

Interação entre Strongyloides venezuelensis e Schistosoma mansoni em camundongos da linhagem AKR/J

Sandro Eugênio Pereira Gazzinelli¹
Alan Lane de Melo²

Resumo

Camundongos da linhagem AKR/J, experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis* 45 dias após o inóculo intraperitoneal de cercárias de *Schistosoma mansoni*, apresentaram uma diminuição de larvas recuperadas dos pulmões, na fecundidade e tamanho alcançado pelas fêmeas, quando comparados aos animais infectados somente por *S. venezuelensis*. A análise dos resultados sugere uma interação parasitária negativa, com alteração da resposta imunológica do hospedeiro, desfavorável à infecção por *S. venezuelensis*.

Palavras-chave. *Strongyloides venezuelensis*- *Schistosoma mansoni* - Camundongos AKR/J; infecção concomitante - Cavidade peritoneal - Camundongos AKR/J.

INTRODUÇÃO

Infecções por mais de um parasito são freqüentes na maioria dos países em desenvolvimento, podendo ocasionar alteração da resposta imunológica do hospedeiro, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento, bem como a realização de estudos epidemiológicos (BUCK et al., 1978; CHAMONE; MARQUES; ALVES-OLIVEIRA, 1986; CHRISTENSEN et al., 1987).

A presença de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro vertebrado é capaz de modular várias doenças parasitárias (GENARO; BRENER; COELHO, 1986; TOWNSON; NELSON; BIANCO, 1985; CURRY et al., 1995; HELMBY; KULBERG; TROYE-

BLOMBERG, 1998), provavelmente devido à indução da proliferação de linfócitos T helper tipo 2 (Th2), o que contribui para eliminação de várias espécies de nematódeos em camundongos infectados por esse trematódeo (FINKELMAN et al., 1997; MARUYAMA et al., 2000b).

Estudos anteriores demonstraram que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro contra os paraitos do gênero *Strongyloides* aparentemente atua, tanto nas larvas durante o período de migração, quanto contra os vermes adultos localizados no intestino delgado, com participações de anticorpos, linfócitos T, macrófagos, eosinófilos e mastócitos

¹Doutorando. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

²Professor Associado. Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados. Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Correspondência para / Correspondence to:

Alan Lane de Melo

Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados. Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas
 Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Cx. Postal 486.

30123-970. Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

Tel.: (31) 3409-2857. Fax: (+55 31) 3409-2970

E-mail: aldemelo@icb.ufmg.br

(MOQBEL, 1980; DAWKINS; MITCHEL; GROVE, 1982; OVERTON et al., 1998; MARUYAMA et al., 2000b).

Entre os nematódeos, encontra-se o *Strongyloides venezuelensis* parasito natural de ratos silvestres, que tem sido utilizado como modelo experimental para se estudar a estrogiloidíase humana, pois é capaz de completar seu ciclo de vida em camundongos, de maneira semelhante ao observado na infecção por *S. stercoralis* no homem (SATO; TOMA, 1990; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006).

No presente estudo, procurou-se verificar alterações na relação entre o parasito e seu hospedeiro, quando camundongos da linhagem AKR/J são infectados por *S. venezuelensis* após infecção pelo *S. mansoni*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos

Foram utilizados, para os experimentos, camundongos *Mus musculus* machos adultos, da linhagem AKR/J, com cerca de 30 gramas de peso, provenientes do Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.. Cada grupo experimental era constituído de cinco animais.

Parasitas

· *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem utilizada vem sendo mantida em camundongos AKR/J, em passagens sucessivas desde 1987, no Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG..

· *Schistosoma mansoni*

Utilizou-se a linhagem LE, isolada em Belo Horizonte e mantida há mais de 40 anos em passagens sucessivas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e moluscos (*Biomphalaria glabrata*) criados e mantidos em condições laboratoriais.

Infecções

Aliquotas de 0,5ml de suspensão com aproximadamente 500 larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram inoculadas, por via subcu-

tânea, na região dorsal de camundongos, 45 dias após o inóculo intraperitoneal por cerca de 50 cercárias da cepa LE de *S. mansoni*. Um grupo de camundongos foi infectado por *S. venezuelensis* e outro grupo de animais, não infectados, serviram como controle.

Quantificação de ovos

Animais dos grupos infectados foram separados diariamente em gaiolas individuais com fundo falso, para coleta de suas fezes e realização do exame parasitológico. Para a realização do exame quantitativo, foi utilizada uma espátula para raspar uma tela metálica (malha 120 / fio 0,09 / área aberta 39%) colocada sobre as fezes, sendo colhido do material 10mg, que foi fixado em formalina 10%, e posteriormente contados com auxílio de microscópio todos os ovos presentes no conteúdo do tubo de hemólise. Paralelamente, foi verificada diariamente a presença de ovos nas fezes, utilizando-se o método de sedimentação espontânea até não serem encontrados ovos no exame de fezes por 14 dias consecutivos.

Recuperação e mensuração dos parasitos

As larvas foram recuperadas dos pulmões de cinco camundongos de cada grupo, no 2º dia após a infecção por *S. venezuelensis*. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os pulmões foram retirados e cortados em pequenos pedaços, transferidos para peneiras de plástico em contato com salina 0,85%, dentro de cálices de sedimentação e mantidos em banho-maria a 37°C por aproximadamente cinco horas. Após esse período, as larvas foram recolhidas, fixadas em formalina 10% e contadas.

Para a recuperação de *S. venezuelensis* adultos, cinco animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical no 7º dia após a infecção. A seguir, o abdome foi aberto, o intestino delgado foi retirado, aberto longitudinalmente, raspado sobre uma placa de Petri e então transferido para peneiras de plástico em contato com salina 0,85% em cálices de sedimentação mantidos em banho-maria a 37°C, aproximadamente por cinco horas. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os parasitos, separados do restante do material,

foram contados, fixados em formalina 10% e medidos com auxílio de um curvímeter (Tokyo - Sakurai, JAPAN), a partir de desenhos feitos com auxílio de uma câmara clara adaptada ao estereomicroscópio (BICALHO; MELO; PEREIRA, 1993; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, , 2006).

Avaliação de fecundidade das fêmeas de *S. venezuelensis*

A fecundidade foi determinada observando-se, com auxílio de microscópio, o número de ovos presentes no útero das fêmeas de *S. venezuelensis* recuperados do intestino dos animais no 7º dia após infecção (BAEK et al., 2003; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006).

Quantificação de leucócitos

Sete dias antes, no 3º, 7º e 12º dia após a infecção por *S. venezuelensis* foi retirado sangue do plexo ocular de cinco camundongos de cada grupo, para realização de leucograma, que foi determinado pelo número global de leucócitos/mm³ por meio de contagem em câmara de Neubauer.

Análise estatística

Para avaliação do grau de significância estatística, foram empregados o teste T de Student e análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos.

Os experimentos foram realizados de acordo com projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, Protocolo 25/2003).

RESULTADOS

Quantificação de ovos de *S. venezuelensis*

Verificou-se, pelos exames qualitativos de fezes, que a oviposição iniciou-se nos animais do grupo de controle no quinto dia após a infecção, permanecendo até o décimo segundo dia. No grupo infectado por *S. venezuelensis* 45 dias após a infecção por *S. mansoni*, observaram-se ovos nas fezes dos camundongos somente do sexto ao oitavo dia após a infecção. A maior quantidade de ovos verificada em ambos os grupos, apesar da grande diferença numérica, foi no sétimo dia após a infecção.

A análise quantitativa das fezes foi realizada até o 12º dia após infecção, sendo observada menor quantidade de ovos excretados pelos animais infectados por *S. venezuelensis* após infecção por *S. mansoni* em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Recuperação de parasitos, mensuração e fecundidade

Verificou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) na carga parasitária. Assim, o número

Tabela 1 - Número médio de ovos por grama de fezes de camundongos da linhagem AKR/J verificado do quinto ao décimo segundo dia após infecção por 500 L₃ de *S. venezuelensis*

Dias após Infecção	Grupos Infectados		Análise de variância ($p < 0,05$)
	<i>S. venezuelensis</i>	<i>S. venezuelensis</i> após <i>S. mansoni</i>	
5º dia	220 ± 64	0	0,017
6º dia	12220 ± 5076	200 ± 98	0,0007
7º dia	25560 ± 9314	1320 ± 148	0,0003
8º dia	8920 ± 2391	180 ± 164	0,00003
9º dia	6560 ± 1180	0	0,000002
10º dia	2740 ± 893	0	0,0001
11º dia	640 ± 207	0	0,0001
12º dia	140 ± 67	0	0,09

Tabela 2 - Número médio de larvas e fêmeas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino de camundongos AKR/J no 7º dia após infecção, mensuração (micrômetros) e fecundidade destas

Grupos infectados	Número médio de larvas	Número médio de fêmeas	Comprimento médio das fêmeas	Fecundidade média das fêmeas
<i>S. venezuelensis</i>	23,6 ± 4,2	94,5 ± 11,6	2500 ± 182	3,4 ± 0,4
<i>S. venezuelensis</i> após <i>S. mansoni</i>	11,0 ± 4,6	48,75 ± 17,4	2150 ± 203	1,8 ± 0,6
Teste t (p < 0,05)	0,0002	0,0001	0,0001	0,002

Tabela 3 - Número médio de leucócitos por mm³ de sangue de camundongos da linhagem AKR/J uma semana antes da infecção e no 3º, 7º e 12º dias após infecção por 500 L₃ de *S. venezuelensis*

Grupos	Antes	3º dia	7º dia	12º
Sem infecção	5560 ± 614	5840 ± 645	5040 ± 713	6520 ± 507
<i>S. venezuelensis</i>	4960 ± 572	10160 ± 993	12240 ± 745	13800 ± 808
<i>S. venezuelensis</i> após <i>S. mansoni</i>	4760 ± 614	9840 ± 805	13360 ± 873	8640 ± 945*

Nota: * p < 0,05 em relação ao grupo infectado somente por *S. venezuelensis*

de larvas recuperadas dos pulmões foi cerca de 50% menor no grupo com ambas as infecções. Também de maneira similar, no grupo infectado por *S. venezuelensis* previamente infectado por *S. mansoni*, a fecundidade e o tamanho alcançado pelas fêmeas, foram menores, quando comparados aos animais infectados somente por *S. venezuelensis* (Tabela 2).

Quantificação de leucócitos

Observou-se, conforme o esperado, um aumento gradativo no número total médio de leucócitos em ambos grupos de animais infectados em relação ao grupo de controle não infectado. Entretanto, quando os resultados obtidos entre os grupos infectados foram comparados entre si, verificou-se diminuição significativa (p < 0,000001) no número médio global de leucócitos sanguíneos do grupo infectado por *S. venezuelensis* e *S. mansoni* no 12º dia após infecção, em relação ao grupo infectado somente por *S. venezuelensis* (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que a infecção prévia por *S. mansoni* atuou de forma negativa na infecção por *S. venezuelensis*, o que está de acordo com Bindseil (1970), que observou redução no número de larvas de *Ascaris suum* recuperadas do pulmão de camundongos infectados por *S. mansoni*, e Baek e colaboradores (1999), que observaram resistência de ratos infectados por *Nippostrongylus brasiliensis* a infecções posteriores por larvas ou à inoculação de adultos de *S. venezuelensis*.

O mecanismo de proteção desenvolvido contra *S. venezuelensis* por camundongos previamente infectados por *S. mansoni* provavelmente é similar ao observado nesses animais durante reinfecções por *S. venezuelensis*, atuando tanto contra as larvas durante seu processo de migração quanto contra os parasitos adultos presentes no intestino delgado dos animais. A diminuição do número de larvas nos pulmões e do número de parasitos adultos no intestino

delgado, bem como o menor comprimento alcançado pelas fêmeas, verificados no presente estudo, estão de acordo com vários autores que também observaram uma redução no número de parasitos recuperados dos pulmões e do intestino de camundongos reinfetados por *S. rattii* ou *S. venezuelensis* bem como diminuição do comprimento das fêmeas adultas (DAWKINS; GROVE, 1980; SATO; TOMA, 1990; BAEK et al., 2003; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006). Tais resultados, provavelmente podem estar relacionados a um aumento na produção de IL-5 e conseqüente eosinofilia sangüínea (MARUYAMA et al., 2000a).

A resistência ao *S. venezuelensis* 45 dias após a infecção por *S. mansoni*, coincide com o período de formação de granulomas no camundongo, o que induz uma maior reatividade de células Th2, e um aumento na produção de interleucinas IL-5, propiciando o recrutamento de eosinófilos que irão secretar substâncias citotóxicas e pró-inflamatórias, importantes na defesa do organismo tanto contra larvas de helmintos durante sua fase de migração quanto contra parasitos adultos (FALLON; SMITH; DUNNE, 1998; EL-MALKY et al., 2003).

O atraso e a diminuição na excreção de ovos observados no presente estudo, bem como a redução no número e no tamanho das fêmeas de *S. venezuelensis* recuperadas, corroboram os resultados obtidos por Andreassen, Odaibo e Christensen (1990), que verificaram uma eliminação rápida de *Hymenolepis diminuta* e *H. microstoma*, bem como atraso e diminuição da fecundidade desses cestódeos em camundongos previamente infectados por *S. mansoni*, provavelmente por influência da reação granulomatosa presente na mucosa intestinal, ao redor dos ovos de *S. mansoni*. Além disso, verifica-se que mastócitos também são impor-

tantes no mecanismo de eliminação de parasitos intestinais, sendo que a invasão do intestino delgado pelo parasito é inversamente proporcional à mastocitose local (KOBAYASHI; ISHIWATA; NAWA, 1996; MARUYAMA et al., 2000a; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006).

A eliminação dos parasitos mais precocemente, verificada no presente estudo, provavelmente também está associada a um aumento de mastócitos presentes na mucosa intestinal, em decorrência de uma maior produção de IL-3 (DAWKINS; MITCHEL; GROVE, 1982; SATO; TOMA, 1990; KOBAYASHI; ISHIWATA; NAWA, 1996; MARUYAMA et al., 2000b).

Maruyama e colaboradores (2000a) não recuperaram fêmeas de *S. venezuelensis* do intestino delgado de camundongos C57BL/6, quando larvas desse parasito foram inoculadas, por via subcutânea, em camundongos 35 dias após infecção por *S. japonicum*. Em nossos experimentos, foram obtidas algumas fêmeas adultas do intestino de animais infectados previamente por *S. mansoni*, provavelmente devido à linhagem utilizada apresentar leucemia e ser deficiente do fator C5 do complemento, importante atraente de leucócitos que participam da resposta contra o *S. venezuelensis* (BENEFRAIM; CINADER, 1964; BICALHO; MELO; PEREIRA, 1993; MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006).

A redução dos leucócitos no 12º dia, verificada no presente estudo, provavelmente está relacionada à eliminação precoce das fêmeas, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente em camundongos da linhagem AKR/J reinfetados por *S. venezuelensis* (MELO; VASCONCELOS; GAZZINELLI, 2006).

Interaction between Strongyloides venezuelensis and Schistosoma mansoni infections in AKR/J strain of mice

Abstract

The AKR/J strain of mice experimentally infected with Strongyloides venezuelensis 45 days after the intraperitoneal inoculation of Schistosoma mansoni cercariae presented a reduction of S. venezuelensis

larvae in the lungs and females in the intestine. These females also showed reduced length and fecundity when compared with mice infected with *S. venezuelensis* only. These results suggest a negative interaction between these helminths leading alteration in immune response of the host, adverse to *S. venezuelensis* infection.

Keywords *Strongyloides venezuelensis* - *Schistosoma mansoni* - *AKR/J Strain*; *Peritoneal Cavity - Infection - AKR/J Strain*.

REFERÊNCIAS

- ANDREASSEN, J.; ODAIBO, A.B.; CHRISTENSEN, N.O. Antagonistic effects of *Schistosoma mansoni* on superimposed *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma* in mice. *J. Helmintol.*, London, v.64, p.337-339, 1990.
- BAEK, B.K. et al. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Vet. Parasitol., Amsterdam*, v.113, p.217-227, 2003.
- BAEK, B.K. et al. Partial cross-resistance between *Strongyloides venezuelensis* and *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Korean J. Parasitol.*, Seoul, v.37, p.101-107, 1999
- BEN-EFRAIM, S.; CINADER, B. The role of complement in the passive cutaneous reaction of mice. *J. Exp. Med.*, New York, v.120, p.925-942, 1964.
- BICALHO, R.S.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H. Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* na cavidade peritoneal de camundongos da linhagem AKR/J. *R. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.35, p.411-416, 1993.
- BINDSEIL, E. Immunity to *Ascaris suum* 4. The effect of different stimulations upon challenge with *Ascaris suum* in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.*, Copenhagen, v.78, p.191-195, 1970.
- BUCK, A.A. et al. Epidemiology of polyparasitism. II. Types of combinations, relative frequency and associations of multiple infections. *Tropenmed. Parasitol.*, Stuttgart, v.29, p.137-144, 1978.
- CHAMONE, M.; MARQUES, C.A.; ALVES-OLIVEIRA, L. Does ancylostomiasis favour the intensity of *Schistosoma mansoni* infection? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.80, p1005, 1986.
- CHRISTENSEN, N.O. et al. Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.73, p.387-410, 1987.
- CURRY, A.J. et al. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris* *J. Exp. Med.*, New York, v.181, p.769-774, 1995.
- DAWKINS, H.J.; GROVE, D.I. Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.11, p.89-96, 1980.
- DAWKINS, H.J.; MITCHEL, G..F.; GROVE, D.I. *Strongyloides ratti* infections in congenitally hypothyroid (nude) mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, Adelaide, v.60, p.181-186, 1982.
- EL-MALKY, M. et al. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol. Int.*, Amsterdam, v.52, p.71-79, 2003.
- FALLON, P.G.; SMITH, P.; DUNNE, D.W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma*

- mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.28, p.1408-1416, 1998.
- FINKELMAN, F.D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models *Annu. Rev. Immunol.*, Palo Alto, v.15, p.505-533, 1997.
- GENARO, O.; BRENER, Z.; COELHO, P.M. *Schistosoma mansoni*: immunodepression of hepatic schistosoma granuloma formation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *R. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.19, p.35-37, 1986.
- HELMBY, H.; KULBERG, M.; TROYE-BLOMBERG, M. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect. Immun.*, Washington, DC, v.66, p.5167-5174, 1998.
- KOBAYASHI, T.; ISHIWATA, K.; NAWA, Y. Intestinal mast cell in parasite infection. *MIU: Mucosal Immunol. Update*, Bethesda, v.4, p.8-11, 1996.
- MARUYAMA, H. et al. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.22, p.279-286, 2000a.
- MARUYAMA, H. et al. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J. Immunol.*, Baltimore, v.164, p.3749-3754, 2000b.
- MELO, A.L.; VASCONCELOS, A.C.; GAZZINELLI, S.E.P. Alterações histopatológicas em camundongos AKR/J reinfetados por *Strongyloides venezuelensis*. *R. Ci. Méd. Biol.*, Salvador, v.5, p.7-12, 2006.
- MOQBEL, R. Histopathological changes following primary, secondary and repeated infections of rats with *Strongyloides ratti*, with special reference to tissue eosinophils. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.2, p.11-27, 1980.
- OVINGTON, K.S. et al. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology*, Oxford, v.95, p.488-493, 1998.
- SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.20, p.57-62, 1990.
- TOWNSON, S.; NELSON, G.S.; BIANCO, A.E. Immunity to *Onchocerca lienalis* microfilariae in mice. II. Effects of sensitization with a range of heterologus species. *J. Helminthol.*, London, v.59, p.337-346, 1985.

Recebido em / Received: 01/02/2008
 Aceito em / Accepted: 19/08/2008