

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA CELULAR IMUNE-INFLAMATÓRIA E DE CÉLULAS
CALICIFORMES NO INTESTINO DELGADO DE BEZERROS BÚFALOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR *TOXOCARA VITULORUM***

Maria Francisca Neves

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA CELULAR IMUNE-INFLAMATÓRIA E DE CÉLULAS
CALICIFORMES NO INTESTINO DELGADO DE BEZERROS BÚFALOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR *TOXOCARA VITULORUM***

Maria Francisca Neves

Orientadora: **Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinária –
Unesp, Campus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária (Patologia
Animal)

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2006**

É com grande gratidão que ofereço este trabalho
aos meus pais, Franklin Neves e Neusa Bernardo Neves,
às minhas irmãs, Magda Luzia Neves e Mônica Bernardo Neves,
às minhas sobrinhas Luísa N. de Alencar e Laura N. de Alencar e,
ao meu noivo Glauco David Froio Cabral,
pela confiança, amor e estímulo que
sempre depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por mais esta oportunidade de trabalho, que me permitiu exercitar e aprimorar minha paciência, perseverança e auto-confiança. Obrigada SENHOR, por tudo e por todos em minha vida.

Meu mais profundo reconhecimento vai para a Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, por seu entusiasmo pelo trabalho, por seu estímulo, percepção e sabedoria. Minha gratidão pelo constante apoio e dedicação por todos estes anos de convívio.

Minha sincera gratidão à Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, por sua colaboração no encaminhamento dos trabalhos de elaboração desta pesquisa, amparando-nos e acreditando na seriedade da tarefa proposta.

À Profa. Dra. Maria Conceição Zocoller Seno e ao Professor Doutor Milton Passipiéri, do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / UNESP, por sua amizade e pelos conhecimentos transmitidos, seja através das aulas ou de esclarecimentos informais. A vocês, o meu respeito e admiração.

À FAPESP, por ter patrocinado esta pesquisa.

Ao Professor Doutor Salatiér Buzetti, do Departamento de Ciências do solo e Engenharia Rural da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, pela colaboração na execução da análise estatística.

Ao amigo Guilherme Sella Godoy, por ter dispensado parte de seu tempo em me ajudar na elaboração das fotos deste trabalho.

As amigas Ana Silvia Dagnone e Gisele Maria Andrade, minha profunda gratidão pela amizade e apoio.

Aos colegas do Departamento de Patologia Animal da UNESP – Campus de Jaboticabal, pela agradável convivência.

Aos Professores Doutores do Departamento de Patologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, pelo apoio amigo durante estes anos.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, pela atenção e colaboração.

A todos os que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo de modo efetivo para a sua realização.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA FRANCISCA NEVES, nascida em 15 de dezembro de 1970 na cidade de Ilha Solteira, Estado de São Paulo. Em sua formação correspondente ao ensino médio, formou-se pela Escola Estadual de segundo grau de Urubupungá, Ilha Solteira SP, em dezembro de 1989. Em sua formação superior, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade de Marília (UNIMAR), Marília SP, em Janeiro de 1997. Em seus estudos complementares, tornou-se Mestre em Zootecnia pela UNESP-FEIS de Ilha Solteira em fevereiro de 2001 e ingressou no curso de Doutorado em Patologia animal pela UNESP-FCAV de Jaboticabal em 2002. Trabalhou como docente na Faculdade de Andradina durante o ano de 2001. Durante o período de 2000 até 2005, estagiou como docente sob a supervisão da Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, nas disciplinas de Zoologia, Parasitologia, Imunologia e Biologia Celular, na UNESP-FEIS de Ilha Solteira. Foi bolsista da FAPESP durante o curso de pós-graduação, nível de Doutorado e em seu *curriculum*, constam trabalhos publicados no país e no exterior.

*“Constatando que existo hoje no mundo,
creio que sempre existirei, sob uma forma
ou outra; e, apesar das inconveniências a
que está sujeita a vida humana, não me
oporei a uma nova edição de mim mesmo,
esperando, porém, que os erros da edição
anterior sejam corrigidos.”*

Benjamin Franklin

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 <i>Toxocara vitulorum</i> : aspectos gerais.....	4
2.2 O papel de linfócitos, mastócitos, células caliciformes e macrófagos na mucosa intestinal de animais infectados por helmintos intestinais.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Local do experimento.....	21
3.2 Animais.....	21
3.3 Exames coprológicos: contagens de ovos por grama de fezes (OPG).....	21
3.4 Grupos experimentais.....	22
3.5 Necropsia e coleta de material.....	23
3.6 Processamento das amostras de tecidos.....	24
3.7 Quantificação de células na camada intraepitelial do intestino.....	24
3.8 Análise morfométrica.....	25
3.9 Análise imunoistoquímica.....	25
3.9.1 Método imunoistoquímico.....	25
3.9.2 Coloração imunoistoquímica do sistema nervoso entérico (SNE).....	26
3.9.3 Combinação das técnicas histoquímica e imunoistoquímica para detecção de mastócitos associados aos processos neurais.....	27
3.9.4 Coloração imunoistoquímica de macrófagos.....	28
3.10 Delineamento estatístico.....	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Exames coprológicos (OPG).....	29
4.2 Contagens de células imune/inflamatórias no espaço intraepitelial da mucosa intestinal.....	31

4.2.1 Linfócitos intraepiteliais (LIE).....	31
4.2.2 Eosinófilos.....	35
4.2.3 Mastócitos.....	38
4.2.4 Células caliciformes.....	41
4.2.5 Macrófagos.....	44
4.3 Associação de mastócitos ao sistema nervoso entérico (M/SNE).....	49
4.3.1 Quantificação de mastócitos associados (MC-nervos) e não associados (MC) aos nervos no plexo submucoso.....	50
4.3.2 Quantificação de MCs/nervos e MCs no plexo mioentérico.....	55
4.4 Análise morfológica da parede intestinal.....	60
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82

**RESPOSTA CELULAR IMUNE-INFLAMATÓRIA E DE CÉLULAS CALICIFORMES
NO INTESTINO DELGADO DE BEZERROS BÚFALOS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *TOXOCARA VITULORUM***

RESUMO - Para estudar a cinética populacional de células imune/inflamatórias na infecção natural por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos, realizou-se a quantificação de mastócitos, eosinófilos, linfócitos intraepiteliais (LIE) e células caliciformes na camada intraepitelial e de macrófagos na parede do intestino delgado. Para isto, amostras de tecidos foram retiradas do duodeno, jejuno e íleo de seis grupos de animais, de acordo com o resultado do exame coprológico, ou seja: animais que estavam no início ou ascensão (1), no pico (2) do parasitismo, durante as fases de declínio ou expulsão (3), e de pós-expulsão dos parasitas (4), além de dois grupos controles de animais não parasitados por *T. vitulorum* com idades médias entre 30 (C30) e 50 (C50) dias. No duodeno, no jejuno e no íleo, a população de LIE, mastócitos, eosinófilos e células caliciformes teve um aumento significativo principalmente durante o pico da infecção. Em seguida, estas células começaram a declinar durante a fase de expulsão, aproximando-se do nível do controle na fase de pós-expulsão. Os macrófagos também encontravam-se elevados no pico do parasitismo, mas foi na fase de pós-expulsão que a hiperplasia destas células foi mais evidente, tanto no duodeno, quanto no jejuno, principalmente na submucosa e na musculatura lisa intestinal. Confirmou-se ainda a existência de associação entre mastócitos e nervos intestinais nos plexos submucoso e mioentérico do duodeno, do jejuno e do íleo nos animais que estavam no pico da infecção. Pelo estudo morfológico, feito através de mensurações de todas as camadas da parede do intestino delgado, constatou-se somente uma significativa atrofia vilosa no duodeno, durante as fases de ascensão, de pico e de expulsão do parasita, mas a hipertrofia muscular não foi observada. Concluiu-se que a

infecção pelo nematódeo *T. vitulorum* em bezerros búfalos foi responsável pela hiperplasia celular (LIEs, células caliciformes, eosinófilos e mastócitos) na camada intraepitelial e pela interação entre mastócitos e processos nervosos na mucosa, nos plexos submucoso e mioentérico. Como estas alterações celulares predominando no pico da infecção normalizaram-se após a expulsão, concluiu-se também que elastiveram participação no mecanismo imunológico celular de controle e expulsão do parasita pelo hospedeiro. O macrófago presente em maior quantidade na fase da pós-expulsão sugeriu uma importante participação destas células na recuperação das lesões inflamatórias nesta infecção.

Palavras-Chave: Alterações Morfológicas, Búfalo, Células Inflamatórias, Sistema Nervoso Entérico, *Toxocara vitulorum*

**THE IMMUNE-INFLAMMATORY CELLULAR RESPONSE AND OF GOBLET CELLS
IN SMALL INTESTINE OF THE BUFFALO CALVES IN THE NATURAL INFECTION
BY *TOXOCARA VITULORUM***

SUMMARY - The populational kinetics of immune/inflammatory cells was studied in the wall of the small intestine from buffalo calves naturally infected with *Toxocara vitulorum*. Samples of tissues were removed from duodenum, jejunum and ileum of four groups of animals during the beginning of the infection, at the peak of egg output, during the period of expulsion and post-expulsion of the worms, as well as from uninfected calves. Cells (mast cells, eosinophils, intraepithelial lymphocytes - IEL and goblet cells) present in the epithelial layer (intraepithelial) of the small intestine were counted. In the duodenum, jejunum and ileum, the population of mast cells, eosinophils and lymphocytes increased significantly during the peak of the infection. Goblet cell numbers increased also during the beginning and at the peak of the infection. The decline of the number of these cells occurred during the periods of expulsion of the worms reaching to uninfected control counts at the post-expulsion period indicated a role of these cells in the process of expulsion of *T. vitulorum* by the buffalo calves. However, the population of macrophages, increased during the peak of the infection, but it was higher in the phase of post-expulsion of the worms. The numbers of mast cells in close contact with individual nerve fibers or present in the ganglia of both submucosal and myoenteric plexa were dramatically increased, particularly during the peak indicating a neurogenic component to this infection. The layers of the intestinal wall (villus, crypt, submucosa and muscular) were also measured. Morphological examinations showed a significant villar atrophy, particularly in the duodenum during the beginning, peak and during the phase of expulsion of the worms, but smooth muscle hypertrophy or other alteration was not observed in any phase of the infection. In conclusion, the infection by *T. vitulorum* in

buffalo calves elicited cellular hyperplasy of LIEs, goblet cells, eosinophils and mast cells in the intraepithelial layer of the small intestines and association between mast cells and nervous process in the mucosa and in the submucosal and mioentérico plexa, these cellular changes might be important for the worm expulsion. The macrophages presents in high numbers in the post-expulsion phase might have important role in the recovery of the infection.

Keywords: Morphological Changes, Buffalo, Inflammatory Cells, Enteric Nervous System, *Toxocara vitulorum*

1 INTRODUÇÃO

O ascaridídeo *Toxocara vitulorum* é considerado um parasita patogênico e altamente prevalente para bubalinos jovens entre 15 e 120 dias de idade. Esta precocidade de infecção deve-se ao fato destes animais adquirirem as larvas infectantes através do colostro contaminado, logo após o nascimento. Este ascaridídeo é de grande porte e pode obstruir o lúmen do intestino delgado, ocasionando lesões inflamatórias traumáticas que podem predispor os animais às infecções secundárias por bactérias e, conseqüentemente, ocasionar diarréias. A prevalência desta espécie é alta nos rebanhos bubalinos do mundo todo e, algumas vezes, pode levar à morte os animais quando submetidos à subnutrição e a manejos inadequados.

Vários estudos sobre os aspectos imunológicos por infecções helmínticas vêm sendo desenvolvidos com fins de diagnóstico e de controle através da produção de vacinas protetoras. Com relação ao parasita *T. vitulorum*, tem se constatado recentemente que os búfalos quando parasitados naturalmente, são capazes de ser estimulados imunologicamente e armar uma resposta imune celular e humoral. Resta saber se esta resposta imunológica é protetora contra esta infecção. Starke-Buzetti et al. (2001) e Souza et al. (2004) estudaram as respostas imunes em bezerros búfalos mensurando os níveis de anticorpos contra os antígenos de *T. vitulorum* através do imunoensaio ELISA indireto e observaram que os animais desenvolveram uma resposta imune humoral por ocasião da expulsão dos parasitas. Posteriormente, Ferreira (2002), fracionando estes mesmos antígenos pelo SDS-PAGE, detectou várias bandas de polipeptídeos para os antígenos de *T. vitulorum* e observou que a maioria destas frações antigênicas foi reconhecida por todas as amostras de soro dos bezerros e de soro/colostro das búfalas quando analisadas pelo Western Blot. Em seguida, Paula

(2003) imunizou camundongos utilizando estes antígenos e verificou que eles inibiam a migração larval.

A expulsão espontânea dos parasitas helmínticos de um hospedeiro não permissivo é, sem dúvida, um evento imune com componentes da imunidade inata e adquirida. Numerosas células imunes e seus mediadores foram relacionados às alterações intestinais que acompanham a infecção helmíntica e que participam da expulsão do parasita. Estas incluem as células caliciformes/muco, mastócitos/histaminas, eosinófilos, complemento, anticorpos e citocinas. Entretanto, apesar de esforços extensivos em pesquisas, um único mecanismo imune ou um tipo celular crítico ou decisivo para a expulsão ainda não foi identificado. Desta forma, em um animal imunocompetente, a expulsão eficiente dos parasitas entéricos está mais em função de uma resposta coordenada e multicelular envolvendo células imunes, mielóides, epiteliais e nervosas (revisado por CASTRO, 1989,1992; CASTRO & ARNTZEN, 1993; MCKAY & FAIRWEATHER, 1997; PALMER & MEERVELD, 2001). Em trabalho realizado por Neves et al. (2003), ficou evidente que na infecção natural em bezerros búfalos por *T. vitulorum*, principalmente no pico do parasitismo, ocorria uma hiperplasia celular por mastócitos e eosinófilos na mucosa do duodeno e do jejuno de bezerros búfalos que culminava com o pico da infecção. Estes dados sugerem que estas células tiveram participação no processo de expulsão do *T. vitulorum* pelos hospedeiros, pois elas retornaram ao nível do controle após a expulsão do parasita.

Em continuação à pesquisa de Neves et al. (2003), no presente trabalho objetivou-se um levantamento com quantificação de várias células como linfócitos intraepiteliais, células caliciformes e macrófagos além, de mastócitos e eosinófilos que poderiam estar participando também na infecção por *T. vitulorum*. Como o *T. vitulorum* adulto é um parasita de grande porte e não invasor da mucosa, vivendo somente no lúmen intestinal, procurou-se avaliar se os mastócitos e eosinófilos poderiam migrar para a camada intraepitelial que recobre toda a mucosa intestinal para atuar o mais próximo possível do parasita. Sabe-se que moléculas liberadas por estas células podem contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e epitelial. Além disso, pode haver ativação das células neurológicas para secretarem neurotransmissores

essenciais para a sensibilização de mecanismos neuro-vegetativos e neuro-motores, levando à contratibilidade da musculatura e sua hipertrofia além do aumento de muco (PALMER & MEERVELD, 2001). Segundo Stead et al. (1991) e McKay & Bienenstock (1994), mastócitos podem ligar-se e interagir com nervos do sistema nervoso entérico e esta ligação pode modular as funções epiteliais e proporcionar uma base microanatômica de comunicação bilateral entre estes dois componentes em humanos e em ratos. Desta forma, objetivou-se também o estudo da associação entre mastócitos e os processos nervosos do plexo submucoso e mioentérico e procurou-se avaliar esta relação temporal com as alterações morfológicas da parede intestinal com a expulsão do parasita e com a recuperação da infecção durante o período de pós-expulsão de *T. vitulorum* em bezerros búfalos. Este trabalho, embora apenas observacional e de quantificação celular foi o primeiro a ser realizado com este parasita e em bezerros búfalos e pode servir de base para estudos futuros com relação à resposta imune celular e seus componentes celulares e humorais efetores visando um controle efetivo através da vacinação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Toxocara vitulorum*: aspectos gerais

Toxocara vitulorum é nematódeo de grande porte pertencente à Família Ascarididae que parasita o intestino delgado de ruminantes (SMITH, 1994) e principalmente de búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) (ROBERTS, 1989). Patnaik & Pande (1963) listaram-no em primeiro lugar na ordem de prevalência e patogenicidade para bezerros búfalos bem jovens, nos primeiros quatro meses de vida.

O *T. vitulorum* causa anorexia, diarreia ou constipação, desidratação e cólicas no hospedeiro, podendo levá-lo até a morte em alguns casos (DAS & SINGH, 1955). Este parasita é prevalente em bezerros búfalos com até quatro meses de idade onde o pico máximo da infecção se dá em torno dos 30 aos 50 dias. A partir de então ocorre auto-cura onde os búfalos eliminam espontaneamente os parasitas com as fezes e em seguida não mais se reinfectam com adultos (STARKE et al., 1983; NEVES et al., 2003).

Roberts (1990), estudando a dinâmica da infecção por *T. vitulorum*, observou que larvas infectantes marcadas radioativamente e administradas dentro do intestino delgado foram infectantes para búfalos em todas as idades. Muitas larvas foram diretamente para o fígado através da veia porta, mas algumas penetraram nos nódulos linfáticos mesentéricos. Após 90 horas, algumas larvas migraram para os pulmões e outras para a musculatura, cérebro, rins e nódulos linfáticos periféricos. Em búfalas prenhes, as larvas cresceram no fígado e pulmão até atingirem 500 a 600 µm de comprimento e, em seguida, migraram para a

glândula mamária oito dias antes do parto. Na glândula mamária as larvas cresceram ainda mais, atingindo 1200 µm e passaram para o colostro e leite, principalmente durante os primeiros sete dias após o parto. Confirmando estes dados, Starke et al. (1992) constataram a presença de larvas com 886 a 1700 µm de comprimento no colostro e leite de 14 búfalas examinadas (70%) no período entre o parto e o 26º dia pós-parto. Dos bezerros búfalos, 26,7% encontravam-se parasitados nos primeiros 10 dias, e 100 % aos 30 dias de vida.

Com relação à imunidade, Roberts (1993) relatou que búfalas adultas produzem anticorpos contra o antígeno excretor-secretor (ES) e somático de *T. vitulorum*. Os anticorpos passam para seus bezerros através do colostro (RAJAPAKSE et al., 1994a; SOUZA et al., 2004). Além disso, Amerasinghe et al. (1992) constataram imunidade humoral em camundongos imunizados com antígenos larvais e adultos de *T. vitulorum* após vários desafios com ovos infectantes deste parasita. A confirmação da existência de anticorpos específicos foi verificada *in vitro* incubando-se o soro de bezerros búfalos recém-nascidos com larvas de *T. vitulorum*, pela formação de precipitados orais nas larvas e pela morte das mesmas 72 horas após (ROBERTS, 1993).

Rajapakse et al. (1994b) constataram imunidade humoral em ratos pela redução do número de larvas nos tecidos após a injeção de soro e colostro de búfalas adultas infectadas naturalmente com *T. vitulorum*. Starke-Buzetti et al. (2001) e Souza et al. (2004) estudaram as respostas imunes em bezerros búfalos mensurando os níveis de anticorpos contra os antígenos extrato larval bruto (Ex) de larvas infectantes de *T. vitulorum* através do imunoensaio ELISA indireto. Estes autores observaram que a quantidade de anticorpos encontravam-se elevados nos animais recém nascidos logo após a ingestão do colostro. Este aumento permaneceu até 15 dias, decresceu entre 15 e 30 dias e permaneceu relativamente estável até 120 dias de idade. Como os parasitas são expulsos pelos hospedeiros e estes não se reinfectam, sugere-se que os animais desenvolvem resposta imune protetora. Por outro lado, Neves et al. (2003) observaram que ao mesmo tempo em que os ovos de *T. vitulorum* encontravam-se em maior número nas fezes de bezerros búfalos (37 e 62 dias de idade),

ocorria também aumento no infiltrado de mastócitos e eosinófilos na lâmina própria da mucosa intestinal destes animais. Após a expulsão do parasita ocorria declínio destas células, indicando que a hiperplasia celular fora estimulada pelo parasitismo.

2.3 O papel de linfócitos, mastócitos, eosinófilos, células caliciformes e macrófagos na mucosa intestinal de animais infectados por helmintos intestinais

Morfológicamente a mucosa do intestino delgado está disposta de maneira a formar dobras em direção ao lúmen intestinal (placas circulares) e pequenos vilos. Normalmente, os vilos são levemente mais curtos e grossos no duodeno, muito compridos no jejuno e, de menor comprimento no íleo. No duodeno, a proporção normal do comprimento do vilo para a profundidade da cripta é de 3 ou 5:1 (CHANG et al., 2005). O epitélio é composto por uma camada de células de epitélio colunar e estas células epiteliais originam-se da base da cripta. As células da camada epitelial tem funções específicas: as células absortivas possuem microvilosidades em sua superfície luminal, formando uma borda em escova; as células de Paneth possuem grandes grânulos eosinofílicos apicais contendo proteínas microbicidas; as células caliciformes estão envolvidas na secreção de muco e; as células M facilitam a captura de antígenos (CUVELIER et al., 2001).

Acima da camada epitelial está o glicocálice composto de um complexo de glicoproteínas e mucinas. Esta camada de muco é uma importante barreira física para os patógenos, onde estes organismos ficam presos e são levados para fora juntamente com as fezes (THOMSON et al., 2001).

A submucosa contém tecido conjuntivo juntamente com pequenos vasos sanguíneos, linfáticos e células nervosas do sistema nervoso autônomo do intestino ou plexo de Meissner. As glândulas de Brünner estão presentes na submucosa do duodeno proximal e são glândulas mucosas que secretam íons de bicarbonato, glicoproteínas e pepsinogênio II (CUVELIER et al., 2001; THOMSON et al., 2001). Existem também células linfóides agregadas com ou sem formação

folicular. Os folículos linfóides, ou placas de Peyer, podem ultrapassar a muscular da mucosa e estender-se para a submucosa (CHANG et al., 2005).

Em ovinos, as placas de Peyer é um grande tecido linfóide responsável pela formação da maioria dos linfócitos B (REYNOLDS, 1987). A taxa de produção dos linfócitos B é de 3.6 bilhões de células por hora (REYNOLDS, 1986), podendo a placa de Peyer dobrar de tamanho, mas isto não ocorre porque aproximadamente 95% dos linfócitos B produzidos morrem por apoptose (MOTYKA & REYNOLDS, 1991).

O intestino contém dois compartimentos linfóides principais: o tecido linfóide associado a mucosa (MALT) e as células linfóides difusa da mucosa (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004). O intestino é o maior órgão linfóide do corpo pela quantidade de linfócitos e imunoglobulinas produzidas. Isto reflete a enorme carga de antígenos o qual são expostos diariamente (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004). As células linfóides difusas da mucosa consistem de linfócitos intraepiteliais e linfócitos da lâmina própria (CUVELIER et al., 2001). Devido sua estratégica localização, os LIEs provavelmente são importantes na preservação da integridade da mucosa. A lâmina própria normal está infiltrada com linfócitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos e ocasionalmente mastócitos (CHANG et al., 2005).

A primeira barreira da mucosa intestinal consiste de células epiteliais e linfócitos intraepiteliais (LIEs). Os LIEs constituem a principal população de linfócitos residentes próximos ao lúmen intestinal (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004). Na coloração por hematoxilina e eosina (HE), linfócitos intraepiteliais tem um padrão cromático do núcleo basofílico, contorno nuclear irregular e um halo perinuclear claro. Fenotipicamente, os LIEs são linfócitos T, onde a maioria (>70%) são células T $CD4^-/CD8^+$ e menos de 20% são células T $CD4^+$. As células B não estão presentes (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004). Entretanto, no epitélio associado ao folículo (FAE), existem mais LIEs do tipo $CD4^+ CD8^-$. Entre as células M e os folículos linfóides subjacentes estão os linfócitos B intraepiteliais (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004).

Segundo Simecka (1998), os linfócitos intraepiteliais (LIE) não tiveram ainda suas funções bem definidas, porém acredita-se que formam uma primeira linha de defesa contra infecções em mucosas e possuem citocinas e atividades reguladoras. Carroll et al. (1984) verificaram as mudanças nos números de linfócitos intraepiteliais granulares e agranulares em camundongos infectados com *Strongyloides ratti*. Na infecção primária, ocorreu pouca mudança no número de linfócitos intraepiteliais granulares no princípio da infecção, o aumento destas células foi evidenciado algumas semanas após a expulsão dos parasitas e, a quantidade destas células granulares não se modificou na infecção secundária. Em contraste, o número de linfócitos intraepiteliais agranulares mostrou-se maior no princípio da infecção primária e declinou após uma infecção secundária (CARROLL et al., 1984).

Guy-Grand et al. (1978), sugeriram que os linfócitos intraepiteliais granulares fossem precursores de mastócitos. Neste caso, a função destas células em animais infectados com helmintos estaria relacionada com os papéis de mastócitos na lâmina própria e possivelmente com leucócitos globulares (CARROLL et al., 1984). Por outro lado, associa-se tanto linfócitos intraepiteliais granulares como o agranulares com atividades de células “natural killer” (NK) (FLEXMAN et al., 1983). Por esta razão, os dois tipos celulares estariam envolvidos na defesa do hospedeiro contra o parasita (CARROLL et al., 1984).

As helmintoses gastrointestinais estão associadas com o aumento do número de mastócitos de mucosa (MMC) na lâmina própria e no epitélio do trato gastrointestinal de roedores (LEVY & FRONDOZA, 1983). Segundo Miller (1984), estudos em roedores infectados com *Nippostrongylus brasiliensis* mostram que o aparecimento de MMC é imunologicamente mediado, mas suas funções na mucosa não têm sido bem esclarecidas.

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; NEVES et al., 2003). Na maioria dos trabalhos envolvendo mastócitos nas reações inflamatórias contra infecções por helmintos gastrointestinais realizados em roedores, evidenciou-se

mastocitose e eosinofilia (JARRET & MILLER, 1982; DWINELL et al., 1995; STARKE & OAKS, 2001). Desta forma, há evidências de que a ativação no local da infecção e a elevação dos níveis de produtos sistêmicos de mastócitos estão associadas com a expulsão de helmintos intestinais (BEFUS & BIENENSTOCK, 1982; JARRET & MILLER, 1982).

Com ênfase aos eventos ocorridos durante o período de expulsão na infecção primária por *Nematodirus battus* em cordeiros, Winter et al. (1997) acompanharam as respostas imune-celulares intestinais. Os autores verificaram que a mastocitose e o aumento de eosinófilos no tecido eram coincidentes com a expulsão dos parasitas pelos hospedeiros, principalmente durante o período inicial deste processo. No entanto, eosinófilos apresentavam-se em contagens relativamente baixas durante o período da infecção mas aumentavam durante a expulsão até atingir o pico no período em que os parasitas já tinham sido expelidos. Por outro lado, Rothwell et al. (1993), verificaram correlação inversa entre a eosinofilia sangüínea e a contagem de ovos nas fezes de cordeiros infectados repetidamente com *Trichostrongylus colubriformis*, confirmando a associação entre a resistência aos parasitas e a eosinofilia. Da mesma forma, em búfalos, Neves et al. (2003) verificaram a ocorrência de infiltrado de mastócitos e eosinófilos na lâmina própria da mucosa do intestino delgado de bezerros búfalos infectados por *T. vitulorum*. Após a expulsão dos nematódeos, tanto mastócitos quanto eosinófilos retornaram ao nível do controle (animais não infectados), indicando que estas células participaram no processo de expulsão de *T. vitulorum* pelos búfalos.

Após a expulsão de *Trichinella spirallis* por camundongos infectados experimentalmente, Friend et al. (2000) também verificaram uma involução na população de mastócitos e eosinófilos na mucosa intestinal. Fato também constatado por Starke & Oaks (1999) com *Hymenolepis diminuta* em ratos. A diminuição na população destas células ocorreu primeiramente devido ao processo de apoptose local, embora em pequena porcentagem (cerca de 3 %) (STARKE & OAKS, 1999), mas principalmente, pela migração dos eosinófilos para os linfonodos mesentéricos e dos mastócitos para o baço (FRIEND et al., 2000).

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 encontrava-se nos linfonodos, sofrendo o processo de apoptose e sendo em seguida fagocitado por macrófagos (FRIEND et al., 2000).

Outro parâmetro verificado por Neves et al. (2003) foi o aumento de eosinófilos no sangue que permaneceu durante todo o parasitismo patente. Parsons et al. (1993) demonstraram que a eosinofilia no sangue e no tecido foi bastante consistente em animais infectados com larvas de *Toxocara canis*. A hipereosinofilia, com nível de eosinófilos circulantes bastante alto, chegando a atingir 50% a mais que o normal, também foi observada em humanos infectados com *T. canis*. O mecanismo responsável por esta resposta eosinofílica em toxocaríoses é desconhecido mas parece estar direcionada contra os produtos excretor-secretor (ES) da larva. Os antígenos ES também estão envolvidos no mecanismo de aderência de eosinófilos à cutícula da larva em áreas do fígado altamente infiltradas por eosinófilos como consequência da migração larval (PARSONS et al., 1993).

Na mucosa intestinal, Eversole et al. (1999), verificaram aumento no número de eosinófilos na lâmina própria e no epitélio durante a infecção por *N. brasiliensis* em camundongos. Estes eosinófilos migraram na lâmina própria, à medida em que a infecção progredia, da cripta para o vilo, em direção à região subepitelial e daí atravessavam a lâmina basal para a região intraepitelial. Durante a migração, os eosinófilos aumentavam de tamanho e estendiam o citoplasma, mas não degranulavam. Este estudo sugeriu que a migração de eosinófilos para a área intraepitelial seria uma tentativa destas células exercerem uma ação citotóxica direta contra os parasitas adultos no lúmen intestinal.

Segundo Fargeas et al. (1992), citado por Dwinell et al. (1998), mastócitos parecem ter importante papel na tradução e alteração dos padrões mioelétricos durante infecções causadas por nematódeos. Além disso, Weisbrodt et al. (1994) também citado por Dwinell et al. (1998), verificaram alterações na musculatura intestinal durante a infecção por nematódeos. Em seguida, Dwinell et al. (1998)

relataram que ratos infectados por *H. diminuta* apresentavam espessamento da camada muscular intestinal e aumento da profundidade das criptas de Lieberkühn do intestino delgado 20 dias após a infecção. Já os eosinófilos, além de apresentarem uma proteína em seus grânulos denominada de proteína básica principal (MBP) associada com a morte de parasitas (WASSON & GLEICH, 1979) apresentam também mediadores inflamatórios que podem causar destruição do tecido infectado, hipertrofia da musculatura lisa e mudanças na permeabilidade vascular (HIRAI et al., 1997).

Mckay & Bienesnstock (1994) analisaram as interações entre mastócitos e nervos no intestino e verificaram que esta associação regula a fisiologia intestinal em resposta desta aos antígenos. Mastócito pode agir como um “sensor de antígenos” ou como “célula vigilante”, quando posicionados adjacentes aos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e na superfície epitelial da mucosa (MCKAY & BIENESNSTOCK, 1994). Além disso, estímulos antigênicos ou mudanças no microambiente intestinal, podem ser conduzidos através do sistema nervoso entérico (SNE) para o sistema nervoso central (SNC) (MCKAY & BIENESNSTOCK, 1994). Assim, interações entre mastócitos, outras células do sistema imunológico, sistema microvascular, musculatura e SNE podem contribuir com mecanismos de defesa do hospedeiro na tentativa de inativar ou destruir antígenos (MCKAY & BIENESNSTOCK, 1994). Da mesma maneira, Perdue et al. (1990) observaram interações mútuas entre mastócitos e nervos com liberação de histamina e neurotransmissores, respectivamente, associados com as alterações de transporte iônico e diarreias em animais infectados.

A liberação de mediadores pelos mastócitos pode contribuir para a resposta inflamatória local. Estes mediadores podem causar a destruição do parasita, recrutando outras células efectoras como os eosinófilos, induzindo a hipersecreção de muco, alterando a contratilidade intestinal e o aumento do peristaltismo que interfere no processo de fixação do parasita e sua expulsão pelo hospedeiro (NUTMAN, 1993). A ativação de mastócitos e os mediadores liberados alteram o transporte de íons, como cloro através do epitélio intestinal, o qual pode contribuir para a expulsão do parasita (PERDUE et al., 1990). Vários experimentos

conduzidos com ovinos parasitados com diferentes parasitas gastrointestinais revelaram que mastócitos liberam importantes mediadores inflamatórios como resposta protetora. Jones & Emery (1991) observaram que ovinos imunizados contra *T. colubriformis* apresentavam altos níveis de mediadores inflamatórios (prostaglandina F, leucotrienos (C4), tromboxanos (B2) e histamina) no conteúdo intestinal, onde as prostaglandinas estavam presentes em níveis mais altos. Estes resultados indicaram que estes mediadores podiam desempenhar importante papel na expulsão dos parasitas. Tromboxanos aumentam a agregação de plaquetas, prostaglandina-E tem efeito na dilatação de vasos sanguíneos aumentando a permeabilidade vascular; os leucotrienos B4 são quimiotáticos para neutrófilos e aumentam a permeabilidade vascular, enquanto os C4, D4 e E4 estimulam a contração muscular e também aumentam permeabilidade vascular (TIZARD, 1996).

A ativação de mastócitos tem sido associada a um aumento da permeabilidade intestinal nos modelos de hipersensibilidade. Mastócitos produzem mediadores induzindo a secreção de íons e aumentando a permeabilidade do intestino. O mecanismo pelo qual os mastócitos alteram as funções na mucosa intestinal está diretamente associado à ação de mediadores inflamatórios sobre as células epiteliais e/ou pela ação indireta nos neurotransmissores (YU & PERDUE, 2001). Além disso, os modelos de alergia alimentar e infecções parasitárias têm acrescentado informações sobre a imunomodulação do epitélio intestinal por mastócitos. Após a infecção por *N. brasiliensis* e *T. spiralis*, uma acentuada mastocitose é observada no intestino do hospedeiro tornando estes indivíduos imune a uma segunda infecção. A ativação de mastócitos esta intimamente associada com a infecção por nematódeos. (PERDUE et al., 1990) mostraram que na infecção por *N. brasiliensis*, o intestino tornou-se intensamente inflamado entre o sétimo e décimo dia após a infecção. A injúria da mucosa consistiu na atrofia Vilar e na hiperplasia da cripta (PERDUE et al., 1989), além do aumento da secreção de íons cálcio e cloro durante a inflamação aguda (PERDUE et al., 1990). Da mesma forma, em ratos infectados por *T. spiralis* observou-se uma significativa diminuição na absorção (CASTRO et al., 1987), um aumento na

secreção do íon cloro e uma rápida rejeição ao parasita (HARARI et al., 1987). Um evidente aumento bifásico na corrente elétrica do intestino ocorreu na serosa intestinal de ratos sensibilizados pelo parasita (28). Estudos farmacológicos indicaram que os mediadores de mastócitos eram a principal causa na alteração elétrica.

Durante a infecção parasitária ocorre alterações características na mucosa intestinal. A mucosa do intestino torna-se edematosa e inflamada culminando com a expulsão do helminto pelo hospedeiro. A infecção causa um aumento da permeabilidade paracelular epitelial resultando em diarreia e expulsão dos parasitas. O *T. spirallis* estimula uma forte resposta do tipo Th2. Os mastócitos, nesta infecção, são decisivos para a expulsão, pois na ausência destas células, o processo de expulsão é retardado (KAMIYA et al., 1985, citado por McDERMOTT et al., 2003). McDermott et al. (2003) demonstraram que *T. spirallis* aumenta a permeabilidade paracelular do jejuno além de aumentar a expressão de ocludina entre as junções intercelulares dos enterócitos. Estes dados explicam o mecanismo de expulsão deste parasita do intestino e estabelece uma ligação entre mastócitos e epitélio durante a resposta imune adaptativa do tipo Th2.

Algumas pesquisas sobre tipos de hipersensibilidades, principalmente relacionadas com linfócitos T, mostraram que hospedeiros mamíferos possuem mecanismos imunes contra uma variedade de organismos patogênicos diferentes. Isto inclui ambos componentes, humoral e celular, que podem agir independentemente ou em várias combinações. A infecção por helmintos apresenta um particular problema para o hospedeiro devido ao seu tamanho, dificultando o processo de destruição pelo sistema imune humoral e celular (MEEUSEN, 1999). Nos últimos 10 anos, significativo progresso nos métodos científicos, tem fornecido informações sobre os mecanismos celulares e moleculares induzindo a uma imunidade contra infecções de helmintos parasitas, particularmente após as descobertas de citocinas liberadas por linfócitos T (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Recentes estudos com roedores infectados com *T. spirallis*, *H. polygyrus*, *N. brasiliensis* e *T. muris* tem proporcionado importantes informações acerca dos

mecanismos imuno protetores contra nematódeos gastrointestinais. Destes estudos, Finkelman et al. (1997) destacaram, em uma revisão, quatro generalizações: 1) linfócitos T CD4⁺ são células críticas para a proteção do hospedeiro contra helmintos; 2) IL-12 e IFN γ produzidos por linfócitos Th1 inibem a imunidade protetora; 3) IL-4, produzida por linfócitos Th2 pode: a) ser necessária para a proteção do hospedeiro e expulsão do parasita, b) limitar a severidade da infecção, ou c) induzir mecanismos protetores redundantes e 4) algumas citocinas produzidas em resposta à infecção gastrointestinal podem falhar em induzir a proteção do hospedeiro contra alguns parasitas.

Ainda segundo Finkelman et al. (1997), os hospedeiros podem apresentar habilidades para reconhecer características de certos parasitas e estimular resposta protetora efetiva. Por outro lado, os hospedeiros podem também organizar um conjunto de mecanismos de defesa contra os parasitas, mesmo se não necessários para protegê-los contra esse particular parasita e desta maneira causando danos ao hospedeiro infectado.

As células caliciformes também estão associadas aos mecanismos de expulsão de helmintos intestinais (NAWA et al., 1994). Uma variedade de mecanismos foi proposta nos quais as células caliciformes estavam relacionadas com a resistência contra parasitas através da secreção de muco (CLAMP, 1984; CARLISLE et al., 1991). Starke & Oaks (2001) estudando a dinâmica de populações de células no intestino de ratos infectados por *H. diminuta*, verificaram aumento na população de células caliciformes, mostrando o papel funcional desta célula em resposta a esta infecção. As mudanças físicas na superfície luminal do intestino causada pelo aumento do muco liberado por células caliciformes podem ter importante papel na interação física entre hospedeiro e o parasita e assim dificultar a migração deste último dentro do intestino (STARKE & OAKS, 2001).

Ishikawa et al. (1994) demonstraram que linfócitos T estimulam alterações na secreção das células caliciformes intestinais em ratos parasitados por *N. brasiliensis*. Estas alterações foram o aumento do muco e do número das células caliciformes, diretamente relacionadas com a diminuição no tempo de expulsão deste parasita. Além disso, Carroll et al. (1984) observaram após a primeira

infecção com *S. ratti* em camundongos, aumento gradual no número de células caliciformes, com o pico ao redor do décimo segundo dia, que era seguido por rápido declínio. Vinte e oito dias depois da infecção, este número voltou ao normal. Na infecção secundária, o aumento destas células foi mais rápido e o pico foi observado já no sexto dia. Com relação ao *N. brasiliensis*, Levy & Frondoza (1983) observaram que na primeira infecção ocorria um aumento do muco secretado por células caliciformes no jejuno. Mas, durante a segunda semana, estes parasitas estavam envolvidos pelo muco e deslocados para a porção final do intestino, em fase de expulsão.

Os macrófagos fazem parte do sistema mononuclear fagocítico, formam-se na medula óssea, circulam pela corrente sangüínea como monócitos e se diferenciam em macrófagos nos tecidos assim como fígado (células de Kupffer), pulmão (macrófagos alveolares) e peritônio (macrófagos peritoniais) (TAKEMURA & WERB, 1984). Esta célula é um importante componente do sistema imune inato, um fagócito essencial para a defesa do hospedeiro. Além da fagocitose, a secreção de substâncias derivadas destas células também têm um importante papel nas respostas inflamatórias (NATHAN, 1986), podendo funcionar como células exterminadoras, ter atividades pro e/ou anti-inflamatórias e responder a sinais adaptativos através de uma variedade de citocinas e moléculas coestimulatórias (NOËL et al., 2004). Deste modo, através da sua abundância, distribuição e motilidade, os macrófagos podem influenciar diretamente nas respostas imune e inflamatória, de forma aguda ou na hipersensibilidade tardia, desde a primeira lesão no epitélio até o processo de reparação.

Ao encontrar um material estranho ou um microorganismo, os macrófagos auxiliam na inflamação aguda através da secreção de mediadores, assim como prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, leucotrieno C e enzimas proteolíticas. Outros participantes da inflamação aguda, assim como os polimorfonucleares, são atraídos para o local da inflamação por estes mediadores liberados por macrófagos (TAKEMURA & WERB, 1984).

Caso a reação inflamatória seja controlada, os macrófagos desempenham um papel central na reparação do tecido. Eles secretam fatores de coagulação

para limitar o processo de reparo, proteases neutras que removem fragmentos da matriz extracelular ou outros débris além de fatores angiogênicos e mitogênicos, que promovem a migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais. Este local será reconstituído por suprimento sanguíneo e tecido conjuntivo (TAKEMURA & WERB, 1984).

Quando o material estranho persiste, ocorre a fase crônica da inflamação e os macrófagos podem participar na excessiva destruição do tecido pela secreção de proteases neutras que são efetivas em pH neutro, ou pela secreção de hidrolases ácidas efetivas em pH ácido, produzindo fibrose excessiva pela secreção de mitógenos pelos fibroblastos (TAKEMURA & WERB, 1984).

Estas células podem também ser identificadas por sua capacidade de produzir óxido nítrico (NO) juntamente com a maior expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e do CD86 (NOËL et al., 2004). O NO é uma molécula citotóxica/citostática, que inibe o crescimento e a função de diversos agentes infecciosos, assim como bactérias, fungos, protozoários e helmintos parasitas (WOODS et al., 1994). Além do NO, os macrófagos podem liberar citocinas pro-inflamatórias como $TNF\alpha$, IL-1, e IL-6. Deste modo, a persistência do processo inflamatório muitas vezes resulta em destruição do próprio tecido (NOËL et al., 2004).

Além disso, as funções efectoras de macrófagos influenciam a qualidade, a duração e a magnitude de muitas reações inflamatórias. Tradicionalmente foram descritos como fagócitos, apresentadores de antígenos que secretam mediadores pró-inflamatórios e antimicrobianos (GORDON, 1999).

As infecções por helmintos induzem uma forte resposta imune Th2 em seus hospedeiros. Por que e como os helmintos induzem esta resposta são questões ainda sem respostas. Holland et al. (2000) sugeriram que os produtos excretores/secretores de helmintos têm uma importante participação na resposta Th2. As infecções helmínticas modificam a resposta imune normal do hospedeiro contra outros estímulos antigênicos (COX, 2001) e/ou modifica a suscetibilidade a outros parasitas (HELMBY et al., 1998) ou vírus (ACTOR et al., 1993), sugerindo

uma importante influência destas infecções no microambiente imunológico (RODRÍGUEZ-SOSA et al., 2002).

Estudos recentes sugerem que os macrófagos quando ativados alternativamente desempenham importante papel na resposta Th2 induzida por infecções por nematódeos (ALLEN & LOKE, 2001; LOKE et al., 2000a, LOKE et al., 2000b; MACDONALD et al., 1999). Estes macrófagos, ativados alternativamente, também foram mencionados em filarioses, podendo induzir a diferenciação de células T em Th2 (LOKE et al., 2000a, MACDONALD et al., 1998). Alguns estudos sugeriram que o concomitante padrão Th2 de produção de citocinas por $CD4^+$ seguido da interação com macrófagos ativados alternativamente podem explicar os níveis reduzidos de IFN- γ e IL-12 observados em certas infecções helmínticas e a inclinação à resposta tipo Th2 para novos desafios antigênicos resultante de coinfeções helmínticas (ACTOR et al., 1993; KULLBERG et al., 1992; KURODA et al., 2001).

De acordo com estudos *in vitro* realizados por Kuroda et al. (2001), o padrão de produção de citocinas por macrófagos na presença de antígenos de *Toxocara canis* e soro imune proveniente de camundongos infectados, mostrou-se alterado; enquanto a produção de IL-10 e TGF- β estava aumentada, a produção de IL-12 e TNF- α estava diminuída. A IL-12 tem um importante papel na polarização da resposta imune para Th1 e a produção de IL-12 por macrófagos está regulada por muitas citocinas (MANETTI et al., 1993; WU et al., 1993). Porém, Kuroda et al. (2001) verificaram que, quando cada componente foi analisado individualmente, a diminuição de IL-12 e TNF- α não estava relacionada com a diminuição de TNF- α , IL-10, TGF- β e de prostaglandinas e com o aumento de IL-4. No entanto, quando em conjunto, a alteração na concentração de citocinas como IL-4, IL-1 TGF- β e de prostaglandinas poderia modular e diminuir a secreção de IL-12 por macrófagos e direcionar a resposta preferencialmente para Th2 na infecção por *T. canis* em camundongos. Desta forma, o *T. canis* poderia polarizar macrófagos por uma via alternativa para seletivamente secretar alguns tipos de citocina, mas não outros. No entanto, o padrão de citocinas nas infecções helmínticas ainda merece maior atenção e estudo.

Na imunidade a helmintos as células T citotóxicas falham algumas vezes em destruir parasitas (BUTTERWORTH et al., 1979), já as populações de células fagocíticas, incluindo macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, muitas vezes desempenham esta tarefa com sucesso (CAPRON et al., 1982). Macrófagos destruíram significativo número de schistosomulas (estágio encontrado na pele) *in vitro* na ausência da adição de anticorpo (JAMES et al., 1982b), sugerindo que macrófagos ativados podem não somente desempenhar um importante papel na resistência natural ao *Schistosoma*, além de, também, participar de vários mecanismos imunes envolvidos no desenvolvimento de imunidade adquirida a este parasita (CAPRON et al., 1983).

Durante as infecções por nematódeos, Olgilvie (1978), verificou que a população de fagócitos mononucleares podia aumentar. Posteriormente, Mackenzie et al. (1980) observaram, *in vitro*, macrófagos destruindo larvas de *N. brasiliensis* na presença de complemento e o aumento na mortalidade de larvas de *T. spiralis* mediada por eosinófilos IgG-dependente. Ouaiissi et al. (1981) demonstraram em estudo ultraestrutural *in vitro* a interação entre macrófagos e microfilarias na presença do anticorpo IgE, e observaram um processo seqüencial de morte: primeiro ocorreu a aderência dos macrófagos à superfície do parasita: após oito horas de contato, as células emitiram seus pseudópodos ao redor da microfilaria, envolvendo o parasita; após 16 a 24 horas seguiu-se a hipertrofia do complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomos dos macrófagos; o acúmulo de grânulos lisossomais ao redor do parasita, junto com a ruptura de sua cutícula que resultou na perda de seu material intracelular.

O mecanismo de morte celular através da citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) também foi observado em outras infecções por nematódeos, principalmente os filarídeos, onde as células mais importantes neste processo eram macrófagos e eosinófilos e, a imunoglobulina era a IgE (MEHTA et al., 1980; HAQUE et al., 1981; CAPRON et al., 1983; MAIZELS et al., 1983; FALCONE et al., 2001).

Recentemente, trabalhos interessantes mostraram a interação entre as células mastócitos e macrófagos desempenhando diferentes funções na resposta

imune em infecções de um modo geral. Brooks et al. (2000) observaram que mastócitos tem a capacidade de ligar-se ao IFN- γ via glicosaminoglicanas (GAGs) e apresentá-lo à macrófagos ativos, mostrando uma nova função desempenhada por mastócito como uma célula apresentadora de citocina. Visto que mastócitos são residentes em muitos tecidos e também são recrutados aos locais de inflamação (ANDERSON et al., 1997), eles poderiam seqüestrar estas citocinas e transportá-las para dentro dos tecidos (BROOKS et al., 2000). Além disso, mastócitos apresentando do IFN- γ aos macrófagos, estimularia este último a produzir óxido nítrico que por sua vez induziria a estabilização de mastócitos (DeSCHOOLMEESTER et al., 1999), representando um possível mecanismo de feedback negativo na ativação destas células (BROOKS et al., 2000).

Outro tipo de colaboração é quando mastócitos estimulados, antigenicamente ou por qualquer outro fator, liberam seus grânulos gerando um processo inflamatório. Após este processo, os componentes residuais destes grânulos que são componentes solúveis, como as proteases neutras e heparina, permanecem no fluido extracelular. Estas estruturas negativamente carregadas ligavam-se a estruturas básicas através de ligações iônicas, como lipídeos de baixa densidade (LDL) e outras drogas, formando compostos insolúveis que eram fagocitados posteriormente por macrófagos. Outras células como as da musculatura lisa das paredes de artérias podem fagocitar compostos lipídicos e iniciar o processo de arteriosclerose (KOVANEN et al., 1995; DECORTI et al., 2000).

Por outro lado, o sistema imune depende de macrófagos por serem um participante incondicional do sistema imune inato, agindo como uma sentinela contra patógenos invasores, esta célula é crucial como primeira linha de defesa, além de manter a homeostase dos tecidos através da rápida fagocitose de células apoptóticas (BHOGAL et al., 2004). Assim, os macrófagos residentes nas placas de Peyer do íleo de ovinos, mediarão a fagocitose e a remoção de linfócitos B apoptóticos e na ausência de macrófagos a apoptose destas células induziria a uma resposta inflamatória descontrolada neste local (BHOGAL et al., 2004). Além disso, Galeazzi et al. (2000) observaram que na infecção por *T. spiralis* em

camundongos a liberação de acetilcolina pelo plexo mioentérico era suprimida e verificaram que a presença de macrófagos durante esta infecção era responsável pela alteração da função neuronal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi executado na Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista (UNESP - Ilha Solteira), situada à margem direita do Rio Paraná, no município de Selvíria, do Estado de Mato Grosso do Sul. A execução laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia/Imunologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP - Ilha Solteira.

3.2 Animais

O rebanho bubalino foi constituído de 20 búfalas adultas mestiças (Mediterrâneo x Murrah), seus respectivos bezerros e um touro búfalo. Os bezerros que participaram deste experimento nasceram de janeiro a maio nos anos de 1998, ou seja, dois grupos de 20 bezerros para cada ano. Estes bezerros permaneceram juntos com as mães em um piquete de 12 ha formado com *Brachiaria brizantha* e por um lago. As búfalas não foram ordenhadas durante todo o período de execução da pesquisa e os bezerros foram desmamados naturalmente.

3.3 Exames coprológicos: contagens de ovos por grama de fezes (OPG)

Para os exames coprológicos, as fezes foram colhidas diretamente do reto de todos os bezerros búfalos do rebanho e foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos devidamente identificados. Estes exames foram realizados

semanalmente, durante o primeiro mês de vida dos animais e quinzenalmente durante os cinco meses seguintes.

As contagens dos ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) foram realizadas em câmaras de McMaster conforme a técnica preconizada por Whitlock (1948).

De acordo com o resultado do OPG dos 40 bezerros búfalos, 24 foram selecionados e subdivididos em seis grupos sendo: dois grupos controles não parasitados e quatro grupos parasitados, com três a cinco animais em cada grupo.

3.4 Grupos experimentais

As búfalas, antes do parto, foram colocadas em um piquete próximo ao curral para facilitar a observação. Aquelas cujos bezerros pertenciam aos grupos controles (C) não parasitados foram tratadas com anti-helmíntico uma semana antes e no mesmo dia do parto com fosfato de levamisol “Ripercol” na dose de 3,75 mg / Kg pv (20 ml). Nos bezerros dos grupos controles o mesmo anti-helmíntico foi administrado no dia do nascimento e em seguida, semanalmente, para evitar que o animal se infectasse. Além disso, estes animais também foram tratados contra coccidiose com medicamento à base de sulfadiazina “Sulfamax” na dose de 5 ml/animal. As fezes foram colhidas semanalmente para exames coprológicos. Os animais dos dois grupos controles tinham em média 30 (n = 4) e 50 dias de idade (n = 3).

As mães e os bezerros pertencentes aos grupos parasitados não foram tratados com anti-helmínticos, mas apenas com sulfa. Após o nascimento, estes bezerros foram separados em quatro grupos de acordo com o resultado do OPG (ovos por grama de fezes) e a idade:

- 1) Grupo da ascensão - ASC (n = 4): compreendeu animais no início da detecção dos ovos nas fezes e com idade média de 33 dias.
- 2) Grupo do pico de eliminação de ovos nas fezes - PICO (n = 5): esta fase foi estimada através de dados de trabalhos prévios, mostrando que os animais

encontravam-se no pico entre 30 e 50 dias de idade e com OPG médio superior a 10.000 (Starke et al., 1983; Neves et al., 2003; Souza et al., 2004).

3) Grupo do declínio ou expulsão - DECL (n = 4): quando a quantidade de ovos começava a declinar nas fezes e com idade média de 59 dias.

4) Grupo da ausência ou pós-expulsão - PE (n = 4): quando os ovos não foram mais encontrados nas fezes por até um mês consecutivo. Estes animais encontravam-se com idade média de 116 dias.

3.5 Necropsia e Coleta de Material

Os animais foram previamente sedados com Xilazina 2 % (dose = 0,25 a 1,50 mL/100 Kg pv IM) e anestesiados com Ketalar (dose = 0,15 mL /Kg pv IM). Após o animal estar completamente anestesiado este foi posicionado em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta. Os intestinos foram identificados segundo Sisson et al. (1986), o duodeno tendo início no piloro, sua parte cranial passando dorsalmente para a superfície visceral do fígado, onde forma uma curva com o formato de um “S”, o jejuno formando numerosas espirais próximas, ao redor da borda do mesentério, e o íleo que é definido como a parte terminal do intestino delgado, da borda livre da prega ileocecal até o óstio ileocecal; sua parte cranial é aderida ao ceco e cólon e penetra na junção do ceco e do cólon, obliquamente na superfície medial. Após ser devidamente identificada cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foi seccionada; o duodeno na sua região cranial ou mediana, o jejuno em sua região cranial e medial e o íleo também em sua porção cranial e medial, porém preferencialmente onde o enovelado dos parasitas era perceptível. Em seguida ocorreu a retirada dos segmentos. Os segmentos seccionados foram de aproximadamente 15 cm e abertos no sentido longitudinal. Estes segmentos foram lavados em solução salina tamponada (1,93g de NaHCO_3 , 0,37g de KCl e 14,4g de NaCl) e transferidos abertos para uma folha de isopor umedecida com salina tamponada e em temperatura ambiente. Com auxílio de bisturi, segmentos de dois a três centímetros foram seccionados, colocados abertos em papel cartão e

transferidos imediatamente para o fixador. O fixador utilizado foi a solução de Bouin. Após a coleta dos tecidos, os animais foram sacrificados com cloreto de potássio.

3.6 Processamento das amostras de tecidos

Após a fixação das amostras na solução de Bouin por 12 horas, estas foram transferidas para frascos com álcool etílico a 70% após prévio enxágüe de três a quatro vezes neste álcool. As amostras permaneceram em álcool até posterior processamento. Os tecidos foram desidratados através de passagens sucessivas em etanol 70%, 80%, 90% e 100 % , diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina.

As amostras de tecidos intestinais, em blocos de parafina, foram seccionadas em micrótomo (5 μ m) e montadas em lâminas de vidro através da técnica histológica de rotina.

3.7 Quantificação de células na camada intraepitelial do intestino

Para as contagens de mastócitos e eosinófilos intraepiteliais, foram utilizadas as técnicas de coloração específica pelo azul de Astra (Astra Blue 6GLL, Sigma Chemical A-2077, USA) e “Direct Red 80” (Fluka Chemie AG CH-9470), respectivamente, segundo Duffy et al. (1993). Para a contagem de linfócito intraepitelial foi utilizada a técnica de coloração específica pela hematoxilina e eosina. A identificação das células caliciformes foi através da coloração com ácido periódico de Schiff (P.A.S.) (Lison, 1960).

Após a coloração, os tecidos foram desidratados com etanol e xilol e montados entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

Os tecidos utilizados para estas contagens celulares pertenciam aos animais dos grupos: controle com 30 dias de idade (C30), ascensão, pico, declínio e pós-expulsão dos parasitas.

As contagens destas células foram realizadas nas vilosidades intestinais, contando-se as células presentes no epitélio de 20 vilos consecutivos e escolhendo-se

as vilosidades que mais se igualavam em altura e largura. Estas contagens foram realizadas a “duplo cego”, em três lâminas para cada animal de cada grupo, sob microscopia de luz branca.

3.8 Análise morfométrica

Para exames morfológicos, as secções intestinais foram coradas pela hematoxilina eosina (H.E.). Foram analisadas 20 unidades vilo-cripta onde a altura do vilo, a profundidade das criptas, espessura da submucosa e da camada muscular longitudinal e circular foram medidas com auxílio de uma ocular micrométrica em microscópio de luz branca. Três lâminas para os grupos controles (C30 e C50) e três lâminas para os grupos infectados, nas fases de ascensão, pico máximo, declínio e ausência da infecção, foram analisadas morfometricamente.

3.9 Análise Imunoistoquímica

3.9.1 Método imunoistoquímico

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 reação imunoistoquímica usando-se o procedimento indireto. Desta forma, o anticorpo secundário conjugado à biotina e o complexo avidina-biotina peroxidase foram usados 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 0,01M de solução salina fosfatada tamponada (PBS, pH = 7.4), e as reações inespecíficas do anticorpo secundário foram inibidas usando-se o soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário na diluição 1/50. O anticorpo primário 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 foi usado na diluição apropriada e incubado por 30 minutos à temperatura

ambiente. Após outros enxágües em PBS, o complexo Avidina-Biotina Peroxidase na diluição 1:100 (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 substrato, “VIP Substrate Kit for peroxidase SK-4600” (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010) ou “Nova Red substrate Kit for peroxidase SK-4800” (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010), em PBS e água destilada, respectivamente. Após um enxágüe em água destilada, os cortes teciduais foram corados pela hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, MHS32-1L), 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.

3.9.1.1 Coloração imunoistoquímica do Sistema Nervoso Entérico (SNE)

Para a coloração imunoistoquímica do SNE, foi utilizado o anticorpo primário policlonal PGP 9.5 (*protein gene product 9.5*) produzido em coelho (Biogenesis Inc. Sandown, NH-USA). A diluição utilizada deste anticorpo primário foi 1:10.000 e a diluição do anticorpo secundário, anti-IgG de coelho biotinilado produzido em caprino (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), foi de 1: 2.000. Para o bloqueio de reações inespecíficas do anticorpo secundário foi utilizado soro normal de caprino na diluição 1:50 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Os tecidos intestinais analisados foram os de bezerros búfalos pertencentes ao grupo controle não infectado (C30), ao grupo infectado no pico (PICO) e ao grupo pós-expulsão do parasita (PE).

O substrato utilizado foi o VIP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), pois foi o que corou satisfatoriamente a reação.

Para verificar se os anticorpos estavam ou não reagindo inespecificamente, realizaram-se os controles negativos pela ausência dos anticorpos primário e/ou secundário.

3.9.1.2 Combinação das técnicas histoquímica e imunoistoquímica para detecção de mastócitos associados aos processos neuronais

A combinação dos procedimentos histoquímico e imunoistoquímico, como descrito por Stead et al. (1989) foi utilizado para demonstrar a presença da associação entre os mastócitos e os processos neuronais na submucosa e na musculatura lisa intestinal do duodeno, jejuno e íleo. Os mastócitos foram corados com azul de Astra e os nervos foram corados através da imunoistoquímica com o anticorpo primário anti-PGP 9.5, como descrito anteriormente no item 3.9.2.

Para a quantificação dos mastócitos, estas células foram classificadas em duas categorias: 1) mastócitos associados aos nervos e, 2) mastócitos não associados aos nervos, de acordo com Stead et al. (1989). Os mastócitos que estavam a uma distância maior que 1µm dos processos neuronais dos gânglios entéricos (estimada por uma ocular micrométrica) foram considerados como mastócitos não associados aos nervos e aqueles que se encontravam a uma distância menor ou igual a 1µm foram considerados mastócitos associados. As células presentes na submucosa (plexo submucoso) e muscular (plexo mioentérico) do duodeno, jejuno e do íleo dos animais pertencentes aos grupos controle (C30), pico e pós-expulsão do parasita, foram identificadas e contadas em nove áreas que variaram de 0,2 a 1,6 mm² (três lâminas/animal), usando-se uma ocular micrométrica. Em seguida, determinou-se o número médio de mastócitos por mm² na submucosa e na muscular. As células foram contadas em microscópio de luz branca em aumento de 400 vezes. A contagem foi realizada a “duplo cego”.

Concomitantemente, com o auxílio de uma ocular micrométrica, mediu-se os gânglios nervosos dos plexos submucoso e mioentérico do duodeno, jejuno e do íleo dos animais pertencentes aos grupos controle (C30), pico e pós-expulsão. Somente os gânglios que se apresentavam coloridos pela imunoistoquímica (gânglios que reagiram positivamente ao anticorpo anti-PGP 9.5) foram medidos no sentido longitudinal em uma distância de 2 µm. Foram escolhidos três locais diferentes em cada secção intestinal, onde mediu-se os gânglios submucosos bem como os mioentéricos.

3.9.2 Coloração imunoistoquímica de macrófagos

A quantificação de macrófagos da parede intestinal foi realizada após a coloração imunoistoquímica destas células com anticorpo primário monoclonal, anti-macrófago humano (clone MAC387), produzido em camundongo (Serotec Product Data Sheet, Kidlington, Oxford) na diluição de 1:100 (10µg/ml). Apesar de ser um anticorpo humano, o clone MAC 387 tem reação cruzada com outras espécies animais como o bovino (Gutierrez et al., 1999).

O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo biotilado (BA-2001), produzido em cavalo (Vector Laboratories) foi utilizado na diluição de 1:500. Para bloquear as possíveis reações inespecíficas do anticorpo secundário, utilizou-se soro normal de cavalo na diluição 1:50 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

O substrato utilizado foi o “Nova Red Substrat Kit for peroxidase” (Vector Laboratories, Burlingame CA).

O número de macrófagos no intestino delgado (duodeno e jejuno) foi obtido através de contagens realizadas nos tecidos animais do grupo controle (C30), pico e pós-expulsão. As células presentes em 20 vilos e criptas foram contadas e o número médio foi calculado. Já os macrófagos presentes na submucosa e na muscular foram contados e calculados para uma área de 1 mm² como descrito para mastócito (item 3.9.3).

3.10 Delineamento estatístico

Para a análise estatística das contagens de células intraepiteliais (mastócitos, eosinófilos, linfócitos e células caliciformes), dos resultados morfológicos, do número de mastócitos que tocavam e não tocavam os nervos, das medidas dos gânglios nervosos e do número de macrófagos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, considerando as três porções do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo.

Os resultados foram analisados usando a análise de variância e, para a verificação das médias, utilizou-se o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Exames coprológicos (OPG)

O grau de parasitismo por *T. vitulorum* foi avaliado através das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) de 40 bezerros búfalos do rebanho nascidos nos anos de 1998 e 1999. Estes animais foram mantidos juntos com suas mães durante todo tempo. Apenas 24 animais foram usados para formar os grupos do presente experimento. Os 16 animais restantes continuaram sendo utilizados para o acompanhamento do OPG. Na Figura 1 encontram-se os dados médios do OPG dos animais que nasceram no ano de 1998. Cabe salientar que o cálculo da média foi feito incluindo também os animais que apresentavam OPG zero.

Através de amostras de fezes examinadas semanalmente do nascimento aos 106 dias de idade, observou-se que os animais iniciaram o parasitismo patente em torno de 15 a 22 dias e atingiram o pico ao redor de 43 dias após o nascimento. O período de patência variou de 15 a 78 dias. Após o pico, o número de ovos começou a cair, até que se tornassem ausentes nos animais a partir dos 85 dias de idade (Figura 1). Assim, constatou-se que este parasitismo apresentava uma curva com quatro fases: início e ascensão (ASC - fase 1) que compreendeu o período entre 15 e 36 dias; pico na contagem máxima de ovos nas fezes (PICO - fase 2) compreendendo entre 37 e 43 dias; declínio ou expulsão do parasita (DECL - fase 3) entre 50 e 78 dias em média e ausência ou pós-expulsão (PE - fase 4) a partir de 85 dias de idade (Figura 1). O resultado do OPG e do número de *T. vitulorum* adultos encontrados no intestino dos animais necropsiados nas diferentes fases do parasitismo encontram-se na Tabela 1.

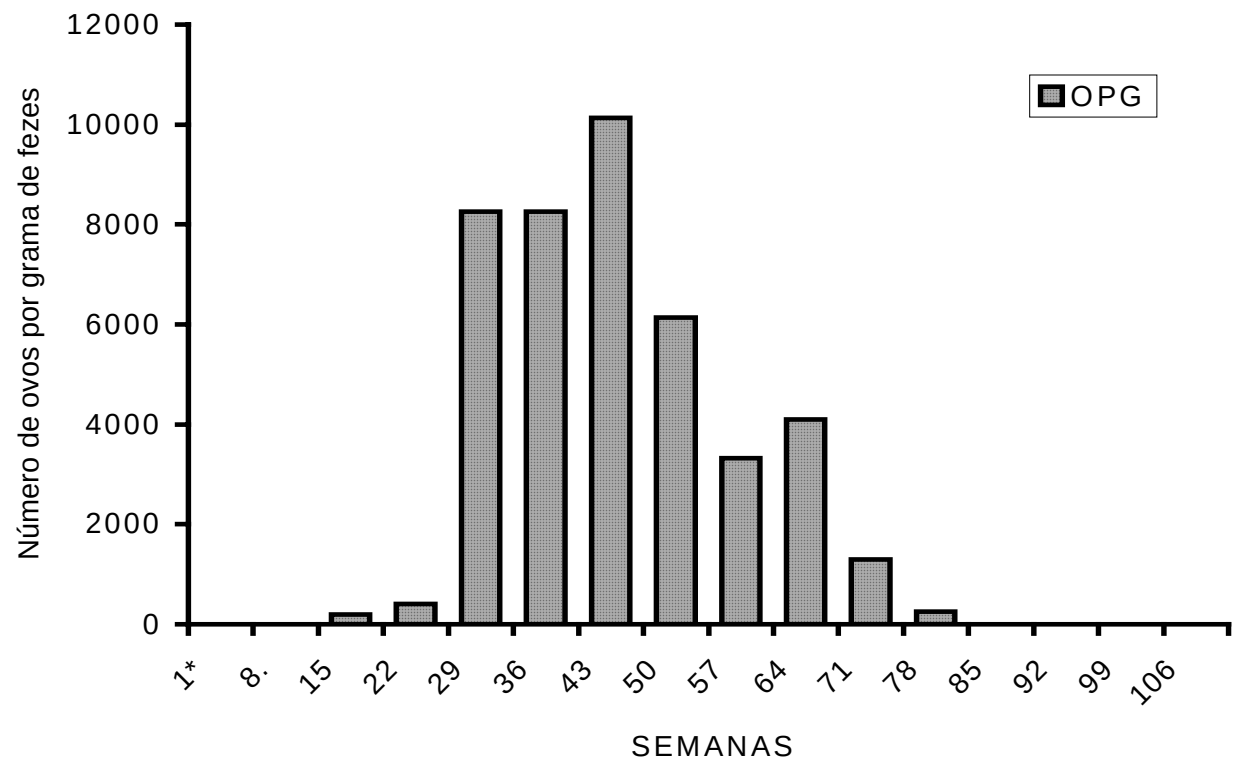


FIGURA 1. Dados médios da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos (n = 9-10) do nascimento aos 106 dias de idade (nascidos em 1999), naturalmente infectados com *Toxocara vitulorum*.

* = A média foi calculada, tendo como base somente os animais positivos.

TABELA 1. Dados médios de OPG e de contagens de *Toxocara vitulorum* adultos encontrados no intestino durante as necropsias de bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência ou pós-expulsão (PE) do parasitismo. Ilha Solteira, SP.

Grupos	OPG	Número de Parasitas adultos (machos e fêmeas)	
	Média ± DP	Variação	Média ± DP
C30	0	0	0
C50	0	0	0
ASC	4.150 ± 3.566	3 - 20	10 ± 8
PICO	46.950 ± 29.245	11 – 51	27 ± 18
DECL	1.812 ± 3.175	0 – 2	0,5 ± 1
PE	0	0	0

DP = Desvio Padrão

4.2 Contagens de células imune/inflamatórias no espaço intraepitelial da mucosa intestinal

De acordo com os dados das contagens de células no espaço intraepitelial (linfócitos, eosinófilos, mastócitos e células caliciformes) do intestino delgado de bezerros búfalos, pôde-se observar o aumento destas células nos animais infectados por *T. vitulorum*, quando comparados com os controles não infectados (Tabelas 2 a 5 e Figuras 2 a 8).

4.2.1 Linfócitos Intraepiteliais (LIE)

No duodeno, principal local do parasitismo por *T. vitulorum* em bezerros búfalos, constatou-se que o número de linfócitos intraepiteliais (LIE) apresentou um significativo aumento no pico quando comparado com os dados das contagens dos animais do grupo controle.

Desta forma, os LIE apresentaram um aumento significativamente mais elevado na fase de pico do parasitismo, mas regrediu rapidamente para alcançar o nível do controle na fase de pós-expulsão do parasita do intestino (Tabela 2 e Figura 2). Esta dinâmica celular foi semelhante tanto no duodeno como no jejuno e no íleo, apesar do número levemente superior no jejuno (Tabela 2). O aumento de LIE, principalmente na fase de pico do parasitismo, coincidiu também com as maiores contagens de OPG e o maior número de *T. vitulorum* adultos no intestino (Tabela 1).

Da mesma forma que no duodeno, *T. vitulorum* também foi encontrado parasitando o jejuno, mas somente na porção inicial do mesmo. E, nesta porção intestinal, a população de LIE ainda encontrava-se bastante elevada nos animais que estavam na fase de pico, ou seja, havia 2,5 vezes mais células do que no controle. Após o pico, o número destas células voltou ao nível do controle durante o período de expulsão dos parasitas pelos bezerros búfalos (Tabela 2 e Figura 2).

No íleo, que compreende a terceira porção do intestino delgado, também observou um aumento significativo da população de LIE na fase de pico do parasitismo, apesar de não ter sido encontrado neste local o parasita *T. vitulorum* em nenhum animal necropsiado (Tabela 2 e Figura 2).

Observe na Figura 3 o epitélio intestinal do duodeno de um bezerro búfalo no pico do parasitismo, mostrando dois linfócitos intraepiteliais.

TABELA 2. Número médio de linfócitos intraepiteliais (LIE) nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) dos bezerros búfalos do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (ASC), pico, declínio ou expulsão (DECL) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	LIE Duodeno	LIE Jejuno	LIE Íleo
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C30	12,62 ± 2,24 ^b	11,97 ± 2,36 ^b	11,62 ± 1,44 ^c
ASC	11,50 ± 0,27 ^b	14,30 ± 2,55 ^b	16,10 ± 2,4 ^b
PICO	18,75 ± 2,61 ^a	28,15 ± 0,83 ^a	20,60 ± 0,81 ^a
DECL	12,32 ± 1,39 ^b	13,12 ± 1,1 ^b	10,12 ± 1,8 ^c
PE	10,02 ± 1,46 ^b	11,80 ± 1,77 ^b	9,0 ± 1,44 ^c

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade

DP = Desvio Padrão

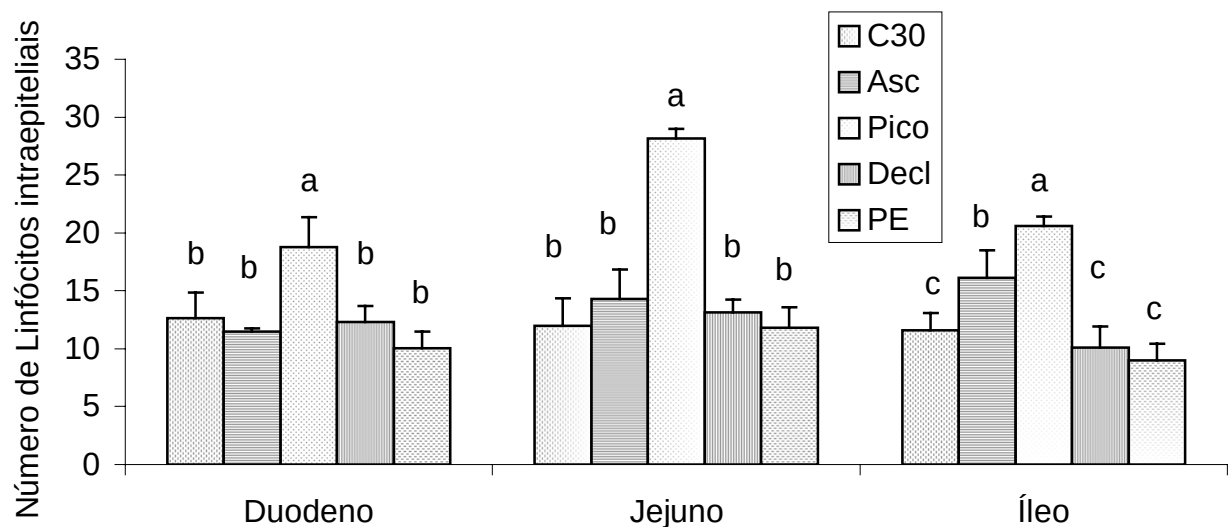


FIGURA 2. Número médio de linfócito intraepitelial (LIE) no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

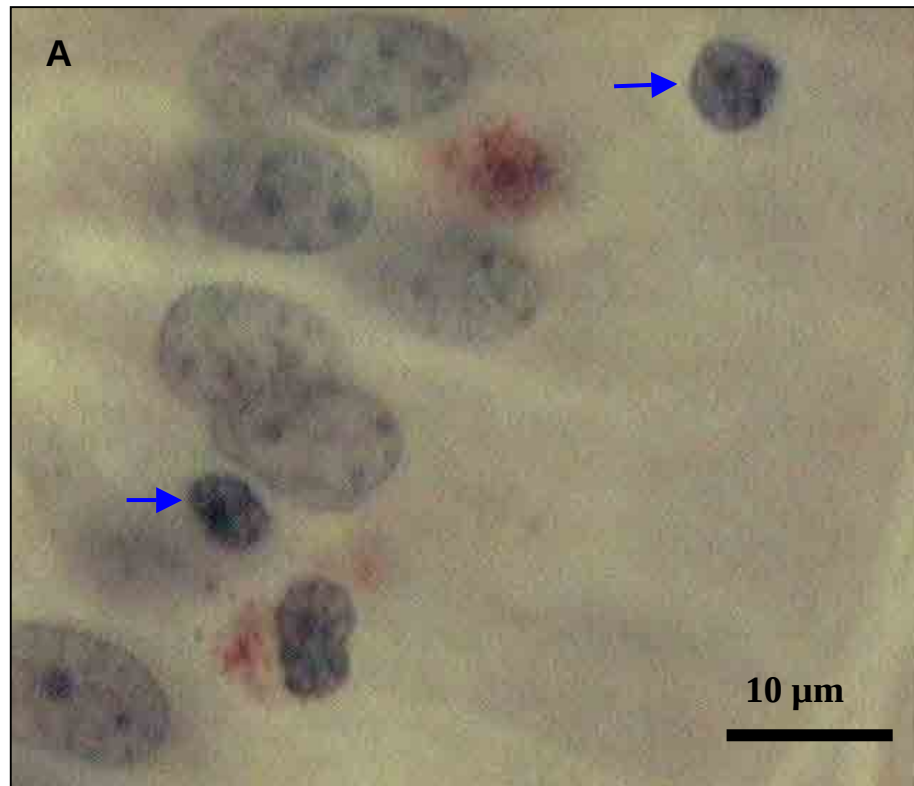


Figura 3. Fotomicrografia do epitélio intestinal do duodeno de búfalos infectados por *Toxocara vitulorum* mostrando linfócitos intraepiteliais (seta azul) corados pela Hematoxilina de Mayer.

4.2.2 Eosinófilos

Eosinófilos não são células comumente encontradas no espaço intraepitelial do intestino, mas no duodeno, constatou-se um elevado aumento destas células nesta região nos animais infectados por *T. vitulorum* quando comparados com os animais controle (C30). Este aumento foi mais acentuado e significativo na fase de pico do parasitismo quando comparado com o número destas células nos animais controles, sugerindo que os eosinófilos migraram da lâmina própria para a camada epitelial em resposta à presença do parasita adulto (Tabela 3 e Figura 4).

Da mesma forma, no jejuno e no íleo, o número de eosinófilos intraepiteliais encontrava-se elevado significativamente nos animais que estavam na fase de pico, mas após esta fase o número destas células tenderam à normalidade (Tabela 3 e Figura 4).

Observe na Figura 5 o epitélio intestinal do duodeno de um bezerro búfalo no pico do parasitismo com eosinófilos presentes na lâmina própria e no espaço intraepitelial.

TABELA 3. Número médio de eosinófilos no espaço intraepitelial (EIE) nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) dos bezerros búfalos do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (ASC), pico, declínio ou expulsão (DECL) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	EIE Duodeno	EIE Jejuno	EIE Íleo
	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP
C30	0,08 $\pm$ 0,16 ^b	0,25 $\pm$ 0,16 ^b	0,12 $\pm$ 0,25 ^b
ASC	2,72 $\pm$ 0,78 ^b	0,84 $\pm$ 0,49 ^b	0,49 $\pm$ 0,58 ^b
PICO	10,96 $\pm$ 5,81 ^a	3,27 $\pm$ 1,71 ^a	2,65 $\pm$ 1,55 ^a
DECL	1,29 $\pm$ 1,20 ^b	0,37 $\pm$ 0,48 ^b	0,16 $\pm$ 0,24 ^b
PE	0,46 $\pm$ 0,52 ^b	0,99 $\pm$ 0,24 ^b	0,04 $\pm$ 0,08 ^b

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

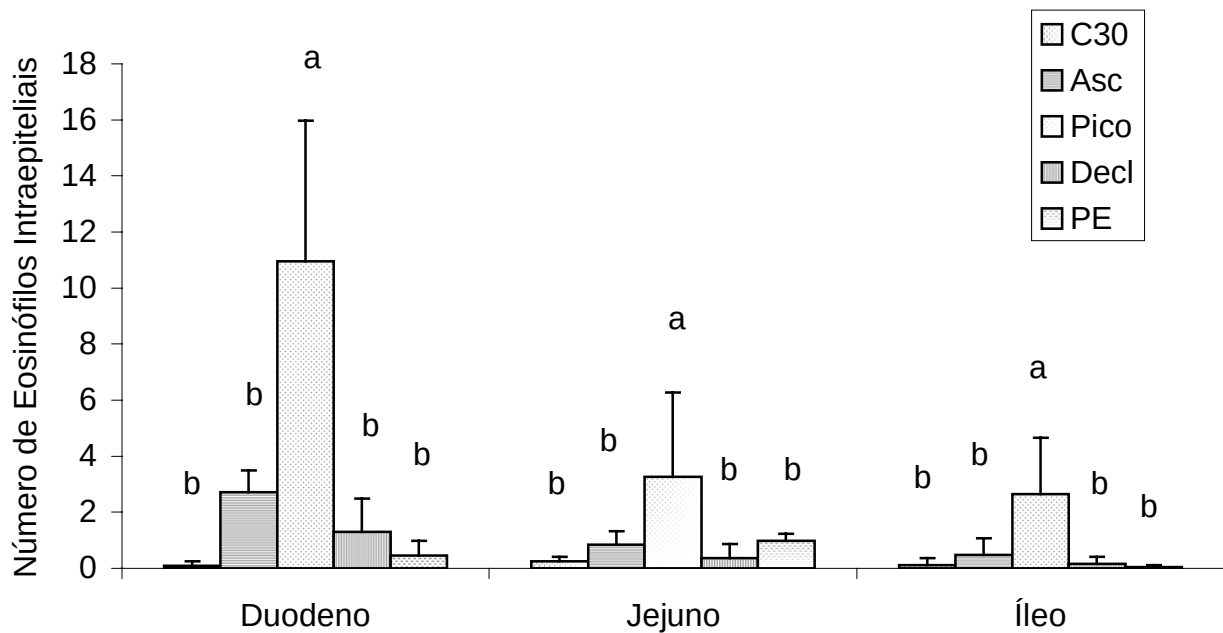


FIGURA 4. Numero médio de eosinófilo no espaço intraepitelial (EIE) no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

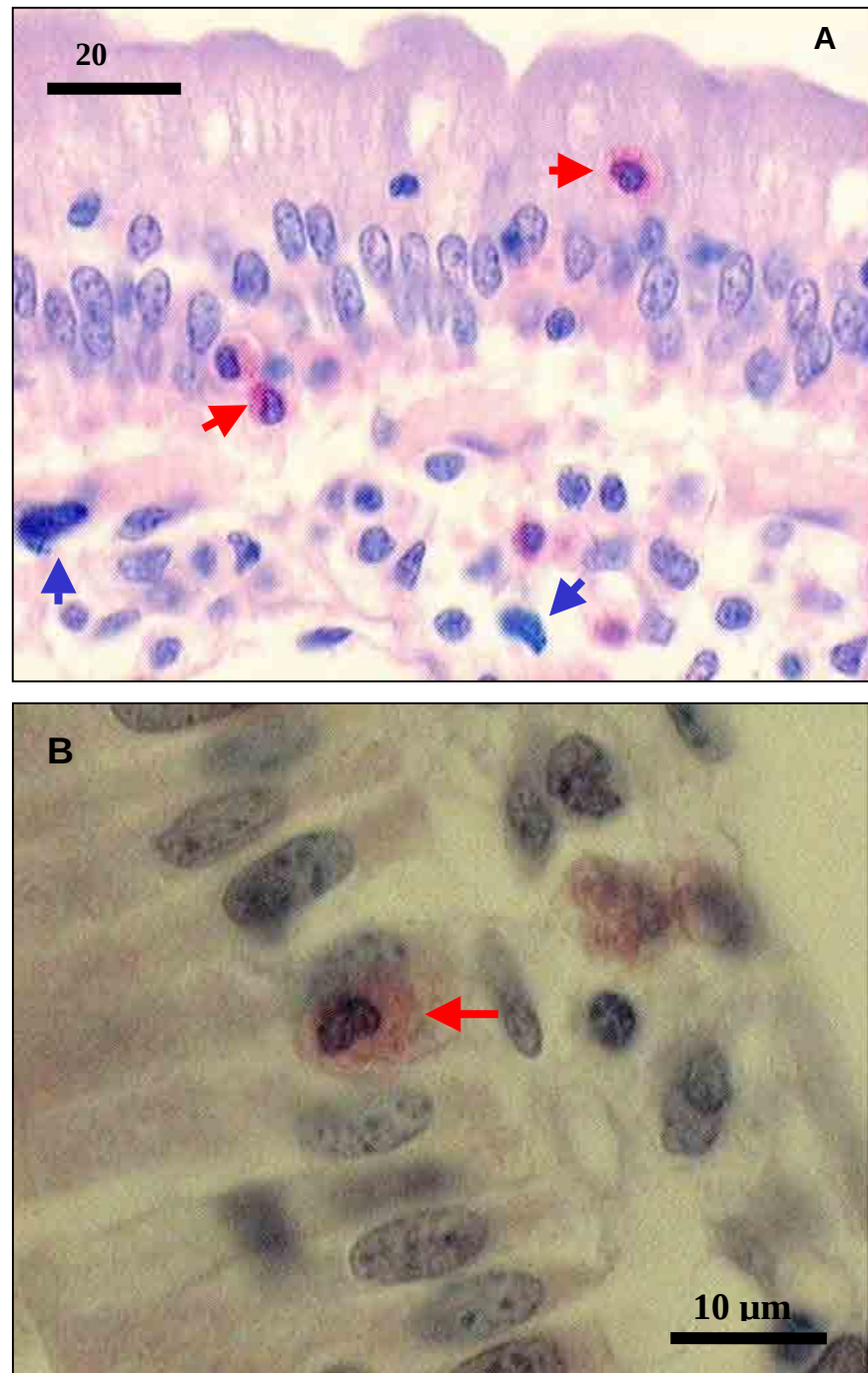


Figura 5. Fotomicrografia do epitélio intestinal do duodeno de búfalos mostrando eosinófilos intraepiteliais (setas vermelhas) na lâmina própria (Foto A) e na camada epitelial (Foto B) após a coloração histoquímica pelo Direct Red.

4.2.3 Mastócitos

Outro tipo celular que habitualmente não está presente no espaço intraepitelial são os mastócitos. Mas, tanto no duodeno, como no jejuno e no íleo, os mastócitos foram visualizados no espaço intraepitelial, mas com significativo aumento em relação ao controle nas fases de ascensão e pico (duodeno) e somente no pico (íleo). Embora, acentuado aumento tenha ocorrido também no jejuno, este não foi estatisticamente significativo. Em todos estes locais, houve uma regressão acentuada na contagem celular a partir do pico, aproximando-se ao nível do controle na fase de pós-expulsão (Tabela 4 e Figura 6), sugerindo que o parasita induziu a migração destas células para próximo da região luminal.

Na Figura 7A pode-se observar mastócitos atravessando o epitélio intestinal, e sua presença também na lâmina própria do vilão (Figura 7B).

TABELA 4. Número médio de mastócitos no espaço intraepitelial (MIE) nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) dos bezerros búfalos do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (ASC), pico, declínio ou expulsão (DECL) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	MIE Duodeno	MIE Jejuno	MIE Íleo
	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP
C30	0,04 $\pm$ 0,08 ^b	0,66 $\pm$ 1,01 ^a	0,04 $\pm$ 0,08 ^b
ASC	1,63 $\pm$ 1,08 ^a	1,41 $\pm$ 1,04 ^a	1,37 $\pm$ 1,21 ^b
PICO	2,0 $\pm$ 0,95 ^a	2,59 $\pm$ 1,43 ^a	5,45 $\pm$ 2,06 ^a
DECL	0,67 $\pm$ 0,72 ^{ab}	0,54 $\pm$ 0,53 ^a	0,12 $\pm$ 0,15 ^b
PE	0,17 $\pm$ 0,13 ^b	0,50 $\pm$ 0,58 ^a	0,16 $\pm$ 0,24 ^b

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

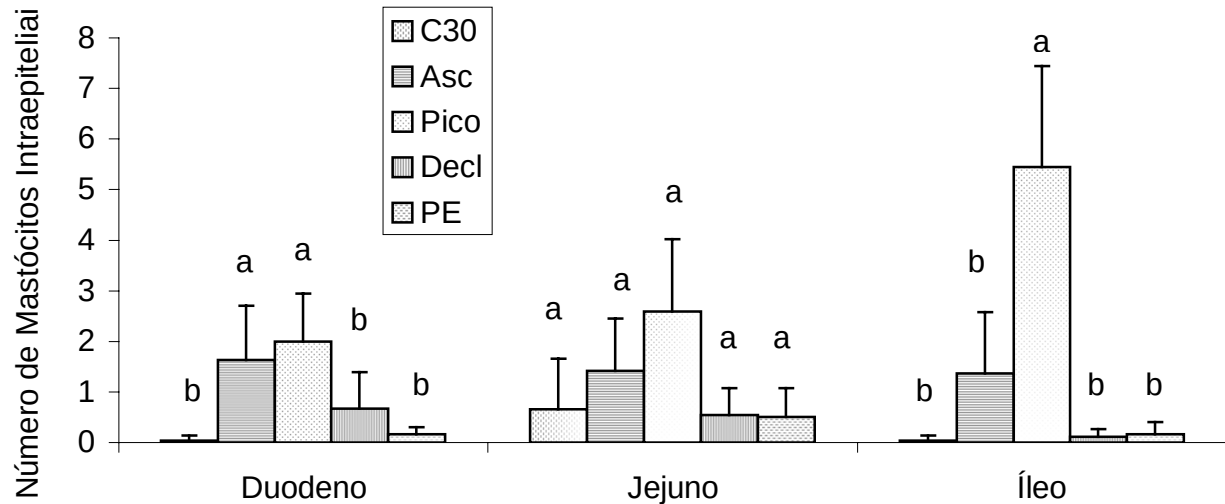


FIGURA 6. Numero médio de mastócito no espaço intraepitelial (MIE) no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Dec) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

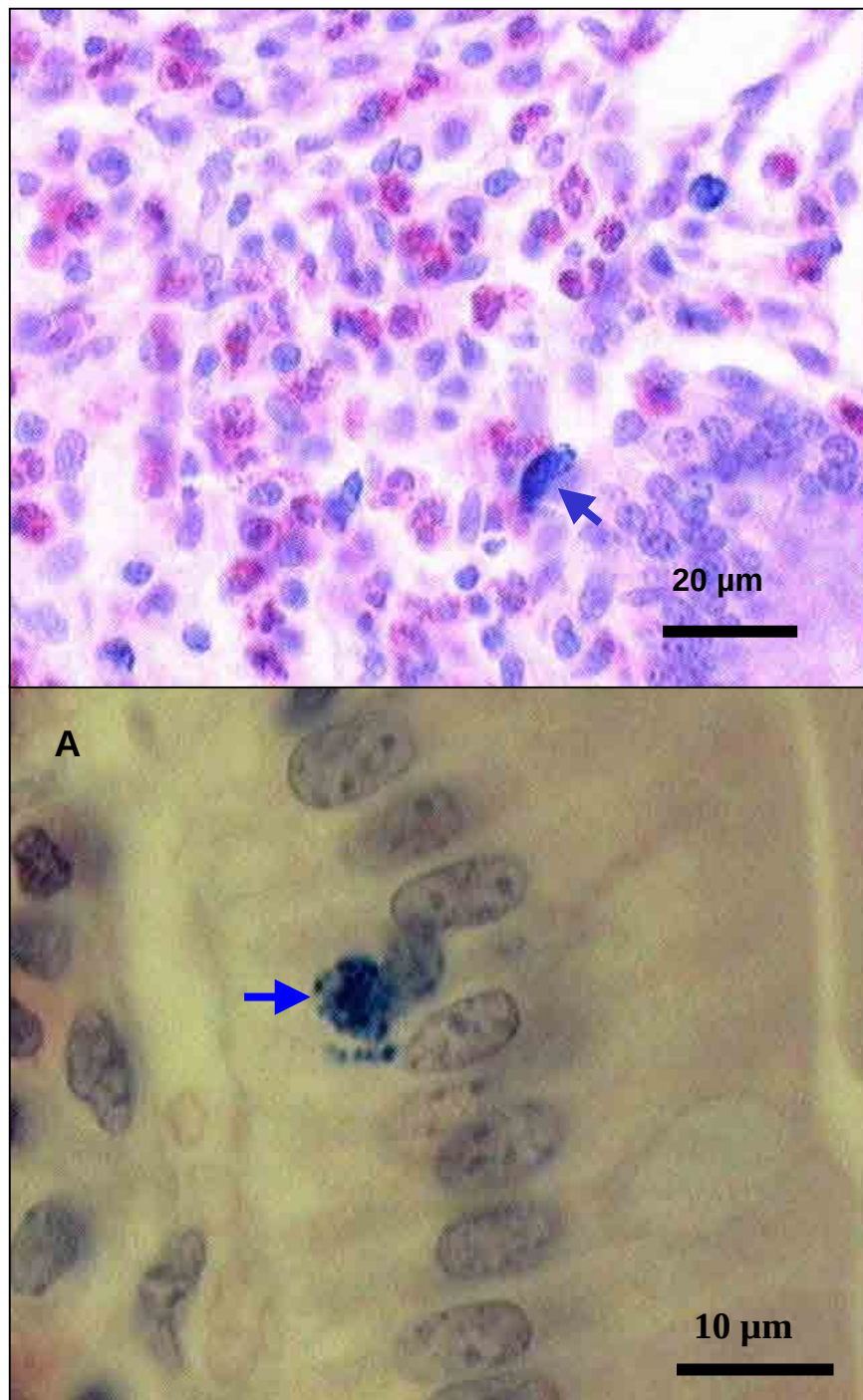


Figura 7. Fotomicrografia do epitélio intestinal do duodeno de búfalos, mostrando mastócito intraepitelial (seta azul) corados pelo Azul de Astra.

4.2.4 Células caliciformes

As células caliciformes, menos freqüentes no duodeno, mostraram-se hiperplásicas, principalmente na fase de pico do parasitismo, quando o OPG dos animais parasitados também encontrava-se elevado (Tabela 5 e Figura 8).

No jejuno, também observou-se células caliciformes hiperplásicas nas fases de ascensão e pico do parasitismo, declinando abruptamente durante a expulsão do parasita pelo hospedeiro (fase de declínio). O número destas células voltou à normalidade após a expulsão dos mesmos (Tabela 5 e Figura 8).

As células caliciformes no íleo também apresentavam-se hiperplásicas quando comparadas com amostras dos animais controles (Tabela 5 e Figura 8).

O número de todas estas células intraepiteliais voltou à normalidade após a expulsão dos parasitas adultos pelas fezes do hospedeiro.

Observe na Figura 9 o epitélio intestinal do Jejuno de um bezerro búfalo no pico do parasitismo, mostrando células caliciformes.

TABELA 5. Número médio de células caliciformes (CC) nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) dos bezerros búfalos do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (ASC), pico, declínio ou expulsão (DECL) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	CC Duodeno	CC Jejuno	CC Íleo
	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP	Médias $\pm$ DP
C30	12,65 $\pm$ 5,64 ^b	11,92 $\pm$ 4,68 ^b	27,30 $\pm$ 1,10 ^b
ASC	19,52 $\pm$ 2,86 ^{ab}	25,33 $\pm$ 2,33 ^a	27,25 $\pm$ 4,65 ^b
PICO	24,30 $\pm$ 0,73 ^a	27,55 $\pm$ 5,60 ^a	39,17 $\pm$ 4,03 ^a
DECL	16,35 $\pm$ 4,01 ^b	14,97 $\pm$ 2,65 ^b	11,82 $\pm$ 4,67 ^c
PE	16,85 $\pm$ 2,01 ^{ab}	19,0 $\pm$ 1,61 ^{ab}	22,5 $\pm$ 2,36 ^b

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

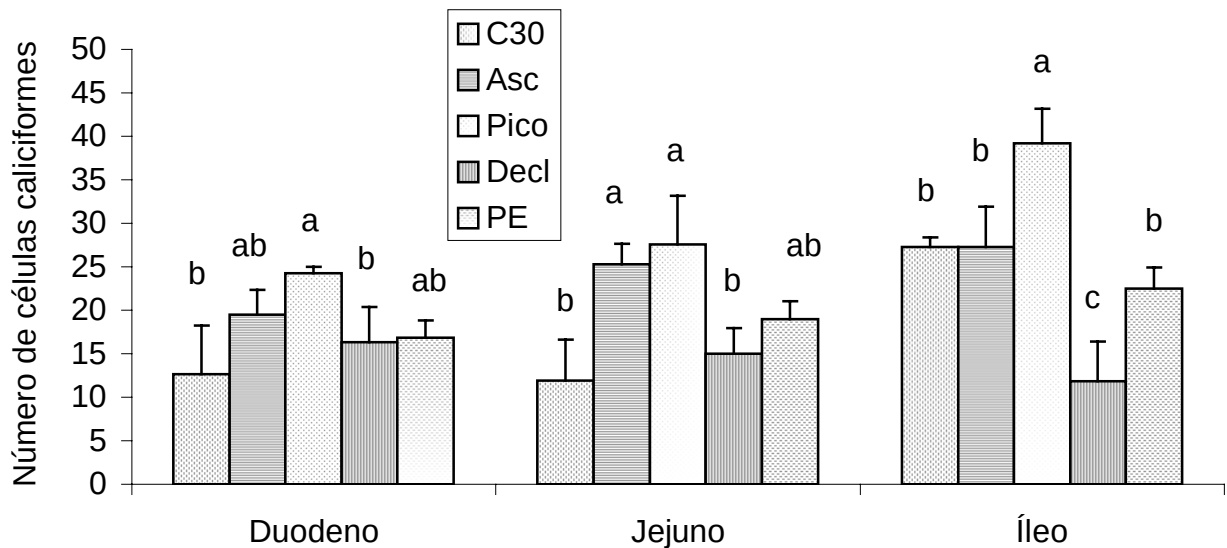


FIGURA 8. Numero médio de células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

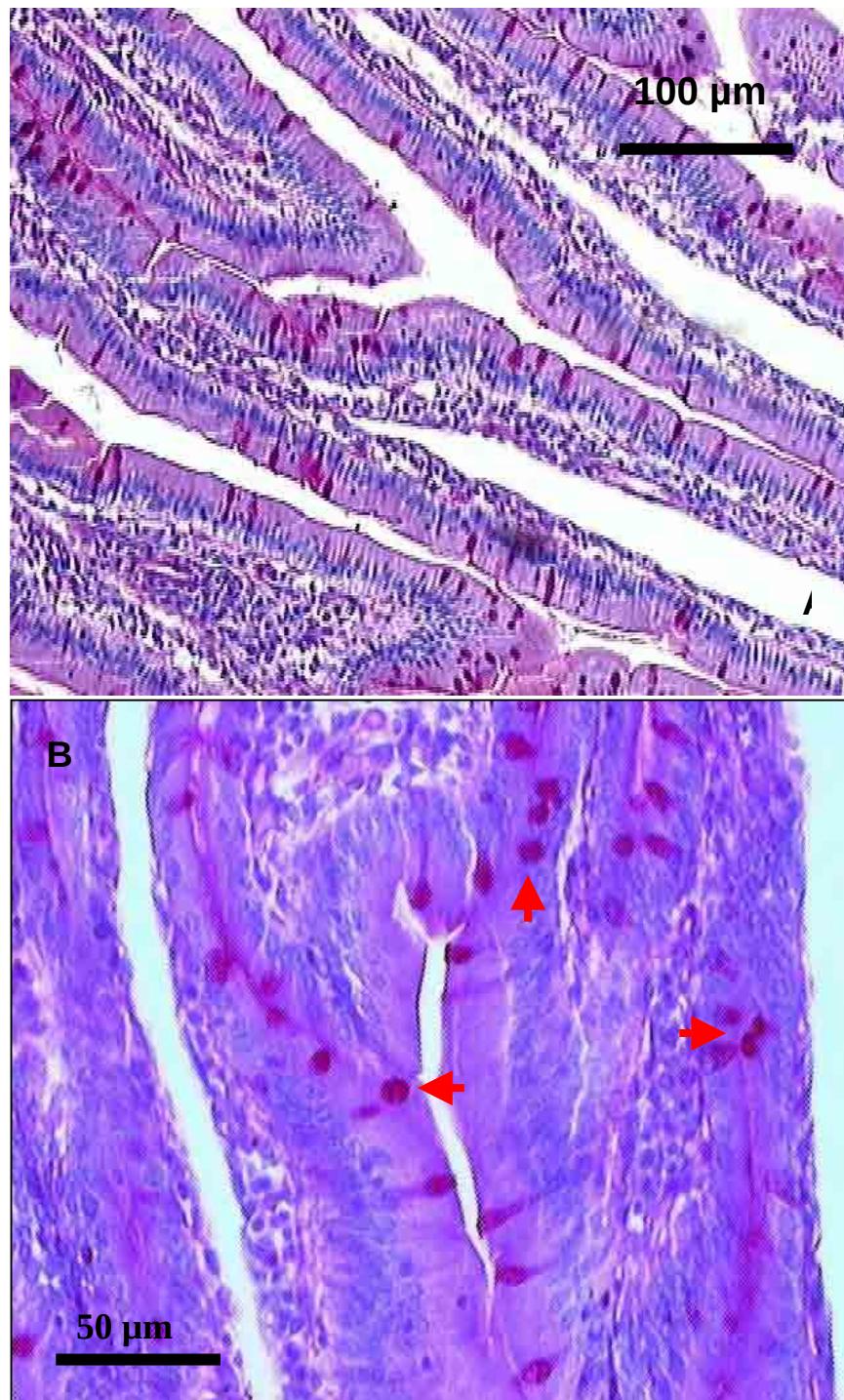


Figura 9. Fotomicrografia do epitélio do duodeno de búfalos, mostrando células caliciformes no jejuno (setas vermelhas) coradas pelo ácido periódico de Schiff.

4.2.5 Macrófagos

Nos resultados das contagens de macrófagos, pode-se perceber que os números destas células no vilo e na cripta do duodeno e cripta do jejuno não foram estatisticamente significativos quando comparados aos três grupos estudados (controle, pico e pós-expulsão), apesar de ter aumentado 3,5 e 3,7 vezes, respectivamente no vilo e na cripta, na fase de pós-expulsão em relação ao controle. Já o número de macrófagos no vilo do jejuno dos animais no período de pós-expulsão foi diferente estatisticamente dos grupos controle e pico com aumento de 5 vezes (Tabela 6 e Figuras 10 e 11).

Quando analisou-se a variação populacional de macrófagos na submucosa e na muscular, verificou-se que o número destas células estava muito elevado no pico e no período de pós-expulsão, tanto no duodeno quanto no jejuno (Tabela 7 e Figuras 12 e 13). O número médio destas células por mm^2 variou de $1,8 \pm 0,95$ no controle (submucosa/duodeno) para $44,85 \pm 3,01$ no pico (submucosa/jejuno). Isto significou um aumento de aproximadamente 25 vezes. No período de pós-expulsão estas células continuaram elevadas na submucosa. Na muscular, a quantidade de macrófagos foi inferior à da submucosa, mas o padrão de alteração populacional foi similar (Tabela 7 e Figuras 12 e 13).

Na figura 14, observa-se os macrófagos corados imunoistoquimicamente na mucosa e na muscular do duodeno de um bezerro búfalo infectado por *T. vitulorum*.

Tabela 6. Número médio de macrófagos na parede intestinal (vilo, cripta) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado, no pico máximo da infecção por *Toxocara vitulorum* e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

	Número de Macrófagos			
	Duodeno		Jejuno	
	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle	1,16 ± 1,3 ^a	1,62 ± 1,7 ^a	0,81 ± 0,5 ^b	0,84 ± 0,5 ^a
Pico	1,33 ± 0,6 ^a	2,61 ± 1,7 ^a	1,02 ± 0,7 ^b	1,4 ± 1,6 ^a
PE	4,11 ± 2,5 ^a	6,09 ± 2,5 ^a	4,71 ± 1,3 ^a	3,73 ± 0,7 ^a

DP = Desvio Padrão

Letras nas colunas = média dos grupos estatisticamente significantes (P < 5%)

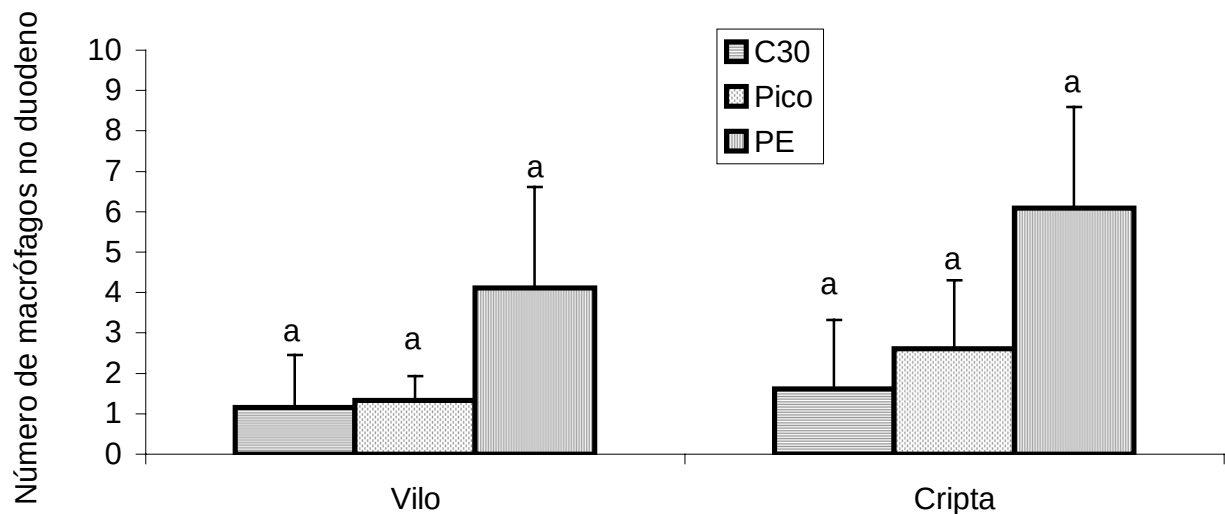


Figura 10. Número médio de macrófagos na parede intestinal do duodeno (vilo, cripta) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado por *Toxocara vitulorum*, no pico máximo da infecção e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

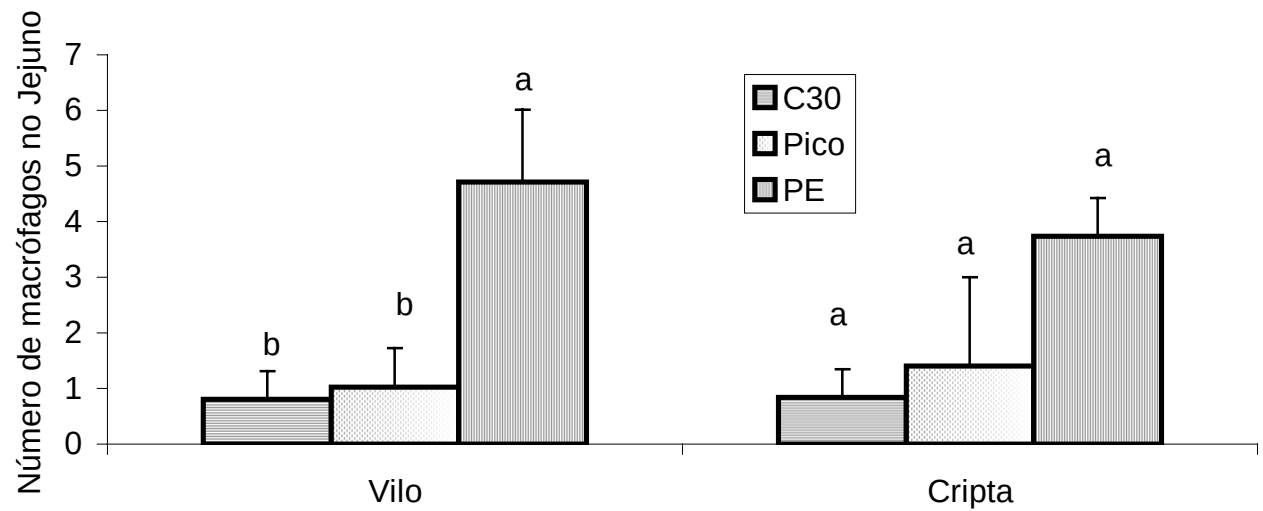


Figura 11. Número médio de macrófagos na parede intestinal do jejuno (vilo e cripta) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado por *Toxocara vitulorum*, no pico máximo da infecção e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

Tabela 7. Número médio de macrófagos na parede intestinal (submucosa, muscular) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado por *Toxocara vitulorum*, no pico máximo da infecção e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

	Número de Macrófagos			
	Duodeno		Jejuno	
	Submucosa	Muscular	Submucosa	Muscular
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle	1,8 ± 0,95 ^c	4,16 ± 0,91 ^c	7,23 ± 2,39 ^b	4,58 ± 2,46 ^c
Pico	28,06 ± 0,72 ^b	15,92 ± 1,46 ^b	44,85 ± 3,01 ^a	27,38 ± 0,86 ^b
PE	41,87 ± 1,41 ^a	20,95 ± 2,34 ^a	40,69 ± 4,16 ^a	32,84 ± 1,30 ^a

DP = Desvio Padrão

Letras nas colunas = média dos grupos estatisticamente significantes (P < 5%)

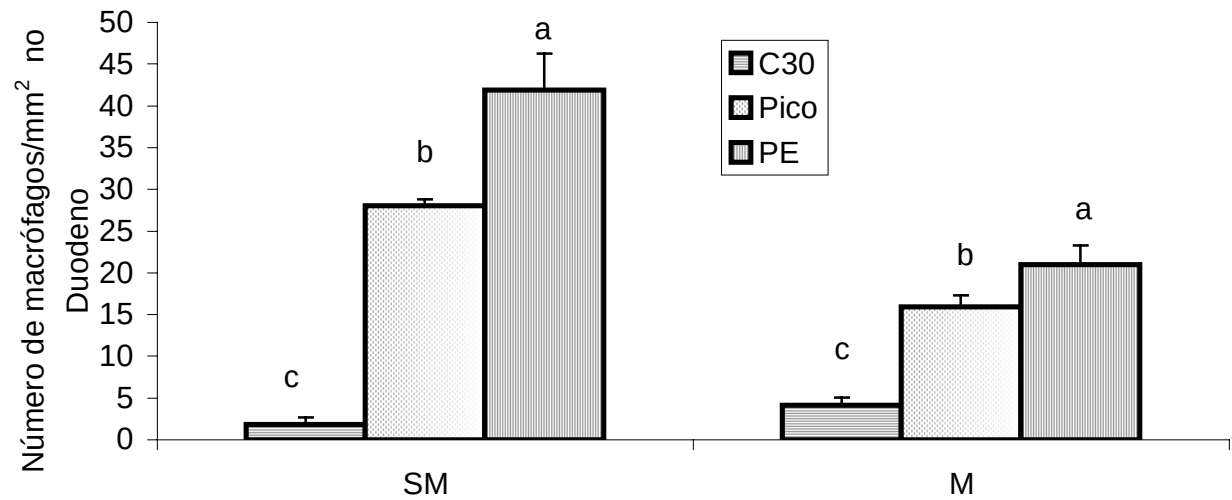


Figura 12. Número médio de macrófagos na parede intestinal do duodeno (submucosa, muscular) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado por *Toxocara vitulorum*, no pico máximo da infecção e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

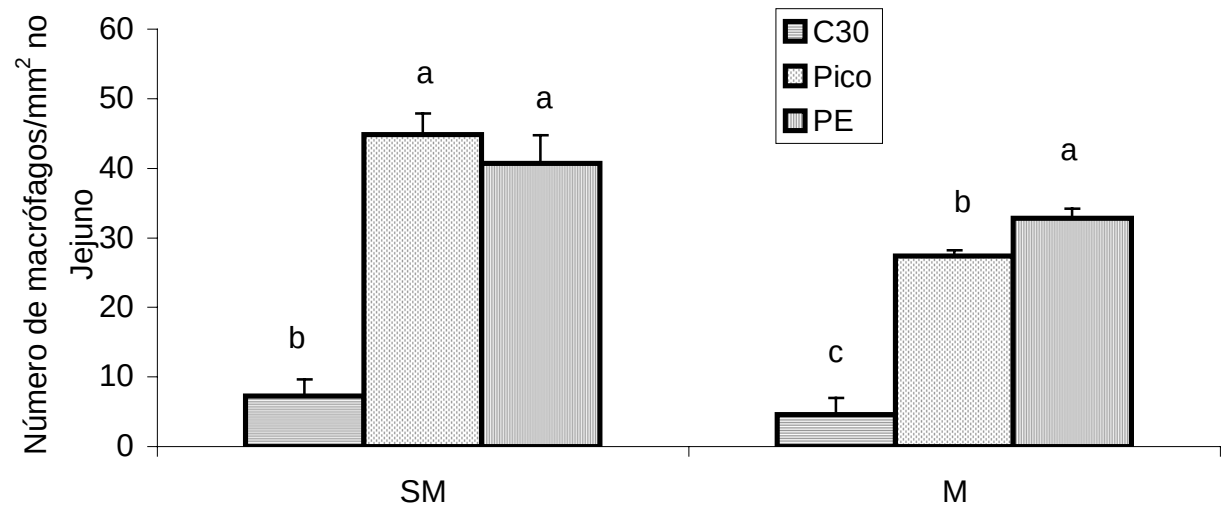


Figura 13. Número médio de macrófagos na parede intestinal do jejunum (submucosa, muscular) de bezerros búfalos pertencentes aos grupos controle, não infectado por *Toxocara vitulorum*, no pico máximo da infecção e no período de pós-expulsão (PE) do parasita.

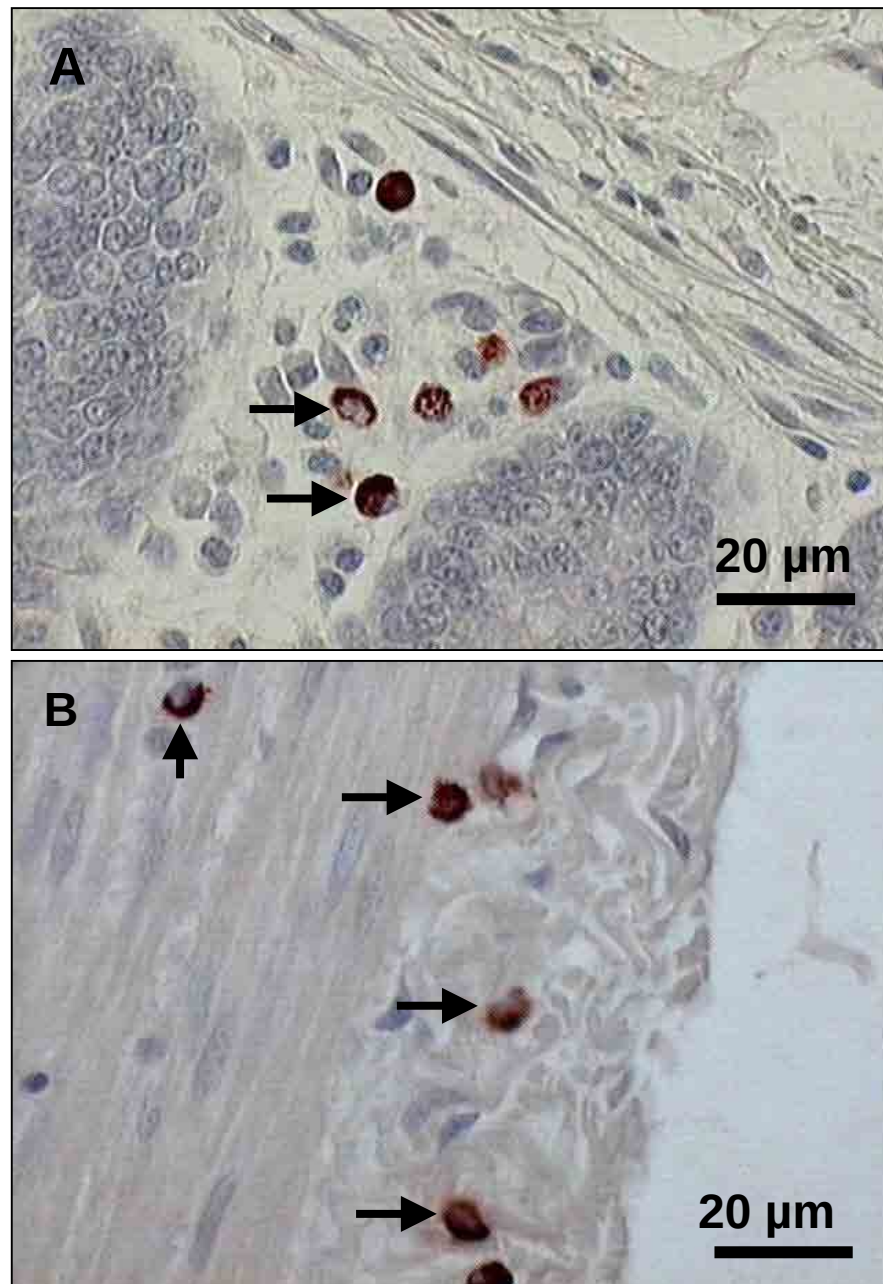


Figura 14. Fotomicrografia do duodeno de um bezerro búfalo infectado por *Toxocara vitulorum*, mostrando macrófagos na mucosa intestinal (Foto A) e na muscular (Foto B).

4.3 Associação de mastócitos ao sistema nervoso entérico (M/SNE)

Utilizando-se a técnica imunoistoquímica, com o anticorpo anti-PGP 9.5 juntamente com a coloração histoquímica específica para mastócitos pode-se observar a interação entre estas células e os processos nervosos que encontravam-se distribuídos nos plexos submucoso e mioentérico.

Observou-se na muscular, o plexo ganglionar mioentérico entre a camada de musculatura lisa intestinal longitudinal e circular e, na submucosa, o plexo ganglionar submucoso. Cabe mencionar que a reação imune pelo anticorpo anti-PGP 9.5 foi muito menos intensa nos animais que não se encontravam infectados por *T. vitulorum* (controles) tanto dos nervos do plexo submucoso como do mioentérico. Já nos animais no pico, os plexos além de estarem mais intensamente corados, estes apresentavam-se também mais volumosos do que no controle (Figuras 17, 20 e 21).

Além dos plexos nervosos evidenciou-se também que os mastócitos estavam diretamente em contato com estes gânglios, indicando uma associação física entre eles. Em algumas regiões mais de um processo nervoso foi encontrado estando associado com mastócitos, principalmente no plexo submucoso e mioentérico onde os mastócitos encontravam-se muitas vezes embebidos na densa rede de nervos (Figuras 17, 20 e 21).

4.3.1 Quantificação de mastócitos associados (MC-nervos) e não associados (MC) aos nervos no plexo submucoso.

No período do pico da infecção, observou-se hiperplasia de mastócitos na submucosa do intestino delgado. No duodeno, jejuno e íleo o número destas células aumentou 2,7; 1,7 e 1,8 vezes, respectivamente, em relação ao grupo controle (média $\pm$ DP do pico vs. controle) que foram: $116,5 \pm 24,5$ vs. $42,4 \pm 15,7$ no duodeno; $132,5 \pm 31,7$ vs. $76,1 \pm 19,7$ no jejuno; $78,5 \pm 11,9$ vs. $42,7 \pm 7,0$ no íleo. Estes números nos animais do pico, foram estatisticamente significantes ($P < 0,05$) quando comparados com os animais do grupo controle. Após a expulsão do parasita o número de mastócitos começou a declinar, mas este declínio não foi diferente estatisticamente do grupo do pico (Tabela 8 e Figura 15).

Por outro lado, o número de mastócitos associados aos nervos no plexo submucoso aumentou 26 vezes no duodeno, 10 vezes no jejuno e 4 vezes no íleo, quando comparados com o grupo controle ($10,7 \pm 8,6$ vs. $0,4 \pm 0,3$ no duodeno; $15,1 \pm 6,3$ vs. $1,5 \pm 2,3$ no jejuno e $7,5 \pm 4,2$ vs. $1,8 \pm 0,8$ no íleo) (Tabela 8). Após a expulsão do parasita ocorreu uma leve diminuição no número de MC/nervo no jejuno (Figura 16).

A porcentagem mais baixa da associação MC/nervo no plexo submucoso foi de 2,2% observada no controle-duodeno e a mais alta foi de 60,9% no pico-jejuno. Já após a expulsão do parasita a porcentagem de MCs/nervos variou de 33,1% para 44,4% (Tabela 8).

Na Figura 17 observa-se a íntima associação de alguns mastócitos ao plexo submucoso em um animal infectado por *T. vitulorum*. Note a intensa coloração, na cor purpura, dos gânglios nervosos do plexo submucoso.

Tabela 8. Números e porcentagens de mastócitos não associados (MCs) e mastócitos associados aos nervos (MC/N) no plexo submucoso do duodeno, jejuno e íleo de bezerros búfalos não infectados (controle - C) e naturalmente infectados com *Toxocara vitulorum* no pico da infecção (P) e no período de pós-expulsão (PE).

Grupos	Número de Mastócitos no Plexo Submucoso					
	Duodeno		Jejuno		Íleo	
	Média ± DP	%	Média ± DP	%	Média ± DP	%
MCs						
C30	42,4 ± 15,7 b	17,4	76,1 ± 19,7 b	24,2	42,7 ± 7,0 b	20,9
Pico	116,5 ± 24,5 a	47,8	132,5 ± 31,7 a	42,2	78,5 ± 11,9 a	38,6
PE	84,5 ± 5,6 a	34,7	105,4 ± 22,9 ab	33,6	82,2 ± 9,2 a	40,4
Total	243,4		314		203,4	
MC/N						
C30	0,4 ± 0,3 b	2,2	1,5 ± 2,3 b	6,1	1,8 ± 0,8 b	10,7
Pico	10,7 ± 8,6 a	59,8	15,1 ± 6,3 a	60,9	7,5 ± 4,2 a	44,6
PE	6,8 ± 3,9 ab	37,9	8,2 ± 1,6 a	33,1	7,5 ± 5,0 a	44,4
Total	17,9		24,8		16,8	

MC = mastócito; C = controle; Pico; PR = pós-rejeição; *(n = 3)

Letras nas colunas = média dos grupos estatisticamente significantes (P < 5%)

DP = desvio padrão

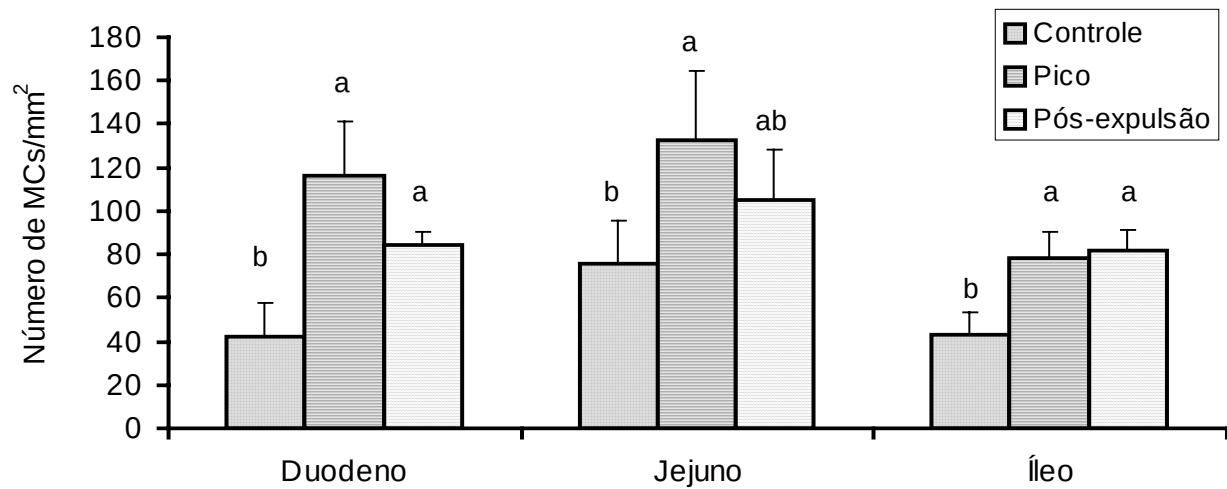


Figura 15. Número de mastócitos (MCs) presentes na submucosa do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (n=4) e infectados no pico (n=5) da infecção por *Toxocara vitulorum* e no período de pós-expulsão do parasita (1 mês de OPG=0, n=3). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

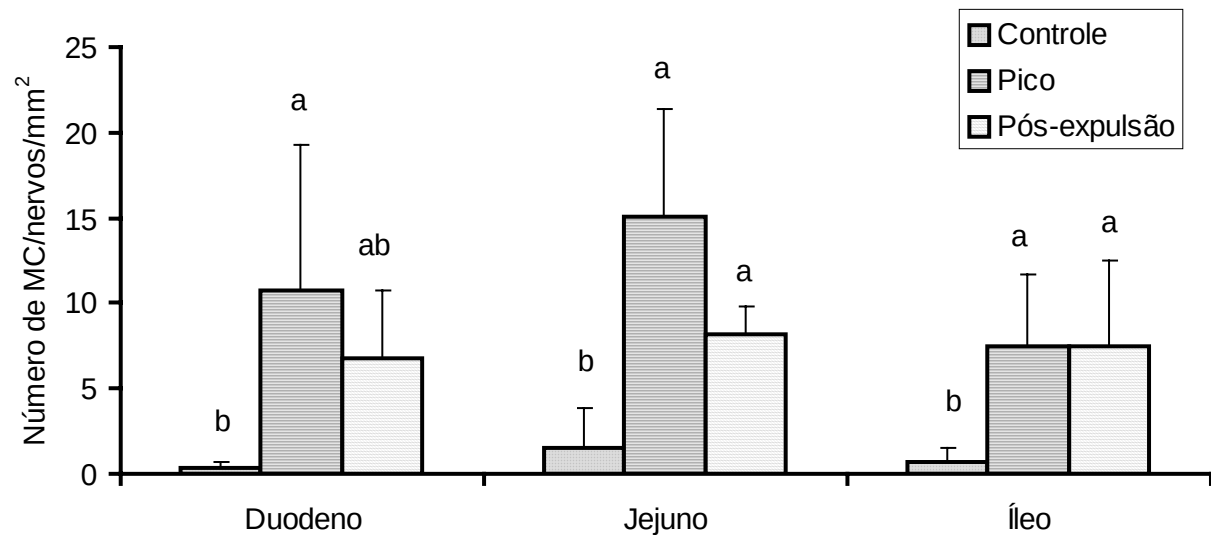


Figura 16. Número de mastócitos associados com gânglios nervosos (MCs/nervos) presentes no plexo submucoso do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (n=4) e infectados no pico (n=5) da infecção por *Toxocara vitulorum* e no período de pós-expulsão do parasita (1 mês de OPG=0, n=3). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

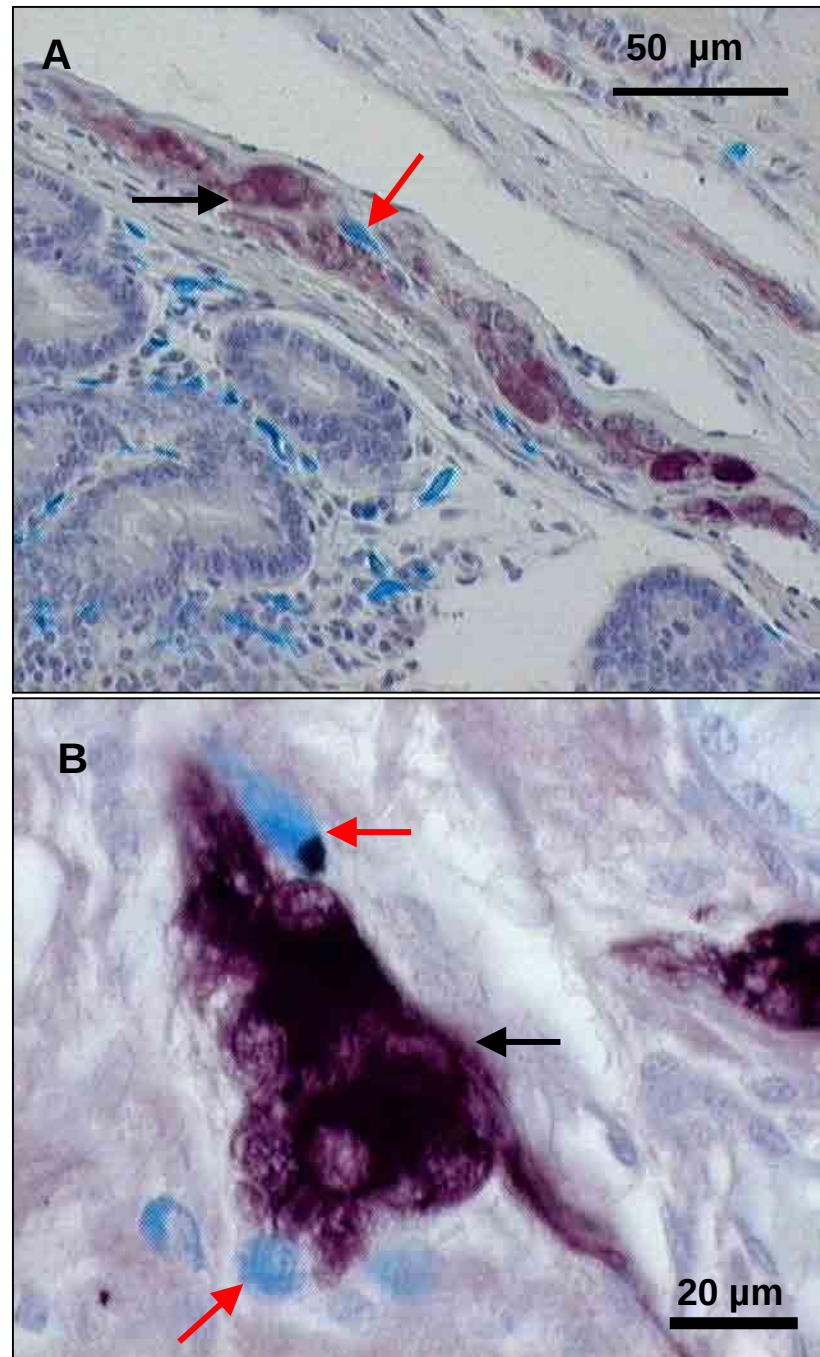


Figura 17. Fotomicrografia do duodeno de búfalo, mostrando a associação dos mastócitos (setas vermelhas) ao plexo nervoso submucoso (setas pretas) em um animal infectado por *T. vitulorum*.

4.3.2 Quantificação de MCs/nervos e MCs no plexo mioentérico

A população de mastócitos presente na camada muscular longitudinal e circular do intestino de bezerros búfalos dos grupos controle, pico e pós-expulsão não apresentou diferenças significativas entre si na contagem destas células. Ocorreu apenas um leve aumento de 1,2 e 1,7 vezes no pico em relação ao grupo controle, mas somente no duodeno e jejuno, respectivamente. A quantidade de mastócitos no íleo alterou ainda menos nos três grupos examinados (Tabela 9 e Figura 18). Entretanto, o número de mastócitos associados aos nervos no plexo mioentérico aumentou estatisticamente em relação ao controle no duodeno e no jejuno, mas não no íleo. Este aumento foi de aproximadamente 12 vezes no duodeno, 4,2 vezes no jejuno e 3 vezes no íleo (Tabela 9 e Figura 19).

No plexo mioentérico, a porcentagem de mastócitos associados aos nervos (MCs/nervos) variou de 57,9% a 70,5% durante o pico e 21,7% a 23,7% após a expulsão do parasita. Por outro lado, nos animais não infectados a porcentagem desta associação variou de 5,8% a 18,4% (Tabela 9 e Figura 18). O aumento da associação MCs/nervos foi estatisticamente significativa no pico quando comparado com o grupo controle. Houve um acentuado declínio na população destas células associadas aos nervos após a expulsão do parasita, porém este declínio não foi significativo no duodeno, mas foi no jejuno onde esta associação MCs/nervos retornou ao nível do controle.

Observe o plexo mioentérico presente entre as duas camadas longitudinal e circular de músculos (Figura 20A) e a intensa reatividade das fibras nervosas com o anticorpo anti-PGP 9.5 (Figura 20B), particularmente nos animais infectados.

Tabela 9. Números e porcentagens de mastócitos não associados (MCs) e mastócitos associados aos nervos (MC/N) no plexo mioentérico do duodeno, jejuno e íleo de bezerros búfalos não infectados (controle - C) e naturalmente infectados com *Toxocara vitulorum* no pico da infecção (P) e no período de pós-expulsão (PE).

Grupos	Número de Mastócitos no Plexo Mioentérico					
	Duodeno		Jejuno		Íleo	
	Média ± DP	%	Média ± DP	%	Média ± DP	%
MCs						
C30	38,1 ± 10,8 a	31,9	38,4 ± 7,2 a	22,5	42,9 ± 10,1 a	35,1
Pico	46,1 ± 12,4 a	38,6	68,2 ± 25,4 a	39,9	45,9 ± 11,5 a	37,6
PE	35,3 ± 9,2 a	29,5	64,3 ± 36,4 a	37,6	33,3 ± 8,3 a	27,3
Total	119,5		170,9		122,1	
MC/N						
C30	0,8 ± 1,0 b	5,8	1,7 ± 1,3 a	14,8	0,7 ± 0,8 a	18,4
Pico	9,8 ± 4,7 a	70,5	7,3 ± 4,8 a	63,5	2,2 ± 1,0 a	57,9
PE	3,3 ± 1,9 ab	23,7	2,5 ± 1,4 a	21,7	0,9 ± 0,7 a	23,7
Total	13,9		11,5		21,7	

MC = mastócito; C = controle; Pico; PR = pós-rejeição; *(n = 3)

Letras nas colunas = média dos grupos estatisticamente significantes (P < 5%)

DP = desvio padrão da média

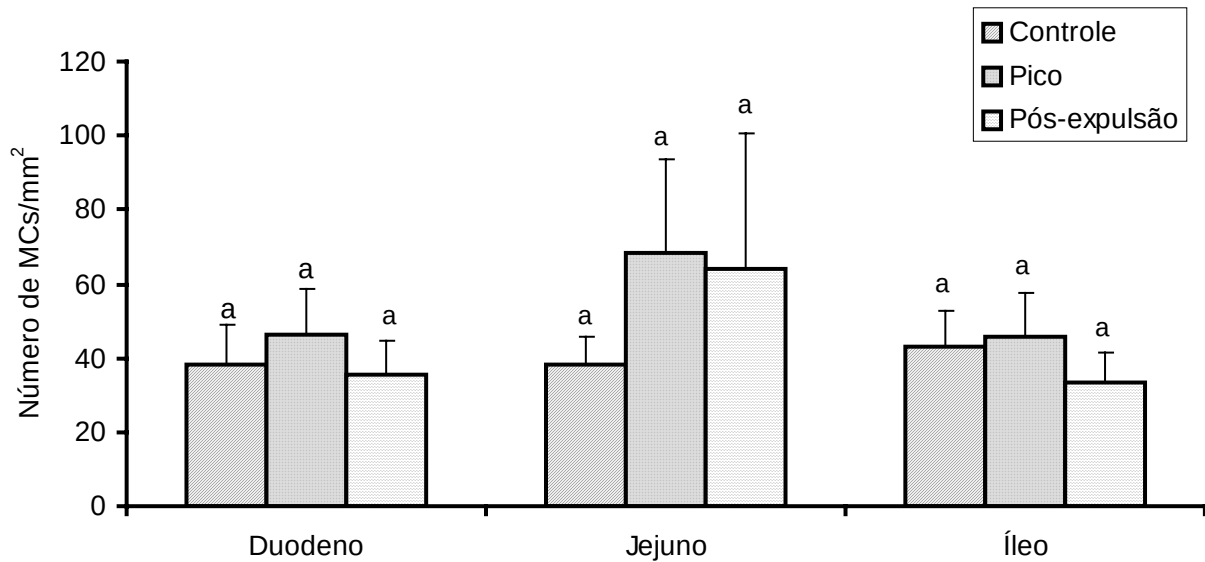


Figura 18. Número de mastócitos (MCs) presentes na muscular do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (n=4) e infectados no pico (n=5) da infecção por *Toxocara vitulorum* e no período de pós-expulsão do parasita (1 mês de OPG=0, n=3). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

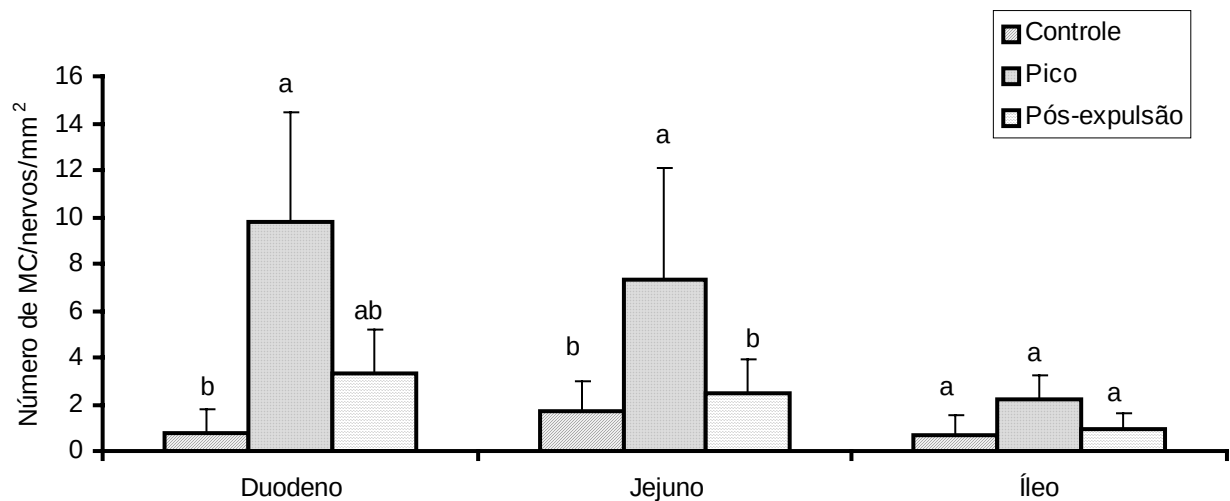


Figura 19. Número de mastócitos associados com gânglios nervosos (MCs/nervos) presentes no plexo mioentérico do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (n=4) e infectados no pico (n=5) da infecção por *Toxocara vitulorum* e no período de pós-expulsão do parasita (1 mês de OPG=0, n=3). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

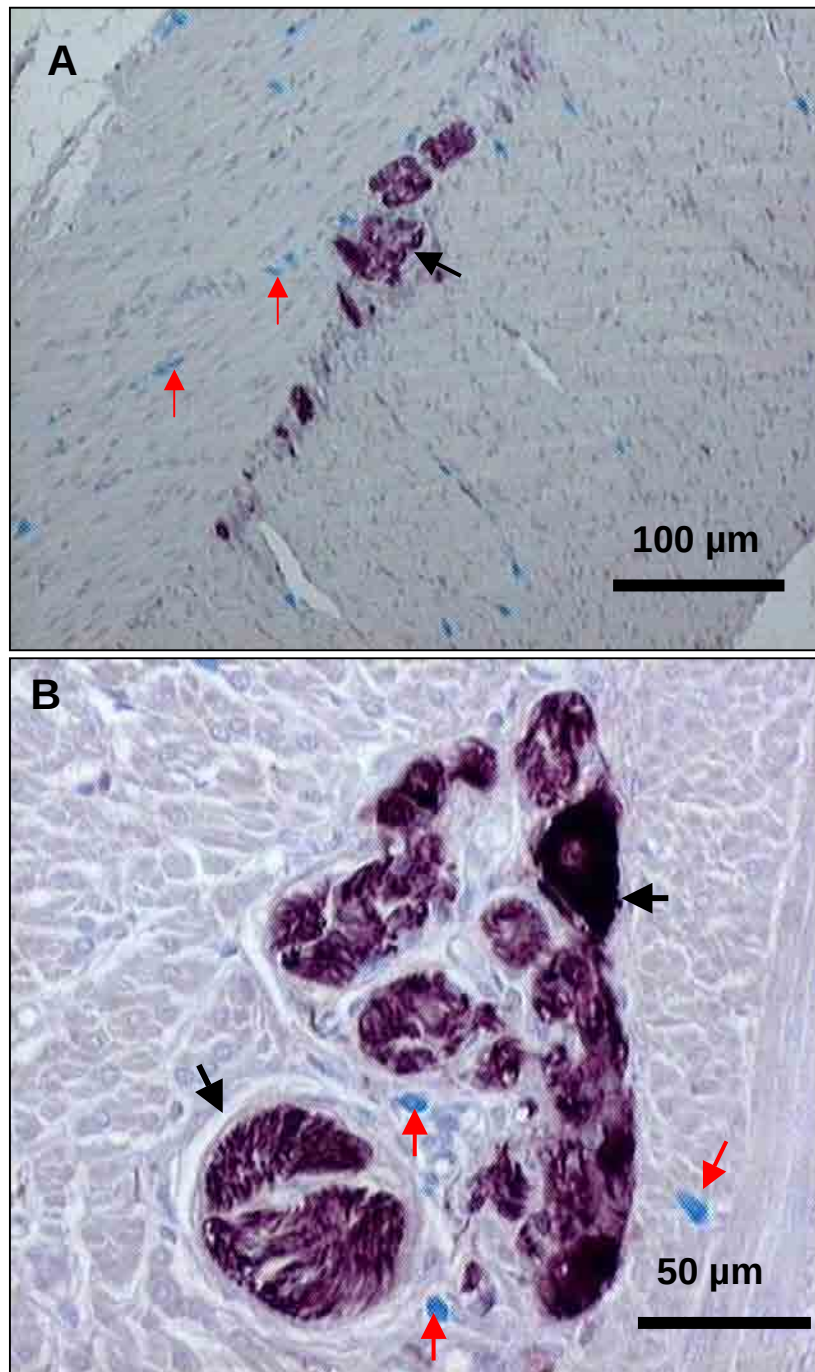


Figura 20. Fotomicrografia do intestino de búfalos, plexo mioentérico do jejuno (Foto A) e do duodeno (Foto B), mostrando mastócitos (setas vermelhas) pela coloração com o azul de Astra e a imunoreação de fibras nervosas com o anticorpo anti-PGP 9.5 (setas pretas) em um animal infectado por *T.vitulorum*.

4.4 Análise morfométrica da parede intestinal

A altura do vilo, a profundidade da cripta, a espessura da submucosa e da camada muscular longitudinal e circular das diferentes regiões intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram analisadas morfometricamente nos animais infectados por *T. vitulorum*, em cada fase do parasitismo (ascensão, pico, declínio e pós-expulsão) e nos animais não infectados (grupo controle C30 e C50).

No duodeno (Tabela 10 e Figura 21), observou-se que houve uma atrofia do vilo já a partir da fase de ascensão, e esta atrofia continuou no mesmo nível nas fases do pico e declínio. Esta atrofia vilar foi significativa tanto em relação ao controle C30 como ao C50. Já no período de pós-expulsão, as medidas do vilo retornaram ao nível do controle. Enquanto a cripta e a submucosa não apresentaram alterações morfométrica significativas. No entanto, a camada muscular em todos os grupos de bezerros infectados por *T. vitulorum* (fase de ascensão, pico, declínio e pós-expulsão) encontrava-se hipertrófica somente em relação ao grupo controle C30, mas não em relação ao grupo controle C50. Mesmo após a expulsão dos parasitas a musculatura continuou espessada e este espessamento possivelmente ocorreu mais em função da idade e do desenvolvimento dos animais do que em função do parasitismo.

Tabela 10. Dimensões do vilo, da cripta, da submucosa e da muscular do duodeno dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	Medidas do Duodeno (mm)			
	Vilo Média ± DP	Cripta Média ± DP	Submucosa Média ± DP	Muscular Média ± DP
C30	0,65 ± 0,07 ^a	0,32 ± 0,08 ^a	0,1 ± 0,03 ^{ab}	0,48 ± 0,05 ^b
C50	0,65 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,09 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,8 ± 0,16 ^a
Asc	0,5 ± 0,11 ^{bc}	0,31 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,04 ^{ab}	0,87 ± 0,07 ^a
Pico	0,5 ± 0,02 ^{bc}	0,31 ± 0,04 ^a	0,12 ± 0,07 ^{ab}	0,91 ± 0,06 ^a
Decl	0,4 ± 0,06 ^c	0,35 ± 0,04 ^a	0,1 ± 0,02 ^b	1,0 ± 0,09 ^a
PE	0,6 ± 0,08 ^{ab}	0,30 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,05 ^{ab}	0,9 ± 0,08 ^a

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

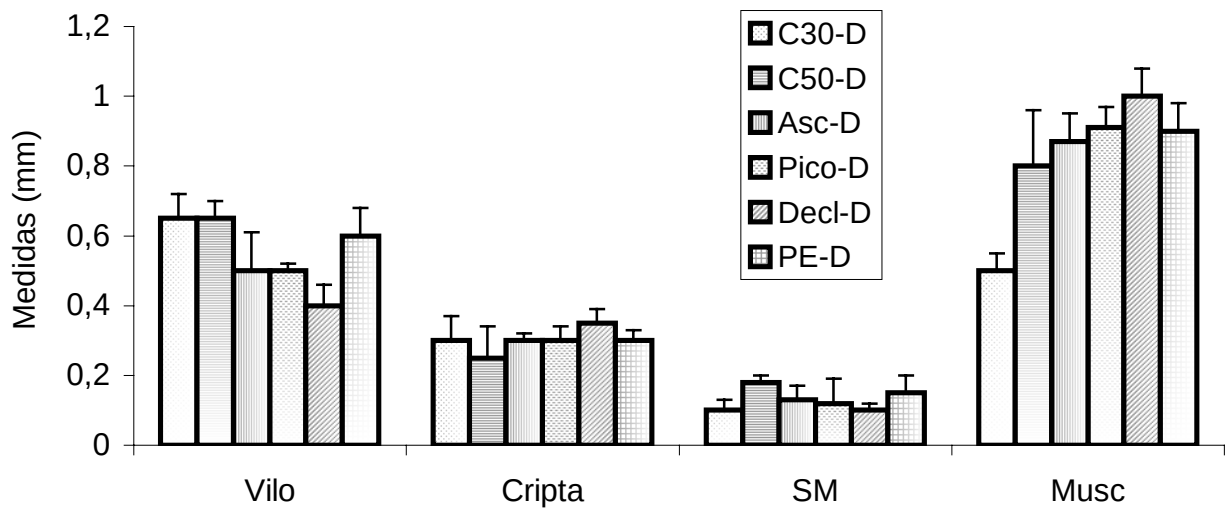


FIGURA 21. Dimensões do vilo, cripta submucosa e muscular do duodeno (D) nos animais dos grupos controles (C30-D e C50-D) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc-D), pico (PICO-D), declínio ou expulsão (Decl-D) e pós-expulsão (PE-D). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

No jejuno (Tabela 11 e Figura 22), a atrofia vilar não foi tão marcante e nem significativa. Assim como no duodeno, a cripta e a submucosa também não apresentaram alterações significativas. Já a camada muscular, embora se apresentasse hipertrofiada na fase do pico, esta hipertrofia não foi significativa em relação ao grupo controle C30, sugerindo que os parasitas adultos no lúmen intestinal não foram os responsáveis pelo aumento de volume das células musculares do jejuno.

TABELA 11. Dimensões do vilo, da cripta, da submucosa e da muscular do jejuno dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Medidas do Jejuno (mm)				
Grupos	Vilo Média ± DP	Cripta Média ± DP	Submucosa Média ± DP	Muscular Média ± DP
C30	1,17 ± 0,16 ^a	0,32 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,57 ± 0,07 ^{bc}
C50	1,17 ± 0,1 ^a	0,22 ± 0,06 ^a	0,12 ± 0,04 ^a	0,51 ± 0,04 ^c
Asc	1,14 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,07 ^a	0,11 ± 0,06 ^a	0,56 ± 0,02 ^{bc}
Pico	1,12 ± 0,14 ^a	0,29 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,78 ± 0,02 ^{ab}
Decl	0,92 ± 0,1 ^a	0,24 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,08 ^{abc}
PE	1,1 ± 0,1 ^a	0,28 ± 0,07 ^a	0,17 ± 0,09 ^a	0,83 ± 0,07 ^a

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

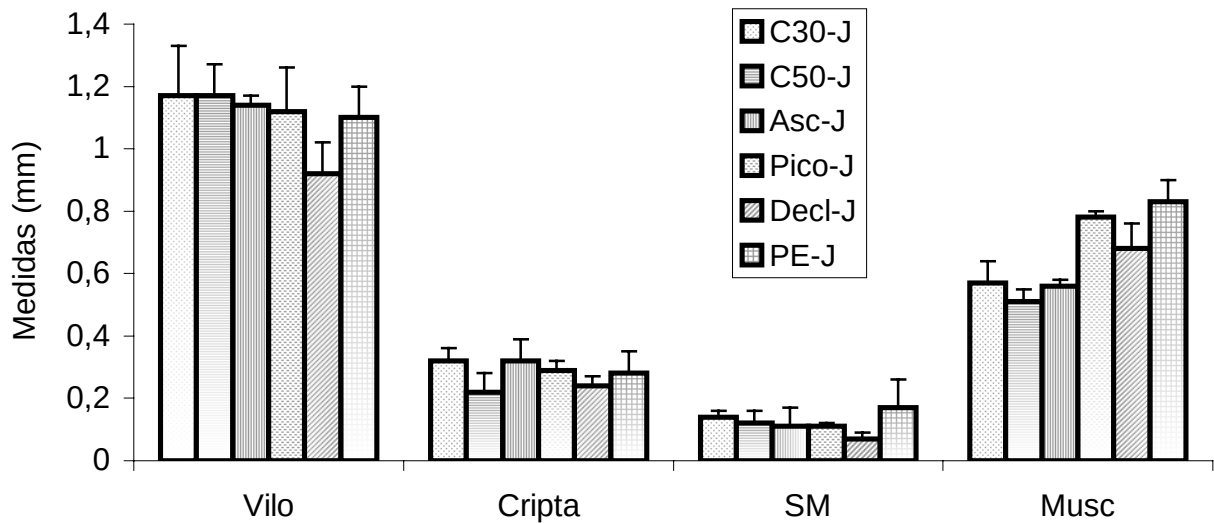


FIGURA 22. Dimensões do vilo, cripta, submucosa e muscular do jejuno (J) nos animais dos grupos controles (C30-J e C50-J) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc-J), pico (Pico-J), declínio ou expulsão (Decl-J) e pós-expulsão (PE-J). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

No íleo (Tabela 12 e Figura 23), os vilos e a musculatura também não apresentaram alterações morfológicas, enquanto a cripta mostrou-se levemente hipertrófica nos animais que se encontravam no pico e declínio do parasitismo quando comparados com os controles.

TABELA 12. Dimensões do vilo, da cripta e da muscular do íleo dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	Medidas do Íleo (mm)		
	Vilo Média ± DP	Cripta Média ± DP	Muscular Média ± DP
C30	0,25 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,03 ^c	0,44 ± 0,09 ^a
C50	0,25 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,04 ^{bc}	0,38 ± 0,04 ^a
Asc	0,26 ± 0,05 ^a	0,30 ± 0,05 ^{abc}	0,42 ± 0,02 ^a
Pico	0,26 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,02 ^a
Decl	0,27 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,08 ^a
PE	0,28 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,05 ^{ab}	0,39 ± 0,06 ^a

Letras diferentes nas colunas: nível de significância = 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão

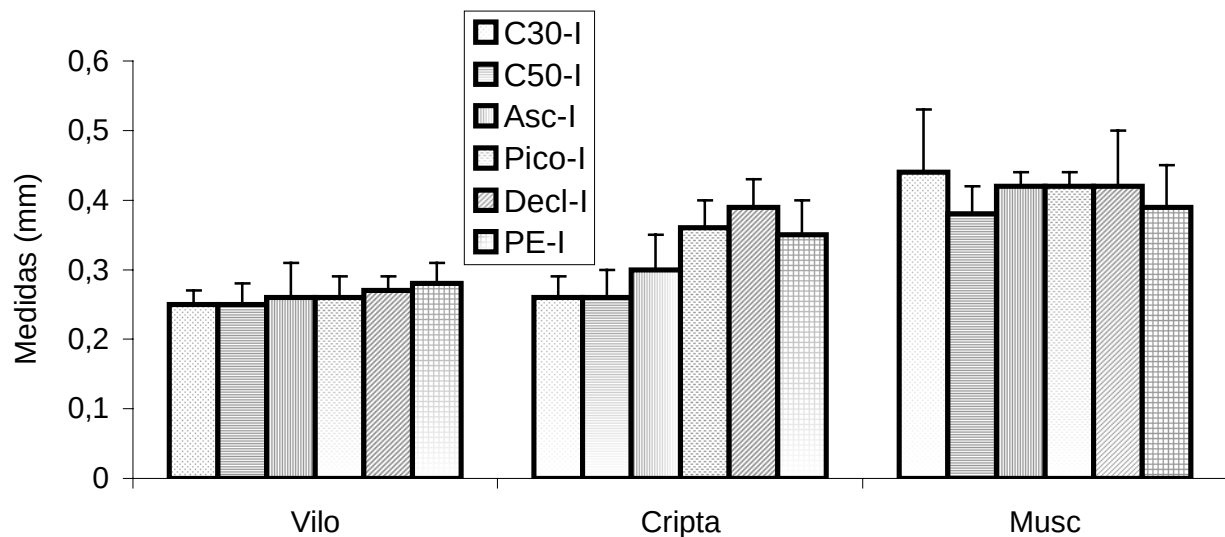


FIGURA 23. Dimensões do vilo, cripta e muscular do íleo (I) nos animais dos grupos controles (C30-I e C50-I) e dos grupos infectados por *T. vitulorum* durante a ascensão (Asc-I), pico (Pico-I), declínio ou expulsão (Decl-I) e pós-expulsão (PE-I). O desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

5. Discussão

5.1. Parasitismo dos bezerros búfalos por *T. vitulorum*

O *T. vitulorum* é um parasita de grande porte presente no lúmen do intestino delgado de bezerros búfalos, principalmente nas primeiras porções (duodeno e jejuno proximal), que quando numerosos pode permanecer enovelados comprimindo e traumatizando a mucosa intestinal. A prevalência desta espécie é alta nos rebanhos bubalinos do mundo todo e algumas vezes podem levar à morte os animais quando submetidos à subnutrição e aos manejos inadequados. Por outro lado, animais em boas condições de manejo, quando parasitados podem adquirir uma imunidade contra estes parasitas, tornando o ambiente intestinal impróprio para o desenvolvimento de algumas espécies de parasitas e assim eliminá-los para o meio exterior.

Através dos exames de fezes de bezerros búfalos naturalmente infectados por *T. vitulorum*, pode-se observar que os animais apresentavam uma precocidade de infecção, onde apresentavam ovos nas fezes já aos 11 dias de idade. Esta precocidade de infecção por *T. vitulorum* também já foi constatada por outros autores em búfalos (STARKE et al., 1983; ROBERTS, 1990a) e deve-se ao fato da aquisição de larvas infectantes através do colostro materno (WARREN et al., 1971; STARKE et al., 1983; ROBERTS, 1990ab). Neste experimento, verificou-se que os animais atingiram o pico máximo do parasitismo ao redor de 43 dias após o nascimento. Após o pico, o número de ovos começou a cair, até que se tornassem ausentes nos animais a partir dos 85 dias de idade. A partir desta idade, os animais adquiriram resistência contra o *T. vitulorum* e verificou-se uma queda brusca na contagem de OPG. Esta queda ocorreu em decorrência da expulsão natural dos helmintos pelos animais (CHAUHAN et al.,

1974 na Índia; COSTA et al., 1980 e STARKE et al., 1983, no Brasil). Verificou-se também que esta auto-cura iniciou a partir de 44 dias, quando os parasitas foram eliminados pelos animais, espontaneamente, através das fezes. Estes ovos não foram mais evidenciados nas fezes dos animais a partir dos 85 dias de idade. Esta cura espontânea já foi também verificada por vários autores em outras espécies de parasitas intestinais como *Haemonchus contortus*, *T. colubriformis*, *Strongyloides papillosus* e *N. battus* em ovinos (ROTHWELL, 1989; MCCLURE et al., 1992; SMITH et al., 1994; NAWA et al., 1994; WINTER et al., 1997), *N. brasiliensis* em ratos e camundogos (MILLER et al., 1983; MOQBEL et al., 1986; NAWA et al., 1994) e *T. spiralis* em ratos e camundongos (CASTRO, 1992). Pouco se conhece, a respeito desse fenômeno, na infecção por *T. vitulorum* em búfalos.

5.2. Infiltração e hiperplasia de células imune-inflamatórias e células caliciformes na camada epitelial do intestino delgado de bezerros búfalos durante a infecção por *T. vitulorum* e seu papel no processo de expulsão do parasita pelos bezerros búfalos.

A expulsão espontânea dos parasitas helmínticos de um hospedeiro é sem dúvida um evento imune com componentes da imunidade inata e adquirida. Numerosas células imunes e seus mediadores foram relacionados às alterações intestinais que acompanham a infecção helmíntica e que participam da expulsão do parasita. Entretanto, apesar de esforços extensivos em pesquisas, um único mecanismo imune ou um tipo celular crítico ou decisivo para a expulsão ainda não foi identificado. Desta forma, em um animal imunocompetente, a expulsão eficiente dos parasitas entéricos está mais em função de uma resposta coordenada e multicelular envolvendo células imunes, mielóides, epiteliais e nervosas (revisado por CASTRO, 1989,1992; CASTRO & ARNTZEN, 1993; MCKAY & FAIRWEATHER, 1997; PALMER & MEERVELD, 2001). Em trabalho realizado por Neves et al. (2003), ficou evidente que na infecção natural por *T. vitulorum*, principalmente no pico do parasitismo ocorria uma hiperplasia celular, por mastócitos e eosinófilos na mucosa do duodeno e do jejuno de bezerros búfalos,

que culminava com o pico da infecção. Estas células tiveram participação no processo de expulsão do *T. vitulorum* pelos hospedeiros, pois elas retornaram ao nível do controle após a expulsão do parasita.

Em continuação à pesquisa de Neves et al. (2003), no presente trabalho realizou-se um levantamento de vários componentes celulares além, de mastócitos e eosinófilos que poderiam estar participando também na infecção por *T. vitulorum*. Como o *T. vitulorum* é um parasita não invasivo da mucosa, vivendo somente no lúmen intestinal, procurou-se avaliar se as células imunoinflamatórias poderiam migrar para a camada intraepitelial que recobre toda a mucosa intestinal, para atuar o mais próximo possível do parasita. Desta forma, estudou-se a participação de componentes celulares nas diferentes fases da infecção natural por *T. vitulorum*, no sentido de relacioná-los ao processo de expulsão dos parasitas pelo hospedeiro o que normalmente ocorre nos bezerros búfalos quando eles atingem em torno de 40 a 60 dias de idade. Assim, pela quantificação de células presentes na camada intraepitelial nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), constatou-se que o número de mastócitos, eosinófilos, linfócitos intraepiteliais (LIE) e células caliciformes apresentaram um aumento significativo nos animais infectados naturalmente por *T. vitulorum* (fase de ascensão e pico) quando comparado com o grupo não infectado, significando uma ativação ou uma sensibilização celular neste local em função do parasita.

5.2.1. Linfócitos Intraepiteliais (LIE).

O número de LIEs no duodeno, aumentou significativamente na fase de pico do parasitismo quando comparado com o grupo controle, regredindo rapidamente e retornando ao nível do controle na fase de pós-expulsão do parasita. Esta dinâmica celular foi semelhante no jejuno e no íleo, apesar do número desta célula encontrar-se bem mais elevado no jejuno do que no íleo. Este aumento de LIE, principalmente na fase de pico do parasitismo, coincidiu também com as maiores contagens de OPG e o maior número dos helmintos adultos no intestino. Embora não se conheça exatamente a ação deste tipo celular no parasitismo, Simecka (1998) não descartou a possibilidade

de que os LIEs possam ajudar na defesa da mucosa contra infecções parasitárias do lúmen intestinal. Estas células podem ter o papel de liberar citocinas para o lúmen ou ter atividade citotóxica. Estas suposições são amparadas pelos estudos de Flexman et al. (1983) que sugeriram que os LIEs efetuam uma atividade citotóxica com uma célula exterminadora natural, o que confere a elas a função de defesa do hospedeiro contra o parasita. Além disso, o aumento de LIE pode ser explicado pelo fato destas células localizarem-se entre as células epiteliais e de constituírem o primeiro componente do sistema imune exposto aos antígenos intestinais (SIMECKA, 1998), a certos microrganismos e a parasitas (CHEROUTRE et al., 2004).

5.2.2. Células Caliciformes.

As células caliciformes são também encontradas normalmente na camada intraepitelial do intestino, mas mostraram-se hiperplásicas nos bezerros búfalos infectados com *T. vitulorum*. No duodeno elas estavam hiperplásicas, principalmente na fase de pico do parasitismo em comparação com o grupo controle, mesmo período em que o OPG dos animais parasitados também encontrava-se elevado. A hiperplasia destas células pode estar diretamente relacionada com a tentativa do hospedeiro em expulsar o parasita, já que a principal função destas é lubrificar e proteger o epitélio intestinal. Essa lubrificação facilitaria a remoção do parasita para as regiões terminais do intestino. No jejuno também observou-se células caliciformes hiperplásicas nas fases de ascensão e pico, declinando abruptamente durante a expulsão do parasita pelo hospedeiro retornando à normalidade após a expulsão dos mesmos. Levy & Frondoza (1983), estudando a imunidade intestinal contra *N. brasiliensis*, verificaram que a eliminação dos parasitas do trato gastrointestinal provavelmente tenha ocorrido em resultado da combinação do aumento do anticorpo IgG e de muco secretado por uma população hiperplásica de células caliciformes estimuladas por mecanismos imune T-dependente, que poderiam interferir com a habilidade do parasita em sobreviver nos espaços entre os vilos do jejuno. No presente trabalho, observou-se acentuado aumento do muco no lúmen intestinal, quando os animais foram necropsiados, durante

o pico e, este muco estava associado com o aumento populacional destas células na parede intestinal.

5.2.3. Eosinófilos.

Além dos LIEs e das células caliciformes, o número de eosinófilos presentes na camada intraepitelial do duodeno, também aumentou significativamente durante o período de pico do parasitismo quando comparado com o grupo controle, demonstrando que os eosinófilos que normalmente não estão presentes nesta camada migram da lâmina própria para a camada intraepitelial em resposta à presença dos parasitas juvenis e adultos no lúmen intestinal. Outros autores como Eversole et al. (1999) observaram eosinófilos migrando da cripta para o vilo, em direção à região subepitelial e atravessando a lâmina basal para a região intraepitelial na infecção por *N. brasiliensis* em camundongos. Além disso, estudos *in vitro* mostram que eosinófilos aderem a uma variedade de helmintos opsonizados com imunoglobulinas e complemento, liberando o conteúdo de seus grânulos e secretando fatores solúveis para matar larvas helmínticas (BUTTERWORTH, 1984).

Recentemente, Meeusen & Balic (2002) relataram que mastócitos, células exterminadoras naturais (NK) e LIEs, poderiam secretar IL-5 induzindo a proliferação e a migração de eosinófilos da medula óssea. No jejuno, embora levemente inferior ao duodeno, a população de eosinófilos também encontrava-se elevada em animais na fase de pico quando comparada com os animais controles, retornando à normalidade após este período. O aumento na população de eosinófilos associado com helmintos gastrointestinais já foi relatado também por vários autores em diversas espécies animais (ROTHWELL, 1993, WINTER, 1997, STARKE & OAKS, 2001, ALDAWEK et al., 2002, KLION & NUTMAN, 2004). Já em búfalos, Neves et al. (2003) verificaram que os eosinófilos começaram a aumentar em número já no início da infecção por *T. vitulorum* tanto na cripta como no vilo do duodeno e do jejuno. Estas células continuaram sempre em número elevado durante o pico e durante a fase de expulsão dos parasitas pelos bezerros búfalos, para alcançar o nível do controle após a expulsão dos mesmos. Estes

autores não detectaram eosinófilos na camada muscular do intestino, sugerindo que os eosinófilos provavelmente chegaram até à lâmina própria através de vasos sangüíneos presentes neste local ou na submucosa e daí migraram para a camada intraepitelial à medida que a infecção progredia.

5.2.4. Mastócitos.

Outro tipo celular também bastante importante e sempre associado às infecções parasitárias são os mastócitos (LEVY & FRONDOZA, 1983). Estas células também não são encontradas em condições normais na camada intraepitelial, mas no presente trabalho, observou-se uma hiperplasia dos mastócitos nesta camada, tanto no duodeno como no jejuno e no íleo, durante a ascensão e o pico da infecção. Esta hiperplasia celular, possivelmente, ocorreu mais em função da infiltração ou migração das células para o espaço intraepitelial do que pela multiplicação celular neste local. No entanto, esta é uma hipótese ainda a ser testada na infecção por *T. vitulorum*. A hiperplasia de mastócitos na ascensão e no pico da infecção por *T. vitulorum*, com retorno à normalidade após a expulsão dos vermes, sugere que estas células, além das outras células mencionadas e discutidas aqui, desempenham importante e coordenado papel na expulsão do parasita pelo hospedeiro. Possivelmente os mastócitos sejam, segundo Nutman (1993), uma das primeiras células a chegar ao local da infecção e, com a liberação de seus mediadores inflamatórios, possam atrair outras células inflamatórias na tentativa de provocar um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasita e facilitar a expulsão pelo hospedeiro. Jones & Emery (1991) observaram altos níveis de mediadores inflamatórios (prostaglandina F, leucotrienos C4, tromboxanos B2, serotoninas e histaminas) no muco intestinal de ovinos imunizados contra *T. colubriformis*, principalmente no período em que ocorreu a expulsão do parasita pelo hospedeiro, indicando a importância dos mediadores de mastócitos neste processo. A presença de mastócitos na camada epitelial sugere sua atração em direção ao lúmen intestinal, provavelmente atraído pelo parasita para poder liberar seus mediadores o mais próximo possível do lúmen. O entendimento deste mecanismo ainda não está

claro, mas sabe-se que quando mastócitos são sensibilizados liberam citocinas importantes para a resposta imune, como a IL-3, IL-4, IL-5 e outras que induzem a proliferação celular na medula óssea, quimiotaxia de outras células e síntese de IgE pelos linfócitos B presentes na mucosa intestinal (MARSHALL & BIENENSTOCK, 1990) e podem também facilitar o fluxo de anticorpos para dentro do lúmen intestinal (MURRAY et al., 1968; ASKENASE, 1980). Além disso, a ação dos mediadores inflamatórios é bastante ampla podendo promover infiltração de eosinófilos, aumento da contração da musculatura lisa intestinal (MARSHALL & BIENENSTOCK, 1990), hipersecreção de muco (NUTMAN, 1993), agregação de plaquetas e aumento da permeabilidade vascular (TIZARD, 1996).

No epitélio do jejuno, os mastócitos demonstraram um leve aumento na fase de pico, porém este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao controle. Talvez pela presença de *T. vitulorum* adultos em maior quantidade no duodeno, estas células tenham sido requeridas com maior intensidade neste órgão onde, provavelmente, suas funções foram mais eficazes. No entanto, mesmo em menor número no jejuno, os mediadores liberados pelos mastócitos podem ter contribuído para o desencadeamento da resposta inflamatória local que, segundo Nutman (1993), contribuem para criar um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasita e facilitam sua expulsão. Além disso, Neves et al. (2003) também observaram que os mastócitos encontravam-se significativamente elevados na lâmina própria (vilo e cripta) do duodeno e jejuno de bezerros búfalos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão, pico e expulsão, retornando à normalidade após a expulsão do parasita.

Interessante comentar que, embora os parasitas não tenham sido encontrados no íleo durante as necropsias dos bezerros búfalos, todos os tipos celulares estudados no presente trabalho, como LIE, eosinófilos, mastócitos e células caliciformes foram observados aumentados na camada intraepitelial do íleo. Segundo Simecka (1998), apesar de um estímulo antigênico ocorrer em um local particular na mucosa intestinal, como por exemplo, na primeira porção do intestino delgado, a resposta a este estímulo, como a secreção de mediadores inflamatórios e a sensibilização celular, pode estender-se para outras porções intestinais, possivelmente através da circulação sanguínea e/ou

linfática que drena toda a mucosa intestinal, as placas de Peyer e/ou os linfonodos mesentéricos. Desta forma, a mucosa de todo o intestino e mesmo as mucosas mais distantes, como por exemplo, do trato urogenital e respiratório, estariam também protegidas contra possíveis invasores. Esta explicação poderia ser aplicável ao estímulo antigênico do *T. vitulorum* que estaria sensibilizando os mecanismos efetores de toda a mucosa intestinal. Cabe destacar que as placas de Peyer de ruminantes, e aqui de bezerros búfalos, são grandes, e é neste local, além da medula óssea, que os linfócitos B sofrem a maturação e a diferenciação e, possivelmente é onde ocorre intensos desafios antigênicos com alta produção de IgA e IgE. No entanto, estudos posteriores deverão ser realizados para se verificar o papel das placas de Peyer do íleo no parasitismo intestinal, nesta espécie animal.

Durante o processo inflamatório decorrente da infecção por *T. vitulorum* que culmina com a expulsão do parasita as células imune-inflamatórias que estão presentes na lâmina própria da mucosa, ou aquelas que migraram para a camada epitelial podem secretar muitas moléculas e liberá-las para o fluído extracelular ou para o lúmen intestinal e desta forma podem contribuir para a contratibilidade e a permeabilidade vascular e favorecer a migração de mais células inflamatórias para local inflamado. Além disso, pode ocorrer aumento da ativação das células neurológicas a produzirem neurotransmissores essenciais para a sensibilização dos mecanismos neuro-vegetativos e neuro-motores, levando à contratibilidade da musculatura lisa e sua hipertrofia além do aumento de muco (PALMER & MEERVELD, 2001).

5.3. Associação de mastócitos ao sistema nervoso entérico (SNE) na infecção e no processo de expulsão de *T. vitulorum* pelos bezerros búfalos.

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído por um conjunto de neurônios no trato gastrointestinal que pode funcionar independentemente do sistema nervoso central. Este sistema controla a motilidade, a secreção endócrina e exócrina e a microcirculação gastrointestinal. Ele também está envolvido nos processos nervosos de regulação imune e inflamatória. Os corpos das células nervosas agrupam-se dentro de

pequenos gânglios que estão conectados por feixes de processos nervosos formando dois plexos principais, o plexo mioentérico e o plexo submucoso. Neste trabalho, as fibras nervosas e nervos dos plexos nervosos entéricos tanto o submucoso quanto o mioentérico, foram identificados usando-se o método de coloração imunoistoquímica com o anticorpo policlonal anti-PGP 9.5 que é um marcador de uma proteína neural e os mastócitos foram corados utilizando-se uma coloração histoquímica pelo azul de Astra. Por este estudo verificou-se que os mastócitos encontravam-se, usualmente adjacentes e em contato com as fibras nervosas. O contato membrana-membrana entre mastócitos e nervos já foi visualizado em microscopia eletrônica de transmissão por Stead et al. (1989) comprovando que este contato existe. Desta forma, os nervos e os mastócitos puderam ser visualizados e tanto os mastócitos associados com os nervos (MC/N) como os não associados foram contados.

5.3.1. Associação de mastócitos/nervos na mucosa do intestino delgado.

A partir dos plexos nervosos da submucosa partem nervos em direção à lâmina própria adjacente à *muscularis mucosa* e em torno dos dutos lacteais e alguns mastócitos foram também visto associados a estas fibras nervosas, particularmente nos animais parasitados. A presença de mastócitos na lâmina própria e na camada epitelial além de estarem fisicamente associados aos nervos na mucosa sugere uma participação ativa destas células na expulsão do *T. vitulorum*. Como a secreção eletrolítica e a contração muscular estão direta ou indiretamente reguladas pela associação MC/Nervos, por inferência pode se dizer que mastócitos degranularam em consequência desta associação e também pela presença de antígenos dos parasitas. A degranulação levaria ao aumento da permeabilidade vascular e do epitélio intestinal. De acordo com Stead et al. (1989), Befus et al. (1986), Bienenstock et al. (1992) e Castro & Arntzen (1993), mastócitos proporcionam um braço efetor muito importante no sistema imune quando ativados através da ligação ao complexo imune IgE/antígeno nas infecções por nematóides. Assim, os mediadores inflamatórios dos mastócitos podem atuar diretamente sobre as células epiteliais desencadeando secreção epitelial

de Cl^- para o lúmen intestinal dos animais sensibilizados pela infecção. Por outro lado, as infecções parasitárias induzem ou causam uma debilidade epitelial que é considerada ser uma defesa do hospedeiro contra o parasita. Um aumento da permeabilidade paracelular epitelial resultando na expulsão do parasita pode ser uma consequência adaptativa da imunidade (MURRAY et al., 1971). Recentemente, McDermott et al. (2003) proporcionaram importantes informações demonstrando a ligação entre mastócitos e epitélio intestinal durante o processo da expulsão dos parasitas. Eles concluíram que a protease de mastócitos foi responsável pela degradação da proteína ocludina que faz parte estrutura da junção entre as células epiteliais da mucosa intestinal, aumentando a permeabilidade paracelular epitelial e desta forma aumentando o extravasamento de íons e água para o lúmen intestinal. A partir das informações obtidas de experimentos conduzidos com *T. spirallis* em ratos e em camundongos pode se sugerir que os eventos físicos e moleculares que levam às alterações estruturais e morfológicas podem ser similares àqueles ocorrendo com *T. vitulorum* em bezerros búfalos, mesmo não sendo um helminto invasor da mucosa com é *T. spirallis*. Uma vez que este ascarídídeo permanece quando adulto ou quando ainda juvenil apenas dentro do lúmen, os mastócitos além dos eosinófilos, migram para a camada intraepitelial intestinal, possivelmente em uma tentativa de liberar o conteúdo dos grânulos para o lúmen intestinal e atacar a cutícula do parasita.

Durante o período de expulsão do *T. vitulorum* pelos bezerros búfalos, uma moderada diarreia líquida foi observada. Tem sido postulado por muitos anos que um influxo de solutos e água da mucosa para o lúmen ocorre durante a infecção por nematóides e este pode ser um modo pelo qual o hospedeiro tenta expulsar os parasitas (MURRAY et al., 1971). Por exemplo, em intestino delgado de hamsters infectados com *T. spirallis* foi detectado uma força intestinal propulsiva 10 dias após a infecção, um fenômeno que somente retornou ao normal após a expulsão espontânea dos parasitas (ALIZADETH et al., 1987). Como o processo diarreico cessa e a população de mastócitos declina após a expulsão de *T. vitulorum* pode-se inferir que os mesmos apresentaram participação na expulsão do parasita.

5.3.2. Associação de mastócitos aos plexos submucosos e mioentéricos do intestino delgado.

Mastócitos foram também observados próximos ou dentro dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos ou em contato íntimo com as fibras nervosas individuais presentes na submucosa e na camada muscular longitudinal e circular. O número destas células associadas com os processos nervosos (MC/Nervo) aumentou no plexo submucoso em torno de 26 vezes no duodeno, 10 vezes no jejuno e 4 vezes no íleo quando comparado com o controle. Após a expulsão, houve ligeira redução no número desta associação celular. Da mesma forma, no plexo mioentérico, o número de MC/Nervo, aumentou em torno de 12 vezes no duodeno, 4 vezes no jejuno e 3 vezes no íleo. A porcentagem da associação MC/nervo foi de 44,6% a 60,9% durante o pico da infecção e 33,1% a 44,4% após a expulsão do parasita no plexo submucoso. Nos animais não infectados, a porcentagem da associação MC/nervo oscilou de 2,2% a 10,7%. Após a expulsão do parasita o número de MC/nervo declinou, mas não chegou ao nível do controle.

O plexo mioentérico localiza-se entre as camadas longitudinal e circular do músculo e estende-se por todo comprimento do intestino. Este plexo abastece primeiro a inervação motora das duas camadas de músculos e a inervação secretomotora da mucosa (FURNESS & COSTA, 1987). Já o plexo submucoso está localizado na submucosa, entre a camada muscular circular e a *muscularis mucosa* e é o mais desenvolvido no intestino delgado, onde apresenta importante papel no controle secretório. Além de inervar o epitélio glandular, neurônios do plexo submucoso inervam a *muscularis mucosa*, células intestinais endócrinas e vasos sanguíneos na submucosa (GOYAL & IKUO HIRANO, 1996). Desta forma, a presença de mastócitos associados aos plexos nervosos durante a infecção pelo *T. vitulorum* sugere que estas células tenham importante papel no controle neuroendócrino e secretório do intestino e também no contratilidade do músculo liso intestinal. Outros autores também verificaram nervos associados com mastócitos em infecções intestinais por nematóides ou em diversas patologias intestinais. McKay e Bienesntock (1994) relataram que essa interação entre

mastócitos e o sistema nervoso entérico poderia contribuir com os mecanismos de defesa do hospedeiro pela alteração da contratilidade intestinal, liberação de mediadores químicos inflamatórios e neurotransmissores. Neurônios de animais antígenoicamente sensibilizados responderam à substância P (SP) e à acetilcolina (ACh) similarmente à histamina, levando à hipótese de que um sistema de “feedback” existe onde a histamina liberada de mastócitos antígenoicamente estimulados aumenta a eficácia da transmissão sináptica, enquanto as substâncias neuroativas (SP e ACh) podem ser liberadas das células do plexo mioentérico para aumentar a liberação de histamina (WOOD, 1991).

Além disso, grande quantidade de mastócitos que não estavam associados aos nervos foram observados na submucosa e entre as camadas musculares circulares e longitudinais da parede intestinal nos três órgãos analisados; duodeno, jejuno e íleo. O número de mastócitos estava mais elevado na submucosa do que na muscular. No entanto, cabe ressaltar que na camada muscular do intestino delgado dos búfalos, estas células são encontradas normalmente em grande quantidade, como pôde-se observar pelas contagens dos animais controles. Após a expulsão dos parasitas houve um leve declínio em relação ao pico no duodeno e no jejuno, mas no íleo ficou inalterado. Desta observação, pode-se deduzir que a infecção por *T. vitulorum* induz uma hiperplasia de mastócitos e estes já presentes na submucosa e na muscular migram em direção aos nervos para efetuarem os contatos físicos entre estes dois tipos celulares quando sensibilizados pelos antígenos dos parasitas.

5.4. Macrófagos.

Outra célula estudada foi o macrófago. O número desta célula, no vilo e na cripta, estava aumentado de 3,5 a 4,4 vezes em relação ao controle, mas somente no período de pós-expulsão do *T. vitulorum* pelos bezerros, tanto no duodeno quanto no jejuno. No entanto, macrófagos, juntamente com os mastócitos, estavam particularmente mais abundantes na camada da musculatura lisa intestinal, tanto do duodeno como do jejuno dos animais infectados com *T. vitulorum*. Ao contrário de

mastócitos que começaram a declinar após o pico do parasitismo, macrófagos continuaram aumentados mesmo após um mês da expulsão dos nematóides pelos bezerros búfalos. Desta forma, na submucosa e na musculatura lisa intestinal a população de macrófagos aumentou significativamente, mas foi mais acentuado na submucosa do duodeno, em torno de 15 vezes no pico e de 22 vezes no período de pós-expulsão. Segundo Nathan (1987), os macrófagos influenciam em muitos aspectos as respostas imunes e inflamatórias, da fase aguda à crônica, desde a primeira lesão do epitélio até o processo de reparo. Estes macrófagos presentes durante o pico, mas principalmente no período de pós-expulsão ou fase de recuperação da infecção, poderia desempenhar diferentes funções: a primeira seria a de reparadora tecidual. Segundo Bhogal et al. (2004) os macrófagos são células importantes na manutenção da homeostase dos tecidos, fagocitando compostos formados e liberados no processo inflamatório assim como também células apoptóticas antes que as células moribundas liberem seus conteúdos pró-inflamatórios dentro da matriz extracelular. Como os mastócitos começaram a declinar após o pico da infecção, é possível que muitas destas células sofreram o processo de apoptose e precisaram ser removidas do local inflamado pelos macrófagos. Segundo Starke & Oaks (1999) alguns mastócitos foram visualizados sofrendo o processo de apoptose após o tratamento dos ratos infectados com *H. diminuta*. Outras células também poderiam ser fagocitadas, como eosinófilos e neutrófilos. Além disso, Takemura et al. (1984) reportaram que em uma resposta primária bem sucedida, os macrófagos juntamente com outras células, desempenham um papel central no reparo tecidual, secretando fatores de coagulação que iniciam o reparo tecidual, proteases que removem fragmentos da matriz extracelular ou outros “debris” além de fator angiogênico e mitogênico que promovem a migração e a proliferação de fibroblastos e células endoteliais.

Em segundo lugar, ainda como célula reparadora, os macrófagos poderiam estar fagocitando parte dos grânulos residuais dos mastócitos que haviam sido liberados no local inflamado. Os resíduos de grânulos de mastócitos são componentes solúveis como as proteases neutras e a heparina que quando ligados ionicamente com outras moléculas presentes no fluído intestinal ou drogas ingeridas pelo hospedeiro formam

compostos maiores e mais complexos e assim são em seguida fagocitados por macrófagos (Decorti et al., 2001).

Uma terceira função dos macrófagos seria no controle da degranulação de mastócitos. Recentes estudos mostram que os mastócitos podem ligar-se ao IFN- γ via glicosaminoglicanas presente em sua membrana e apresentá-lo aos macrófagos ativos, que respondem produzindo NO, que por sua vez, contribui para a diminuição da liberação de mediadores pelos mastócitos, proporcionando um mecanismo de “feedback” negativo nas funções dos mastócitos no processo agudo da infecção (BROOKS et al., 2000).

A quarta função de macrófagos estaria centralizada no controle dos eventos neuro-motores, como na diminuição da contratibilidade intestinal aumentada durante a hipersensibilidade imediata ocorrida no período de expulsão de *T. vitulorum*. Como a motilidade intestinal está sob o controle de diversos sistemas integrados, incluindo o neurogênico, miogênico e o endócrino, durante o processo inflamatório, este complexo controle pode ser direcionado pelos macrófagos. Macrófagos foram associados com a supressão de acetilcolina (ACh) na camada muscular associada aos nervos colinérgicos do plexo nervoso mioentérico levando à disfunção da contração muscular em animais infectados por nematóides. Collins et al. (1989, 1992) verificaram que a inflamação gerada por *T. spirallis* provocava alterações nos níveis de acetilcolinesterase e de acetiltransferase colina, enzimas responsáveis pela degradação e síntese de ACh, respectivamente, indicando uma completa perturbação no sistema colinérgico. Este controle da contração muscular pela falha na liberação de ACh pode ser um meio também efetivo para diminuir a contratibilidade muscular na infecção por nematóides após a sua expulsão. Após um período de patência de aproximadamente dois meses, *T. vitulorum* é expelido pelos bezerros búfalos juntamente com fezes liquefeitas, diarréicas e com muito muco, muitas vezes levando à uma severa diarreia e desidratação (ENYENIHI, 1969b). Os macrófagos poderiam, portanto, exercer seu papel reparador contribuindo por alterar o padrão da contração muscular via neurotransmissores secretados por células neuroendócrinas, nervos e células imunes (Masson et al., 1996). Desta forma, a plasticidade do sistema neuro-imune entérico

desempenharia um importante papel na defesa do hospedeiro contra parasitas entéricos e teria participação também na reparação das lesões e no remodelamento estrutural e funcional do intestino após a expulsão do parasita.

5.5. Exame morfométrico da parede do intestino delgado dos bezerros búfalos infectados ou não por *T. vitulorum*.

A musculatura lisa intestinal de animais infectados por helmintos sofre extensivas alterações funcionais e morfológicas que são imunologicamente e geneticamente programadas alterando as propriedades contráteis e os reflexos neurais do intestino do hospedeiro (PALMER & MEERVELD, 2001). A causa do aumento da massa muscular não se conhece, mas pode envolver efeitos físicos ou substâncias derivadas dos parasitas ou mediadores inflamatórios da inflamação. A capacidade do hospedeiro em modular as funções do músculo liso através das reações do sistema imune e entérico parece ter grande valor adaptativo. A exposição à rede de nervos entéricos poderia assumir um controle da atividade muscular coordenada por todo o intestino proporcionando uma importante defesa contra o invasor.

Desta forma, realizou-se concomitantemente ao exame quantitativo celular um estudo morfológico para verificar se a parede do intestino delgado de bezerros búfalos sofria também alterações morfométricas quando parasitados *T. vitulorum*. Para este estudo, o vilo, a cripta, a submucosa e a camada muscular (longitudinal e circular) das diferentes regiões intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram mensuradas nos animais infectados por *T. vitulorum*, em cada fase do parasitismo (ascensão, pico, declínio e pós-expulsão) e nos animais não infectados (grupos controles C30 e C50).

De acordo com os dados das medidas de comprimento dos vilos, no duodeno, nas fases de ascensão, pico e declínio, foi observado uma atrofia significativa quando os dados foram comparados com os dos grupos controles C30 e C50. Esta atrofia pode ter ocorrido em função da ação mecânica e irritativa dos helmintos sobre a mucosa intestinal. A cripta e a submucosa, no entanto, não apresentaram alterações morfológicas significativas, enquanto que as camadas musculares intestinais

apresentavam-se significativamente hipertróficas nos animais que se encontrava em todas as fases parasitárias (início, pico e declínio) e inclusive na fase de pós-expulsão dos parasitas. No entanto, esta alteração só foi significativa quando estas medidas foram comparadas com as dos animais do grupo controle C30, mas não com as do grupo controle C50. Lembrando que no grupo C50 (idade média de 50 dias), os animais eram ligeiramente mais velhos do que do grupo C30 (idade média de 30 dias). Desta forma, pôde-se inferir que esta hipertrofia muscular do duodeno ocorreu mais em função do desenvolvimento dos animais do que propriamente em decorrência da infecção.

Já no jejuno e no íleo, não foram detectadas alterações morfológicas significativas em nenhuma estrutura dimensionada nas diferentes fases parasitárias quando se comparou com os controles. No entanto, alteração morfológica como hipertrofia da camada muscular intestinal muscular foi observada em vários animais infectados com helmintos: ratos infectados com *H. diminuta* (DWINELL et al., 1998; STARKE & OAKS, 1999), ratos com *N. brasiliensis*, ratos e hamsters com *T. spirallis*, ratos com *Moniliformis dubius*, cavalos com *Parascaris equorum* e porcos com *Ascaris suum* (CASTRO, 1989). Segundo Gabella (1990) doenças de obstrução do intestino, com conseqüente diminuição do trânsito intestinal, resultaram em aumento do tamanho das células musculares próximas a esta estenose e a intensidade do “trabalho” intestinal, ou seja, da contratibilidade, levando à hipertrofia da musculatura. Pode envolver uma alteração adaptativa resultando do conteúdo movendo através do intestino com estenose devido a pressão dos parasitas de grande porte. Sabe-se que os ascarídeos, por serem de grande porte e principalmente quando numerosos, formam enovelados e obstruem o lúmen intestinal dificultando a passagem de o bolo alimentar e, desta forma, podem ocasionar alterações do padrão mioelétrico contrátil do intestino. Com relação ao *T. vitulorum*, quando bezerros encontram-se altamente infectados, com centenas de parasitas adultos no lúmen intestinal, é freqüente ocorrerem obstruções, impedimento na absorção alimentar (ENYENIHI, 1969b, SUKHAPESNA, 1981a) e alterações na mucosa e na camada muscular da parede intestinal (SRIVASTAVA, 1963). No entanto, no presente trabalho, embora tenha ocorrido aumento populacional

de células imune-inflamatórias na parede intestinal levando, possivelmente, a uma maior motilidade muscular e à expulsão dos parasitas pelos hospedeiros, alterações morfométricas significativas, como por exemplo, a hipertrofia muscular, não ocorreu significativamente. Uma explicação para este fato, pode ser em função do número de parasitas presentes (máximo de 51 exemplares adultos), que provavelmente não foi suficiente para causar a obstrução e dificuldades no trânsito intestinal, sobrecarregando a musculatura para manter o ritmo normal do peristaltismo e da homeostase intestinal, como foi observado pelos autores acima citados.

Embora as alterações fisiológicas e celulares que ocorrem nas infecções helmínticas intestinais, já tenham sido discutidas e estudadas em diversas espécies animais, mas principalmente, usando-se modelos experimentais em laboratório ou cultivos celulares, pouco ainda se conhece a respeito das respostas imunes e neurológicas. Além disso, na presente pesquisa, utilizou-se um nematóide que é um parasita habitual em uma infecção natural em um hospedeiro ainda pouco explorado que é o búfalo. Desta forma, embora os dados obtidos fossem apenas quantitativos e observacionais, esta pesquisa pode ter importância para o conhecimento básico, pois os dados aqui obtidos poderão ser utilizados para o conhecimento posterior dos mecanismos imunes de proteção visando o controle por vacinas, principalmente as vacinas orais que poderão estar atuando ao nível de mucosa intestinal.

Um outro ponto importante a ser mencionado é que o *T. vitulorum* apesar de ser expulso pelo hospedeiro, esta expulsão só ocorre após os parasitas terem completado seu ciclo de vida, atingindo o estágio adulto, reproduzindo-se e eliminando grande quantidade de ovos para o meio ambiente para perpetuar a espécie. Assim, deve-se pensar que estes helmintos, além de eliminarem substâncias antigênicas que sensibilizam o mecanismo neuro-imune e culmina com a expulsão, estes nematóides podem também produzir moléculas similares às que o hospedeiro produz e desta forma podem permanecer em equilíbrio com seus hospedeiros até à reprodução. Na revisão realizada por Palmer & Meerveld (2001), foi relatado que os parasitas helmínticos entéricos geram uma extensa diversidade de produtos excretados/secretados (ES) que podem ser homólogas às moléculas dos hospedeiros para intervenção ou manipulação

dos processos neuro-imunes do trato gastrointestinal do hospedeiro. Desta forma, a presença destas substâncias indica que o helminto também desenvolveu estratégias para ativamente manipular a resposta do hospedeiro e favorecer a sua sobrevivência no mesmo.

Além disso, apesar do *T. vitulorum* adulto permanecer apenas no lúmen intestinal, as larvas penetram na mucosa para realizar o ciclo somático de migração tecidual antes de retornar ao intestino delgado para maturação. As larvas necessitam atravessar a barreira intestinal antes de realizar esta migração. Desta forma, os animais vivendo em uma ambiente contaminado com ovos infectantes podem estar em contínuo desafio parasitológico. No entanto, tem se verificado que após os animais expulsarem os parasitas adultos do trato intestinal, eles não se reinfectam, pelo menos ao nível intestinal, mas as búfalas adultas continuam portadoras e passam larvas infectantes pelo colostro aos seus filhotes. Isto significa que algumas larvas conseguiram ultrapassar a barreira intestinal para alcançar o fígado ou outros tecidos e assim ficarem hipobióticas até o momento do parto e da lactação. Desta maneira, importantes perguntas podem ser levantadas a respeito desta enfermidade parasitária, como por exemplo: Qual o nível de proteção imunológica que a infecção primária oferece contra a reinfecção? A parede intestinal pode ser considerada uma importante barreira para a penetração das larvas? Como prevenir a migração larval nas mães para que elas não transmitam o parasita pelo colostro?

6. CONCLUSÕES

A infecção por *T. vitulorum* em bezerros búfalos, nas diferentes fases do parasitismo, foi responsável pelo:

1. Aumento populacional de linfócitos intraepiteliais (LIE), células caliciformes, mastócitos e eosinófilos nas camadas intraepiteliais da mucosa do duodeno, jejuno e íleo. O número destas células foi máximo no pico da infecção parasitária, mas declinou após o processo de expulsão do parasita pelo hospedeiro, indicando a participação da imunidade celular neste processo.
2. Aumento da associação física entre os mastócitos e os processos nervosos na mucosa e nos plexos submucosos e mioentéricos, indicando uma colaboração entre o sistema nervoso entérico e o imunológico nesta infecção.
3. Aumento no número de macrófagos, principalmente, no período de pós-expulsão, indicando papel destas células no reparo das lesões inflamatórias decorrentes desta infecção.
4. Significativa atrofia vilosa no duodeno.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-793, 1996.

ACTOR, J.K.; SHIRAI, M.; KULLBERG, M.C.; BULLER, R.M.; SHER, A.; BERZOFSKY, J.A. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 90, p. 948-952, 1993.

ALDAWEK, A.M., LEVKUT, M., REVAJOVÁ, V., KOLODZIEYSKI, L., SEVEIKOVÁ, Z. and DUBINSKY, P. Laval toxocariosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, p. 207-214, 2002.

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

ALLEN, J.E.; LOKE, P. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 345-352, 2001.

AMERASINGHE, P.H., RAJAPAKSE, R.P.V.J., FERNANDO, S.T. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. **Parasitology Research**, v.78, p. 643-7, 1992.

ANDERSON, D.F.; MACLEOD, J.D.; BADDELEY, S.M.; BACON, A.S.; MCGILL, J.I.; HOLGATE, S.T.; ROCHE, W.R. Seasonal allergic conjunctivitis is accompanied by increased mast cell numbers in the absence of leukocyte infiltration. **Clinical Experimental Allergy**, v. 27, p. 1060, 1997.

ASKENASE, P.W. Immunopathology of parasitic diseases: involvement of basophils and mast cells. **Seminars Immunopathology**, v. 2, p. 417-442, 1980.

BEFUS, D.A., BIENENSTOCK, J. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. **Journal Immunology**, v.128, p. 2475-80, 1982.

BEFUS, D.A., BIENENSTOCK, I.; DENBURG, I.A. Mast cell differentiation and heterogeneity. **Raven Press, New York**, v. 1, p. 426, 1986.

BHOGAL, H.S.; KENNEDY, L.J.; BABIC, K.; REYBOLDS, J.D. The role of macrophages in the removal of apoptotic B-cells in the sheep ileal Peyer's patch. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 843-853, 2004.

BIENENSTOCK, J. Cellular Communication Network: Implications for our understanding of gastrointestinal physiology. **Annual New York Academic Science**, v. 664, 1-9, 1992

BROOKS, B.; BRIGGS, D.M.; EASTMOND, N.C.; FERNING, D.G.; COLEMAN, J.W. Presentation of IFN- γ to nitric oxide-producing cells: Novel function for mast cells. **The journal of immunology**, v. 164, p. 573-579, 2000.

BUTTERWORTH, A.E.; VADAS, M.A., MARTZ, E.; SHER, A. Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni* but fail to induce damage. **Journal of Immunology**, v. 122, p. 1314-1321, 1979.

BUTTERWORTH, A.E. Cell-mediated damage to helminthes. **Adv. Parasitology**, v. 23, p. 143-235, 1984.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M.; JOSEPH, M.; TORPIER, G. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. **Immunological Reviews**, v. 61, p. 41-66, 1982.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; HAQUE, A.; AURIAULT, C.; JOSEPH, M. Macrophages as effector cells in helminth infections. **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 631-635, 1983.

CARLISLE, M.S., MCGREGOR, D.D., APPLETON, J.A. intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. **Immunology**, v. 74, p. 546-51, 1991.

CARROLL, S.M., MAYRHOFFER, G., DAWKINS, H.J.S., GROVE, D.I. Kinetics of intestinal lamina propria mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes, goblet cells and eosinophils in murine. **In Article Allergy Applied Immunology**, v. 74, p. 311-17, 1984.

CASTRO, G.A.; HARARI, Y.; RUSSELL, D. Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. G540- G548, 1987.

CASTRO, G.A. Parasite infections and gastrointestinal motility. In Handbook of physiology, section 6: The gastrointestinal system, v.I. Motility and circulation, part 2, Schultz S.G. and Wood J.D. (eds.). **Waverly Press**, Baltimore, U.S.A., p. 1133-1152, 1989.

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

CASTRO, G.A.; ARNTZEN, C.J. Immunophysiology of the gut – a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune-system. **American Journal of Physiology**, v. 265, n, 4, p. G599-G610, oct. 1993.

CHANG, F.; MAHADEVA, U.; DEERE, H. Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 6, p.385, 2005.

CHAUHAN, P.P.S.; AGRAWAL, R.D.; AHLUWALIA, S.S. A note on the presence of *Strongyloides papillosus* and *Neoscaris vitulorum* larvae in the milk of buffaloes. **Current Science**, v. 43, p. 486-487, 1974.

CHEROUTRE, H.; MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. **Nature Review Immunology**, v. 4, p. 290-300, 2004.

CLAMP, J.R. The relationship between the immune system and mucus in the protection of mucous membranes. **Biochemical Society Transactions**, v. 12, p. 754-6, 1984.

COLLINS, S.M.; BLENNERHASSETT, P.A.; BLENNERHASSETT, M.G.; VERMELLION, D.L. Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. G898-903, 1989.

COLLINS, S.M.; BLENNERHASSETT, P.A.; VERMELLION, D.L.; DAVIS, K.; LANGER, J.; ERNST, P.B. Impaired acetylcholine-release in the inflamed rat intestine is T-cell independent. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 2, p. G198-G201, aug. 1992.

COSTA, A.J.; PACOLA, L.J.; ARANTES, I.G.; DOHARA, J.; JUSTOS, C.L. Desenvolvimento das helmintoses em búfalos (*bubalus bubalis*) nascidos em Sertãozinho (SP). **Boletim da Indústria Animal de Nova Odessa (SP)**, v.37, p. 195-205, 1980.

COX, F.E. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, v. 122, p. S23-S38, 2001.

CUVELIER, C.; DERMETTER, P.; MIELANTS, H.; VEYS, E.M.; DE VOS, M. Interpretation of ileal biopsies: morphological features in normal and diseased mucosa. **Histopathology**, v. 38, p. 1-12, 2001.

DAS, K.M., SINGH, G.B. Calf ascariasis in India. A nine years survey with special reference to "Hetrazan". **British Veterinary Journal**, v. 111, p. 342-7, 1955.

DECORTI, G.; KLUGMANN, F.B.; CRIVELLATO, E.; MALUSÀ, N.; FURLAN, G.; CANDUSSIO, L.; GIRALDI, T. Biochemical and microscopic evidence for the internalization of drug-containing mast cells granules by macrophages and smooth muscle cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 169, p. 269-275, 2000.

DeSCHOOLMEESTER, M.L.; EASTMOND, N.C.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I.; BASKETTER, D.A.; COLEMAN, J.W. Reciprocal effects of interleukin-4 and interferon- γ on immunoglobulin E-mediated mast cell degranulation: a role for nitric oxide but not peroxynitrite or cyclic guanosine monophosphate. **Immunology**, v. 96, p. 138, 1999.

DUFFY, J.P., SMITH, J.P., CROCKER, J. and MATTHEWS, H.R. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. **Journal Histotech**, v. 16, n. 2, p. 143 -144, 1993.

DWINELL, M.B., BASS, P., OAKS, J.A. Praziquantel treatment normalizes intestinal myoelectric alterations associated with *Hymenolepis diminuta*-infected rats. **Journal Parasitology**, v. 81, p. 979-984, 1995.

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.

ENYENINHI, U.K. Pathogenicity of *Neascaris vitulorum* infections in calves. **Bulletin of Epizootic Diseases of Africa**, v. 17, p. 171-178, 1969.

EVERSOLE, R., MACKENZIE, C., CONDER, G., JOHNSON, S. and BEUVING, L. Changes in the Morphology and the distribution of rat intestinal eosinophil during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 7, p. 785-97, 1999.

FALCONE, F.H.; LOKE, P.; ZANG, X.; MACDONALD, A.S.; MAILZELS, R.M.; ALLEN, J.E. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophils recruitment during nematode infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 5348-5354, 2001.

FARGEAS, M.J., THEODOUROU, V., FIORAMONTI, J. and BUENO, L. Relationship between mast cell degranulation and jejunal myoelectric alterations in intestinal anaphylaxis in rats. **Gastroenterology**, v. 102, p. 157-162, 1992.

FERREIRA, F.P. Obtenção e caracterização de antígenos de *Toxocara vitulorum* por SDS-Page e "Western blot". Ilha Solteira, 2002. 53p. Dissertação (Mestrado –

Sistema de Produção Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

FINKELMAN, F.D., SHEA-DONOHUE, T., GOLDHILL, J., SULLIVAN, C.A., MORRIS, S.C., MADDEN, K.B., GAUSE, W.C. and URBAN, J.F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. **Annual Review Immunology**, v. 15, p. 505-33, 1997.

FIOCCHI, C. Intestinal inflammation: A complex interplay of immune and non-immune cell interactions. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. G769-G775, 1997.

FLEXMAN, J.P., SHELLAM, G.R. and MAYRHOFER, G. Natural cytotoxicity responsiveness to interferon and morphology of intraepithelial lymphocytes from the small intestine of the rat. **Immunology**, v. 48, p. 733-41, 1983.

FRIEND, D.S., GURISH, M.F., AUSTEN, K.F., HUNT, J. and 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**, p. 344-352, 2000.

FURNESS, J.B. and COSTA, M. The enteric nervous system. **New York: Churchill Livingstone**, 1987.

GABELLA, G. Hypertrophy of visceral smooth muscle. **Anatomy and Embryology**, v. 182, p. 409-424, 1990.

GALEAZZI, F.; HAAPALA, E.M.; ROOIJEN, N.V. Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent.

American Journal Gastrointestinal Liver Physiology, v. 278, p. G259-G265, 2000.

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

GOYAL, R.K.; IKUO HIRANO, M.D. The Enteric Nervous System. **The New England Journal of Medicine**, v.334, n.17, p. 1106-1115, 1996.

GUTIERREZ, M.; FORSTER, F.I.; MCCONNELL, S.A.; CASSIDY, J.P.; POLLOCH, J.M.; BRYSON, D.G. The detection of CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, and WC1⁺T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 321-334, 1999.

GUY-GRAND, D.; GRISCELLI, C.; VASSALLI, P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, p. 1661-1677, 1978.

HAQUE, A.; OUAISSI, A.; JOSEPH, M.; CAPRON, M.; CAPRON, A. IgG antibody in eosinophils and macrophage-mediated in vitro killing of *Dipetalonema viteae* microfilariae. **Journal of Immunology**, v. 127, p. 716-725, 1981.

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

HIRAI, K.; MIYAMASU M.; TAKAISHI T.; MORITA Y. Regulation of function of eosinophils and basophils. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 325-352, 1997.

HOLLAND, M.J.; HARCUS, Y.M.; RICHES, P.L.; MAIZELS, R.M. Protein secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1977-1987, 2000.

ISHIKAWA, N., HORIL, Y., OINUMA, T., SUGANUMA, T., NAWA, Y. Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminthes: T-cell-independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damage' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites. **Immunology**, v. 81, p. 480-6, 1994.

JARRET, E.E., MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. **Proceeding Allergy**, v. 31, p. 178-233, 1982.

JAMES, S.L.; SHER, A.; LAZDINS, J.K.; MELTZER, M.S. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. II. Killing of newly transformed schistosomula in vitro by macrophages activated as a consequence of *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Immunology**, v. 128, p. 1535-1540, 1982.

JONES, W.O., EMERY, D.L. Demonstration of a range of inflammatory mediators released in Trichostrongylosis of sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 361-3, 1991.

KIRCHGESSNER, A.L. and GERSHON, M.D. Innervation of the pancreas by neurons in the gut. **Journal of the Neuroscience**, v. 10, p. 1626-1642, 1990.

KOVANEN, P.T. Role of mast cells in atherosclerosis. **Chemical Immunology**, v. 62, p. 132-170.

KULLBERG, M.C.; PEARCE, E.J.; HIENY, S.E.; SHER, A.; BERZOFISKY, J.A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to non-parasite antigen. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 3264-3270.

KURODA, E.; YOSHIDA, Y.; SHAN, B.E.; YAMASHITA, U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor- α production in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 305-311, 2001.

LEVY, A.M., FRONDOZA, C. Immunity to intestinal parasites: role of mast cells and goblet cells. **Federation Proceedings**, v. 42, p. 1750-5, 1983.

LISON, L. Histochemie et cytochimie animales: principes et méthodes. 3 ed. Paris: Gauthier-Villars, 1960.

LOKE, P.; MACDONALD, A.S.; ALLEN, J.E. Antigen-presenting cells recruited by *Brugia malayi* induce Th2 differentiation of naive CD4⁺ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1127, 2000a.

LOKE, P.; MACDONALD, A.S.; ROBB, A.O.; MAIZELS, R.M.; ALLEN, J.E. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell to cell contact. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 2669, 2000b.

MACDONALD, A.S.; MAIZELS R.M.; LAWRENCE, R.A.; DRANSFIELD, I.; ALLEN, J.E. Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the production of proliferative suppression by filarial parasites. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 4124, 1998.

MACDONALD, A.S.; LOKE, P.; ALLEN, J.E. Suppressive antigen-presenting cells in helminth infection. **Pathobiology**, v. 67, p. 265-268, 1999.

MACKENZIE, C.D.; JUNGERY, M.; TAYLOR, P.M.; OGILVIE, B.M. The activation of complement, the induction of antibodies to the surface of nematodes and the effect of these factors and cells on worm survival *in vitro*. **European Journal of Immunology**, v. 10, p. 594-601, 1980.

MAIZELS, R.M.; PARTONO, F.; OEMIJATI, S.; OGILVIE, B.M. Antigenic analysis of *Brugia-Timori* a filarial nematode of man-initial characterization by surface radioiodination and evaluation of diagnostic potential. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 51, n. 2, p. 269-277, 1983.

MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.G.; PICCINNI, M.P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin12 / IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune response and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1199-1204, 1993

MARSHALL, J.S. and BIENENSTOCK, J. Mast cells. **Springer Seminars in Immunology**, v. 12, p. 191-202, 1990.

MASSON, S.D., MACKAY, D.M., STEAD, R.H., AGRO, A., STANISZ, A. and PERDUE, M.H. *Nippostrongylus brasiliensis* infection evokes neuronal abnormalities and alterations in neurally regulated electrolyte transport in rat jejunum. **Parasitology**, v. 113, p. 173-182, 1996.

MCCLURE, S.J.; EMERY, D.L.; WAGLAND, B.M.; JONES, W.O. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. **International Journal Parasitology**, v. 22, p. 227-234, 1992.

MCDERMOTT, J.R.; BARTRAM, R.E.; KNIGHT, P.A.; MILLER, H.R.P.; GARROD, D.R.; GRENCIS, R.K. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric infection. **Immunology**, v. 100, p. 7761-7766, 2003.

MCKAY, D.M. and BIENENSTOCK, J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. **Immunology Today**, v. 15, p. 533-8, 1994.

MCKAY, D.M. and FAIRWEATHER, I. A role for the Enteric Nervous System in the response to helminth infections. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 63-69, 1997.

MEEUSEN, N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 259-73, 1999.

MEEUSEN, E.N.T. and BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 95-101, 2002.

MEHTA, K.; SINDHU, R.K.; SUBRAHAMANYAM, D.; NELSON, D.S. IgE-dependent adherence and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to *Litosoides carinii* microfilaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 41, p. 107-114, 1980.

MILLER, H.R., WOODBURY, R.G.; HUNTLEY, J.F.; NEWLANDS, G. System release of mucosal mast cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 49, p. 471-479, 1983.

MILLER, H.R.P. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 6, p. 167-259, 1984.

MOQBEL, R.; KING, S.J.; MACDONALD, A.J.; MILLER, H.R.P.; CROMWELL, O.; SHAW, R.J.; KAY, A.B. Enteral and systemic release of leuckotrienes during anaphylaxis of *Nippostrongylus brasiliensis*-primed rats. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 296-301, 1986.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annuals Reviews immunology**, v.7, p. 145, 1989.

MOTYKA, B.; REYMONDS, J.D. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 8, p. 1951-1958, 1991.

MURRAY, M.; MILLER, H.R.P.; JARRETT, W.F. The globule leucocyte and its derivation from the subepithelial mast cell. **Laboratory Investigation**, v. 19, p. 222-233, 1968.

MURRAY, M.; MILLER, H.R.P.; SANFORD, J.; JARRETT, W.F. 5-hydroxytryptamine in intestinal Immunological reactions. Its relationship to mast cell activity and worm expulsion in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **International Archives of allergy**, v. 40, p. 236-247, 1971.

NATHAN, C.F. Peroxide and pteridine: a hypothesis on the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon. **In Interferon**. Vol. VII. I. Gresser and J. Vilcek, editors Academic Press, Inc., New York., p. 125-143, 1986.

NAWA, Y., ISHIKAWA, N., TSUCHIYA, K., HORII, Y., ABE, T., KHAN, A.I., BING-SHI, ITOH, H., IDE, H. And UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v. 16, N.7, p.333-338, 1994.

NEVES, M.F, STARKE-BUZETTI, W.A. and CASTRO, A.M.M.G. Mast cell and eosinophils in the wall of the gut and eosinophils in the blood stream during *Toxocara vitulorum* infection of the water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 59-72, 2003.

NOEL, A.; MAILLARD, C.; ROCKS, N.; JOST, M. CHABOTTAUX, V.; SOUNNI, N.E.; MAQUOI, E.; CATALDO, D.; FOIDART, J.M. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 6, p. 577-584, jun. 2004.

NUTMAN, T.B. Mast cells and their role in parasitic helminth infection. **In: The mast cell in health and disease**, p. 669-86, 1993.

OUASSI, M.A.; HAQUE, A.; CAPRON, A. *Dipetalonema viteae*. Ultrastructural study on the *in vitro* infection between rat macrophages and microfilariae in the presence of IgE antibody. **Parasitology**, v. 82, p. 55-62.

PALMER, J.M. and MEERVELD, B.G. integrative neuroimmunomodulation of gastrointestinal function during enteric parasitism. **Journal of the Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 483-504, 2001.

PARSON, J.C.; COFFMAN, R.L.; GRIEVE, R.B. Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. **Parasitology Immunology**, v. 15, p. 501-508, 1993.

PATNAIK, M.M., PANDE, B.P. Notes on helminthic infestations encountered in one month old buffalo calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 40, p. 128-33, 1963.

PAULA, S.H.S. Inibição da migração de larvas para os tecidos de camundongos pela imunização com antígenos de *Toxocara vitulorum* e o estudo da histopatologia das lesões. Ilha Solteira, 2003. 50p. Dissertação (Mestrado – Sistema de Produção Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

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. 724-31, 1989.

PERDUE, M.H.; MARSHALL, J.; MASSON, S. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum: involvement of mast cells and nerves. **Gastroenterology**, v. 98, p. 561-567, 1990.

PERDUE, M.H.; MCKAY, D.M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. G151-G165, 1994.

RAJAPAKSE, R.P.V.J.; LLOYD, S.; FERNANDO, S.T. *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (*Bubalis bubalis*) to calves and levels of infection with *T. vitulorum* in the calves. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 81-7, 1994a.

RAJAPAKSE, R.P.V.J., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. The effect of serum and colostrum immunoglobulins from buffaloes infected with *Toxocara vitulorum* or *T. vitulorum* larvae *in vitro* and *in vivo* in mice. **Research Parasitology**, v. 80, p. 426-30, 1994b.

REYMONDS, J.D. Evidence of extensive lymphocyte death in sheep Peyer's patches. I. A comparison of lymphocyte production and export. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 6, p. 2005-2010, 1986.

REYMONDS, J.D. Peyer's patches and the early development of B lymphocytes. **Current Topics Microbiology Immunology**, v. 135, p. 43-56, 1987.

ROBERTS, J.A. The extraparasitic life cycle of *Toxocara vitulorum* in the village environment of Sri Lanka. **Veterinary Research Communications**, v.13, p.377-88, 1989.

ROBERTS, J.A. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal for Parasitology**, v. 20, p.833-40, 1990a.

ROBERTS, J.A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 37, p. 113-120, 1990b.

ROBERTS, J.A. *Toxocara vitulorum* in ruminants. **Helminthological Abstracts**, v.62, n.4, p.151-74, 1993.

RODRÍGUEZ, M.; TERRAZAS, L.I.; MARQUEZ, R.; BOJALIL, R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 177-185, 1999.

RODRÍGUEZ-SOSA, M.; SATOSKAR, A.R.; CALDERÓN, R.; GOMEZ-GARCIA, L.; SAAVEDRA, R.; BOJALIL, R.; TERRAZAS, L.I. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. **Infection and Immunity**, v. 70, n.7, p. 3656-3664, 2002.

ROTHWELL, T.L.W. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **International Journal for Parasitology**, v.19, p. 139-68, 1989.

ROTHWELL, T.L.W. Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **International Journal Parasitology**, v. 23, p. 203-11, 1993.

SIMECKA, J.W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.34, p. 235-59, 1998.

SISSON, S., GROSSMAN, J.D. Ruminante – Sistema digestivo. In_. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p. 807-58.

SMITH, J.D. Phasmid nematoda: rhabditida ascaridida and oxyurida. In_. **Introduction to animal parasitology**. 3.ed. New York: Cambridge, 1994. p.397-409.

SMITH, J.M.; KOURY, H.I.; HAFNER, C.D.; WELLING, R.E. Subclavial steal syndrome – a review of 59 consecutive cases. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 35, n. 1, p. 11-14, feb. 1994.

SOUZA, E.M., STARKE-BUZETTI, W.A., FERREIRA, F.P., NEVES, M.F. & MACHADO, R.Z. Humoral immune response of water buffalo monitored with three different antigens of *Toxocara vitulorum*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 67-78, 2004.

SRIVASTAVA, S.C. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782) Travassos, 1907, in intestinal perfoliation with its localisation in liver of buffalo calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 40, p. 758-762, 1963.

STARKE, W.A., ZOCOLLER, M.C., MACHADO, R.Z. and HONER, M.R. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no município de Andradina (SP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.35, p.651-64, 1983.

STARKE, W.A., ZOCOLLER, M.C., MACHADO, R.Z. Transmissão transmamária de larvas de nematódeos gastrintestinais a bezerros búfalos. II. Larvas de

Toxocara vitulorum. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p. 97-103, 1992.

STARKE, W.A., OAKS, J.A. *Hymenolepis diminuta*: Praziquantel removal of adult tapeworm is followed by apoptotic down-regulation of mucosal mastocytosis. **Experimental Parasitology**, v. 92, p. 171-81, 1999.

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. 1220-25, 2001.

STARKE-BUZETTI, W.A.; MACHADO, R.Z.; ZOCOLLER, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Toxocara vitulorum* in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 55-64, 2001.

STARKE-BUZETTI, W.A.; FERREIRA, F.P. Characterization of excretory/secretory antigen from *Toxocara vitulorum* larvae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 210-218, 2004a.

STARKE-BUZETTI, W.A.; FERREIRA, F.P. Detection of IgG antibody to *Toxocara vitulorum* soluble larval extract (Ex) by Western blotting in the colostrums and sorum of buffalo calves and cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2004b (in press).

STARKE-BUZETTI, W.A.; FERREIRA, F.P. Detection of antibody to *Toxocara vitulorum* perienteric fluid antigens (Pe) in the colostrums and serum of buffalo calves and cows by Western blotting. **The Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 119-124, 2005.

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

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

SUKHAPESNA, V. Ascariosis in buffalo calves. **Journal of the Thai Veterinary Medical Association**, v. 32, p. 263-268, 1981.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **American Journal of Physiology**, v. 246, p. C1-C9, 1984.

THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; THIESEN, A.; CLANDININ, M.T.; ROPELESKI, M.; WILD, G.E. Small bowel review: normal physiology part 2. **Dig. Dis. Science**, v. 46, p. 2588-2607, 2001.

TIZARD, I. Introdução à Imunologia Veterinária. In_. **Imunidade contra Protozoários e Helminthos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 211-24.

URBAN, J.F.; MADDEN, K.B.; KATONA, I.M.; MALISZEWSKI, C.R.; FINKELMAN, F.D. Restoration of protective: immunity to a nematode parasite in T-cell-deficient mice with cytokines and immune serum. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 8, p. A85-A85, 15 apr. 1993.

WARREN, E.G. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. **International Journal for Parasitology**, v.1, p. 85-99, 1971.

WASSON, D.L.; GLEICH, G.J. Damage to trichinella spirallis newborn larvae by eosinophils major basic protein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, p. 860-863, 1979.

WEISBRODT, N.W.; LAI, M.; BOWERS, R.L.; HARARI, Y.; CASTRO, G.A. Structural and molecular changes in intestinal smooth muscle induced by Trichinella spiralis infection. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. G856-G882, 1994.

WHITLOCK, A.V. Some modifications of the McMaster helminth eggs; counting technique and apparatus. **Journal Helminthology**, v. 29, p. 177-80, 1948.

WINTER, M.D., WRIGHT, C., LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. **Parasitology**, v. 114, p. 189-93, 1997.

WOOD, J.D. Communication between minibrain in gut and enteric immune system. **New Physiology Science**, v. 6, p. 64-69, 1991.

WOODS, A.; CHEN, H.Y.; TRUMBAUER, M.E.; SIROTINA, A.; CUMMINGS, R.; ZALLER, D.M. Human major histocompatibility complex class II-restricted T-cell responses in transgenic mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180,n. 1, p. 173-181, 1 jul. 1994.

WU, C.Y.; DEMEURE, C.; KINIWA, M.; GATELY, M.; DELESSESSE, G. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 1938-1949, 1993.

YU, L.C.H.; PERDUE, M.H. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. **Immunological Reviews**, v. 179, p. 61-73, 2001.