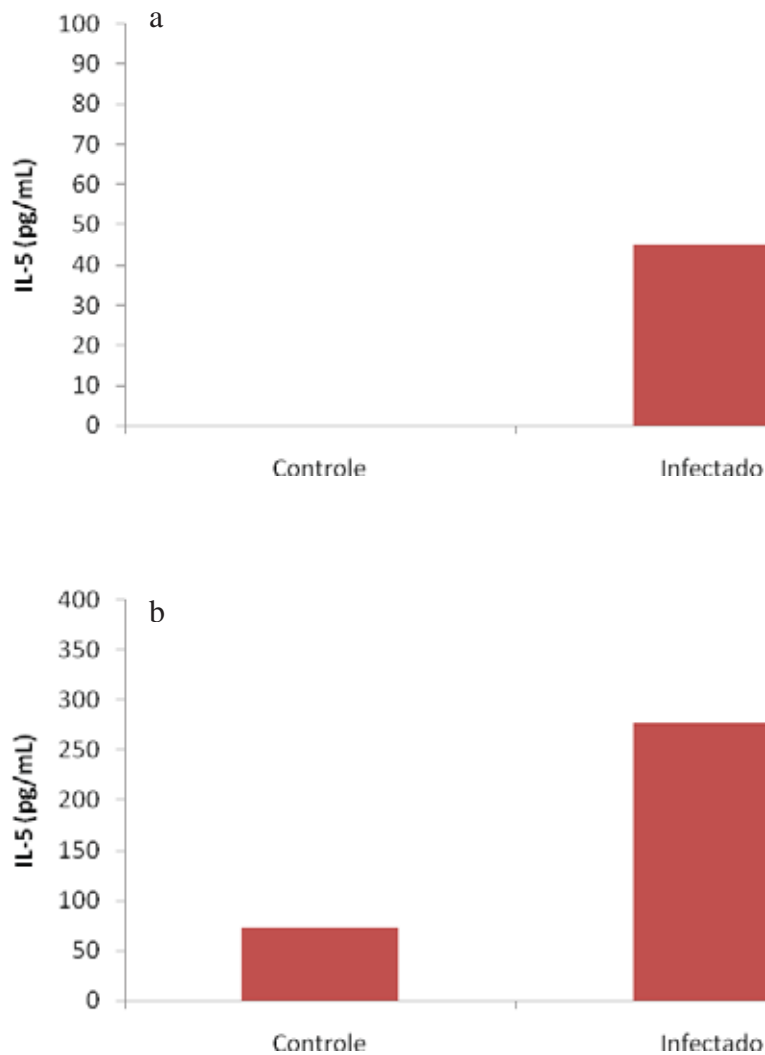


Figura 8 - Produção de IL-5 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células de linfonodo foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados da produção de IL-5 foram avaliados em *pool* de células de linfonodo de 6 animais por grupo.

Detectamos um aumento significativo na produção de IL-10 pelas células de baço do grupo infectado em relação ao grupo controle quando as mesmas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (figura 9a) e ConA (figura 9b). As células de linfonodo do grupo infectado estimuladas *in vitro* com ConA (figura 10) também produziram uma quantidade maior de IL-10 comparado ao grupo controle. No entanto, células de linfonodo dos grupos controle e infectado estimuladas com o antígeno de *S. venezuelensis*, não produziram (dados não mostrados).

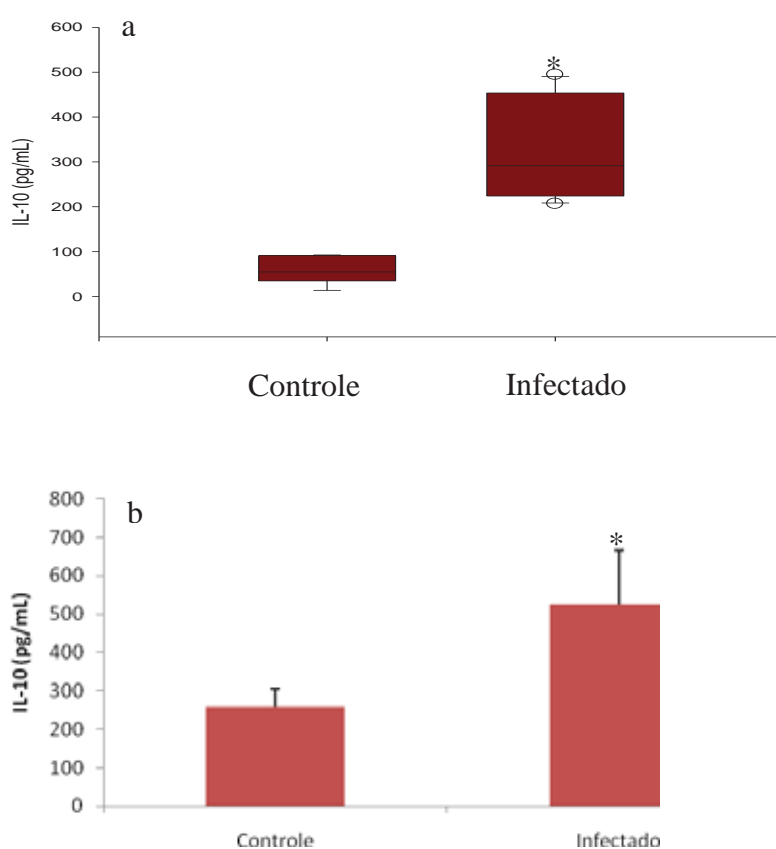


Figura 9 – Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados da produção de IL-10 frente ao estímulo com antígeno (a) representam a mediana (25-75%) e com ConA (b) representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

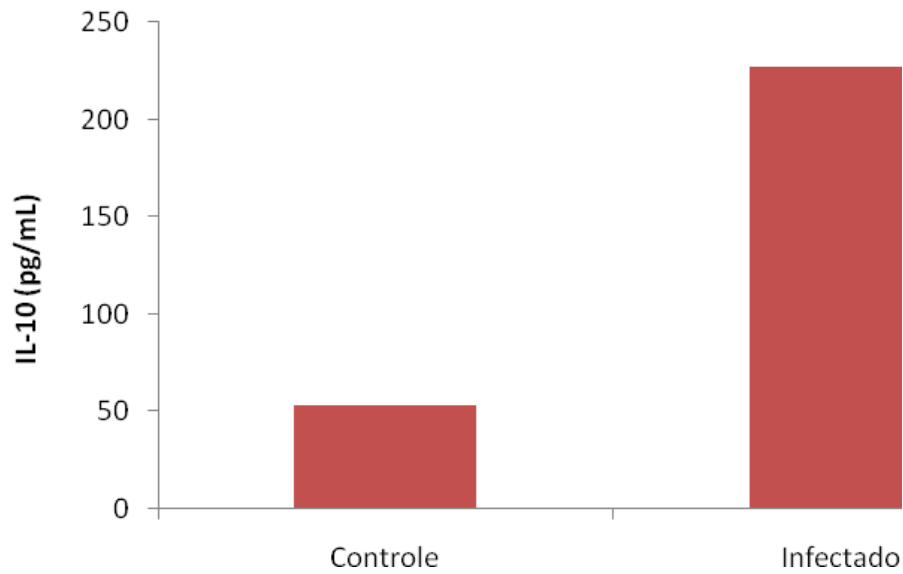
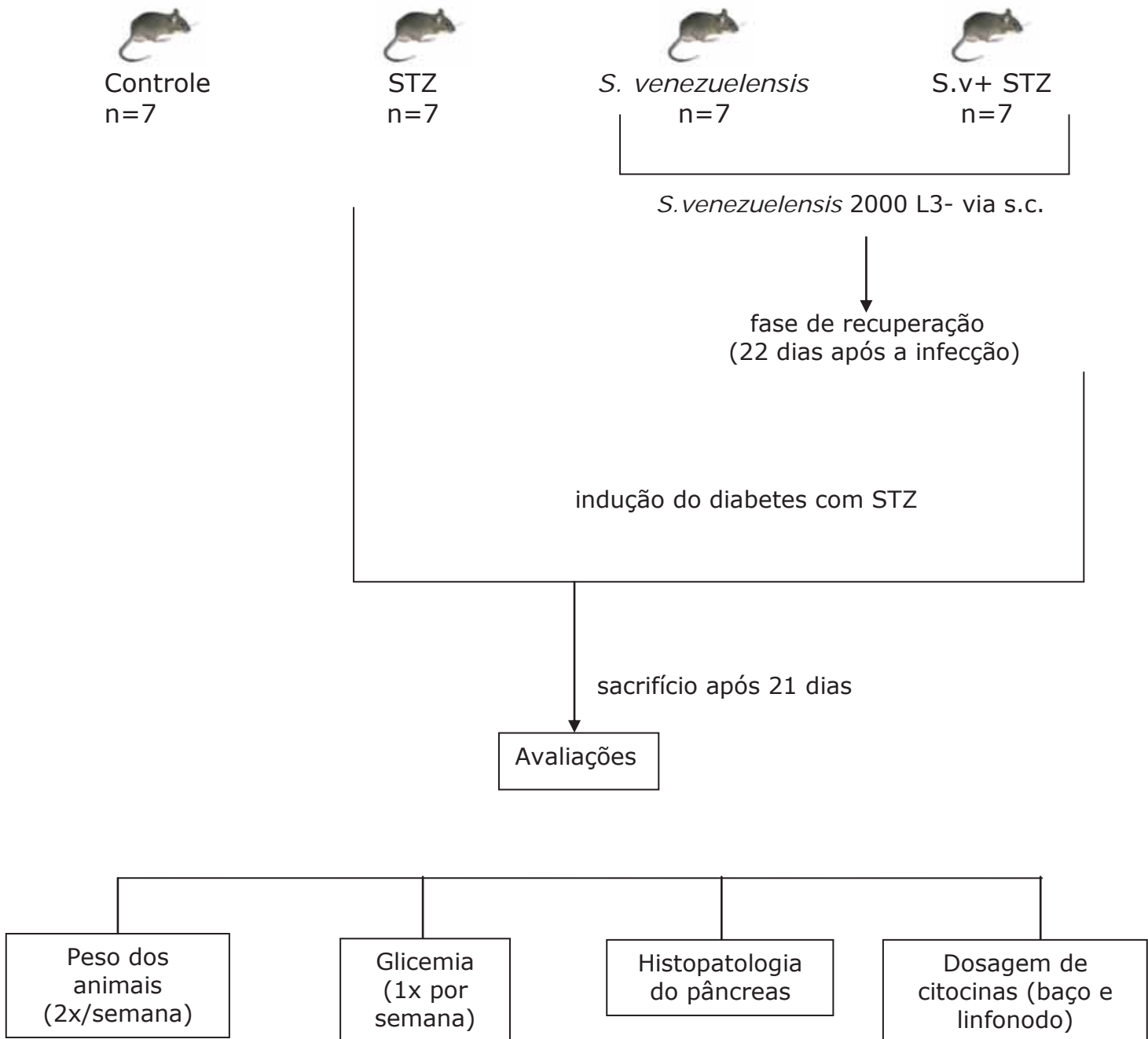


Figura 10 - Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células de linfonodo foram estimuladas *in vitro* com ConA. Os resultados da produção de IL-10 foram avaliados em *pool* de células de linfonodo de 6 animais por grupo.

4.2 - Protocolo Experimental II

Objetivo: avaliar do efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis* no desenvolvimento do diabetes experimental do tipo 1 em camundongos C57BL/6.



4.2.1-Resultados do Protocolo Experimental II

A- Peso corpóreo

O peso corpóreo dos animais foi acompanhado a partir do início da indução do diabetes (dia 0) até o dia da eutanásia (dia 21). A variação em porcentagem (%) nesse período mostrou um ganho no peso dos grupos Controle, *S. venezuelensis* e *S. venezuelensis* + STZ. Este ganho de peso foi bem menor no grupo *S. venezuelensis* + STZ. O grupo STZ foi o único que perdeu peso.

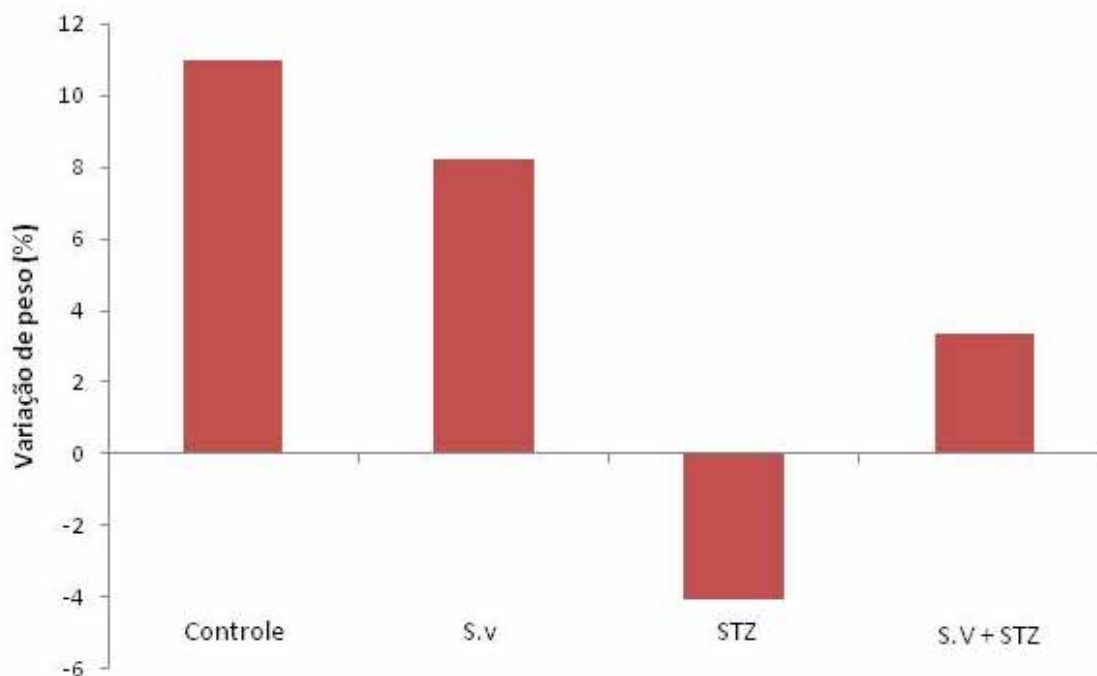


Figura 11- Peso corpóreo de camundongos C57BL/6 durante 21 dias após a indução do diabetes experimental. O peso corpóreo foi avaliado duas vezes por semana.

B- Níveis glicêmicos

Animais submetidos à administração de STZ apresentaram um aumento significativo na glicemia em relação aos grupos de animais que não foram submetidos ao tratamento com STZ. Porém, não ocorreram diferenças significativas entre os dados dos grupos STZ e *S. venezuelensis* + STZ (tabela 2). Os mesmos resultados são mostrados também sob a forma de um gráfico (figura 12) para facilitar a visualização.

Tabela 2 – Efeito da infecção prévia com *Strongyloides venezuelensis* nos níveis glicêmicos.

Grupos	0*	6 dias	14 dias	21 dias
Controle salina	73,5 ± 3,68	75,75 ± 27,74	79,75 ± 9,53	116,5 ± 43,44
<i>S.venezuelensis</i>	94,16 ± 10,06	92,67 ± 20,86	94,16 ± 15,35	99 ± 16,08
STZ	88,42 ± 18,86	163,71 ± 54,17	323,85 ± 116,13	266,42 ± 102,14
<i>S.venezuelensis</i> + STZ	89 ± 14,22	189,42 ± 55,18	388,14 ± 64,92	343,28 ± 85,98

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão; *nível glicêmico antes do tratamento com STZ. O experimento foi realizado com n=7 para cada grupo experimental.

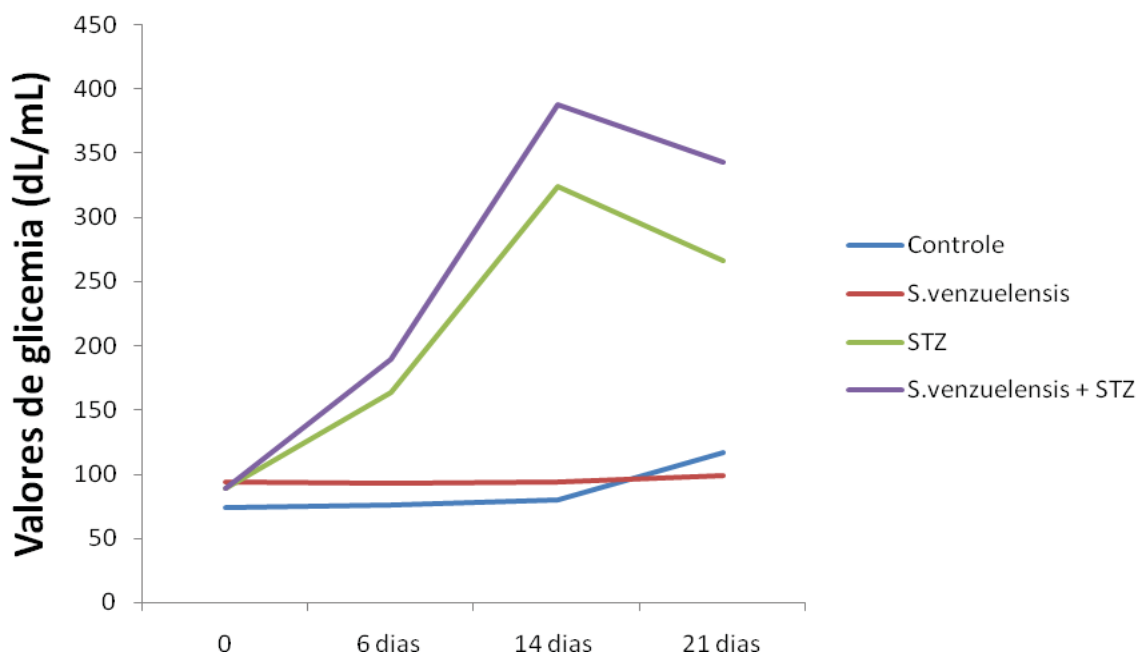


Figura 12 – Efeito da infecção com *Strongyloides venezuelensis* nos níveis glicêmicos após a indução do diabetes experimental. Foram utilizados 7 animais por grupo experimental.

C- Análise histopatológica do pâncreas

A estrutura das ilhotas pancreáticas dos grupos Controle e *S. venezuelensis* permaneceram intactas e sem infiltrado mononuclear, como pode ser visto nas figuras 13a e 13b. As ilhotas pancreáticas dos grupos STZ e *S. venezuelensis* + STZ apresentaram marcante destruição, pois além da presença do infiltrado leucocitário, muitas ilhotas também exibiram modificações estruturais tais como perda de sua forma arredondada (figuras 13c e 13d).

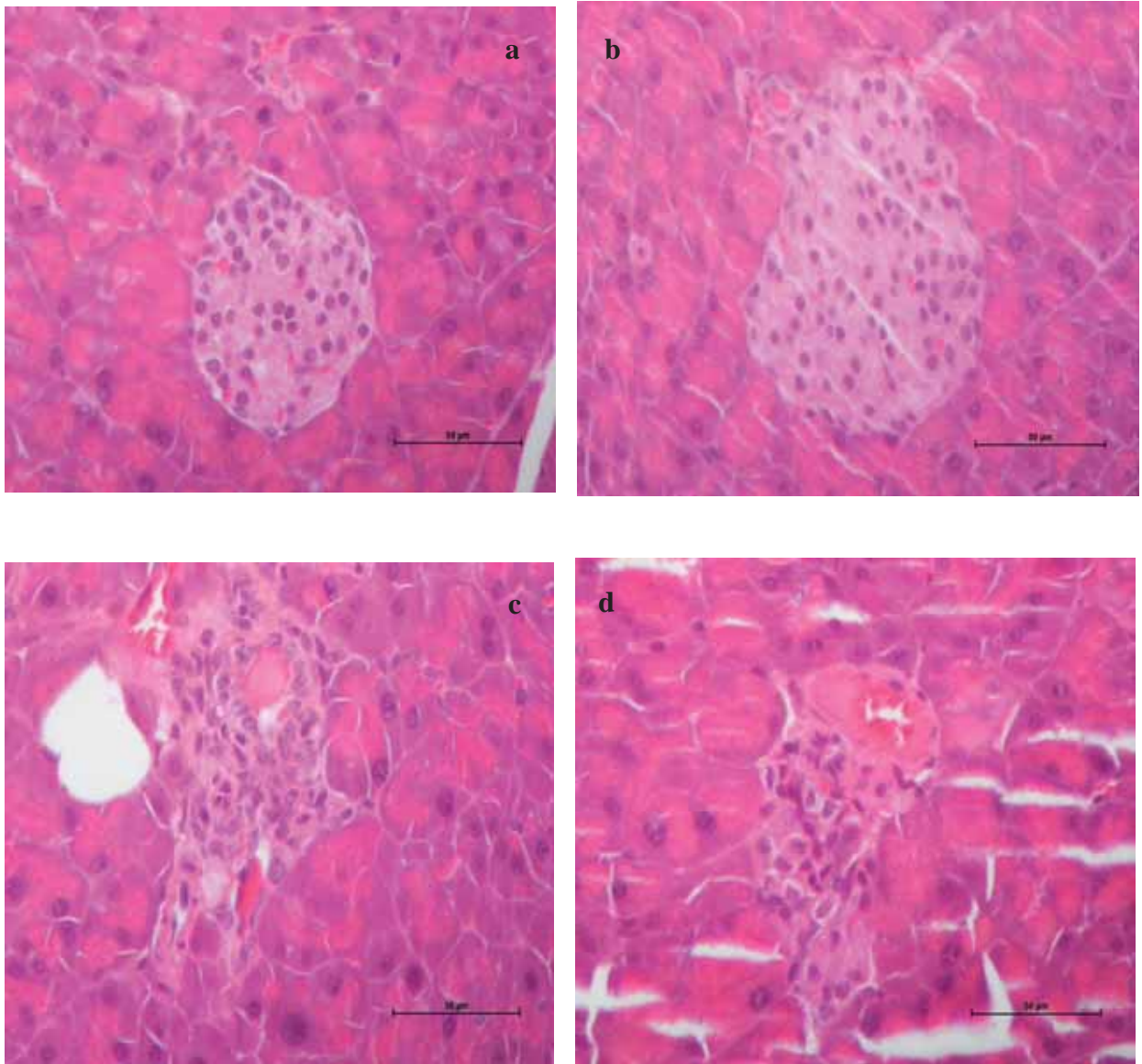


Figura 13 – Efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis* na insulite de camundongos C57BL/6 submetidos a T1D com STZ. Controle (a); infectado com *S. venezuelensis* (b); STZ (c); *S. venezuelensis* + STZ (d). Cortes de pâncreas foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). Aumento de 20x em todas as figuras.

A análise comparativa das ilhotas pancreáticas dos grupos STZ e *S. venezuelensis* + STZ, indicou uma discreta proteção contra o diabetes no grupo infectado antes da indução da doença autoimune. Nesse grupo foi observada uma redução na percentagem de ilhotas com graus mais elevados de destruição (graus 2 e 3) quando comparadas com as ilhotas do grupo STZ. Entretanto, o percentual de ilhotas com comprometimento em grau 1 foi maior no grupo *S. venezuelensis* + STZ. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos. Estes resultados podem ser observados na tabela 3 e na figura 14.

Tabela 3 – Efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis* no grau de comprometimento das ilhotas em camundongos C57BL/6 inoculados com STZ.

	Grau 0 (%)	Grau 1 (%)	Grau 2 (%)	Grau 3 (%)
Grupo STZ	8,3	30	41,7	20
Grupo S.v + STZ	13,3	43,3	26,7	16,7

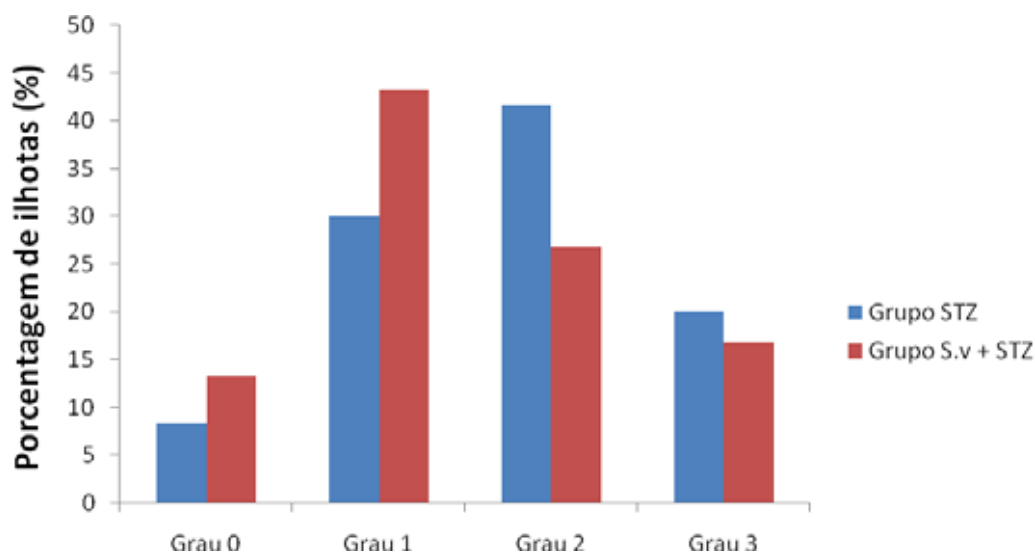


Figura 14 – Efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis* no grau de comprometimento das ilhotas em camundongos C57BL/6 inoculados com STZ.

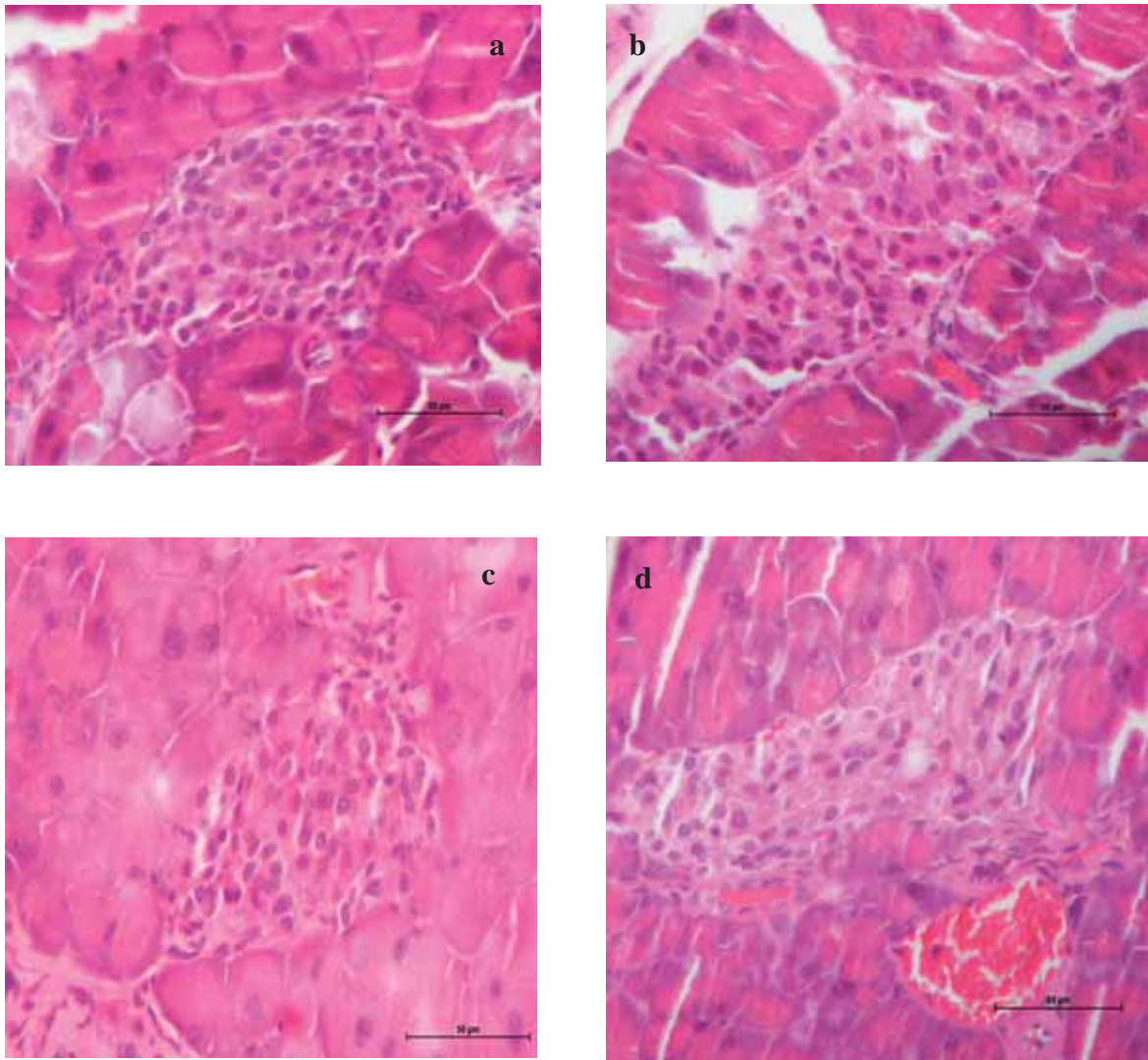


Figura 15- Ilhotas pancreáticas no grau 3 dos grupos STZ (a e b) e *S. venezuelensis* + STZ (c e d). Cortes de pâncreas foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). Aumento de 20x em todas as figuras.

D- Produção de citocinas

Quando as células do baço (figura 16a) foram estimuladas *in vitro* com o antígeno específico, a produção de IFN- γ foi significativamente mais elevada nos grupos *S. venezuelensis* e *S. venezuelensis* + STZ em relação ao grupo controle e STZ. A produção de IFN- γ por células esplênicas estimuladas com ConA foi elevada e similar em todos os grupos experimentais (figura 16b).

Optamos novamente em não apresentar os valores de culturas de células não estimuladas desse protocolo, pois os valores encontrados foram todos abaixo do limite de detecção da técnica.

Não ocorreu produção de IFN- γ em culturas de linfonodos, estimuladas com antígeno ou ConA, em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados).

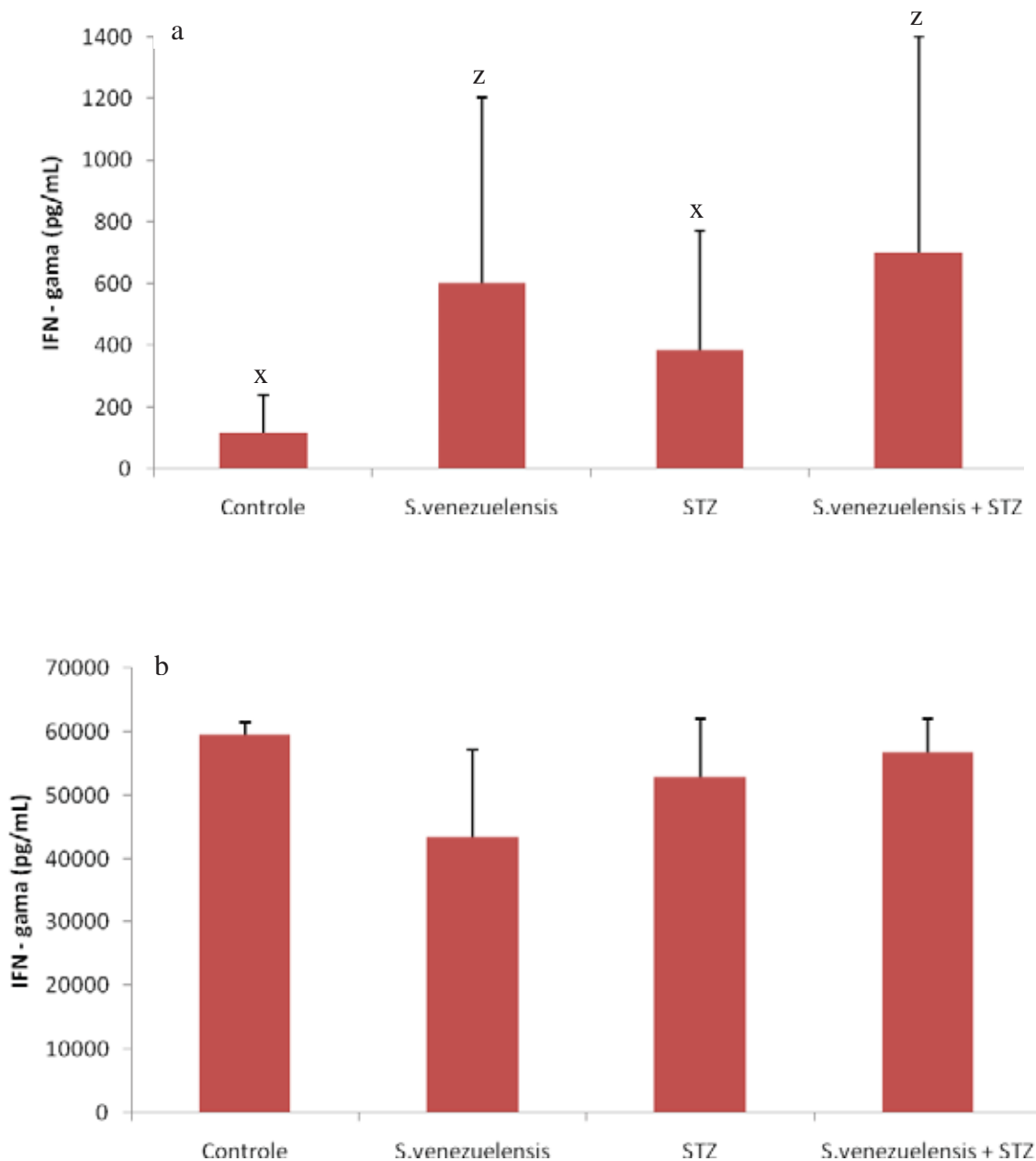


Figura 16 – Efeito da infecção prévia com *S. venezuelensis* na produção de IFN- γ por camundongos C57BL/6 inoculados com STZ . As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. A diferença estatística é mostrada pela presença de letras não coincidentes nas colunas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Células de baço estimuladas *in vitro* com antígeno específico (figura 17a) e ConA (figura 17b) dos grupos *S. venezuelensis* e *S. venezuelensis* + STZ apresentaram um aumento significativo na produção de IL-5 quando comparado aos demais grupos. Não foi detectada IL-5 em culturas de linfonodo em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados).

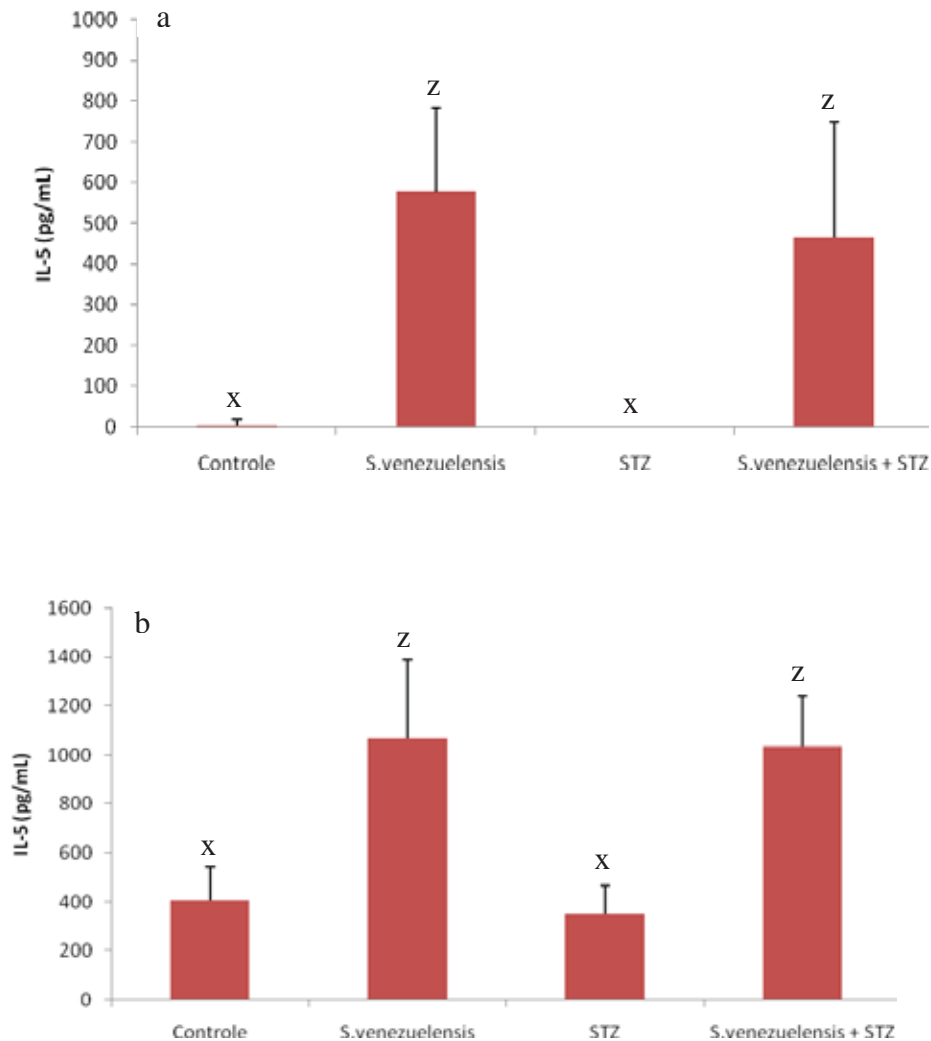


Figura 17- Produção de IL-5 em camundongos C57BL/6. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA (b). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. A diferença estatística é dada pela presença de letras não coincidentes nas colunas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Células esplênicas dos grupos *S. venezuelensis* e *S. venezuelensis* + STZ estimuladas *in vitro* com antígeno específico, produziram níveis significativamente elevados de IL-10, em comparação com o grupo STZ (figura 18a). A produção de IL-10 por células esplênicas estimuladas *in vitro* com ConA (figura 18b) foi elevada em todos os grupos experimentais, porém não houve diferença estatística entre os mesmos.

Culturas de células de linfonodos estimuladas com antígeno mostraram elevada produção de IL-10 no grupo *S. venezuelensis* e discreta produção desta citocina no grupo *S. venezuelensis* + STZ (figura 19a). A produção de IL-10 por células de linfonodos estimuladas com ConA (figura 19b) foi elevada, mas similar nos quatro grupos experimentais.

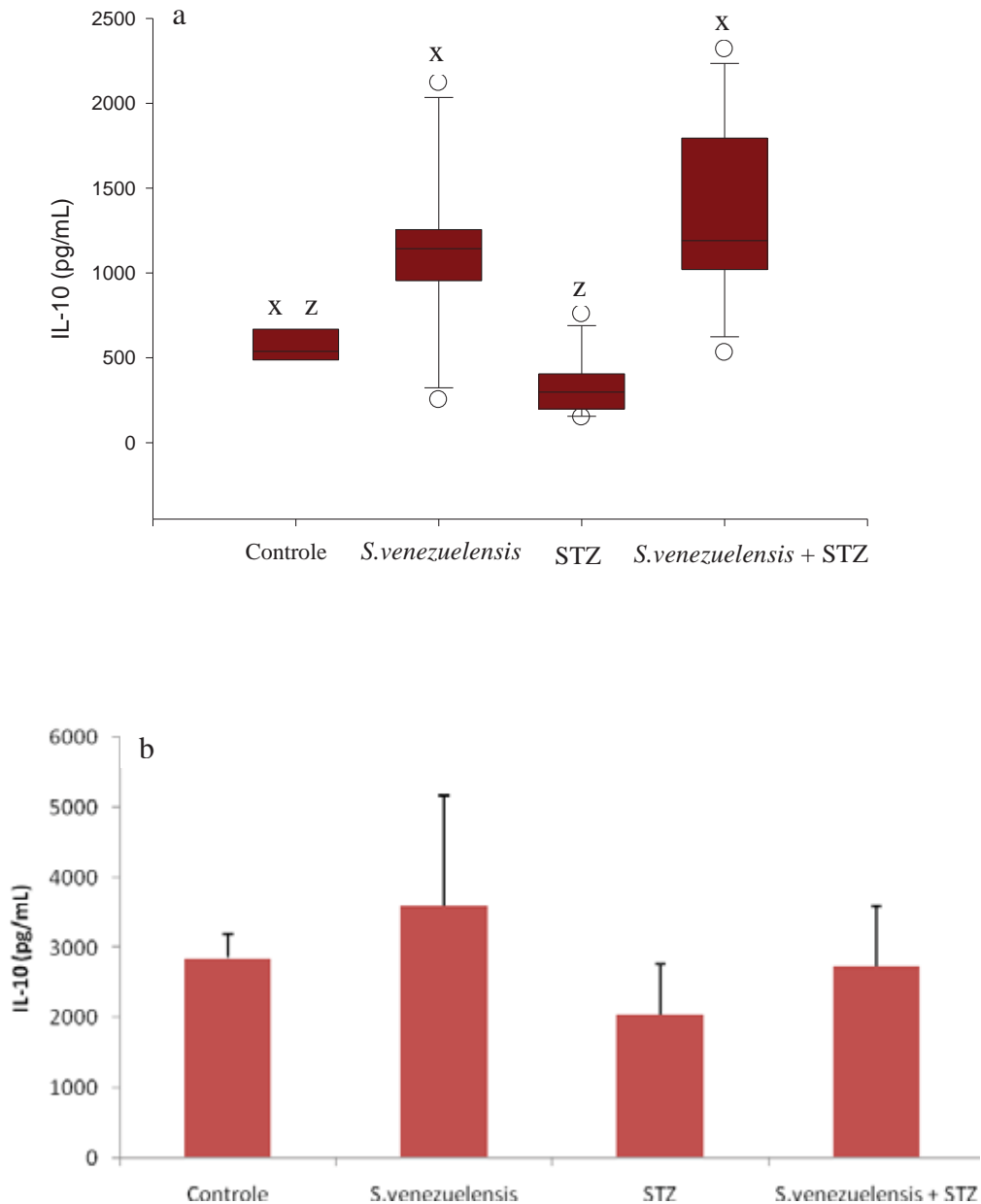


Figura 18- Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e ConA(b). Os resultados representam a mediana (25-75%) nas culturas estimuladas com o antígeno específico (a), e com ConA (b), representam a média ± desvio padrão de 7 animais por grupo. A diferença estatística é mostrada pela presença de letras não coincidentes nas colunas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

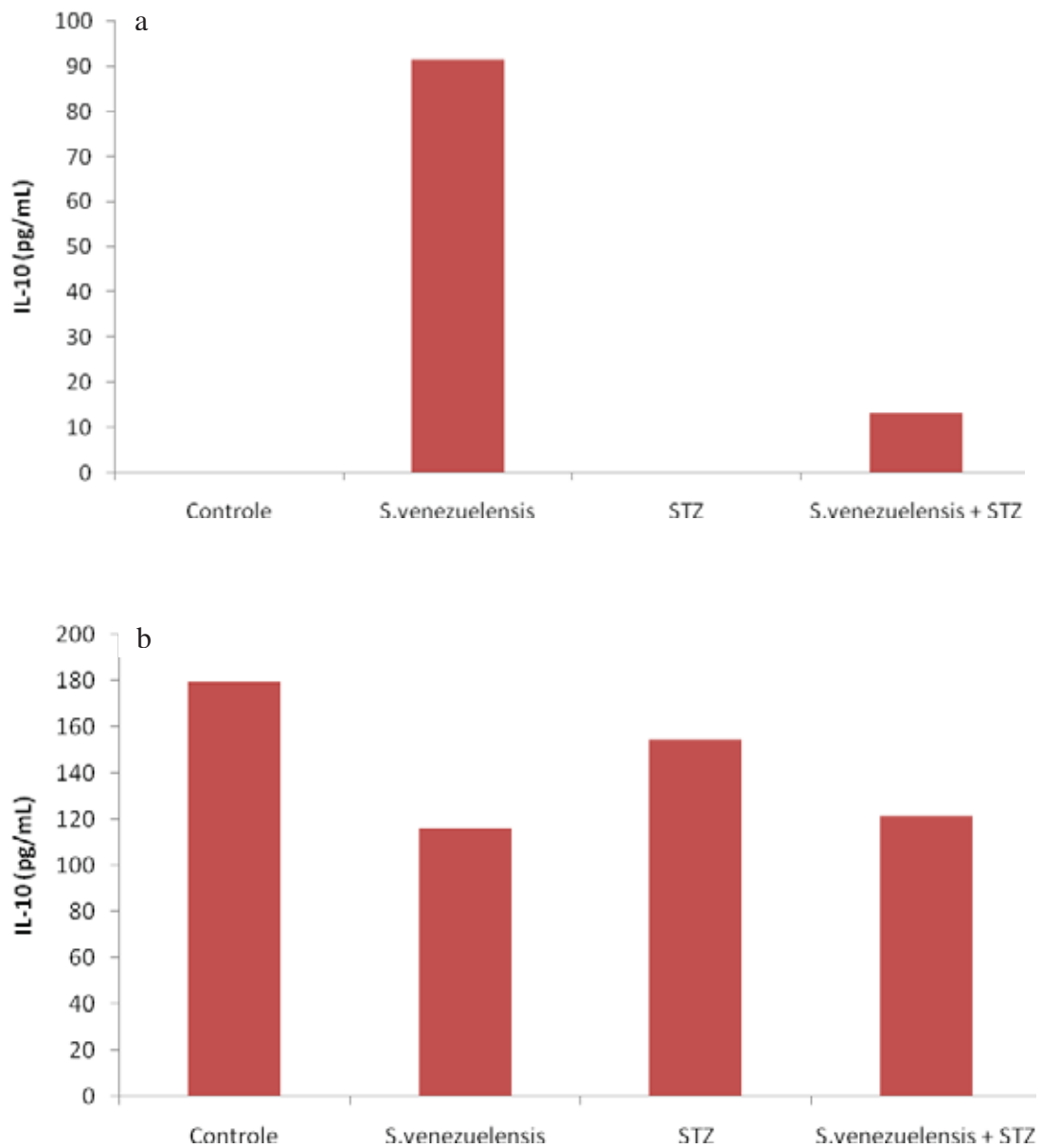


Figura 19 - Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. venezuelensis*. As células de linfonodo foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *S. venezuelensis* (a) e com ConA (b). Os resultados da produção de IL-10 foram avaliados em *pool* de células de linfonodo de 7 animais por grupo.

5. Discussão

Esta investigação foi proposta em função da Hipótese da Higiene. Esta hipótese postula que o aumento mais recentemente observado de doenças imunomediadas tais como alergia e autoimunidade, seria decorrente da ausência de infecções ou de contato com determinados agentes infecciosos (helmintos, micobactérias e lactobacilos) durante a infância (Rook, 2009).

Neste contexto, nossa hipótese de trabalho era que a infecção com *Strongyloides venezuelensis* determinaria uma resistência, parcial ou total, ao desenvolvimento do diabetes. Para investigar esta possibilidade, infectamos camundongos C57BL/6 com 2000 larvas infectantes (L3) e, no período de recuperação, induzimos um quadro de diabetes por inoculação de estreptozotocina (STZ).

O *S. venezuelensis* determinou uma infecção cuja carga parasitária maior ocorreu no 9º dia após a inoculação. A partir do 12º dia não foram encontrados ovos nas fezes. Estes resultados são similares aos previamente descritos por Amarante & Oliveira-Siqueira (2002), que constataram na infecção com *S. venezuelensis* em camundongos C57BL/6 o aparecimento de ovos nas fezes a partir do 5º dia de infecção. Também observaram o número máximo de ovos no 8º dia e a partir do 11º dia de infecção, os ovos não foram mais detectados.

O 22º dia foi o período máximo de seguimento da infecção e foi escolhido como o período de recuperação. Neste período os animais foram eutanasiados e a resposta imune específica foi avaliada. A análise global dos parâmetros imunológicos obtidos indicou a ocorrência um padrão misto de resposta, ou seja, tanto Th1 quanto Th2. Entretanto, os resultados também indicam que o padrão Th2 foi claramente predominante nesta fase de recuperação da infecção.

Nesta fase constatou-se produção de IgG1, mas não de IgG2a específica. Em relação à produção de citocinas, observamos produção de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. Este padrão de resposta é compatível com vários relatos. Por exemplo, Machado et al., 2007 descreveram a presença de elevada produção de anticorpos IgG1 e de citocinas de ambos os padrões de resposta, IFN- γ , IL-4 e IL-5, em camundongos infectados com *S. venezuelensis*. Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa (Chiuso-Minicucci et al., 2009) descreveu resultados similares na infecção com *S. venezuelensis* em ratos Lewis, nos quais também foi observado um padrão misto de resposta imune.

Teoricamente, esta polarização de resposta imune causada pela infecção poderia determinar algum grau de proteção contra o desenvolvimento do diabetes, pois esta patologia é caracteristicamente associada com uma resposta do tipo Th1 (Hill et al., 2003; Gianani & Eisenbarth, 2005). Além disto, chama atenção a exuberante produção de IL-10. Esta citocina é reconhecida como uma potente reguladora da resposta imune, pois a mesma pode agir regulando tanto a imunidade natural, através, por exemplo, de seu efeito na diminuição da atividade de macrófagos e células NK, quanto na imunidade adquirida, pela sua ação direta nas células T, pois inibe a ação de outras citocinas, como IL-4 e IL-5 nestas células (Couper et al., 2008). Este aumento de IL-10 foi constatado em todas as condições testadas, ou seja, ocorreu tanto por estímulo específico quanto policlonal. Além disto, foi detectada tanto em culturas de células oriundas de baço quanto de linfonodos. A identidade destas células produtoras de IL-10 não foi avaliada até o momento, porém, é possível que células T com capacidade reguladora (Tregs) contribuam para esta produção. Células Tregs são conhecidas como fontes importantes desta citocina e sua capacidade de regular respostas autoimunes tem sido descrita recentemente. (Alonso et al., 2009; Von Herrath & Harrison, 2003).

A participação da IL-10 como citocina reguladora da resposta imune está bem estabelecida (O`Garra et al., 2008). Mais recentemente, a contribuição da IL-10 derivada de células Tregs, nos processos inflamatórios, especialmente nas patologias autoimunes vem sendo desvendada (Zhang et al., 2004). Neste contexto tem sido experimentalmente demonstrado que os helmintos são capazes de induzir a diferenciação de células T reguladoras produtoras de IL-10 (Hesse et al., 2004).

Apesar do embasamento científico de nossa proposta, nossa hipótese de trabalho não se confirmou, ou seja, a infecção prévia com *S. venezuelensis* não evitou, de forma significativa, o desenvolvimento do diabetes induzido por STZ em camundongos C57BL/6. Os resultados obtidos são distintos de vários relatos, como por exemplo, Liu et al., 2009 descreveu que a infecção com o helminto *Heligmosomoides polygyrus* diminuiu a insulite causada em camundongos diabéticos. Outro exemplo de proteção é o que foi descrito por Thabet et al., 2008. Estes autores observaram uma proteção marcante do diabetes em modelo de infecção com *Schistosoma mansoni*, através de uma redução significativa da glicemia dos animais infectados.

Como explicar então este efeito protetor tão discreto? Várias possibilidades poderiam ser futuramente testadas. É possível, por exemplo, que várias re-infecções sejam necessárias para desencadear um efeito imunorregulador significativo. Esta possibilidade se baseia no efeito protetor discreto, menor número de ilhotas com elevado grau de infiltração e desestruturação, constatado nesta investigação. Além disto, estudos epidemiológicos sugerem que a proteção por helmintos ocorre em áreas endêmicas, ou seja, locais de presença constante do parasita (Zaconne et al., 2006; Cooke, 2009).

A produção acentuada de IL-10 é sugestiva da presença de células T reguladoras durante esta infecção. Poderia se pensar, por exemplo, que as mesmas necessitem de ativação para expressar esta habilidade imunorreguladora. Neste sentido, encontra-se em execução um protocolo baseado em imunização com *S. venezuelensis* seguida de uma etapa de infecção com o mesmo parasita. Pressupomos que esta estratégia possa ser mais eficaz na indução de células Tregs.

Apesar de várias revisões atuais (Hewitson et al., 2009; Maizels et al., 2009) alertarem para o efeito imunorregulador dos helmintos, vários aspectos precisam ainda ser esclarecidos. Por exemplo, a imunomodulação mediada por nematódeos gastrointestinais parece exibir certa especificidade local. Neste sentido, tem sido observado que este tipo de infecção pode proteger contra inflamação alérgica das vias respiratórias, mas não contra dermatite atópica (Hartmann et al., 2009). Efeitos divergentes têm sido também atribuídos às diferentes espécies de nematódeos e à cinética da infecção. Isto foi constatado, por exemplo, no efeito protetor do *Schistosoma mansoni* na inflamação alérgica das vias aéreas o qual dependeu da intensidade e da cronicidade da infecção (Smits et al., 2007). Por último, é também importante considerar o aspecto de cronicidade das infecções por helmintos. No caso desta proposta empregamos um modelo que determina eliminação do parasita. Talvez seja necessário o emprego de um modelo no qual a relação parasita-hospedeiro exiba cronicidade, como é caso do modelo de infecção com *Schistosoma mansoni*, que apresenta resultados relevantes quando é utilizado como agente imunomodulador.

Em resumo, estes resultados mostram que a infecção com *S. venezuelensis* não impediu o desenvolvimento de diabetes em camundongos C57BL/6 inoculados com STZ. Entretanto, o discreto grau de proteção observado contra a insulite nos motivou a preservar esta linha de investigação, pois

estratégias similares poderão definir um efeito benéfico significativo contra esta patologia.

6. Referências Bibliográficas

1. Alonso N, Soldevila B, Sanmartí A, Pujol-Borrell R, Martínez-Cáceres E. Regulatory T cells in diabetes and gastritis. **Autoimmun Rev.**8(8):659-62, 2009.
2. Amarante AFT, Oliveira-Siqueira TCG. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 54:273-78, 2002.
3. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**, 190:995-1004, 1999.
4. Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. **Annu Rev Immunol**, 19:131-61, 2001.
5. Cameron MJ et al. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. **J Immunol**, 159:4686-42, 1997.
6. Cardwell CR, Carson DJ, Yarnell J, Shields MD, Patterson CC. Atopy, home environment and the risk of childhood-onset type 1 diabetes: a population-based case-control study. **Pediatr Diabetes**, 9:191-6, 2008.
7. Chiuso-Minicucci F, Marra NM, Zorzella-Pezavento SFG, França TGD, Ishikawa LLW, Amarante MRV et al. Recovery from *Strongyloides venezuelensis* infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response. **Parasite Immunol**, 2009(aceito para publicação).
8. Cooke A. Infection and autoimmunity. **Blood Cells Mol Diss.**42(2):105-7, 2009.
9. Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, Dunne DW. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. **Parasite Immunol**, 21:169-76, 1999.
10. Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. **Parasite Immunology**, 26:455-67, 2004.
11. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol**, 180: 5771-7, 2008.
12. Elliott DE, Summers RW, Weinstock JV. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. **Int J Parasitol**, 37:457-64, 2007.

13. Fallon PG, Alcami A. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? **Trends Immunol**, 27:470-6, 2006.
14. Feillet H, Bach JF. On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes. **Clin Dev Immunol**, 11:191-4, 2004.
15. Fernandes A, Pereira ATM, Eschenazi PD, Schilter HC, Sousa ALS, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, 30:139-49, 2008.
16. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Immunol**, 4:330-6, 2003.
17. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. **Immunol Rev**, 204:232-49, 2005.
18. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Council Sci Ind Res**, 12:50-2, 1939.
19. Hartmann S, Schnoeller C, Dahten A, Avagyan A, Rausch S, Lendner M et al. Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. **Clin Exp Allergy**, 39: 1585–96, 2009.
20. Helmbj H, Bickle Q. Immune modulation by helminth infections. **Parasite Immunology**, 28:479-81, 2006.
21. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prifer J, Mentink-Kane M, Leusink M et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, 172: 3157–66, 2004.
22. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Mol Biochem Parasitol**, 167: 1–11, 2009.
23. Hill NJ, Van Gunst K, Sarvetnick N. Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice. **J Immunol**. 170(4):1649-58, 2003.
24. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, 299:1057–61, 2003.
25. Hunter MM, Wang A, Hirota CL, McKay DM. Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. **J Immunol**, 174:7368-75, 2005.

26. Igarashi H, Cao Y, Iwai H, Piao J, Kamimura Y, Hashiguchi M et al. GITR ligand-costimulation activates effector and regulatory functions of CD4⁺ T cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 369:1134-8, 2008.
27. Jaeckel E, Mpofo N, Saal N, Manns MP. Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. **Horm Metab Res**, 40:126-36, 2008.
28. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Ellis JS, Hoeman CM, Franklin CL, Zaghouni H. Innocuous IFN-gamma induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. **J Exp Med**. 205(1):207-18, 2008.
29. Kantwerk-funke G, Burkart V, Kolb B. Low dose streptozotocin causes stimulation of the immune system and of anti-islet cytotoxicity in mice. **Clin. exp. Immunol**, 86: 266-70, 1991.
30. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. **Nat Immunol**, 4:337-42, 2003.
31. Kitagaki K, Businga TR, Racilia D, Elliot DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. **J Immunol**, 177:1628-35, 2006.
32. Kukreja A, Maclaren NK. NKT cells and type-1 diabetes and the "hygiene hypothesis" to explain the rising incidence rates. **Diabetes Technology & Therapeutics**, 4:323-34, 2002.
33. Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. **Cell**, 78:399-408, 1994.
34. La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Infect Immun**, 71:4996-5004, 2003.
35. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, 51:216-226, 2008.
36. Liotta F, Cosmi L, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Functional features of human CD25⁺ regulatory thymocytes. **Microbes Infect**, 7:1017-22, 2005.
37. Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A et al. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25⁻ and IL-10-independent mechanisms. **Infect Immun**, 77(12):5347-58, 2009.

38. Luque C, Cisternas FA, Araya M. Changes in the patterns of disease after the epidemiological transition in health in Chile, 1950-2003. **Rev Med Chil**, 134:703-12. 2006.
39. Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Roque-Barreira MC, Faccioli LH. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, 29:549-557, 2007.
40. Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **J Exp Med**, 28: 2059-66, 2009.
41. Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, Chen X, Li WQ, Hall VL, Willette-Brown J, Hurwitz AA, Leonard WJ, Durum SK. Development of regulatory T cells requires IL-7 α stimulation by IL-7 or TSLP. **Blood**, 112:3283-92, 2008.
42. McDevitt H. Closing in on type 1 diabetes. **The New England journal of medicine**, 345:1060-61, 2001.
43. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. **Eur J Immunol**, 35:31-41, 2005.
44. Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. **Immunobiology**, 205:35-50, 2002.
45. Nakai ES, Amarante AFT. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 10:1-6, 2001.
46. Negrão-Corrêa D, Souza DG, Pinho V, Barsante MM, Souza ALS, Teixeira M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* infected mice. **Infect Immun**, 72:1135-42, 2004.
47. Nicoletti F, Di Marco R, Conget I, Gomis R, Edwards C, Papaccio G, Bendtzen K, Sandler S. Sodium fusidate ameliorates the course of diabetes induced in mice by multiple low doses of streptozotocin. **J Autoimmun**, 15:395-405, 2000.
48. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol Rev** 2008; 223: 114-31.

- 49.Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. **J Exp Med**, 183:2669-74, 1996.
- 50.Pugliese A, Awdeh ZL, Alper CA, Jackson RA, Eisenbarth GS. The INS B allele (1,428 Fok I) is associated with reduced IDDM incidence in autoantibody-positive first degree relatives despite the presence of autoantibodies and high-risk HLA alleles. **Transplantation proceedings**, 6:3392:98, 1995.
- 51.Randolph DA, Fathman CG. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their therapeutic potential. **Annu Rev Med**, 57:381-402, 2006.
- 52.Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. **Diabetologia** ,46(3):305-21, 2003.
- 53.Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? **Eur J Immunol**, 38:925-7, 2008.
- 54.Rook GA. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, 1:3-11, 2009.
- 55.Scheffold A, Murphy KM, Höfer T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. **Nat Immunol**, 8:1285-7, 2007.
- 56.Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. **Immunol Letters**, 82: 101-10, 2002.
- 57.Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sardor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. **Int Immunol**, 15: 59-69, 2003.
- 58.Smith EM, Cadet P, Stefano GB, Opp MR, Hughes TK Jr. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. **J Neuroimmunol**, 100: 140-8, 1999.
- 59.Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **J Allergy Clin Immunol**, 120: 932-40, 2007.
- 60.Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. **Br Med J**, 299:1259-60, 1989.

- 61.Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.**50: 536-46, 2001.
- 62.Thabet HS, Saleh NKM, Thabet SS, Abdel-Aziz M, Kalleney NK. Decreased basal non-insulin-stimulated glucose uptake by diaphragm in streptozotocin-induced diabetic mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, 2008.
- 63.Tindall N, Wilson PA. Criteria for a proof of migration routes of immature parasites inside hosts exemplified by studies of *Strongyloides ratti* in the rat. **Parasitology**, 96:551-563, 1988.
- 64.Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 273 p, 1998.
- 65.Von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. **Nat Rev Immunol**, 3(3):223-32, 2003.
- 66.Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**, 16: 249-56, 2004.
- 67.Zhu H, Wenhong Q, Lei P, Zhou W, Wen X, He F, Li L, Dai H, Shen G, Gong F. IL-10 gene modified dendritic cells inhibit T helper type 1-mediated alloimmune responses and promote immunological tolerance in diabetes. **Cellular & Molecular Immunology**, 5:41-46, 2008.
- 68.Zaccone P, Fehérvári Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur J Immunol**, 33:1439-49, 2003.
- 69.Zaccone P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. **Parasite Immunology**, 28:515-23, 2006.
- 70.Zheng Y, Manzotti CN, Burke F, Dussably L, Qureshi O, Walker LS, Sansom DM. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+ CD25- T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3. **J Immunol**, 181:1683-91, 2008.
- 71.Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, 414:782-87, 2001.
- 72.Zorzella SFG, Seger J, Martins DR, Pelizon AC, Sartori A. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis development in Lewis rats from conventional animal facility. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 102:931-6, 2007.

