

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CAROLINE OHNESORGE MAIA

**“EVOLUÇÃO DO *Strongyloides venezuelensis* EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ETILISMO AGUDO”**

VITÓRIA
2015

CAROLINE OHNESORGE MAIA

**“EVOLUÇÃO DO *Strongyloides venezuelensis* EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ETILISMO AGUDO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial de obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Fausto Edmundo Lima
Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Narcisa Imaculada Brant
Moreira

VITÓRIA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda CAROLINE OHNESORGE MAIA apresentou a dissertação intitulada “Evolução do *Strongyloides venezuelensis* em camundongos submetidos ao etilismo agudo” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica CAROLINE OHNESORGE MAIA a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 15 de junho de 2015

Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga
(Membro Externo)

Profa. Dra. Blimã Fux
(Membro Interno)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Orientador)

Profa. Dra. Narcisa Imaculada Brant Moreira
(Coorientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M217e Maia, Caroline Ohnesorge, 1989 -
Evolução do Strongyloides venezuelensis em camundongos
submetidos ao etilismo agudo/Caroline Ohnesorge Maia– 2015.
65f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
Coorientador: Narcisa Imaculada Brant Moreira.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Strongyloides. 2. Abuso de Álcool. 3. Alcoolismo.
I. Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Moreira, Narcisa Imaculada
Brant. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, à minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Muito obrigada por tudo. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, e de maneira especial:

À Deus, por me abençoar em todos os meus caminhos e por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Aos meus pais, João e Norma, por terem muitas vezes, desistido de seus sonhos para a realização dos meus. Vocês são minha fonte maior de alegria. Obrigada por sempre almejarem o melhor para os seus filhos e por dar total apoio na busca dos nossos objetivos. Obrigada pela educação, pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pelos exemplos de dignidade, caráter e ética, pela paciência, pelo incentivo, pela força, pelas orações e principalmente pelo carinho e amor incondicional. Esta vitória é muito mais de vocês do que minha!!!

Ao meu irmão João Paulo e a minha tia Zenira, por sempre torcerem pelo meu sucesso. Obrigada pelo companheirismo, por toda ajuda, apoio e carinho.

Ao meu namorado Iuri, pela presença constante, por ser compreensivo e paciente, e que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, sempre disposto a ajudar.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Fausto, excelente profissional, por quem tenho grande respeito, admiração e gratidão. Uma pessoa que não mede esforços para ajudar a quem precisa. Obrigada pela enorme dedicação, pela confiança depositada em mim para execução desse trabalho, pelos ensinamentos, compreensão, paciência e orientações.

À minha co-orientadora Prof^a Dr. Narcisa, pessoa nobre e generosa, por quem tenho extrema admiração e gratidão. Sempre muito atenciosa, competente, dedicada e bem humorada. Obrigada pelas orientações, por seus ensinamentos, conselhos, carinho, motivação, paciência e confiança ao longo desta jornada.

Ao meu amigo Steveen, pela acolhida desde o início desta caminhada, por todo ensinamento, conselhos, paciência, ajuda, incentivos e apoio constantes. Muito

obrigada pela sua contribuição e pelas palavras de estímulo que me ajudaram a superar debilidades e vencer desafios.

À minha amiga Débora, que muito me ajudou, uma pessoa de coração bondoso e que não mede esforços para ajudar, obrigada pelo convívio, pela paciência, pela compreensão, pelo apoio e auxílio em parte dos experimentos.

À Professora Blima e aos colegas da parasito pelo suporte e ajuda em vários momentos dos meus experimentos.

Aos meus companheiros de turma de Mestrado, pelos momentos de seriedade e descontração que tornaram mais fácil a jornada.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas pela oportunidade do estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

A prevalência de *Strongyloides stercoralis* em alcoolistas crônicos é maior do que em não alcoolistas. Como os mecanismos envolvidos nesta maior prevalência não estão esclarecidos, planejamos verificar o efeito da intoxicação etílica na evolução do *S. venezuelensis* em camundongos, modelo considerado semelhante ao *S. stercoralis*. Foram utilizados dois modelos de intoxicação etílica: (a) um episódio de etilismo agudo (7mg/g peso corporal de etanol a 40%, por gavagem (grupo EA); (b) três episódios de etilismo agudo (5mg/g peso corporal a 40%) com intervalo de uma semana, em camundongos tratados com etanol a 15% na água de consumo nas três semanas e durante o período após a infecção (grupo EA/C). Camundongos suíços machos foram infectados uma hora após a gavagem do etanol, com 700 L3 de *Strongyloides venezuelensis*. A evolução da infecção foi acompanhada por: (a) contagem de ovos nas fezes diariamente até o seu completo desaparecimento; (b) contagem de larvas no pulmão 48 h após a infecção; (c) contagem de vermes adultos no intestino no 8º (grupo EA) ou 9º dia (grupo EA/C) após a infecção. Foi realizada a contagem global de leucócitos e de eosinófilos com intervalo de 4 dias a partir do segundo dia após a infecção. Os resultados mostraram: (1) nos dois grupos que receberam o etanol a contagem de ovos e o número de vermes recuperados do intestino foram maiores do que nos respectivos grupos controle; (2) no grupo EA o número de larvas recuperadas no pulmão foi maior do que no grupo controle, o que não foi observado no grupo EA/C; (3) não houve diferença significativa no comportamento dos leucócitos totais e dos eosinófilos, embora houvesse uma tendência de número menor no segundo dia após a infecção nos grupos tratados com etanol. Em conclusão, um episódio, ou três episódios com intervalo de uma semana de etilismo agudo em animais recebendo etanol a 15%, alterou a cinética da infecção de *S. venezuelensis* em camundongo, com aumento na eliminação de ovos e na recuperação de vermes adultos do intestino, sem diferenças relacionadas ao modelo da intoxicação etílica.

Palavras-chaves: *Strongyloides venezuelensis*, etilismo agudo, etilismo, *Strongyloides*.

ABSTRACT

The prevalence of *Strongyloides stercoralis* in chronic alcoholics is greater than in non-alcoholics. As the mechanisms involved in this higher prevalence remain unclear, we plan to evaluate the effect of ethanol intoxication in the course of infection by *S. venezuelensis* in mice, the model considered similar to *S. stercoralis*. Two models of intoxication with ethanol were used: (a) an episode of acute alcoholism (7 mg/g body weight ethanol 40% by gavage (EA group), (b) three episodes of acute alcoholism (5 mg/g body weight 40%) at an interval of one week in mice treated with 15% ethanol (at water *ad libitum*), at three weeks and during the period after infection (EA/C group.) Male Swiss mice were infected with 700 L3 larvae of *Strongyloides venezuelensis*, one hour after gavage with ethanol. The course of the infection was accompanied by: (a) egg counts in the feces daily until complete disappearance (b) larvae counts in the lung 48 hours after infection, and (c) counting adult worms in the gut 8 (EA group) or 9 days (Group AE/C) after infection. It was held total leukocyte and eosinophil 4 days interval from the second day after infection. The results showed (1) in both groups that received ethanol, egg counts and the number of worms recovered from the intestine were higher than the respective control groups; (2) at EA group, the number of larvae recovered in the lung was higher than the control group, which was not observed in the EA/C group; (3) there was no significant difference in the behavior of total leukocytes and eosinophils, although there were fewer tendency on the second day after infection in the groups treated with ethanol. In conclusion, one episode, or three episodes with an interval of one week in acute alcohol administered in animals receiving 15% of ethanol, changed the kinetics of *S. venezuelensis* infection in mice, with an increase in the elimination of eggs and the recovery of adult worms of intestine, with no differences related to the model of an ethanol intoxication.

Keywords: *Strongyloides*, *Strongyloides venezuelensis*, alcoholism and acute alcoholism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) e (B) Fêmeas partenogenéticas com ovos enfileirados na mucosa intestinal de camundongo infectado	23
Figura 2 – Ovo de <i>S. venezuelensis</i> em fezes de gerbilo: (A) larvado e (B) não larvado	23
Figura 3: Aspecto microscópico do sedimento do Baerman de cultura de ovos de <i>S. venezuelensis</i> em vermiculita no sétimo dia após a incubação. (A) - Larvas (setas azuis) e fêmeas de vida livre (setas vermelhas). (B) - Campo microscópico em maior aumento mostrando larva rabditóide (seta branca), larva filarióide (seta preta) e fêmea de vida livre na qual pode ser observado um ovo no útero (seta amarela).....	24
Figura 4: Larva filarióide (L3) de <i>S. venezuelensis</i> : (A) Esôfago filariforme, (B) cauda bifurcada e (C) extremidade posterior	24
Figura 5: Ciclo evolutivo do <i>S. venezuelensis</i> em camundongo	26
Figura 6: Mecanismo de resistência à infecção por <i>S. venezuelensis</i> no intestino..	28
Figura 7: Mecanismo de resistência á infecção por <i>S. venezuelensis</i> no pulmão	29
Figura 8: Imunidade adaptativa às larvas de <i>S. venezuelensis</i>	30
Figura 9 - Câmara de McMaster em vistas frontais e em corte para mostrar a distancia entre as duas lâminas	35
Figura 10 - Delineamento experimental do etilismo agudo	38
Figura 11 - Delineamento experimental do etilismo crônico	39
Figura 12 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> e submetidos ao etilismo agudo (grupo etanol) e do grupo controle correspondente, analisados diariamente após a infecção com 700 L3 de <i>S. venezuelensis</i> até a completa negativação da eliminação de ovos	41
Figura 13 - Área sob a curva obtida com quantificação diária da eliminação de ovos entre o 5 ^o e o 18 ^o após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> em camundongos com intoxicação etílica aguda e seus respectivos controles. As barras representam a média e o erro padrão da média *p<0,05	42

Figura 14 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos infectados com <i>S. venezuelensis</i> e submetidos ao etilismo crônico com três episódios de etilismo agudo (grupo etanol) e do grupo controle correspondente, analisados diariamente após a infecção com 700 L3 de <i>S. venezuelensis</i> até a completa negativação da eliminação dos ovos	43
Figura 15 - Área sob a curva obtida com a quantificação diária da eliminação de ovos entre o 5 ^o e o 18 ^o após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> em camundongos que receberam três episódios de intoxicação aguda, mantidos com ingestão crônica do etanol e seus respectivos controles. As barras representam a média e o erro padrão da média *p<0,05	43
Figura 16 - Pulmão de camundongo 48 horas após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> , apresentando pontos hemorrágicos	44
Figura 17 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo (grupo etanol) e de camundongos do grupo controle 48h após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> . As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico. *P<0,05	44
Figura 18 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos submetidos à intoxicação crônica com etanol e a três episódios de etilismo agudo (grupo etanol) e de camundongos do grupo controle 48h após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> . As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico	45
Figura 19 – Aspecto histológico do pulmão 48h após a infecção. (A) Foco de hemorragia no qual se observa uma larva (seta), vista ampliada em (B)	46
Figura 20 - Número de fêmeas partenogênicas recuperadas do intestino delgado de camundongos submetidos a intoxicação aguda com etanol (grupo etanol), e de camundongos do grupo controle, no 8 ^o dia após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> . As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico. *P<0,05	47
Figura 21 - Número de fêmeas partenogênicas recuperadas do intestino delgado de camundongos submetidos a três episódios de etilismo agudo durante intoxicação crônica com etanol (grupo etanol) e de camundongos do grupo controle no 9 ^o dia após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> . As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico. *P<0,05	48
Figura 22 - Número de leucócitos totais no sangue circulante de	

camundongos infectados com *S. venezuelensis*. (A) camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo e seus respectivos controles; (B) camundongos submetidos a três episódios de etilismo agudo durante intoxicação crônica com etanol. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartilico 49

Figura 23 - Número de eosinófilos no sangue circulante de camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo (grupo etanol) e de seus respectivos controle (grupo controle), infectados com *S. venezuelensis*. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartilico 50

Figura 24 - Número de eosinófilos no sangue circulante de camundongos submetidos a intoxicação crônica com etanol com três episódios de etilismo agudo (grupo etanol) e de seus respectivos controles (grupo controle), infectados com *S. venezuelensis*. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartilico..... 51

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CD4 – Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação 4)

DPI – Dia Pós-Infecção

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FcR γ - Fc receptor gama

FcR ϵ - Fc receptor épsilon

Gv - Gavagem

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HTLV 1 – Vírus Linfotrópico para Células T Humanas Tipo 1

ICB – Instituto Central de Biologia

IgE – imunoglobulina E

IgG1 - imunoglobulina G1

IgG4 – imunoglobulina G4

IL-4 – interleucina-4

IL-5 - interleucina-5

IL-9 – interleucina-9

IL-13 - interleucina-13

IL-33 – interleucina-33

ILC2 - Innate Lymphoid Cells type 2 (Célula linfóides da imunidade inata tipo 2)

IQ – Intervalo Interquartilico

L1 – Larvas de primeiro estágio

L2 – Larvas de segundo estágio

L3 – Larvas de terceiro estágio

L4 – Larvas de quarto estágio

LT - Linfócito T

MG – Minas Gerais

NaCl – Cloreto de Sódio

OPG - Ovos Por Grama

RPM – Rotação Por Minuto

TH2 - T helper tipo 2

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

V/V – Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Associação do alcoolismo com a infecção por <i>Strongyloides stercoralis</i>	19
2.2 Modelo experimental de infecção com <i>Strongyloides venezuelensis</i> em camundongos	22
2.2.1 Morfologia de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	22
2.2.2 Ciclo evolutivo do <i>Strongyloides venezuelensis</i> no camundongo	25
2.2.3 Mecanismos de resistência á infecção por <i>Strongyloides venezuelensis</i>	27
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Camundongos utilizados nos experimentos	32
4.2 Parasito	32
4.3 Indução do etilismo agudo	32
4.4 Indução dos episódios de etilismo agudo associado à ingestão crônica do etanol	32
4.5 Infecção com <i>Strongyloides venezuelensis</i>	33
4.6 Avaliação da infecção com <i>Strongyloides venezuelensis</i>	34
4.6.1 Contagem dos ovos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> nas fezes	34
4.6.2 Contagem de larvas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> no pulmão	36
4.6.2.1 Análise histopatológica do pulmão.....	36
4.6.3 Contagem de fêmeas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> no intestino	36
4.6.4 Contagem de leucócitos totais e de eosinófilos no sangue circulante	37
4.7 Delineamento experimental	37
4.8. Análise estatística	40
4.9 Aspectos éticos	40
5. RESULTADOS	40
5.1 Contagem dos ovos nas fezes	40
5.1.1 Um episódio de etilismo agudo	40
5.1.2 Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico.....	42
5.2 Recuperação de larvas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> do pulmão	44

5.2.1 Um episódio de etilismo agudo	44
5.2.2. Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico.....	45
5.2.3. Análise histopatológica do pulmão.....	45
5.3 Recuperação de fêmeas partenogênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> no intestino delgado	46
5.3.1 Um episódio de etilismo agudo	46
5.3.2 Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico.....	47
5.4 Contagem de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante	48
5.4.1 Contagem global de leucócitos no sangue circulante	48
5.4.2 Contagem de eosinófilos no sangue circulante	49
5.4.2.1 Um episódio de etilismo agudo	49
5.4.2.2 Episódios repetidos de intoxicação aguda em animais submetidos a ingestão crônica do etanol.....	50
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	56
8. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Infecções produzidas por nematóides gastrintestinais são altamente prevalentes na população humana, sendo consideradas um problema de Saúde Pública em países em desenvolvimento localizados em regiões tropicais e subtropicais. Há uma estimativa de que mais de 25% da população mundial encontra-se infectada por nematóides (MONTEIRO et al., 1988; WHO, 1987; CHAN, 1997; CROMPTON, 1999). Entre os nematódeos parasitos intestinais de grande impacto na saúde humana está o *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1896).

Nematóides do gênero *Strongyloides* pertencem à Classe Secernentea, Ordem Rhabditida e família Strongyloididae (ADAMSON, 1987). Foram descritas 52 espécies de *Strongyloides*, sendo que apenas *S. stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni* são capazes de infectar os seres humanos. *Strongyloides fuelleborni* é originalmente encontrado em primatas. Entretanto, tem sido responsável pela infecção em humanos, em algumas áreas restritas da África, Ásia e Oceania (ASHFORD et al., 1992; GROVE, 1996).

Strongyloides stercoralis possui uma particularidade importante que é a de realizar um duplo ciclo evolutivo, ocorrendo um no hospedeiro humano (ciclo direto ou homogônico ou partenogenético) e o outro no solo (ciclo indireto ou heterogônico ou de vida livre). As larvas infectantes ao penetrarem na pele, migram pela corrente sangüínea até o pulmão. Logo após atravessarem a membrana alveolar, chegam à faringe, sendo deglutidas e deslocadas para o intestino delgado. A partir daí, as larvas sofrem maturação e se transformam em fêmeas adultas partenogenéticas. Estas fêmeas fazem a postura dos ovos que eclodem ainda na intimidade da mucosa do intestino delgado, eliminando larvas rhabditóides na própria mucosa intestinal, que são eliminadas para o meio externo pelas fezes. As larvas rhabditóides eliminadas nas fezes podem seguir dois ciclos: direto ou partenogenético, em que as larvas rhabditóides chegam ao exterior junto com as fezes e em condições ambientais favoráveis transformam-se em larvas filarioides infectantes; e o indireto ou de vida livre, no qual as larvas rhabditóides eliminadas junto com as fezes, quando em contato com o solo, evoluem em machos e fêmeas de vida livre e após a cópula a fêmea inicia a oviposição. Os ovos, já no solo e em condições favoráveis de temperatura e umidade, tornam-se embrionados; em seguida, eclodem, pondo em

liberdade as larvas rabditóides que posteriormente se transformam em larvas infectantes (COSTA-CRUZ, 2011).

Embora *S.stercoralis* provoque infecção oligo ou assintomática, com carga pequena de larvas rabditóides nas fezes (GROVE, 1996), as formas graves (hiperinfecção ou formas disseminadas) podem ocorrer quando o equilíbrio parasito-hospedeiro é comprometido (BUONFRATE et al., 2013).

As hiperinfecções e as formas disseminadas da estrogiloidíase são mais freqüentemente relacionadas com: (a) imunossupressão por uso de corticóides, de imunossupressores anti-rejeição de enxertos e de quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias malignas; (b) infecção com HTLV 1 (vírus linfotrópico para células T humanas) (BUONFRATE et al., 2013); (c) infecção pelo vírus HIV, que apesar de causar uma profunda imunossupressão, as formas disseminadas são muito menos freqüentes do que o esperado (VINEY et al., 2004). Além disso, há também, relatos de casos de hiperinfecção não associados à imunodeficiência (MAYAYO et al., 2005; ANDRADE et al., 2007).

Recentemente o etilismo crônico tem sido relatado como facilitador da infecção por *S. stercoralis* (DE-OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002). Como os mecanismos envolvidos na maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos não estão esclarecidos, pretendemos na presente investigação, verificar em um modelo experimental de infecção de camundongos com *Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934), o efeito da intoxicação etílica aguda e crônica na evolução da infecção com o parasito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Associação do com a infecção por *Strongyloides stercoralis*

Tem sido demonstrado, em observações descritivas de serie de casos, que a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas é maior do que em não alcoolistas internados no mesmo hospital (DE-OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002).

O estudo realizado por De-Oliveira et al. (2002) em Uberlândia - MG demonstrou que a prevalência de larvas de *S. stercoralis* nas fezes de pacientes alcoolistas crônicos foi maior do que em pacientes não-alcoolistas admitidos no mesmo hospital, não havendo diferença na prevalência de outros helmintos nos dois grupos. Relataram ainda, que a prevalência foi maior nos pacientes com pancreatite crônica ou com cirrose hepática. Ao discutirem os mecanismos envolvidos nessa maior prevalência, os autores não descartaram a possibilidade de maior facilidade de infecção devido aos hábitos e condições de higiene dos alcoolistas, mas discutem amplamente a possibilidade de que a imunossupressão induzida pelo uso abusivo do etanol esteja envolvida no processo.

Zago-Gomes et al. (2002) também demonstraram maior prevalência de larvas de *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos do que em não alcoolistas internados no mesmo Hospital em Vitória-ES. No entanto, esses autores não mostraram maior prevalência nos cirróticos em relação aos não cirróticos. Por outro lado, mostraram que a prevalência de outros parasitos intestinais não diferiu significativamente entre os alcoolistas e não alcoolistas. Ao discutirem os possíveis mecanismos, os autores admitem as mesmas hipóteses admitidas por De-Oliveira et al. (2002), ou seja, que o etilismo pode estar facilitando a infecção e a autoinfecção devido aos precários hábitos de higiene ou porque está induzindo uma disfunção do sistema imunitário favorecendo a sobrevivência do parasito.

Antes das publicações citadas acima, Gaburri et al. (1997) em Juiz de Fora-MG, relataram maior prevalência de *S. stercoralis* em pacientes com cirrose hepática, sendo maior em pacientes com cirrose alcoólica do que nas de outra etiologia. No entanto, os autores não chamam a atenção no texto, para essa maior prevalência de *S. stercoralis* em cirrose alcoólica estar relacionada ao etilismo.

Outras observações mostram maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos, mas sem comparação com amostras controles. Assim Avendaño et al. (1999) encontraram 5,7% de *S. stercoralis* nas fezes de 106 alcoolistas crônicos na Costa Rica. Os autores não usaram controles, mas a prevalência observada foi maior do que a prevalência de 0,9% relatada após um inquérito nacional sobre parasitos intestinais, ainda que os métodos empregados no inquérito tenham sido menos sensíveis do que o utilizado na amostra de alcoolistas. Adedayo et al. (2002) também relataram 27 casos de estrogiloidíase disseminada na ilha de Dominica, no Caribe, entre os quais doze pacientes (44%) tinham um histórico de etilismo crônico. Observaram os autores que o etilismo crônico poderia ser um fator associado com a disseminação de *S. stercoralis*.

Avaliando a prevalência de *S. stercoralis* em pacientes HIV positivos em Uberlândia, Silva et al. (2005) mostraram que a prevalência de *S. stercoralis* em pacientes HIV positivos alcoolistas crônicos era significativamente maior do que nos HIV positivos não alcoolistas. Observação semelhante foi feita em Vitória-ES, onde Gonçalves (2011) mostrou que a prevalência de *S. stercoralis* em pacientes HIV positivos era maior do que em HIV negativos quando havia etilismo crônico associado.

Há, portanto, evidências indicando que há uma associação positiva entre etilismo crônico e a prevalência de infecção com *S. stercoralis*. Essa associação foi reforçada por Marques et al. (2010) que demonstraram que a prevalência de larvas rabditóides nas fezes é diretamente proporcional a quantidade de etanol ingerida diariamente.

Embora todos os autores que relataram a prevalência maior de *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos tenham levantado a hipótese de que a imunodeficiência induzida pelo etanol seja responsável pela facilitação da instalação do parasito, apenas Marques et al. (2010) fazem uma discussão mais detalhada levantando várias hipóteses para explicar a maior frequência do parasito em alcoolistas crônicos, resumidas a seguir: (a) pobre padrão de higiene do alcoolista favorecendo a infecção exógena e a autoinfecção perianal (*larva currens*); (b) redução da motilidade intestinal induzida pelo etanol, aumentando a permanência de larvas no intestino, favorecendo a autoinfecção; (c) imunossupressão da imunidade adaptativa ou inata, induzida pelo etanol favorecendo a autoinfecção e a sobrevivência do

parasito; (d) alteração no metabolismo de esteróides; (e) desregulação da resposta imunitária com alteração na produção de anticorpos e da imunidade celular que interferem na diferenciação das larvas do parasito.

De-Oliveira et al. (2002) e Zago-Gomes et al. (2002) consideraram a imunossupressão da resposta adaptativa, como possível mecanismo da maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas. No entanto a resposta Th2 não parece comprometida pelo consumo do etanol (GONZÁLEZ-QUINTELA et al., 1999; DOMÍNGUEZ-SANTALLA et al., 2001). Como a resistência ao parasito é predominantemente decorrente de resposta Th2 (NEVA et al., 1998; PORTO et al., 2001), aparentemente preservada no alcoolista (KROLEWIECKI et al., 2001), fica difícil admitir que a imunossupressão seja o mecanismo fundamental na maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas. Por outro lado, o etanol interfere na imunidade inata (SZABO & MANDREKAR, 2009), principalmente na atividade de fagócitos e do complemento, ambos importantes na resistência ao parasito nas fases iniciais da infecção (GALIOTO et al., 2006; PADIGEL et al., 2006).

Como o parasito se dissemina com frequência após uso de corticóides, foi admitido que o mecanismo dessa disseminação estivesse ligado não à imunossupressão em si, mas ao fato de que metabólitos de esteróides possam mimetizar as ecdisonas, hormônios que atuam na diferenciação das larvas filarióides infectantes. Como o etanol interfere no eixo hipotálamo-hipófise com aumento da secreção de glicocorticóides (OGILVIE et al., 1998), e no fígado aumentando a atividade do retículo endoplasmático (LIEBER, 1997) onde os esteróides são metabolizados, isto poderia resultar no aumento da produção de possíveis metabólitos ecdisonas-símile (GENTA, 1992). Este poderia ser um mecanismo envolvido na facilitação da autoinfecção em alcoolistas.

A possibilidade de uma alteração na resposta imunitária do hospedeiro interferir na evolução do parasito é sustentada pela observação experimental que a ausência de anticorpos anti-*Strongyloides ratti* favorece a diferenciação direta de larvas filarióides infectantes, enquanto que a presença dos anticorpos favorece a diferenciação de machos e fêmeas de vida livre em roedores (HARVEY et al., 2000). Em pacientes com AIDS foi demonstrado uma relação inversa entre o número de LT CD4+ e o desenvolvimento direto das larvas rabióides em machos e fêmeas de vida livre, desfavorecendo o desenvolvimento direto em larvas filarióides infectantes

(VINEY et al., 2004). Esse dado mostra, indiretamente, uma influência da resposta imunitária no desenvolvimento do *S. stercoralis*, reforçando a idéia de que a resposta imunitária regula o desenvolvimento do parasito. É possível, portanto, que em alcoolistas crônicos haja uma desregulação do sistema imunitário que favoreça a diferenciação em larvas filarióides ainda no tubo digestivo, facilitando a autoinfecção e, por conseqüência, a persistência do parasito no duodeno.

2.2 Modelo experimental de infecção com *Strongyloides venezuelensis* em camundongos

Strongyloides venezuelensis é uma das 52 espécies de nematóides do gênero *Strongyloides* (Rhabditida, Strongyloididae) e parasito roedores (WERTHEIM, 1970). Foi isolado inicialmente de *Rattus norvegicus*, por meio de uma infecção mista de *S. venezuelensis* e *S. ratti*. O isolamento foi feito por infecções sucessivas em ratos da linhagem Wistar, em que a espécie *S. ratti* foi perdida permanecendo somente a espécie *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1934).

Rattus norvegicus é um hospedeiro natural de *S. venezuelensis*, porém este nematóide também infecta facilmente camundongos (*Mus musculus*) e gerbilos (*Meriones unguiculatus*) (SATO & TOMA, 1990; TAKAMURE et al., 1995; NAKAI & AMARANTE, 2001; BAEK et al., 2002; FERNANDES et al., 2008).

Em várias pesquisas acerca da estrogiloidíase tem sido utilizado como modelo experimental o parasito *Strongyloides venezuelensis*, por ser de fácil manutenção em laboratório por passagens seriadas em ratos (WERTHEIM, 1970), além de eliminar uma grande quantidade de ovos; apresenta ainda, passagem pelo pulmão durante a migração das larvas após a infecção, o que é semelhante a *S. stercoralis* (SATO & TOMA, 1990; TAKAMURE, 1995).

2.2.1 Morfologia de *Strongyloides venezuelensis*

As fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* que vivem nas criptas da mucosa do terço anterior do intestino delgado tem comprimento médio entre 2,49 a 2,97 mm, com amplitude entre 2,0 e 3,49 mm; a espessura média varia entre 31 e 40 mm, com amplitude entre 29 e 43 mm (TAIRA et al., 1994). Quando maduras,

apresentam os ovários com os ovos enfileirados que podem ser facilmente observados em fragmentos da mucosa espremidos entre lâminas de vidro (Figura 1).

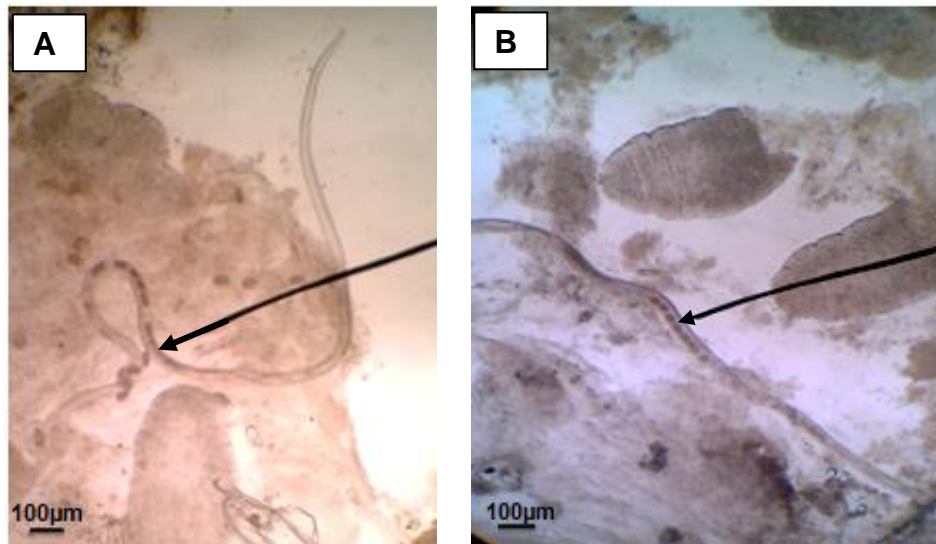


Figura 1 – (A) e (B) Fêmeas partenogênicas com ovos enfileirados na mucosa intestinal de camundongo infectado.

Os ovos são eliminados com as fezes, sem eclosão. São ovais, medindo $52,35 \pm 2,43 \times 25,39 \pm 1,09 \mu\text{m}$ (Figura 2) (BAEK et al., 1998).

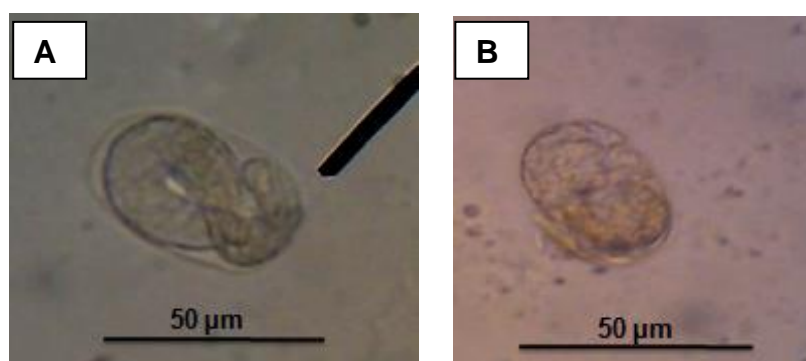


Figura 2 – Ovo de *S. venezuelensis* em fezes de gerbilo: (A) larvado e (B) não larvado

No meio exterior, os ovos eclodem e liberam as lavas rabditóides (L1), que evoluem para larvas L2, e que por sua vez, evoluem para larvas filarióides (L3) infectantes ou passam pra o estágio L4 e dão origem a adultos de vida livre (Figura 3). Segundo Hino et al. (2014), ou não há diferenciação de machos de vida livre na

espécie, ou ela é muito rara, e a diferenciação de fêmeas é um evento muito pouco freqüente (19 casos em 162 culturas feitas pelo autor em três temperaturas: 19°, 25° e 30° C), diferentemente do que acontece com outras espécies de *Strongyloides*, como o *S. ratti* e o *S. stercoralis*. As larvas L3 infectantes apresentam esôfago filariforme, intestino e cauda bifurcada (Figura 4), com comprimento médio de 544 a 590 µm com amplitude entre 470 e 640 µm e com espessura média de 15,6 a 17,9 µm com amplitude entre 14,4 a 19 µm. (TAIRA et al., 1994).

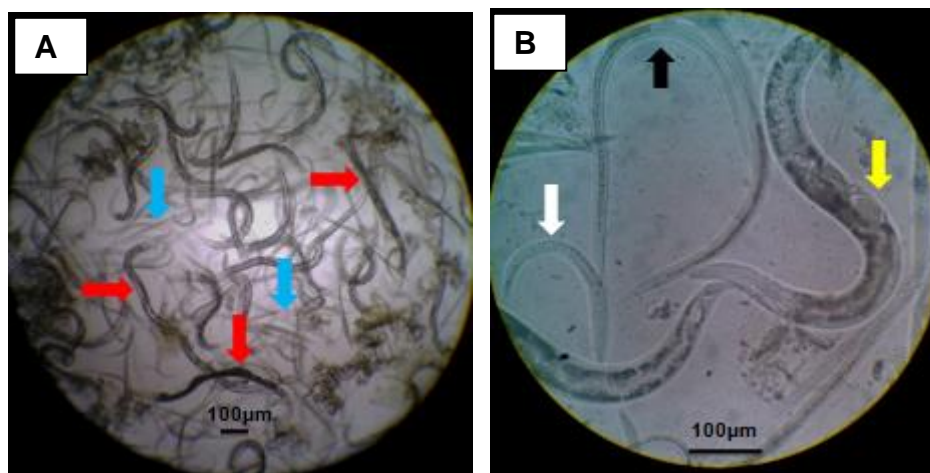


Figura 3: Aspecto microscópico do sedimento do Baerman de cultura de ovos de *S. venezuelensis* em vermiculita no sétimo dia após a incubação. (A) - Larvas (setas azuis) e fêmeas de vida livre (setas vermelhas). (B) - Campo microscópico em maior aumento mostrando larva rabbitóide (seta branca), larva filarióide (seta preta) e fêmea de vida livre na qual pode ser observado um ovo no útero (seta amarela).

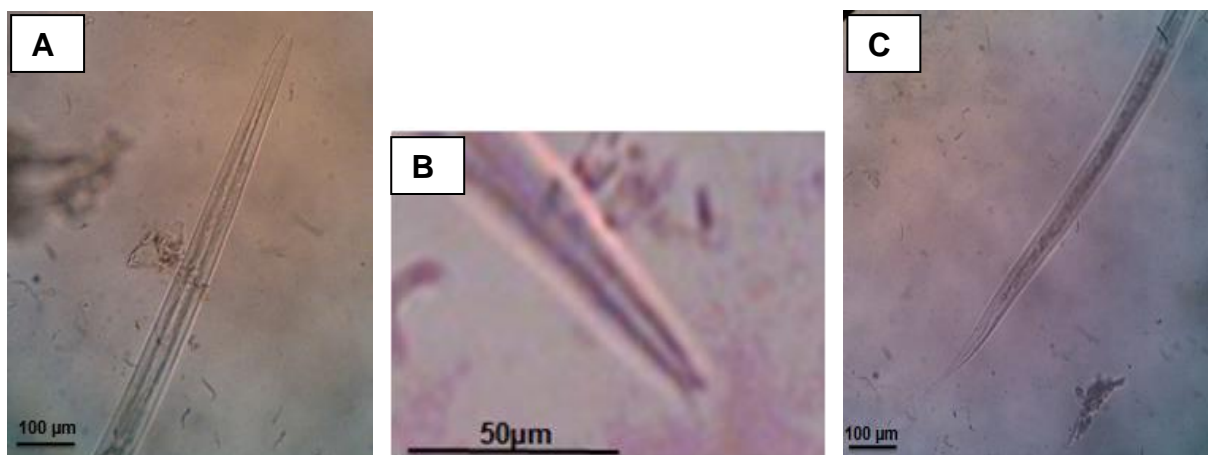


Figura 4: Larva filarióide (L3) de *S. venezuelensis*: (A) Esôfago filariforme, (B) cauda bifurcada e (C) extremidade posterior

2.2.2 Ciclo evolutivo do *Strongyloides venezuelensis* no camundongo

Após inoculação subcutânea de larvas L3 de *S. venezuelensis* em camundongos, a infecção pode ser acompanhada pela contagem de ovos nas fezes ou pela detecção dos vermes no intestino. O intervalo de tempo entre a infecção e a eliminação dos primeiros ovos nas fezes (período pré-patente) e a quantidade de ovos eliminados é variável de acordo com a linhagem e a idade do camundongo e com a quantidade de larvas inoculadas. Esse período pré-patente varia de cinco a seis dias em camundongos de diferentes linhagens e tamanho do inóculo (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; NAKAI & AMARANTE, 2001). O tempo de duração da eliminação de ovos nas fezes (período patente), correspondente ao tempo em que as fêmeas estão presentes e viáveis no intestino, está em torno de 14 dias, também com pequenas variações relacionadas à linhagem e idade do animal e tamanho do inóculo (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; GAZZINELLI & MELO, 2008; MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2014).

Foi demonstrado que o tamanho do inóculo é inversamente proporcional ao comprimento que as fêmeas partenogénicas atingem no intestino, ao início da detecção de ovos nas fezes, e diretamente proporcional ao período patente, ao tempo necessário para que seja detectado um pico na eliminação de ovos, à contagem geral do número de ovos por grama de fezes e à contagem do número de fêmeas partenogénicas recuperadas do intestino (NAKAI & AMARANTE, 2001). Por outro lado nem sempre doses infectantes muito elevadas resultam em uma carga parasitária superior àquelas resultantes de doses menores. No estudo de Nakai e Amarante (2001) que utilizaram inóculos com 500, 1000, 2000, ou 4000 L3 em camundongos, constatou-se que o inóculo de 2000 L3 foi o que resultou em maior número de parasitos adultos no intestino. Os autores admitem que esse achado deve-se provavelmente, ao fato de que inóculos elevados provoquem uma reação imunológica mais acentuada do hospedeiro, resultando na eliminação mais rápida dos parasitos.

Strongyloides venezuelensis possui um ciclo pulmonar em roedores semelhante ao de *S. stercoralis* em humanos (Figura 5). A infecção por *S. venezuelensis* também ocorre pela penetração ativa das larvas filarióides (larvas de 3º estágio ou L3i) pela pele ou mucosa do hospedeiro. Nos inóculos experimentais

em camundongos observa-se que as larvas migram para os músculos esqueléticos, inicialmente no terço inferior do corpo e em seguida para o terço superior, e daí para os pulmões, de onde migram para o intestino (TAKAMURE, 1995). As L3 são capazes de penetrar na pele por meio de uma enzima conhecida como metaloprotease, específica de larva infectante, porém, uma vez dentro dos tecidos dos hospedeiros, perdem a capacidade de penetrar na pele algumas horas depois (MARUYAMA et al., 2006).

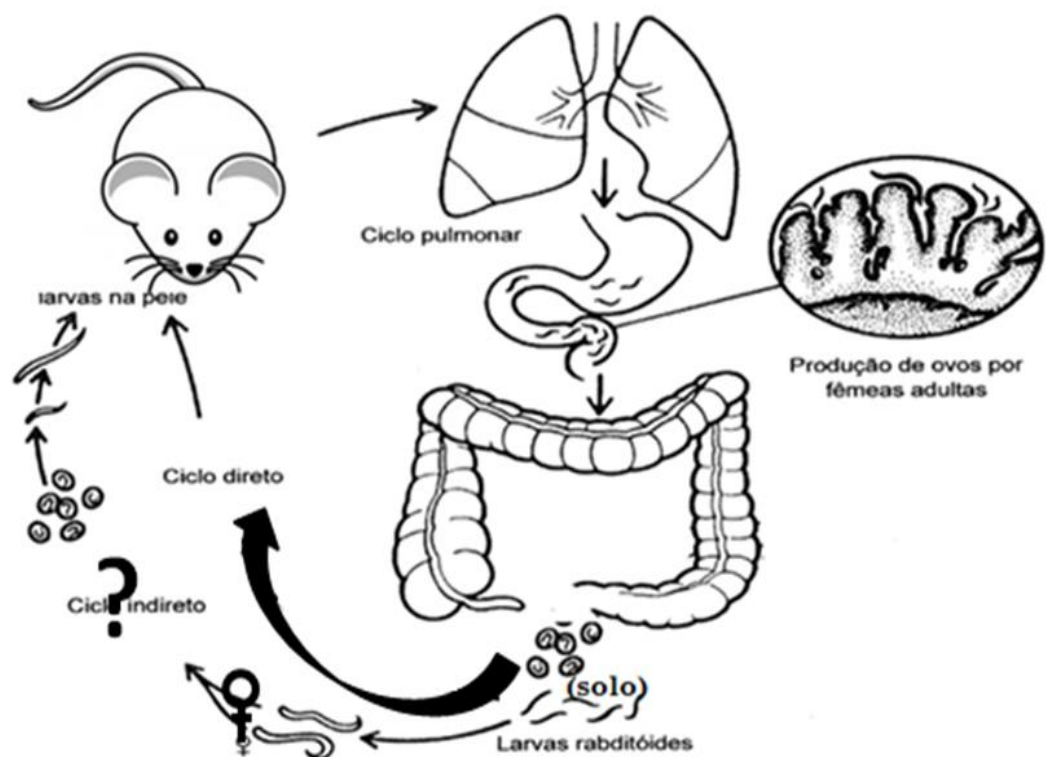


Figura 5: Ciclo evolutivo do *S. venezuelensis* em camundongo.

Fonte: adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfelcAK/parasitologia-helminthos>.

Dos pulmões, onde são detectadas entre um e três dias após inóculo no subcutâneo, as larvas migram gradualmente pelas vias aéreas superiores passando pela faringe, esôfago e estômago até atingir o duodeno onde terminam a maturação e iniciam a postura dos ovos. Fêmeas imaturas podem ser encontradas no intestino a partir do segundo dia após a infecção (SATO & TOMA, 1990). Os vermes adultos de *S. venezuelensis* secretam moléculas de adesão existentes na boca, que desempenham um papel importante na invasão, adesão e estabelecimento na

mucosa intestinal. Essas moléculas de adesão começam a ser secretadas quando as larvas deixam os pulmões (MARUYAMA & NAWA, 1997).

Após o estabelecimento no intestino, as larvas se transformam em fêmeas adultas entre o quinto e sexto dia após infecção, completando seu desenvolvimento e amadurecimento sexual, o que corresponde ao início da postura dos ovos. O pico de eliminação de ovos é observado entre o 6º e 8º dia pós- infecção (DPI), mas na maioria das vezes, o pico ocorre no 7º DPI (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; NAKAI & AMARANTE, 2001). A maioria das fêmeas fica localizada nas porções iniciais do intestino delgado, correspondendo ao duodeno e jejuno (NAKAI & AMARANTE, 2001), onde se alojam entre as células epiteliais e a lâmina própria da mucosa intestinal (PEREIRA, 2008). Diferentemente dos seres humanos infectados com *S. stercoralis* que normalmente eliminam larvas nas fezes, os roedores infectados com *S. venezuelensis* eliminam ovos que podem ser facilmente recuperados (BAEK et al., 2002). As fêmeas adultas começam a ser eliminadas do intestino a partir do 8º, e entre o 10º e o 14º DPI a eliminação se completa (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002). Essa eliminação espontânea se deve a um mecanismo de resistência natural do camundongo a esse parasito, que será discutido a seguir.

No meio ambiente, os ovos do *S. venezuelensis* eclodem e as larvas L1 evoluem na sua maioria para as larvas L3, infectantes. A diferenciação em vermes adultos é muito pouco freqüente, sendo que quando aparecem são sempre fêmeas, de acordo com algumas observações relatadas (HASEGAWA et al., 1988, HINO et al., 2014).

2.2.3 Mecanismos de resistência á infecção por *Strongyloides venezuelensis*.

A resposta imunológica e proteção do hospedeiro contra infecção por nematóides intestinais têm sido estudada na infecção humana e em modelos experimentais. Os resultados mostram mecanismos gerais, comuns aos diferentes parasitos e hospedeiros, entre os quais estão a dependência de células T predominantemente caracterizada por resposta tipo Th2, com produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, responsáveis pela ativação de eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos alternativamente ativados, aumento nos níveis de Imunoglobulina E

(IgE) e IgG4 em humanos (ou IgE e IgG1 em camundongos) e aumento da produção de muco pelas células caliciformes localizadas no epitélio superficial da mucosa (FINKELMAN et al., 1997; ONAH & NAWA, 2000; FINKELMAN et al., 2004; KREIDER et al., 2007; MAIZELS et al., 2009; NAKANISHI, 2010). Esses mecanismos atuam na eliminação dos vermes, com amplas variações dependendo da espécie. Apesar da ênfase na resposta imunitária adaptativa, cada vez mais se demonstra que a resposta imunitária inata é importante co-adjuvante nos mecanismos de resistência aos helmintos (YASUDA et al., 2014).

A resistência à infecção por *S. venezuelensis* depende da imunidade inata e adaptativa, e os sítios de maior contato do parasito com os tecidos do hospedeiro são o pulmão e a mucosa intestinal, onde se desenvolvem reações inflamatórias com eosinofilia, além de alterações epiteliais importantes especialmente a diferenciação de células produtoras de muco (células caliciformes) (EL-MALKY et al., 2003; YASUDA et al., 2014). A expulsão de *S. venezuelensis* depende de mastocitose na mucosa, ativação de mastócitos via $FcR\gamma$ e $FcR\epsilon$ e dos anticorpos IgG1 e IgE (Figura 6) (MATSUMOTO et al., 2013; YASUDA et al., 2014).

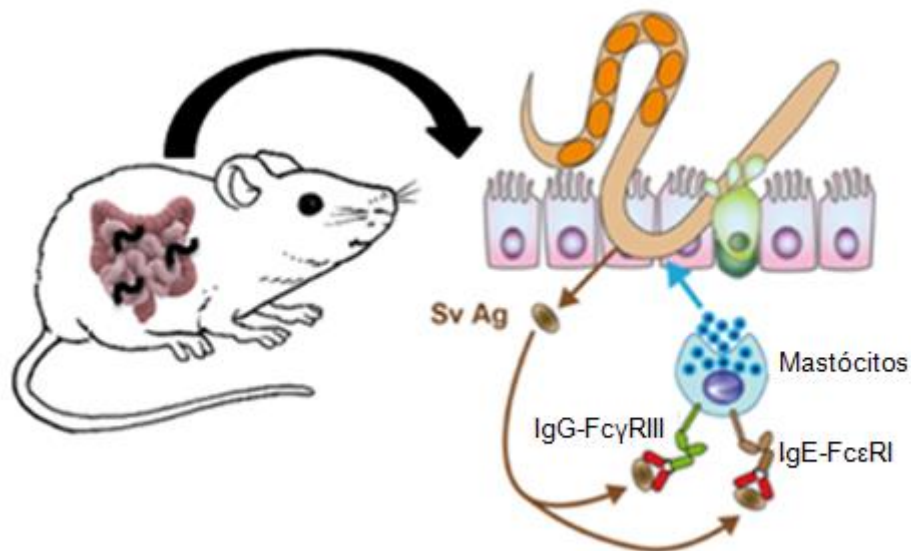


Figura 6: Mecanismo de resistência à infecção por *S. venezuelensis* no intestino

Fonte: adaptado de Yasuda et al. (2014)

Na infecção por *S. venezuelensis* as alterações mais comuns são: (a) instalação de inflamação com exsudato de eosinófilos no pulmão, acompanhada de diferenciação de células caliciformes no epitélio brônquico; a reação pulmonar é semelhante ao que se descreve na síndrome de Löffler em infecção humana por geohelminhos com ciclo pulmonar (YASUDA et al., 2012); (b) mastocitose na mucosa intestinal com infiltrado eosinofílico, inclusive com eosinófilos intra-epiteliais (KHAN et al., 1993; EL-MALKY et al., 2003); (c) eosinofilia circulante a partir do 7º dia após a infecção, aumentando progressivamente até a expulsão dos vermes (YASUDA et al., 2012); (d) aumento nos níveis séricos de IgE e IgG1 (MATSUMOTO et al., 2013).

A inflamação pulmonar é dependente de IL-33, produzida e liberada pelos pneumócitos do tipo II ativados pelas larvas (quitina do revestimento da larva) e que estimula os linfócitos da imunidade inata do tipo 2 (ILC2, - Innate Lymphoid Cells 2). Os ILC2 produzem IL-5 e IL-13 responsáveis por induzir a eosinofilia e a hiperplasia das células caliciformes do epitélio brônquico (Figura 7) (YASUDA et al., 2014).

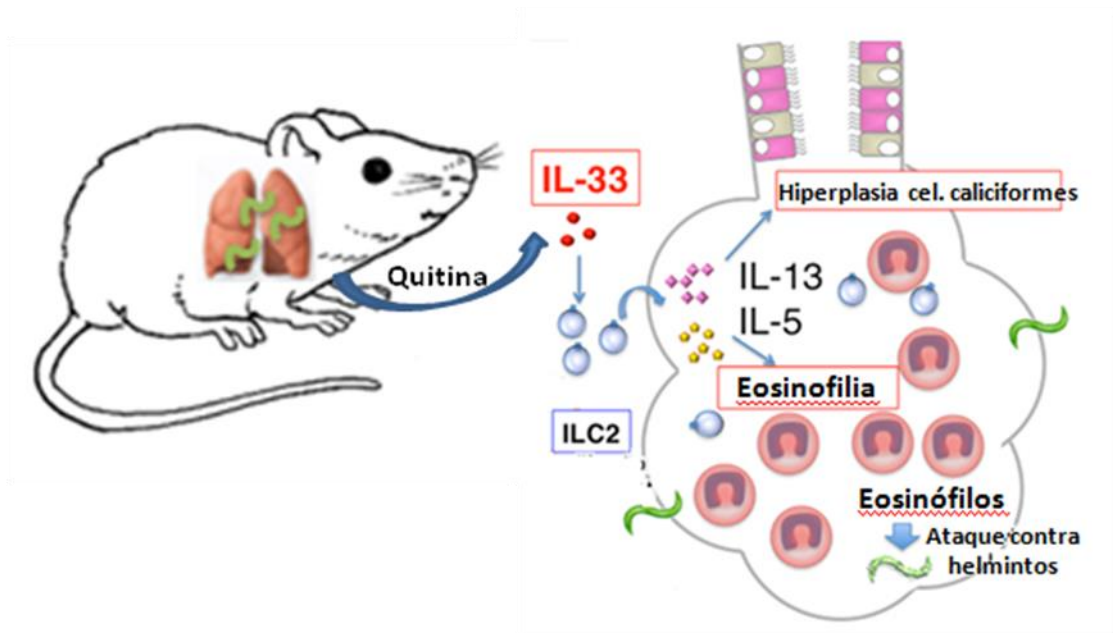


Figura 7: Mecanismo de resistência à infecção por *S. venezuelensis* no pulmão

Fonte: adaptado de Yasuda et al. (2014)

A imunidade adaptativa ao *S. venezuelensis* é do tipo Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pela eosinofilia, mastocitose e hiperplasia de células

caliciformes que ocorre nas mucosas com participação ativa de linfócitos B na produção de anticorpos IgG1 e IgE (Figura 8) (EL-MALKY et al., 2013; YASUDA et al., 2014).

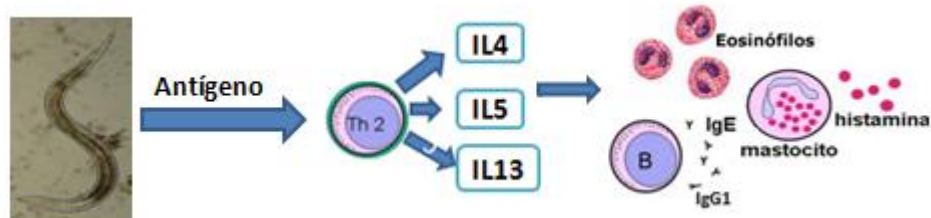


Figura 8: Imunidade adaptativa às larvas de *S. venezuelensis*

A expulsão dos vermes depende da eosinofilia, da mastocitose e da ativação dos mastócitos pelos anticorpos IgG1 e IgE, sendo essa ativação indispensável para a resistência (SASAKI et al., 2005).

Camundongos que expulsaram os vermes após uma primeira infecção tornam-se resistentes a reinfecção. A proteção contra uma nova infecção é demonstrada por redução acentuada no número e na fecundidade das fêmeas. A resistência começa a se manifestar precocemente, já que se demonstra redução de larvas no pulmão e expulsão de larvas do intestino antes de completarem a maturação, demonstrando que existe uma resposta imunitária adaptativa contra as larvas tentando eliminá-las durante o processo de migração (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; FERNANDES et al., 2008; SCHILTER et al., 2010). O mecanismo da expulsão dos vermes inclui a ativação dos mastócitos, os quais liberam mediadores que ativam os movimentos do intestino, especialmente na mucosa (movimento da muscular da mucosa), que impedem os parasitos adultos de invadir a mucosa intestinal do hospedeiro; liberam ainda, glicosaminoglicanos que agem sobre as fêmeas inibindo a ligação de moléculas de adesão de *S. venezuelensis* e conseqüentemente impedindo a sua aderência à mucosa, dificultando a invasão nas criptas (MARUYAMA et al. 2000).

3. OBJETIVOS

Estudar a evolução da infecção causada pelo *S. venezuelensis* em camundongos submetidos a uma intoxicação aguda ou a episódios de intoxicação aguda durante ingestão crônica de etanol, avaliando:

- 1- A cinética de eliminação de ovos, por contagem diária nas fezes até o seu completo desaparecimento;
- 2- O número de larvas nos pulmões 48 horas após a infecção;
- 3- O número de fêmeas partenogênicas no intestino nos dias 8 ou 9 após a infecção;
- 4- O número de eosinófilos circulantes no 2º, 6º, 10º e 14º dia após a infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Camundongos utilizados nos experimentos

Foram utilizados camundongos suíços machos originados do Biotério do Centro de Ciências da Saúde, com 6 semanas de idade e peso médio de 32g, mantidos em gaiolas de plástico com tampas metálicas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Camundongos machos foram utilizados devido à maior frequência de etilismo no sexo masculino e maior susceptibilidade de infecção nesse gênero (RIVERO et al., 2002a e 2002b).

4.2 Parasito

O parasito *Strongyloides venezuelensis* pertence a uma cepa mantida no Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG e tem sido mantido no laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFES, em gerbilos (*Meriones unguiculatus*), infectados subcutaneamente com 1000 larvas filarióides (L3). São utilizados gerbilos para manutenção do *S. venezuelensis* pelo fato desse roedor ser muito susceptível ao nematóide, mantendo infecções persistentes por longos períodos (BAEK et al. 2002).

4.3 Indução do etilismo agudo

Etilismo agudo nos camundongos foi induzido por gavagem, utilizando solução de etanol a 40%, em volume correspondente a 7 mg de etanol/ g de peso corporal. Essa dose de etanol induz uma intoxicação aguda sem mortalidade (CARSON & PRUETT, 1996). Animais controle receberam igual volume de água e foram mantidos com água e ração *ad libitum*.

4.4 Indução dos episódios de etilismo agudo associado à ingestão crônica do etanol

Etilismo crônico nos camundongos foi induzido por ingestão forçada de etanol na água de consumo, acrescido de intoxicação aguda segundo modelo proposto por Bertola et al. (2013), com modificações. Os animais receberam concentrações

crencentes de etanol na água acrescida de edulcorante artificial para estimular o consumo (sacarina sódica associada com ciclamato de sódio): 5% (v/v) durante 7 dias, 10% (v/v) durante 7 dias e 15% (v/v) até o final do experimento. As mamadeiras foram trocadas diariamente tomando-se o cuidado de pesá-las antes e após as trocas para estabelecer a quantidade da solução que foi ingerida pelo camundongo. A partir da 4ª semana, após o início da indução da intoxicação crônica por etanol, os camundongos foram submetidos a um episódio de etilismo agudo (5mg de etanol/g de peso corporal) a cada semana, durante 3 semanas, quando então, foram infectados com larvas L3 de *S.venezuelensis*. Os animais continuaram a receber o etanol após a infecção até o final do experimento. Animais de mesma idade foram mantidos com água e ração *ad libitum*.

4.5 Infecção com *Strongyloides venezuelensis*

Os camundongos foram infectados com larvas L3 de *S. venezuelensis* obtidas pelo cultivo das fezes dos gerbilos, contendo os ovos do parasito, em vermiculita.

Os gerbilos infectados foram colocados em gaiolas contendo jornal umedecido e fundo anticoprofágico por um período de 24 horas. Após esse tempo, as fezes foram recolhidas e colocadas, com o auxílio de palito de picolé, em um frasco de plástico de 250 mL, misturando-as com vermiculita na proporção de 1:2 segundo Ribeiro et al. (2014). O frasco contendo a cultura foi coberto com papel alumínio perfurado, para entrada de ar e incubado em estufa a 28° C durante 5 dias. Verificou-se diariamente o grau de umidade, a homogeneidade e aeração das culturas, para promover condições adequadas para a eclosão das larvas. Após a incubação, as L3 presentes na coprocultura foram isoladas e concentradas pela técnica de Baermann modificada por Moraes (1948). Para a realização desta técnica foi preparado um funil com a mangueira de látex vedada por pinça de Mohr, sobre um suporte de madeira, onde foi adicionada água aquecida a 45°C e uma tampa feita com gazes contendo a cultura de fezes. Após repouso de 60 minutos, a tampa foi retirada e descartada. O material presente no funil foi colocado em tubo cônico e centrifugado a 2000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento analisado no microscópio com objetiva de 4x para a quantificação das larvas e posterior inoculação nos camundongos.

Os camundongos foram inoculados no subcutâneo da parede abdominal, mais próximo da região inguinal, com 700 larvas em volume de 0,1 mL, dose frequentemente utilizada para estudo do parasito em camundongos (PEREIRA, 2008).

4.6 Avaliação da infecção com *Strongyloides venezuelensis*

A infecção por *S. venezuelensis* foi avaliada pela: contagem de ovos eliminados nas fezes; quantificação de larvas recuperadas do pulmão; contagem de fêmeas partenogênicas recuperadas do intestino.

4.6.1 Contagem dos ovos de *Strongyloides venezuelensis* nas fezes

A partir do quinto dia pós-infecção, amostras de fezes foram colhidas todos os dias e pesadas para contagem do número de ovos. Para colheita das fezes, os animais foram colocados em gaiolas com fundo anticoprofágico contendo folhas de jornal umedecido abaixo desse fundo. Desse modo, as fezes foram facilmente coletadas a cada 24 horas. Dois gramas de fezes foram diluídos em 30 mL de solução saturada de NaCl. Após agitação, a mistura foi filtrada em peneira de nylon; em seguida foram acrescentados mais 30 mL de solução salina saturada. Sob homogeneização, uma alíquota foi retirada com pipeta Pasteur e aplicada com cuidado, para não formar bolhas de ar, em cada um dos compartimentos da câmara de McMaster até que todo o compartimento fosse preenchido. A câmara foi deixada em repouso por 2 minutos e, logo após, examinada em microscópio com objetiva de 10x. A contagem de ovos foi sempre feita em triplicata.

A contagem foi realizada de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock (1939), modificada, utilizando câmara de McMaster. Esta câmara (Figura 9) apresenta dois compartimentos de contagem, cada um com um quadrado de 1,0 cm x 1,0 cm desenhado na lâmina superior. O espaço entre as duas lâminas é de 0,15 cm. Portanto debaixo de cada quadrado cabe um volume de 0,15 mL (1x1x0,15). Considerando que a câmara tem dois compartimentos e a contagem foi feita nos dois, o número de ovos foi contado em 2x0,15 mL, ou seja em 0,3 mL, sendo considerada a média como o valor de um compartimento. Como as fezes (2g) foram

suspensas em 60mL de solução saturada de NaCl, o número de ovos por grama de fezes (X_g) foi obtido após o seguinte cálculo:

$$X_g = \frac{N \times 60}{0,15} \div 2$$

Onde N é o número de ovos contados em cada quadrado (em 0,15 ml), 60 é o volume da suspensão, 0,15 é o volume da câmara e 2 representa as duas gramas de fezes suspendidas. Como os valores 60, 0,15 e 2 são constantes, a fórmula pode ser simplificada para:

$$X_g = N \left(\frac{60}{0,15} \div 2 \right); X_g = N \times 200$$

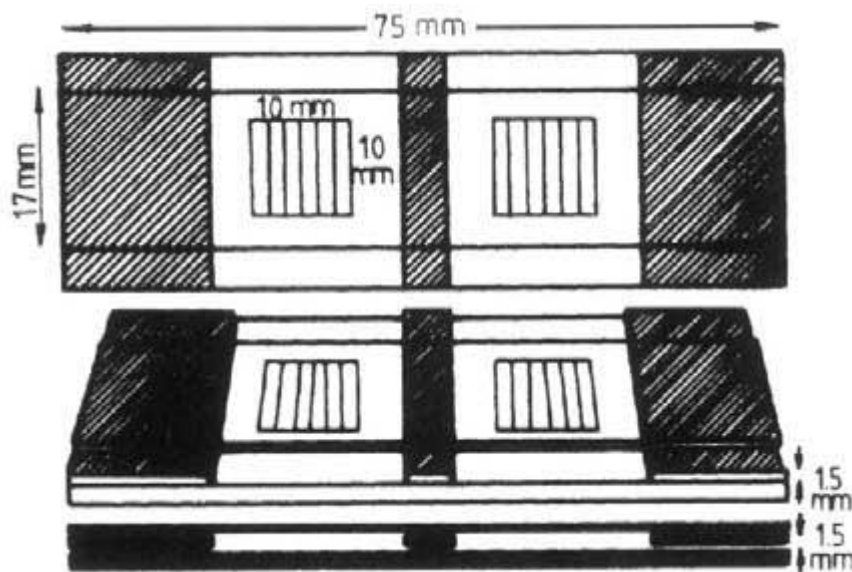


Figura 9 - Câmara de McMaster em vistas frontais e em corte para mostrar a distancia entre as duas lâminas.

A contagem de ovos por grama de fezes foi realizada até que três avaliações consecutivas fossem negativas. Após a última contagem de ovos, os camundongos foram eutanasiados para avaliar a presença de vermes adultos no intestino delgado.

4.6.2 Contagem de larvas de *Strongyloides venezuelensis* no pulmão

Para a realização da contagem de larvas no pulmão, os animais foram sacrificados com sobredose de uma mistura de cloridrato de cetamina com cloridrato de xilazina por via intraperitoneal.

As larvas presentes no pulmão foram quantificadas 48 h após a infecção, conforme descrito por Pereira (2008). O lobo pulmonar esquerdo foi dissecado, fragmentado com tesoura e colocado sobre tela de nylon em um béquer com salina (0,85% NaCl), o qual foi mantido a 37° C em banho-maria por 4 horas, para migração das larvas do parênquima pulmonar para a solução. Após este período, o material foi concentrado por centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi analisado ao microscópio óptico para quantificação das larvas.

4.6.2.1 Análise histopatológica do pulmão

Após o sacrifício dos animais o lobo pulmonar superior direito foi fixado imediatamente em Bouin a 1:4 em salina, incluído em parafina para estudo histopatológico, com o intuito de analisar as alterações do tecido, causadas pela passagem das larvas no mesmo.

4.6.3 Contagem de fêmeas de *Strongyloides venezuelensis* no intestino

Para recuperação de fêmeas de *S. venezuelensis* utilizamos o método descrito por Pereira (2008). Após a contagem dos ovos, no 8º dia (experimento de etilismo agudo) ou no 9º dia (experimento de etilismo crônico) após a infecção, os animais foram eutanasiados como descrito para coleta dos pulmões. Todo o intestino delgado dos animais infectados, controles e alcoolistas, foi retirado. O intestino foi aberto longitudinalmente, colocado sobre tela de nylon dentro de um béquer contendo solução salina (0,85% NaCl), incubado em banho maria por 4h a 37°C para migração das fêmeas partenogenéticas da mucosa intestinal para a solução. Após este período as fêmeas depositadas no fundo do béquer foram concentradas por centrifugação e quantificadas com auxílio de microscópio óptico.

4.6.4 Contagem de leucócitos totais e de eosinófilos no sangue circulante

A contagem dos leucócitos e eosinófilos circulantes no sangue foi realizada no 2º, 6º, 10º e 14º após a infecção. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina/Xilazina. Depois de anestesiados, foi realizada a coleta de sangue através da técnica preconizada por Hoffmann (1963), que consiste em puncionar o plexo orbital existente nos mamíferos, com um tubo capilar umedecido com EDTA, entre o glóbulo ocular e o fundo da cavidade orbitária. Foram colhidos 50µL de sangue em cada punção.

A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer. A partir do sangue colhido com EDTA, foi feita a diluição de 1:20 com o líquido Turk (hemolítico) e, em seguida, foram contados os leucócitos dos 4 quadrantes laterais da câmara. Os valores foram expressos em leucócitos/mm³ de sangue.

Para a contagem diferencial de eosinófilos circulantes foram feitos esfregaços sanguíneos a partir do sangue coletado no momento da sangria. Estes esfregaços foram imediatamente corados com corante panótico rápido (Instant Prov – Newprov; Paraná, Brasil) e examinados com objetiva de imersão (100x) para contagem diferencial dos leucócitos. O resultado foi expresso em leucócitos/mm³ de sangue (valor absoluto) de cada tipo celular.

4.7 Delineamento experimental

Em todos os experimentos para avaliar o efeito da intoxicação etílica aguda, os animais foram infectados uma hora após a gavagem (gv) (Figura 9). Procedimento semelhante foi feito no modelo de etilismo crônico: os animais, que estavam ingerindo etanol a 15%, foram infectados uma hora após o terceiro episódio de etilismo agudo (Figura 10).

Para avaliação da eliminação dos ovos, contagem das larvas no pulmão e dos vermes adultos no intestino e contagem de eosinófilos no sangue periférico, foi utilizado 10 camundongos machos para cada experimento (cinco submetidos à intoxicação alcoólica e cinco controles).

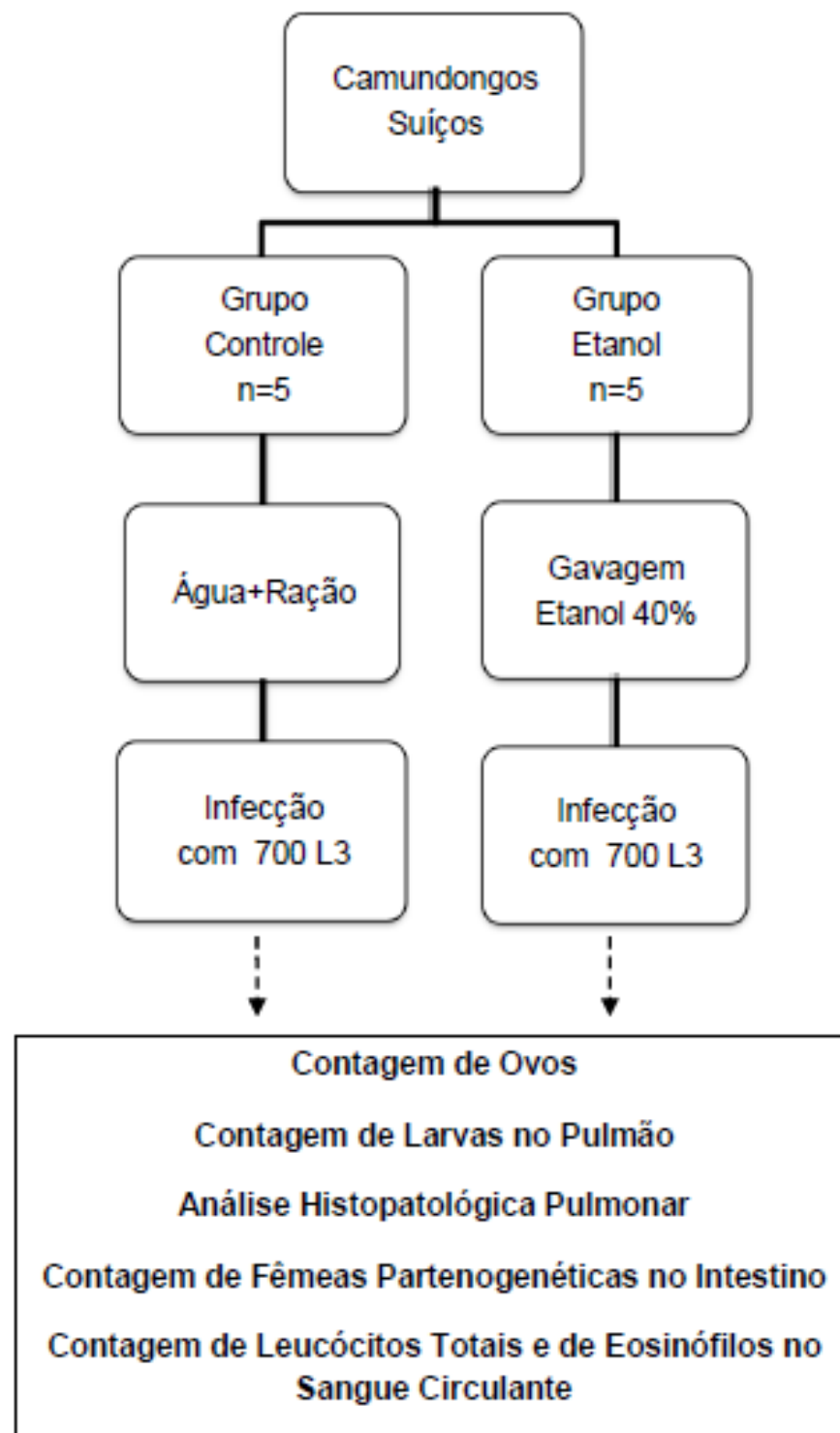


Figura 10 - Delineamento experimental do etilismo agudo.

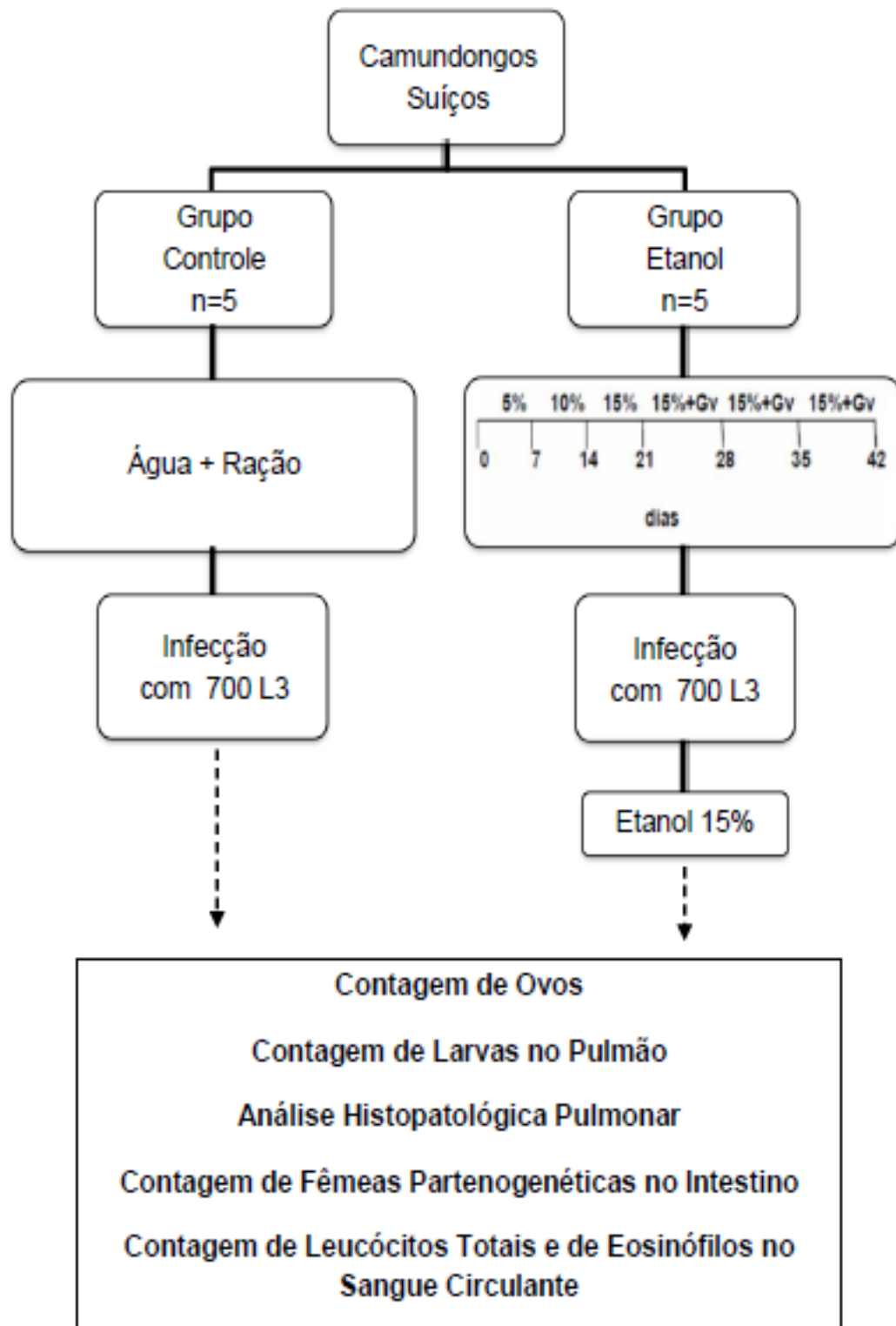


Figura 11 - Delineamento experimental do etilismo crônico

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como medianas e intervalos interquartílicos. A comparação das medianas das variáveis quantitativas (OPG, número de larvas no pulmão, número de fêmeas no intestino e número de leucócitos e eosinófilos no sangue periférico) foi feita pelo teste não paramétrico Wilcoxon, com utilização do software GraphPad Prism 6.0. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. A comparação da ovoposição (OPG) ao longo do tempo foi feita comparando as áreas sob as curvas obtidas com o grupo controle e o experimental.

4.9 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFES (nº do protocolo 035/2011).

5. RESULTADOS

A realização de culturas a partir de gerbilos infectados possibilitou a obtenção de ovos durante todo o período da pesquisa. A utilização da vermiculita como meio de cultura mostrou também excelentes resultados, com culturas positivas na grande maioria dos casos. As culturas eram analisadas no quinto ou sexto dia de incubação para a obtenção de larvas L3. Raramente observamos formas adultas do parasito.

Os animais alcoolizados apresentaram sinais de intoxicação etílica aguda instantes depois da ingestão de etanol, evidenciada pelo andar cambaleante, arrepiamento da pelagem, falta de coordenação motora e imobilidade por entrarem em estado de coma superficial, do qual se recuperavam 40 a 60 minutos depois. Portanto, a dose de etanol utilizada nos experimentos foi suficiente para induzir uma intoxicação aguda em todos os animais que apresentaram sinais evidentes de alterações no movimento e nos níveis de consciência, sem terem sido levados a um estado de coma profundo, irrecuperável.

5.1 Contagem dos ovos nas fezes

5.1.1 Um episódio de etilismo agudo

Os resultados da contagem de ovos nas fezes dos camundongos submetidos à intoxicação etílica aguda e nos correspondentes controles estão representados na Figura 12. Nos dois grupos a eliminação de ovos começou no sexto dia; no grupo controle foi negativa no 15º DPI e no grupo etanol a eliminação de ovos foi negativa no 18º DPI. Após a última contagem de ovos, não foi observado presença de fêmeas no intestino delgado. O número de ovos foi significativamente maior no grupo intoxicado com o etanol ($p < 0,05$). A área sob a curva foi significativamente maior (Figura 13). As curvas mostraram-se semelhantes quanto ao formato, com os picos de ovoposição no 8º dia.

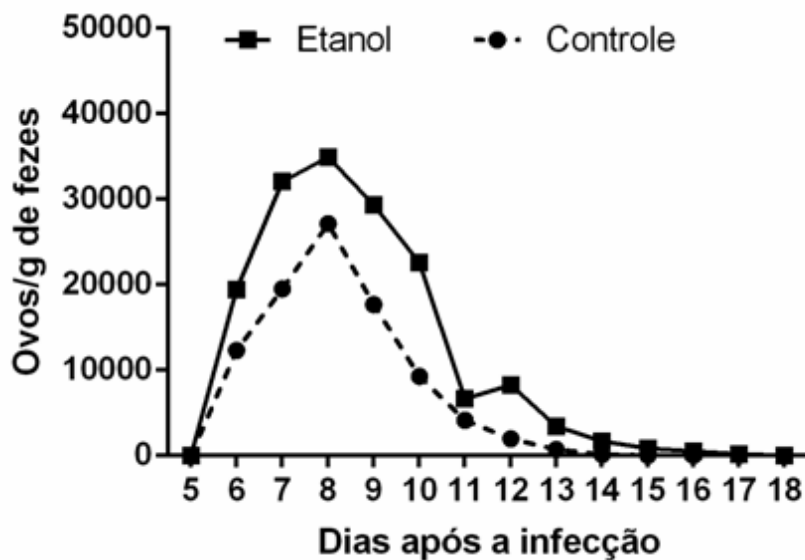


Figura 12 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos infectados por *S. venezuelensis* e submetidos ao etilismo agudo e do grupo controle correspondente, analisados diariamente após a infecção com 700 L3 de *S. venezuelensis* até a completa negatização da eliminação de ovos.

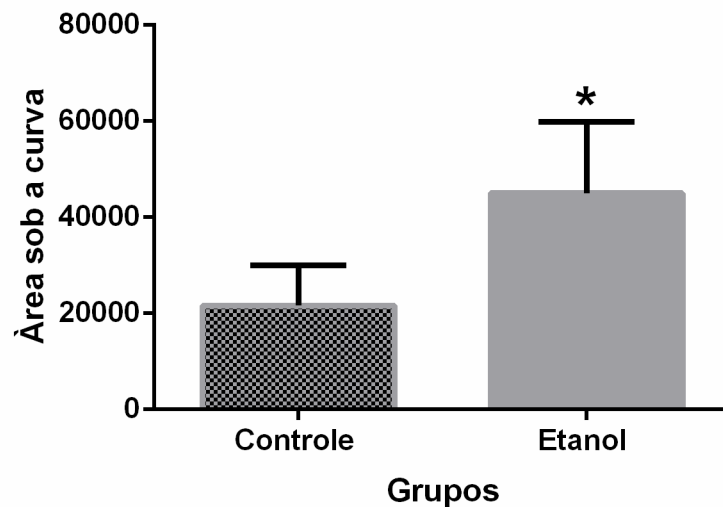


Figura 13 - Quantificação diária da eliminação de ovos entre o 5º e o 18º dia após a infecção com *S. venezuelensis* em camundongos com intoxicação etílica aguda e seus respectivos controles, baseado na curva de eliminação. As barras representam a média e o erro padrão da média, * $p < 0,05$.

5.1.2 Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico

O resultado da contagem de ovos nas fezes dos camundongos submetidos a um modelo de etilismo crônico intercalado com três episódios de etilismo agudo (grupo etanol) e dos respectivos controles está representado na figura 14. A eliminação de ovos foi significativamente maior no grupo etanol ($p < 0,05$). Como pode ser observado, a ovoposição foi iniciada no 6º dia nos dois grupos e negativou a partir do 16º dia no grupo controle e a partir do 18º no grupo etanol. Após a última contagem de ovos, não foi observado a presença de fêmeas no intestino delgado. A forma da curva foi, assim como no experimento com etilismo agudo, semelhante quanto ao formato nos dois grupos com pico do número de ovos no 9º dia após a infecção. A área sob a curva foi significativamente maior no grupo etanol (Figura 15).

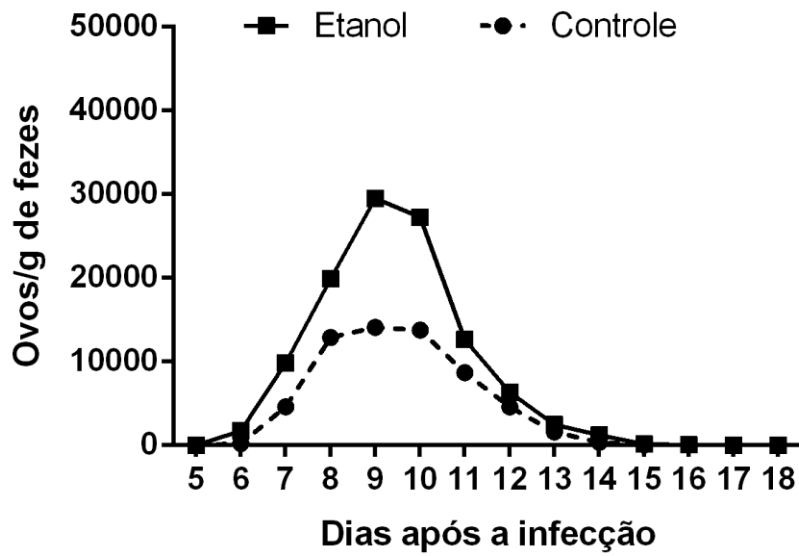


Figura 14 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos infectados com *S. venezuelensis* e submetidos ao etilismo crônico com três episódios de etilismo agudo e do grupo controle correspondente, analisados diariamente após a infecção com 700 L3 de *S. venezuelensis* até a completa negatização da eliminação dos ovos.

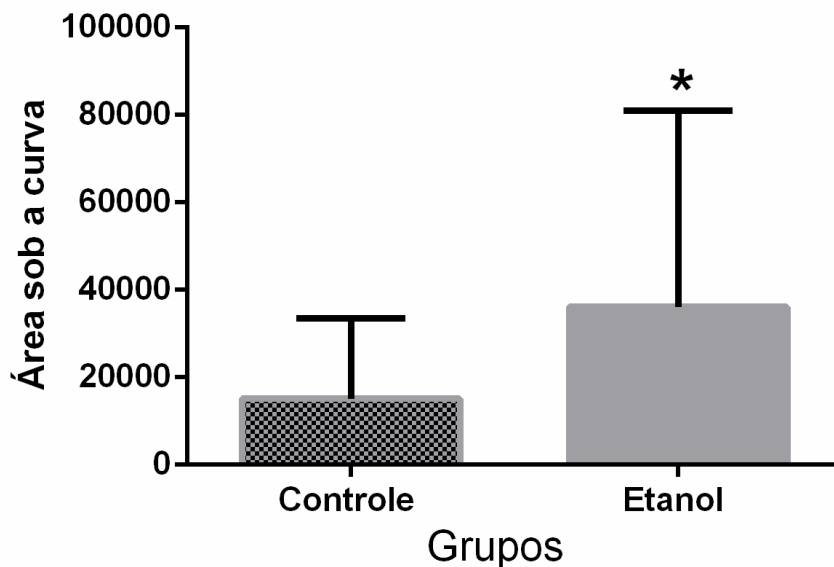


Figura 15 - Quantificação diária da eliminação de ovos entre o 5º e o 18º dia após a infecção com *S. venezuelensis* em camundongos que receberam três episódios de intoxicação aguda, mantidos com ingestão crônica do etanol e seus respectivos controles, baseado na curva de eliminação. As barras representam a média e o erro padrão da média, * $p < 0,05$.

5.2 Recuperação de larvas de *Strongyloides venezuelensis* do pulmão

5.2.1 Um episódio de etilismo agudo

O aspecto macroscópico dos pulmões nos dois grupos foi semelhante, com numerosas áreas hemorrágicas distribuídas bilateralmente (Figura 16). A recuperação de larvas nos pulmões 48h após a infecção com *S. venezuelensis* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) e mostrou mediana de 40 (IQ: 32-70) larvas no grupo etanol e mediana de 33,5 (IQ 11-49,5) no grupo controle (Figura 17).



Figura 16 - Pulmão de camundongo 48 horas após a infecção com *S. venezuelensis*, apresentando pontos hemorrágicos

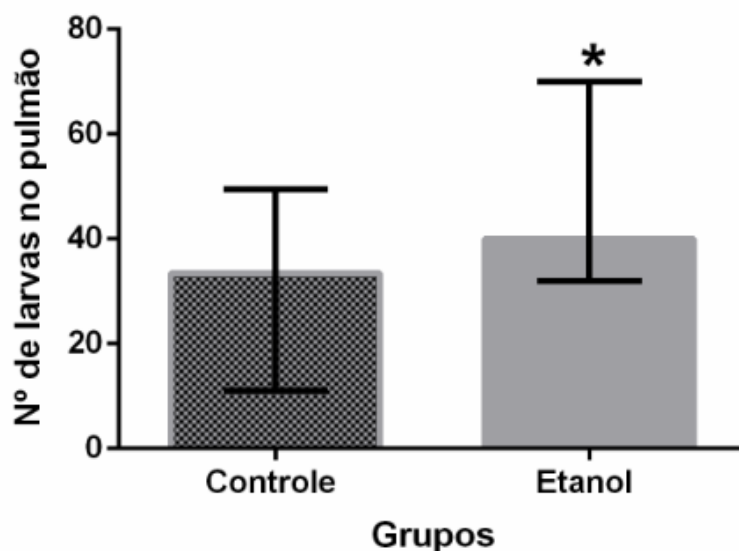


Figura 17 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo e de camundongos do grupo controle 48h após a infecção com *S. venezuelensis*. As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico. * $p < 0,05$

5.2.2 Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico

O aspecto macroscópico dos pulmões foi semelhante ao observado no experimento de etilismo agudo, sendo frequentes os focos hemorrágicos distribuídos bilateralmente. Ao contrário do observado no experimento de intoxicação aguda, nos animais que receberam três episódios de intoxicação aguda durante a ingestão crônica do etanol, o número de larvas foi menor do que no grupo controle (respectivamente: medianas de 18 (IQ: 5 - 71,5) e 45 (IQ: 30,5 - 101,5). Porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 18).

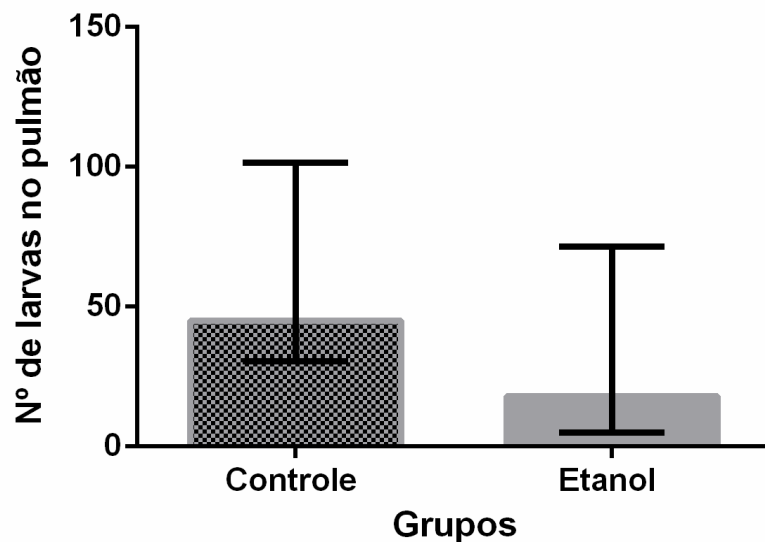


Figura 18 - Número de larvas recuperadas do lobo esquerdo do pulmão de camundongos submetidos à intoxicação crônica com etanol e a três episódios de etilismo agudo e de camundongos do grupo controle 48h após a infecção com *S. venezuelensis*. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil.

5.2.3. Análise histopatológica do pulmão

Nos dois experimentos (um episódio ou três episódios de etilismo agudo), o aspecto microscópico dos pulmões 48h após a infecção mostrou múltiplos focos de hemorragia intraparenquimatosa, subpleurais ou não, confirmando o aspecto macroscópico observados nos dois modelos de etilismo. Não se observou diferenças

aparentes nas áreas de hemorragia onde o exsudato de leucócitos era extremamente escasso. Curiosamente o número de larvas observadas nos cortes histológicos foi pequeno (Figura 19).

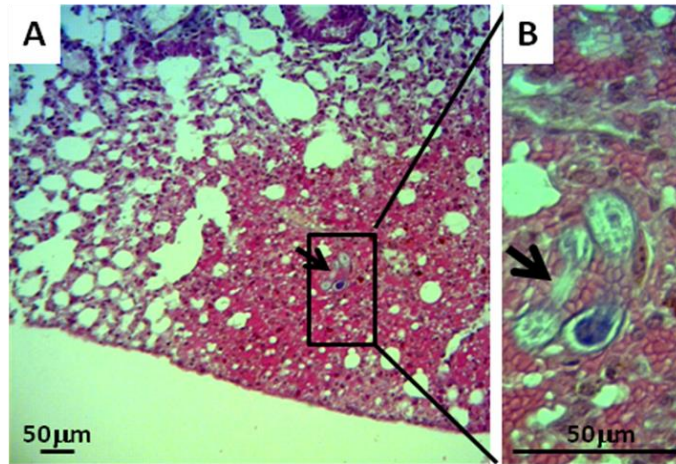


Figura 19 - Aspecto histológico do pulmão 48h após a infecção. (A) Foco de hemorragia no qual se observa uma larva (seta), vista ampliada em (B).

5.3 Recuperação de fêmeas partenogênicas de *Strongyloides venezuelensis* do intestino delgado

5.3.1 Um episódio de etilismo agudo

No grupo submetido ao etilismo agudo, no 8º dia após a infecção foi recuperado um número significativamente maior de fêmeas do que no grupo controle ($p < 0,05$), respectivamente medianas de 121 (IQ 92 - 155,5) e de 58 (IQ 50 - 88,5) (Figura 20).

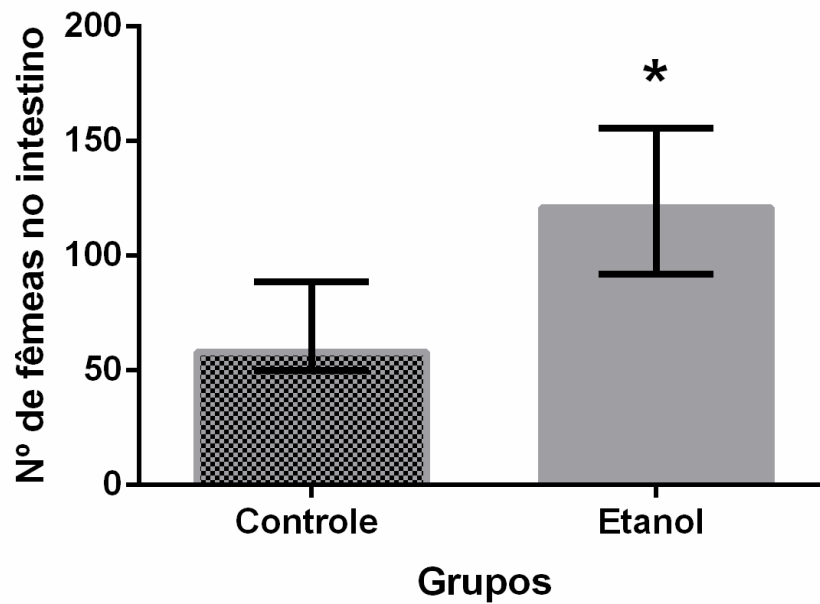


Figura 20 - Número de fêmeas partenogênicas recuperadas do intestino delgado de camundongos submetidos à intoxicação aguda com etanol e de camundongos do grupo controle, no 8º dia após a infecção com *S. venezuelensis*. As barras representam a mediana e o intervalo interquartilico. * $p < 0,05$

5.3.2 Episódios repetidos de etilismo agudo em animais submetidos ao etilismo crônico

No grupo submetido a três episódios de etilismo agudo durante a ingestão crônica de etanol, o número de fêmeas recuperadas no intestino delgado no 9º dia após a infecção foi significativamente maior do que no grupo controle ($p < 0,05$), respectivamente, medianas de 52 (IQ 34 - 73) e de 12 (IQ 1,75 - 24,25) (Figura 21).

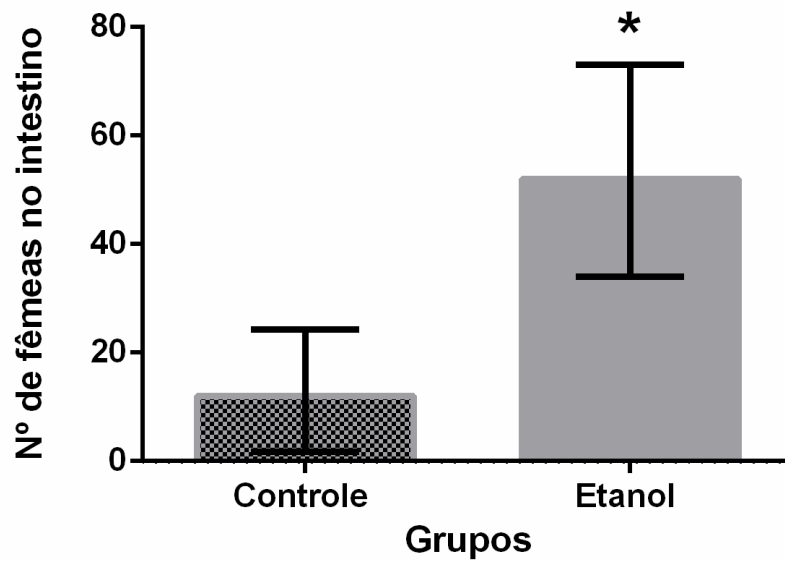


Figura 21 - Número de fêmeas partenogênicas recuperadas do intestino delgado de camundongos submetidos a três episódios de etilismo agudo durante intoxicação crônica com etanol e de camundongos do grupo controle no 9º dia após a infecção com *S. venezuelensis*. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil. * $p < 0,05$

5.4 Contagem de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante

5.4.1 Contagem global de leucócitos no sangue circulante

Os valores referentes às contagens de leucócitos totais em diferentes tempos após a infecção foi semelhante nos dois experimentos (etilismo agudo Figura 22 A e etilismo crônico Figura 22 B). Apesar de haver aparente redução dos leucócitos totais no segundo dia após a infecção, a diferença não foi estatisticamente significativa em nenhum dos intervalos de tempo em que a avaliação foi feita.

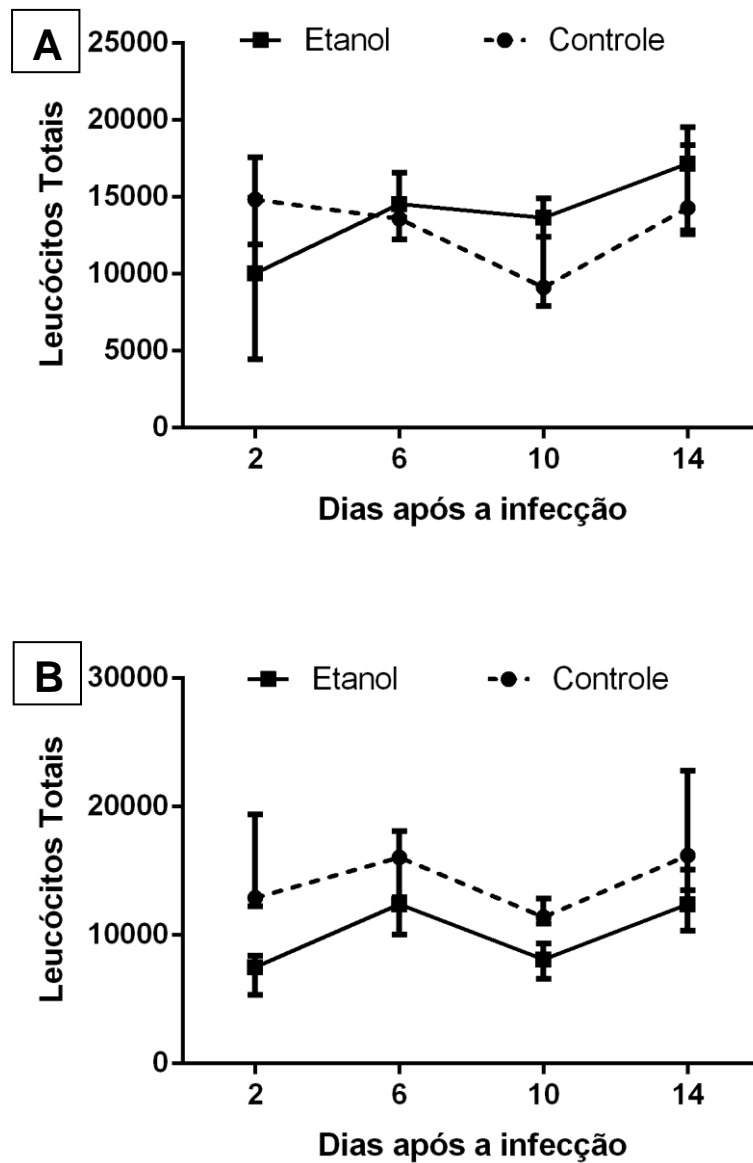


Figura 22 - Número de leucócitos totais no sangue circulante de camundongos infectados com *S. venezuelensis*. (A) camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo e seus respectivos controles; (B) camundongos submetidos a três episódios de etilismo agudo durante intoxicação crônica com etanol. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartil.

5.4.2 Contagem de eosinófilos no sangue circulante

5.4.2.1 Um episódio de etilismo agudo

Os valores referentes à contagem de eosinófilos em diferentes tempos após a infecção, nos grupos etanol e controle, estão apresentados na figura 23. Há uma

tendência não significativa de menor número de eosinófilos no grupo etanol especialmente no 14^o dia após a infecção.

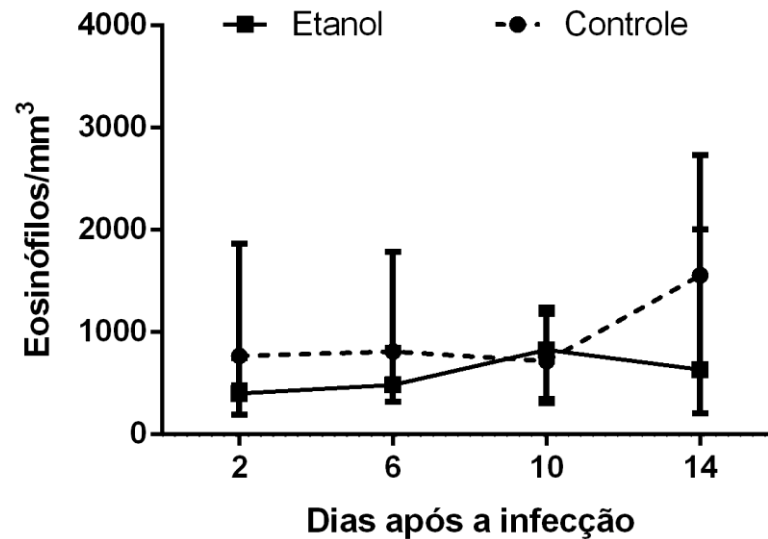


Figura 23 - Número de eosinófilos no sangue circulante de camundongos submetidos a um episódio de etilismo agudo e de seus respectivos controle, infectados com *S. venezuelensis*. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartil.

5.4.2.2 Episódios repetidos de intoxicação aguda em animais submetidos a ingestão crônica do etanol.

Os valores referentes às contagens de eosinófilos no sangue circulante mostraram resultados semelhantes para os grupos etanol e controle (Figura 24). Há menor número de eosinófilos no segundo dia após infecção no grupo etanol, mas a diferença com o grupo controle não foi estatisticamente significativa.

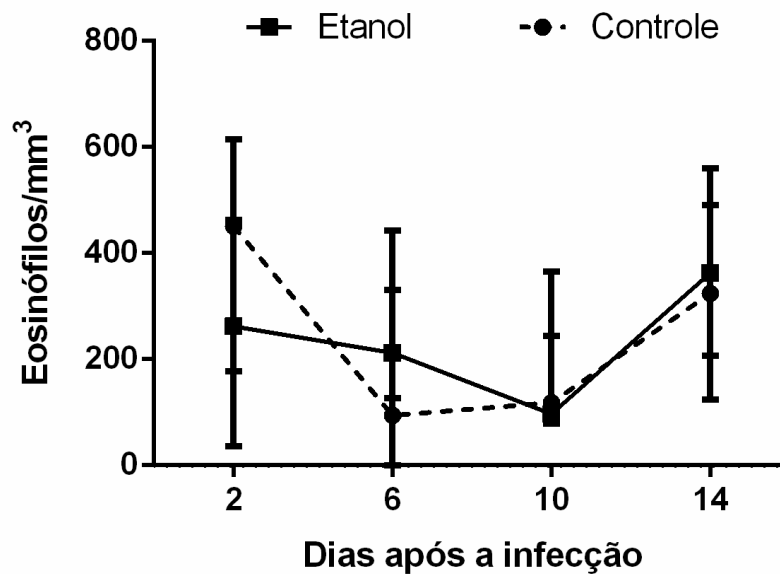


Figura 24 - Número de eosinófilos no sangue circulante de camundongos submetidos à intoxicação crônica com etanol com três episódios de etilismo agudo e de seus respectivos controles, infectados com *S. venezuelensis*. Os pontos representam a mediana e o intervalo interquartílico.

6. DISCUSSÃO

Os camundongos foram infectados com larvas filarióides de *S. venezuelensis* provenientes do cultivo das fezes dos gerbilos (*Meriones unguiculatus*), roedores também conhecidos como esquilo da Mongólia, que foram utilizados para a manutenção de *S. venezuelensis* no laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia. Neste trabalho confirma-se que o gerbilo é ótimo hospedeiro para manter infecções com *S. venezuelensis* por longos períodos de tempo (animais que persistiram infectados por mais de dois anos), como demonstrado por Baek et al. (2002) que mantiveram gerbilos infectados além de 570 dias.

As larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas pelo cultivo das fezes em vermiculita, que se mostrou excelente meio de cultivo, com eclosão de grande quantidade de ovos em praticamente todos os cultivos realizados, confirmando observação do nosso laboratório (RIBEIRO et al., 2014). Utilizou-se cultivos de 5 dias porque em ensaio piloto, as fezes foram cultivadas em diferentes períodos (entre 3 e 7 dias) e o maior número de larvas L3 era obtido no quinto ou no sexto dia. Segundo Machado et al. (2011a), a infectividade de larvas L3 varia com o tempo e temperatura de cultivo e, na observação relatada pelos autores, a maior

infectividade demonstrada pela maior recuperação de fêmeas foi com utilização de larvas obtidas por cultivo de 7 dias a 28°C. Acredita-se que a infectividade das larvas L3 obtidas após 5 dias de coprocultura foi boa porque sempre havia recuperação de fêmeas após a infecção.

Quanto ao modelo de etilismo empregado, foi utilizado o modelo de um episódio de intoxicação aguda, que já é consagrado na literatura (CARSON & PRUETT, 1996). Esse tipo de intoxicação mimetiza o que pode acontecer com humanos onde não é rara a ocorrência do “bebedor de fim de semana”, com ingestão de grande quantidade de bebida alcoólica. Quanto ao outro modelo de episódios repetidos de etilismo agudo no animal submetido à intoxicação crônica, não há informação na literatura. Ele foi introduzido com base em publicação sobre etilismo experimental em camundongo utilizando ingestão forçada de etanol durante 10 dias, seguida de uma intoxicação aguda (BERTOLA et al., 2013). Os autores rotularam esse modelo como de intoxicação crônica no qual observaram focos de infiltração de neutrófilos no fígado (modelo de hepatite alcoólica freqüente no etilista crônico após episódio de etilismo agudo). Com base nesse modelo, foi prolongado a ingestão forçada do etanol durante seis semanas com interpolação de uma intoxicação aguda a cada semana a partir da quarta semana (três episódios de etilismos agudo), continuando os animais a receber o etanol após a infecção até o final do experimento. Acredita-se que esse modelo mimetizaria parcialmente o que ocorre no etilismo crônico humano, frequentemente associado a um aumento da ingestão abusiva nos fins de semana. Embora todos os modelos de etilismo experimental em camundongos sejam criticáveis, eles são os mais fáceis e mostram resultados, especialmente em relação à resposta imunitária, semelhantes ao que se observa em humanos (D’SOUZA EL-GUINDY et al., 2010).

Quanto ao comportamento da infecção com *S. venezuelensis* nos camundongos controles, foi possível observar resultados semelhantes ao que se relata na literatura: o início da eliminação de ovos foi no sexto dia após a infecção. Na literatura é relatado que a ovoposição se inicia no quinto (SATO & TOMA, 1990; MARTINS et al., 2000; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; GAZZINELLI & MELO, 2008; MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA SEQUEIRA et al., 2014) ou sexto dia (AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002), dependendo da linhagem e idade do animal e o tamanho do inóculo. O tempo de maior eliminação de ovos ocorreu no

oitavo ou nono dia após a infecção, um pouco diferente do que é relatado na literatura. A maioria dos autores relatou pico de eliminação de ovos no sétimo dia (GAZZINELLI & MELO, 2008; MARTINS et al., 2009; ESCHENAZI, 2013), tendo alguns relatado no sexto e mesmo no quinto dia, variação decorrente da linhagem utilizada (SATO e TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2014). É possível que a diferença na curva de eliminação de ovos observada nos controles dos nossos experimentos esteja relacionada com o uso de camundongos suíços, não utilizados em nenhuma das pesquisas citadas anteriormente. Por essa razão, foi feita a coleta de fêmeas no intestino delgado no oitavo ou nono dia, correspondendo ao pico de eliminação de ovos nos camundongos suíços. Quanto ao período patente, nos dois grupos controles utilizados, a duração da infecção ficou entre 15 e 16 dias, além dos quais não houve mais eliminação de ovos e nem encontro de fêmeas no intestino delgado. Esse período patente foi ligeiramente maior do que o relatado na literatura, variando de 10 a 14 dias, dependendo da linhagem e idade dos camundongos e do tamanho do inóculo (SATO & TOMA, 1990; AMARANTE & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; GAZZINELLI & MELO, 2008; MARTINS et al., 2009; ESCHENAZI, 2013). Como já referido, nenhuma dessas observações foi feita em camundongos suíços.

No presente estudo, os animais controles demonstram que em camundongos suíços a evolução da infecção com *S. venezuelensis* é semelhante ao relatado na literatura, com utilização de camundongos isogênicos de diferentes linhagens, apenas com diferenças no início tardio da eliminação de ovos e no pico dessa eliminação, com período patente ligeiramente maior.

Os resultados demonstraram que um episódio, ou três episódios semanais de etilismo agudo em animais submetidos à ingestão crônica do etanol facilitaram a infecção com *S. venezuelensis* no camundongo. De fato, houve maior eliminação de ovos e maior recuperação de fêmeas do que nos controles, nos dois modelos estudados. Sugere-se que a possibilidade de que a redução da resposta imunitária inata induzida pelo etilismo agudo possa ter facilitado a sobrevivência de larvas no pulmão e aumentado o número de fêmeas que chegaram ao intestino. Um episódio de etilismo agudo induz um estado de imunossupressão, especialmente da imunidade inata (PRUETT et al., 2004) facilitando infecções (O'BRIEN et al., 2007; GORAL et al., 2008) e induzindo aumento de liberações de corticóides endógenos,

acompanhada de involução do timo e de redução de linfócitos no baço (HAN et al., 1993; HAN & PRUETT, 1995). Há, portanto, um comprometimento da imunidade inata, com redução da capacidade migratória e microbicida de neutrófilos e monócitos. A resistência á infecção por *S. venezuelensis* depende da imunidade inata nas primeiras fases de sua evolução (YASUDA et al., 2014), mas o real papel de neutrófilos ou eosinófilos na resposta imunitária inata ao parasito ainda não está esclarecido. Quando as larvas do *S venezuelensis* passam pelos pulmões, a quitina da larva induz pneumócitos do tipo 2 a liberarem IL-33, que recruta linfócitos da imunidade inata 2 (ILC2), que por sua vez, produzem citocinas responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos e diferenciação mucóide (células caliciformes) no epitélio brônquico (YASUDA et al., 2014). Não há relatos sobre o efeito do etanol sobre a ILC2, mas é possível que tal ocorra, já que outros componentes da imunidade inata são afetados. Por outro lado, existe relato sobre alterações de pneumócitos do tipo 2 em roedores submetidos à intoxicação crônica com etanol, mas sem referência a produção de citocinas por essas células (ALLI et al., 2014). Os neutrófilos e eosinófilos exercem efeitos larvicidas sobre larvas infectantes de *S. stercoralis*, sendo possível que a redução na migração e atividade dessas células induzidas pelo etanol possa estar favorecendo a sobrevivência de larvas no pulmão (GALIOTO et al. 2006). É possível que um efeito semelhante exista também sobre larvas do *S. venezuelensis*. De fato, nos animais submetidos a um episódio de etilismo agudo, o número de larvas nos pulmões foi significativamente maior 48h após a infecção. O maior número de larvas sobreviventes no pulmão, explicaria nesse experimento, o maior número de fêmeas observado no intestino.

No experimento em que os camundongos foram submetidos a três episódios de etilismo agudo, a depressão dos mecanismos imunitários pode ter sido mais acentuada, porém os efeitos sobre a ovoposição e o número de fêmeas no intestino foram semelhantes aos observados com um único episódio de etilismo agudo. No entanto, o número de larvas no pulmão do grupo etanol foi menor do que no grupo controle, ao contrário do que ocorreu com os animais submetidos a um único episódio de etilismo agudo. Sugere-se que a maior depressão da imunidade inata, cujo efeito se manifesta retardando a migração das larvas, tenha favorecido uma passagem mais rápida das larvas no pulmão, de modo tal, que no momento da

análise, 48 horas após a infecção, a maioria delas tenha migrado para o tubo digestivo.

Como os episódios de intoxicação etílica aguda induzem liberação de corticóides endógenos, persistente nas primeiras 18 horas (HAN et al., 1993), é possível admitir o efeito desses corticóides facilitando diretamente a sobrevivência das larvas durante a migração. De fato, os camundongos submetidos à ação de corticóides exógenos e infectados com *S. venezuelensis* apresentam um aumento da carga parasitária e redução na produção de citocinas e anticorpos importantes na resistência ao parasito (MACHADO et al., 2011b).

O etilismo agudo pode interferir na imunidade adaptativa ou porque altera células apresentadoras de antígeno (LAU et al., 2006) ou pela ação dos corticóides endógenos liberados (HAN & PRUETT, 1995). Portanto pode ter ocorrido um retardo na resposta adaptativa aos antígenos do helminto, mesmo que pequena, o que pode também ter favorecido a maior sobrevivência observada.

Quanto ao impacto da intoxicação etílica sobre o número dos leucócitos e eosinófilos circulantes, os resultados não mostraram diferenças significativas. No entanto, nos dois experimentos o número de leucócitos e eosinófilos no início (segundo dia) da infecção era menor nos grupos que receberam o etanol, talvez refletindo o efeito inibidor de uma intoxicação etílica aguda sobre a produção de granulócitos na medula óssea especialmente, fato bem demonstrado quando há uma infecção aguda (ZHANG et al 2009). É possível que nos camundongos suíços a resposta eosinofílica à infecção seja menor, mas há necessidade de se investigar melhor esse aspecto do comportamento do *S. venezuelensis* em camundongos suíços.

Concluindo, a avaliação da infecção com *S. venezuelensis* em camundongos suíços submetidos a dois diferentes modelos de etilismo agudo mostrou que a ovoposição e o número de vermes recuperados do intestino foi maior nos animais alcoolizados, sugerindo que a intoxicação etílica tenha facilitado a infecção, possivelmente em suas fases iniciais, embora a recuperação de larvas no pulmão tenha sido maior apenas no grupo que recebeu um episódio de etilismo agudo.

7. CONCLUSÃO

Um episódio, ou três episódios semanais de etilismo agudo em animais submetidos à ingestão crônica do etanol alterou a cinética da infecção de *S. venezuelensis* em camundongo, com aumento na eliminação de ovos e na recuperação de vermes adultos do intestino, sem diferenças relacionadas ao modelo da intoxicação etílica.

8. REFERÊNCIAS

- Adedayo O, Grell G, Bellot P. Hyperinfective strongyloidiasis in the medical ward: review of 27 cases in 5 years. **South Med J.** 2002; 95 (7):711-6.
- Alli AA, Brewer EM, Montgomery DS, Ghant MS, Eaton DC, Brown LA, Helms MN. Chronic ethanol exposure alters the lung proteome and leads to mitochondrial dysfunction in alveolar type 2 cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2014; 306(11):L1026-35.
- Amarante AFT, Oliveira-Sequeira TCG. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2002; 54(3):273-278.
- Andrade CG, Maia FFR, Queiróz LMC, Iglésias JDF, Salomon CV. Estrongiloidíase disseminada na ausência de imunodeficiência. **Jornal Brasileiro de Medicina.** 2007; 92;26-28.
- Ashford RW, Barnish G, Viney ME. *Strongyloides fuelleborni* kellyi: infection and disease in Papua New Guinea. **Parasitol Today.** 1992; 8(9):314-8.
- Avendaño L, Hernandez F, Jimenez F, Avila A, Castro D. *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcohólicos. **Parasitol Dia.** 1999; 23: 1–6.
- Baek BK, Islam MK, Matsuda K. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. **Korean J Parasitol.** 1998; 36(2):99-107.
- Baek BK, Whang IS, Islam MK, Kim BS, Kakoma I. Persistent infection with *Strongyloides venezuelensis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Korean J Parasitol.** 2002;40(4):181-6.
- Bavay, A. Sur l'anguillule intestinale (*Languillula intestinalis*), nouveau ver nematoïde trouvé par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de Cochinchine. **Comp Rend Sci Biol.** 1876; 84:266-268.
- Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). **Nat Protoc.** 2013; 8(3):627-37.
- Brumpt E. Précis de Parasitologie, 6th ed. **Masson et Cie**, Paris, 1934.

- Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, Bisoffi Z. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC Infect Dis.** 2013; 8;13:78.
- Carson EJ, Pruett SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.** 1996; 20(1):132-8.
- Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. **Parasitol Today.** 1997; 13(11):438-43.
- Costa-cruz, JM. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 12ª ed., São Paulo: Atheneu. 2011; p. 295-305.
- Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world? **J. Parasitol.** 1999; 85: 397-403.
- De-Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes DM, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002; 97(1):119-21.
- Domínguez-Santalla MJ, Vidal C, Viñuela J, Pérez LF, González-Quintela A. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. **Alcohol Clin Exp Res.** 2001; 25(8):1198-205.
- D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, De Witte P, Spies C, Littleton JM, de Villiers WJ, Lott AJ, Plackett TP, Lanzke N, Meadows GG Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. **Alcohol Clin Exp Res.** 2010;34(9):1489-511.
- El-Malky M, Maruyama H, Hirabayashi Y, Shimada S, Yoshida A, Amano T, Tominaga A, Takatsu K, Ohta N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitol Int.** 2003; 52(1):71-9.
- El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harhi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. **Parasit Vectors.** 2013; 24;6:148.

Eschenazi PD. A participação do linfócito B na resposta imune protetora induzida pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongo. **Tese de doutorado**. 2013; Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Fernandes A, Pereira AT, Eschenazi PD, Schilter HC, Sousa AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunol**. 2008; 30(3):139-49.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annu Rev Immunol**. 1997; 15:505-33.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol Rev**. 2004; 201:139-55.

Gaburri D, Gaburri AK, Hubner E, Lopes MH, Ribeiro AM, de Paulo GA, Pace FH, Gaburri PD, Ornellas AT, Ferreira JO, Chebli JM, Ferreira LE, de Souza AF. Intestinal parasitosis and hepatic cirrhosis. **Arq Gastroenterol**. 1997; 34(1):7-12.

Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ, Abraham D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infect Immun**. 2006; 74(10):5730-8.

Gazzinelli SEP, Melo AL. Interação entre *Strongyloides venezuelensis* e *Schistosoma mansoni* em camundongos da linhagem AKR/J. **R. Ci. md. biol**. 2008; 7(2):149-155.

Genta RM. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clin Microbiol Rev**. 1992; 5(4):345-55.

Gonçalves FL. *Strongyloides stercoralis* e infecção pelo hiv: prevalência em pacientes hiv positivos em Vitória, Espírito Santo e revisão sistemática dos casos de estrongiloidíase grave em pacientes com hiv/aids. **Dissertação de Mestrado**, 2011.

González-Quintela A, Vidal C, Lojo S, Pérez LF, Otero-Antón E, Gude F, Barrio E. Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 1999; 83(1):61-7.

- Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. **Alcohol**. 2008; 42(4):237-47.
- Gordon Hm, Whitlock Hv. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**. 1939; 12:50-52.
- Grove DI. Human strongyloidiasis. **Adv Parasitol**. 1996; 38:251-309.
- Han YC, Lin TL, Pruett SB. Thymic atrophy caused by ethanol in a mouse model for binge drinking: involvement of endogenous glucocorticoids. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1993; 123(1):16-25.
- Han YC, Pruett SB. Mechanisms of ethanol-induced suppression of a primary antibody response in a mouse model for binge drinking. **J Pharmacol Exp Ther**. 1995; 275(2):950-7.
- Harvey SC, Gemmill AW, Read AF, Viney ME. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Proc Biol Sci**. 2000; 267(1457):2057-63.
- Hasegawa H, Orido Y, Sato Y, Otsuru M. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. **Jpn J Parasitol**. 1988; 37:429–34.
- Hino A, Tanaka T, Takaishi M, Fujii Y., Palomares-Rius JE, Hasegawa K, Maruyama H, Kikuchi T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**. 2014; 141(13):1736–1745.
- Hoffmann, G. Les animaux de laboratoire. **Paris: Vigot Frères**, 1963.
- Khan AI, Horii Y, Tiuria R, Sato Y, Nawa Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. **Int J Parasitol**. 1993; 23(5):551-5.
- Kreider T, Anthony RM, Urban, Jr. JF, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr Opin Immunol**. 2007; 19(4): 448–453.
- Krolewiecki AJ, Leon S, Scott PA, Nolan TJ, Schad GA, et al. Effect of chronic ethanol consumption on protective T-helper 1 and T-helper 2 immune responses against the parasites *Leishmania major* and *Strongyloides stercoralis* in mice. **Alcohol Clin Exp Res**. 2001; 25:571–578.

Lau AH, Abe M, Thomson AW. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. **J Leukoc Biol.** 2006; 79(5):941-53

Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. **Physiol Rev.** 1997; 77: 517–544.

Machado ER, Carlos D, Sorgi CA, Ramos SG, Souza DI, Soares EG, Costa-Cruz JM, Ueta MT, Aronoff DM, Faccioli LH. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model. **Am J Trop Med Hyg.** 2011b; 84(6):957-66.

Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Aníbal Fde F, Silva EV, Roque-Barreira MC, Costa-Cruz JM, Faccioli LH. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Exp Parasitol.** 2011a; 127(1):72-9.

Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **J Exp Med.** 2009; 206(10): 2059–2066.

Marques CC, Zago-Gomes MP, Gonçalves CS, Pereira FEL. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010; 4(6):717.

Martins WA, Melo AL, Nicoli JR, Cara DC, Carvalho MA, Lana MA, Vieira EC, Farias LM. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. **J Med Microbiol.** 2000; 49(4):387-90.

Martins WA, Nicoli JR, Farias LM, Carvalho MAR, Cara DC, Melo AL. *Strongyloides venezuelensis*: efeito de antimicrobiano e imunossupressor no curso da infecção em camundongos da linhagem AKR/J. **R. Ci. med. biol.** 2009; 8(3):315-324.

Maruyama H, Nawa Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Exp Parasitol.** 1997; 85(1):10-5.

Maruyama H, Nishimaki A, Takuma Y, Kurimoto M, Suzuki T, Sakatoku Y, Ishikawa M, Ohta N. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology.** 2006; 132(3):411-8.

Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **J Immunol**. 2000; 164(7):3749-54.

Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Takai T, Muramatsu M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IgG and IgE Collaboratively Accelerate Expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a Primary Infection. **Infect Immun**. 2013; 81(7): 2518–2527.

Mayayo E, Gomez-Aracil V, Azua-Blanco J, Azua-Romeo J, Capilla J, Mayayo R. *Strongyloides stercoralis* infection mimicking a malignant tumour in a non-immunocompromised patient. Diagnosis by bronchoalveolar cytology. **J Clin Pathol**. 2005; 58(4):420-2.

Monteiro CA, Zuñiga HPP, Benício MHDA, Szarfa SC. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. I – Aspectos epidemiológicos, características socioeconômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**. 1988, 20(6):435-45.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço de Saúde Pública (RJ)**. 1948; 1(3): p.507-624.

Nakai ES, Amarante AFT. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. **Rev Bras Parasitol Vet**. 2001; 10:1-6.

Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. **Eur J Immunol**. 2010; 40(7):1836-42.

Neva FA, Filho JO, Gam AA, Thompson R, Freitas V, Melo A, Carvalho EM. Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. **J Infect Dis**. 1998; 178(6):1856-9.

O'Brien JM Jr, Lu B, Ali NA, Martin GS, Aberegg SK, Marsh CB, Lemeshow S, Douglas IS. Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients. **Crit Care Med**. 2007; 35(2):345-50.

Ogilvie K, Lee S, Weiss B, Rivier C. Mechanisms mediating the influence of alcohol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune and nonimmune signals. **Alcohol Clin Exp Res.** 1998; 22(5 Suppl):243S-247S.

Oliveira-Sequeira TCG, David EB, Ribeiro C, Guimarães S, Masseno APB, Katagiri S, Sequeira JL. EFFECT OF *Bifidobacterium animalis* ON MICE INFECTED WITH *Strongyloides venezuelensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2014; 56(2): 105–109.

Onah DN, Nawa Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **Korean J Parasitol.** 2000; 38(4): 209–236.

Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infect Immun.** 2006; 74(6): 3232–3238.

Pereira ATM. Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934) em camundongos Balb/c. **Dissertação de Mestrado.** 2008; ICB- UFMG, Belo Horizonte.

Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcântara L, Carvalho EM. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunol.** 2001; 23(9):503-7.

Pruett SB, Schwab C, Zheng Q, Fan R. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. **J Immunol.** 2004; 173(4):2715-24.

Ribeiro SR, Maia CO, Baiao MG, Moreira NIB. Comparação entre Culturas de Fezes para Obtenção de Larvas de *Strongyloides venezuelensis*: Carvão X Vermiculita. 2014.

Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Age- and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to *Strongyloides venezuelensis* infection. **J Vet Med Sci.** 2002a; 64(6):519-21.

Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. **J Vet Med Sci.** 2002b; 64(6):457-61.

- Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **J Exp Med.** 2005; 202(5): 607–616.
- Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **Int. J. Parasitol.** 1990; 20: 57-62.
- Schilter HC, Pereira AT, Eschenazi PD, Fernandes A, Shim D, Sousa AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunol.** 2010; 32(3):184-92.
- Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scand J Infect Dis.** 2005; 37(3):211-5.
- Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity and host defense. **Alcohol Clin Exp Res.** 2009; 33(2): 220–232.
- Taira N, Hirooka M, Saeki H. Isolation of *Strongyloides venezuelensis* from *Rattus norvegicus* in Kagoshima Prefecture. **J Vet Med Sci.** 1994; 56(2):255-8.
- Takamure A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol.** 1995; 25(8):907-11.
- Viney ME, Brown M, Omoding NE, Bailey JW, Gardner MP, Roberts E, Morgan D, Elliott AM, Whitworth JA. Why does HIV infection not lead to disseminated strongyloidiasis? **J Infect Dis.** 2004; 190(12):2175-80.
- Wertheim G. Growth and development of *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 in the albino rat. **Parasitology.** 1970; 61(3):381-8.
- World Health Organ Tech Rep Ser. Prevention and control of intestinal parasitic infections. Report of a WHO Expert Committee. 1987; 749:1-86.
- Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of both innate immunity and acquired immunity for rapid expulsion of *S. venezuelensis*. **Front Immunol.** 2014; 5:118.

Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012; 109(9) : 3451-6.

Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Gonçalves CS, Pereira FEL. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2002; 35(6):571-4.

Zhang P, Welsh DA, Siggins RW 2nd, Bagby GJ, Raasch CE, Happel KI, Nelson S. Acute alcohol intoxication inhibits the lineage- c-kit+ Sca-1+ cell response to Escherichia coli bacteremia. **J Immunol.** 2009; 182(3):1568-76.