

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

Michelle Alves Vicentini

**EFEITO MODULATÓRIO DA COINFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
bovis NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Strongyloides venezuelensis***

JUIZ DE FORA

2008

2008

PGCBIO

Michelle Alves Vicentini

ICB/UFJF

MICHELLE ALVES VICENTINI

**EFEITO MODULATÓRIO DA COINFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
bovis NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Strongyloides venezuelensis***

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de
Imunologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2008

VICENTINI, M. A. Efeito Modulatório da Coinfecção pelo *Mycobacterium bovis* na Resposta Imunológica de Camundongos Infectados com *Strongyloides venezuelensis*, 2008. 65f.
Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

Esta dissertação intitulada:

**EFEITO MODULATÓRIO DA COINFECÇÃO PELO *Mycobacterium*
bovis NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Strongyloides venezuelensis***

apresentada por:

MICHELLE ALVES VICENTINI

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira – Universidade Federal de Juiz de Fora-MG

Prof. Dr. Sílvio Celso Gonçalves da Costa – Instituto Oswaldo Cruz -FIOCRUZ - RJ

Prof. Dr. Cádúio Galuppo Diniz– Universidade Federal de Juiz de fora-MG

Prof^a. Dr^a. Celeste Silva Freitas de Souza- Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ

Dissertação defendida em 5 de Março de 2008

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira, com o patrocínio financeiro da UFJF e da FAPEMIG.

Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor

Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar

Vou persistir, continuar a esperar e crer

E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!

Música "TUDO POSSO"

Celina Borges

"A fé é um modo de já possuir aquilo
que se espera, é um meio de conhecer
realidades que não se vêem." (Hebreus, 11:1)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por minha saúde, por me dar forças para perseverar, por me ter dado a felicidade de ser filha de meus pais e irmã dos meus irmãos, por ter colocado tantos anjos, no meu caminho, ao longo das estradas que trilhei.

Aos meus pais Dorinha e Alceu pelo amor sem medida, doação, e eterno apoio. Aos meus irmãos lindos, Leandro e Eduardo, pelo incentivo, pelas risadas e pelo carinho de sempre. Vocês são pra mim, o lado doce e alegre da vida, com suas risadas fáceis e a forma tão leve de encarar os acontecimentos. A todos vocês, muito obrigada por existirem, por me amar, e pela compreensão por tantas ausências devido às horas dedicadas aos estudos. Mesmo longe eu sempre soube que vocês estariam lá pra mim e por mim, quando eu precisasse.

Ao meu namorado, Bruno, por tanto companheirismo, incentivo, compreensão, carinho e pela impressionante PACIÊNCIA! Às vezes, eu mesma não me entendia ou suportava! Mas você continuava ao meu lado, me dando forças e me fazendo rir!

À minha orientadora, Ana Paula Ferreira, por ter me aceito como orientada, a quase cinco anos atrás, e ter me ensinado tantas e tantas coisas! Muito obrigada por seu exemplo de profissionalismo, carinho, por ir para a bancada comigo nos experimentos e me ensinar com tanta paciência as técnicas de pesquisa. Obrigada principalmente, por tudo aquilo que aprendi com você como ser humano, riquezas e conhecimentos que não estão contidos em nenhum livro ou artigo científico.

Ao chefe do laboratório de Imunologia, Henrique Couto Teixeira, pelo apoio no desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus tantos amigos do laboratório, que foram tão importantes na minha formação humana e profissional. Obrigada pelos momentos de conversas, descontração, risadas ou lamentações! Aos encontros nas casas de amigos! Ao carinho e simpatia constantes! Com vocês, a vida ficou muito mais colorida!

Muito obrigada a todos, que me ajudaram nos experimentos com tanta dedicação: Alyria, Ana Maria, Bianca, Bruno, Caio, Carol, Chico, Cida, Isabelly, Lívia,

Márcio, Marina, Juliana, “Micheles” Barsante e Rodrigues, Raquel, Suelen..... Esse trabalho tem um pouco de cada um de vocês!

À Alyria e Lívia, um agradecimento especial por sua dedicação, ajuda e companheirismo no desenvolvimento desse trabalho. Vocês são maravilhosas, em todos os sentidos!

À minha mãe-irmã Ana Maria, presente de Deus em minha vida. Muito obrigada por seu companheirismo, lealdade, carinho e exemplo de superação! Sem você, teria sido muito mais difícil chegar até aqui!

Ao meu anjo-amigo Caio, por ter me acolhido desde que cheguei ao laboratório, pela paciência invejável em me explicar tantas vezes a mesma coisa! Pelas tantas vezes em que ficou até tarde no laboratório para me ajudar nos experimentos e por tantas outras coisas que não cabem em palavras. Você foi meu co-orientador não oficial nessa caminhada!

À “minha-nossa” doce Maria Aparecida de Souza (Cida), por seu carinho, auxílio e paciência em todos os momentos em que precisei. Eu não consigo encontrar palavras que expressem o quanto você foi importante para a preparação desse trabalho e o quanto é importante pra mim.

À Fernanda Moreira de Freitas Soares, por tanto apoio, carinho, profissionalismo e cuidado comigo. Você é mais um dos anjos que Deus colocou em meu caminho!

A poucos dias ,um tal anjo, Fábio de Melo, disse que há momentos e palavras que não cabem dentro de nós de tão grandes que o são, mesmo que levem poucos segundos para acontecer. E que de tão grandes e importantes, eles ainda continuarão a soar em nossa alma e coração pelo resto de nossas vidas. Obrigada a todos aqueles que com gestos, palavras ou silêncio, mesmo sem saber, plantaram tais momentos em mim...

RESUMO

As parasitoses intestinais representam um importante problema médico-sanitário, tendo em vista o grande número de pessoas acometidas e as inúmeras alterações orgânicas que podem provocar no hospedeiro. Infecções provocadas por *Strongyloides venezuelensis* apresentam uma resposta imune local tanto nos pulmões quanto no intestino, predominantemente do tipo Th2, caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, resultando em eosinofilia, aumento da produção de muco, mastocitose e altas concentrações de IgE. Por outro lado, infecções provocadas por micobactérias estimulam uma imunidade predominantemente do tipo Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e óxido nítrico. A tuberculose, causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das doenças infecciosas mais importantes, sendo responsável por aproximadamente 2,9 milhões de óbitos e 8 milhões de novos casos por ano. Ainda são escassos os trabalhos envolvendo co-infecções, e devido às complexas relações existentes entre parasitos e entre eles e seu hospedeiro, faz-se necessário observações criteriosas. No presente trabalho avaliou-se o efeito modulatório que o *Mycobacterium bovis* virulento exerce sobre a resposta imune de camundongos co-infectados com *S. venezuelensis*. Os resultados demonstraram que o perfil de resposta imune durante a infecção por *S. venezuelensis* parece ser diretamente influenciado pela presença do *M. bovis*, uma vez que o perfil de resposta Th2, específico ao verme, esteve diminuído nos animais co-infectados. Tal diminuição pôde ser constatada pelo aumento do número de ovos e vermes nos animais co-infectados quando comparado com os animais infectados somente com *S. venezuelensis*; assim como a diminuição dos níveis de IgE específica à larva L3 do verme detectada em diferentes pontos da infecção; diminuição dos níveis de IL-10 produzida por células de baço estimuladas *in vitro* com antígeno da larva L3 do verme; diminuição dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no intestino; diminuição da expressão de CD80, CD86 e CD25 em células de baço e linfonodo e aumento da expressão de CD28 em células de linfonodos mesentéricos. Em conjunto, esses resultados sugerem que a infecção por *M. bovis*, e a conseqüente ativação do perfil de resposta imune do tipo Th1, foi capaz de modular o desenvolvimento do perfil de resposta imune do tipo Th2 contra *S. venezuelensis* nos animais co-infectados, deixando-os mais susceptíveis à infecção com *S. venezuelensis*. Esse trabalho é o primeiro a avaliar os mecanismos imunoregulatórios envolvidos na co-infecção *S. venezuelensis* versus *M. bovis*.

Palavras-chave: Co-infecção; *Strongyloides venezuelensis*; *Mycobacterium bovis*; imunomodulação, moléculas co-estimulatórias.

ABSTRACT

The intestinal parasites are a major medical-health problem, in view of the large number of people involved and the numerous organizational changes which may result in the host. Infections caused by *Strongyloides venezuelensis* have a local immune response in both lungs as in the intestine, predominantly from the Th2 type, characterized by the production of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and IL-10, resulting in eosinophilia, increased production of mucus, mastocytosis and high levels of IgE. In addition, infections caused by mycobacteria stimulate predominantly an Th1-type immune response characterized by the production of IFN- α , IL-12, TNF- γ and nitric oxide. Tuberculosis, caused by intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the most important infectious diseases, accounting for approximately 2.9 million deaths and 8 million new cases per year. Are still scarce papers involving co-infections, and because of the complex relationship between parasites and between them and their host, it is necessary criterious evaluations. This study evaluated the modulatory effect that the virulent *Mycobacterium bovis* has on the immune response of mice co-infected with *S. venezuelensis*. The results showed that the profile of immune response during infection with *S. venezuelensis* seems to be directly influenced by the presence of *M. bovis*, because the profile of Th2 response, specific to the worm, was reduced in co-infected animals. This decline could be observed by increasing the number of eggs and worms in animals co-infected when compared with animals infected only with *S. venezuelensis*, as well as decreased levels of IgE specific to the L3 larvae of the worm detected at different points of infection, decreased levels of IL-10 produced by spleen cells stimulated *in vitro* with L3 larvae antigen; decreased levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in the intestine, reducing the expression of CD80, CD86 and CD25 cells in the spleen and lymph nodes and increased expression of CD28 cells in mesenteric lymph nodes. Together, these results suggest that infection with *M. bovis*, and the consequent activation of the profile of Th1-type immune response, was able to modulate the development of the profile of Th2 type of immune response against *S. venezuelensis* in co-infected animals, leaving them more susceptible to infection with *S. venezuelensis*. This work is the first to evaluate the mechanisms involved in immunoregulatory mechanisms involved in co-infection *S. venezuelensis* versus *M. bovis*.

Key words: Co-infection; *Strongyloides venezuelensis*; *Mycobacterium bovis*; immunomodulation, co-stimulatory molecules.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	- Ethylbenzothiazoline sulfonic acid
AgL3	- Antígeno da larva L3 de <i>S. venezuelensis</i>
AP	- Aprotinina
APC	- Células Apresentadoras de Antígenos
BCG	- Bacillus Calmette-Guerin
BSA	- Albumina bovina
C	- Animais do grupo Controle
CBR	- Centro de Biologia da Reprodução
CD4	- Receptor de linfócitos T
CD4	- Receptor de linfócitos T
CD8	- Receptor de linfócitos T
CD25	- Molécula co-estimulatória/imunomodulatória
CD28	- Molécula co-estimulatória
CD80	- Molécula co-estimulatória
CD86	- Molécula co-estimulatória
CFU	- Unidades formadoras de colônias
COIN	- Animais Co-infectados
CTAB	- Trimetil ammonium bromide
CTLA-4	- Molécula co-estimulatória
D.P.I	- Dias após a infecção
EDTA	-Ácido Etilenodiaminotetracético
EPO	-Peroxidase de eosinófilos
FoxP3	- Marcador molecular de células T regulatórias
HBSS	- Solução Salina Balanceada de Hanks

HE	- Hematoxilina - Eosina
HTAB	- Hexadecyltrimethylammonium Bromide
IFN- γ	- Interferon gama
IgE	- Imunoglobulina E
IL-10	- Interleucina 10
IL-13	- Interleucina 13
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-9	- Interleucina 9
iNOS	- Enzima envolvida na síntese induzida de óxido nítrico
MB	- Animais infectados por <i>Mycobacterium bovis</i>
MPO	- Mieloperoxidase
NaEDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético de Sódio
NK	- Natural Killer
NO	- Óxido Nítrico
OPD	- O-Phenylenediamine
PBMC	- Células mononucleares do sangue periférico
PBS	- Salina tamponada com fosfatos
PBST	- Salina tamponada com fosfatos saponada (Tween)
PCR	- Reação da Cadeia da Polimerase
PMSF	- Metil Sulfonil Fluoride
PPD	- Proteína Purificada Derivada
SDS	- Sodium dodecil sulfate
SV	- Animais infectados por <i>Strongyloides venezuelensis</i>
TCR	- Receptor de linfócitos T

TH	- Linfócito T Helper
TLRs	- Toll-like (receptores celulares)
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF- α	-TNF alfa
TREG	- Células T regulatórias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de ovos e vermes de <i>S. venezuelensis</i> de camundongos infectados com <i>S. venezuelensis</i> (SV) e coinfectados com <i>M. bovis</i> virulento (COIN).....	29
Tabela 2	Níveis de IgE do soro de camundongos BALB/c infectados com <i>S. venezuelensis</i> (grupo SV) e coinfectados com <i>M. bovis</i> virulento (grupo COIN).....	31
Tabela 3	Níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno da larva L3 de <i>S. venezuelensis</i>	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ativação e diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 ou Th2 via apresentação do antígeno associado às proteínas do MHC.....	4
Figura 2	Mecanismo de ativação de linfócitos T via interação das moléculas coestimulatórias/imunomodulatórias, presentes na superfície das APCs e dos linfócitos T.....	7
Figura 3	Ciclo vida de <i>S. venezuelensis</i>	10
Figura 4	Desenho experimental das infecções realizadas.....	23
Figura 5	Níveis de citocinas (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-13, em macerado de intestino de animais infectados apenas com <i>S. venezuelensis</i> (SV) ou co-infectados com <i>M. bovis</i> (COIN) por ELISA, 7º e 10º d.p.i. com <i>S. venezuelensis</i>	34
Figura 6	Níveis da peroxidase de eosinófilos (EPO) - figuras A e B - no intestino de camundongos BALB/c no 7º e 10º dias após a infecção com <i>S. venezuelensis</i> (4 e 7 dias após a infecção com <i>M. bovis</i> , respectivamente).....	36
Figura 7	Porcentagem de marcadores celulares em células de baço de camundongos BALB/c: (A) 7 d.p.i. com <i>S. venezuelensis</i> (4 d.p.i. com <i>M. bovis</i>); (B) 10 d.p.i. com <i>S. venezuelensis</i> (7 d.p.i. com <i>M. bovis</i>).....	40
Figura 8	Porcentagem de marcadores celulares em células de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c: (A) 7 d.p.i. com <i>S. venezuelensis</i> (4 d.p.i. com <i>M. bovis</i>); (B) 10 d.p.i. com <i>S. venezuelensis</i> (7 d.p.i. com <i>M. bovis</i>).....	42

Sumário

1. INTRODUÇÃO

1.1a ASPECTOS GERAIS DOS HELMINTOS.....	1
1.1b ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A HELMINTOS.....	2
1.2 - PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS /IMUNOMODULATÓRIAS NAS INFECÇÕES POR PARASITOS GASTROINTESTINAIS.....	6
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFECÇÃO COM O <i>Strongyloides venezuelensis</i>	9
1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium</i>	12
1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i>	15
1.6 PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/ IMUNOMODULATÓRIAS NAS INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS.....	17
1.7 <i>Mycobacterium</i> E COINFECÇÕES.....	18

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 INFECÇÃO E ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO COM <i>S. venezuelensis</i>	21
3.3 DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO PELO <i>S. venezuelensis</i> E ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO.....	22
3.4 CO-INFECÇÃO.....	22
3.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO de <i>S. venezuelensis</i>	24
3.6 OBTENÇÃO DE SORO PARA DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA AO ANTÍGENO DA LARVA L3 DE <i>S. venezuelensis</i>	24
3.7 CULTURA DE CÉLULAS.....	24

3.8 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE MACERADO DE INTESTINO.....	25
3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA.....	25
3.10 DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA POR ELISA.....	26
3.11 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDASE (EPO)	26
3.12 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/ IMUNOMODULATÓRIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	26
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27

4. RESULTADOS

4.1 NÚMERO DE OVOS E VERMES DE <i>S. venezuelensis</i>	28
4.2 NÍVEIS DE IgE NO SORO... ..	30
4.3 PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	32
4.4 NÍVEIS DE EPO NO INTESTINO NO 7º E 10º D.P.I. COM <i>S. venezuelensis</i>	35
4.5 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS /IMUNOMODULATÓRIAS EM CÉLULAS ESPLÊNICAS.....	37
4.6 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/ IMUNOMODULATÓRIAS EM CÉLULAS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS.....	40

5. DISCUSSÃO.....	43
--------------------------	-----------

6. CONCLUSÕES.....	50
---------------------------	-----------

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1a ASPECTOS GERAIS DOS HELMINTOS

Os helmintos constituem um grupo numeroso, com três filios: Platyhelminthes, Aschelminthes e Acanthocephala, incluindo espécies de vida livre e espécies parasitas. As ocorrências no homem são muito comuns (especialmente representantes dos filios Platyhelminthes e Aschelminthes) e tais infecções, em geral, resultam em danos para o hospedeiro, os quais se manifestam de formas variadas (NEVES *et al.*, 2003).

Os representantes do filo Platyhelminthes, são achatados dorso-ventralmente, acelomados, com ou sem tubo digestivo, sem ânus, sem aparelho respiratório e circulatório, estando distribuídos nas classes: Turbelária, Trematoda e Cestoda. A classe Turbelária só apresenta indivíduos de vida livre. Na classe Trematoda encontra-se o *Shistosoma mansoni*, importante parasito humano e na Cestoda, as espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata* (causadoras da teníase e cisticercose em humanos).

No filo Aschelminthes, a classe que apresenta o maior número de espécies capazes de parasitar o homem, é a classe Nematoda. Os nematódeos, são pseudocelomados, apresentam um corpo cilíndrico e alongado, tubo digestivo completo, sexos separados e são revestidos por uma cutícula altamente resistente. No desenvolvimento pós-embrionário, o nematóide passa por cinco estágios e na passagem de um estágio para outro ocorre uma troca de cutícula. O primeiro estágio (o embrião que se forma dentro do ovo) é a larva L1, passando pelas fases de L2, L3 (geralmente o estágio infectante), L4 e L5 (verme adulto). Há nematóides de vida livre e parasitas, sendo que os últimos apresentam gêneros de grande importância para a saúde humana, como *Ascaris*, *Ancylostoma*, *Enterobius*, *Necator*, *Onchocerca*, *Strongyloides*, *Trichuris* e *Wuchereria* (NEVES *et al.*, 2003) .

1.1b ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A HELMINTOS

As parasitoses intestinais representam um importante problema médico-sanitário, tendo em vista o grande número de pessoas acometidas e as inúmeras alterações orgânicas que podem provocar no hospedeiro (ENOBE, 2005). Especialmente, aquelas provocadas por helmintos, tendem a se tornar crônicas (ONAH e NAWA, 2000), sendo que essa cronicidade parece estar relacionada com a fragilidade da imunidade natural do hospedeiro e a capacidade dos parasitos em resistir aos processos de eliminação estimulados por sua presença (ENOBE, 2005). Os nematódeos dos gêneros *Ascaris*, *Ancylostoma*, *Necator*, *Strongyloides* e *Trichuris* infectam aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo, resultando em um milhão de mortes devido a essas infecções (FINKELMAN *et al.*, 1997 apud ONAH e NAWA, 2000). As espécies mais prevalentes no ser humano são o *Ascaris lumbricoides*, com 1.472 milhões de pessoas infectadas, seguido por 1.298 milhões de indivíduos infectados com cestóides e 1.049 milhões de indivíduos com *Trichuris trichiura* (CROMPTON, 1999; O'LORCANN e HOLLAND, 2000; NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006). Outro importante nematódeo que infecta humanos é o *Strongyloides stercoralis*, o qual aflige entre 30 e 100 milhões de pessoas em 70 países, (SIDDIQUI e BERK, 2003; NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006). Estima-se que um quarto da população mundial apresenta infecções causadas por espécies de nematóides gastrointestinais, sendo que essas infecções são prevalentes particularmente, em países tropicais e subtropicais, nos quais vinte e seis espécies de helmintos são capazes de infectar seres humanos (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; GAUSE, 2003). Crianças com infecções helmínticas apresentam um quadro de anemia, acompanhado de baixo crescimento e atraso no desenvolvimento cognitivo (COOPER e BRUNDY, 1988 apud ONAH e NAWA, 2000). Além de parasitar seres humanos, os helmintos podem parasitar outros animais, como por exemplo, os

bovinos, provocando grandes perdas econômicas. Calcula-se que 1,7 bilhões sejam gastos anualmente no controle destas parasitoses em animais (LAWRENCE, 2003).

Apesar da alta prevalência e morbidade crônica produzidas pelos nematódeos, os mecanismos envolvidos na imunopatologia e na imunoproteção contra esses parasitos, ainda não estão completamente esclarecidos (LAWRENCE, 2003). As infecções helmínticas têm como características marcantes, a capacidade de persistência do parasito no hospedeiro e ciclo de vida complexo, de modo que as interpretações das interações parasito-hospedeiro tornam-se bastante complexas (WILKES *et al.*, 2004; MAIZELS *et al.*, 1993 apud ENOBE, 2005).

Dentre as inúmeras células de defesa do hospedeiro, destacam-se os linfócitos auxiliares TCD4, os quais podem se diferenciar em dois grupos, linfócito T auxiliar 1 (LTh1) e T auxiliar 2 (LTh2), que participam no controle das diversas infecções que podem afetar o organismo dos seres vivos. A ativação e diferenciação de células T dependem de dois sinais. Primeiramente, é necessário que haja o contato entre as células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs maduras e ativadas) e as células T imaturas (linfócitos Th0) com o reconhecimento de peptídeos associados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC). O segundo sinal, necessita da interação entre moléculas co-estimulatórias presentes na superfície de células APCs e da produção de citocinas por essas células (BLUESTONE, 2006). Na presença de antígenos proteicos, as APCs (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos ou linfócitos B) são capazes de endocitá-los e convertê-los em peptídeos, os quais serão apresentados em sua superfície celular associados à proteínas do MHC. As moléculas de MHC associadas à peptídeos, interagem com os receptores de membrana dos linfócitos T (TCR), estimulando a ocorrência de cascatas metabólicas intracelulares que levarão à diferenciação do linfócito Th0, em Th1 ou Th2. A diferenciação celular nos subtipos Th1 ou Th2, é direcionada a partir da natureza do antígeno apresentado (origem extra ou intracelular), aos tipos de moléculas co-estimulatórias presentes na superfície da APC e do linfócito T (moléculas estimulatórias ou imunomodulatórias) e às citocinas presentes no contexto da apresentação (produzidas pela APC e/ou por outras células do sistema imunológico).

Cada subtipo de linfócito T será capaz de produzir alguns tipos de citocinas, as quais estimularão o desenvolvimento de distintos padrões de respostas imunológicas. Antígenos de natureza intracelular, como vírus e micobactérias,

normalmente estimulam a diferenciação dos linfócitos Th0 em linfócitos Th1, com produção de citocinas como IFN- γ , IL-12, TNF- α e de substâncias derivadas do oxigênio, como o óxido nítrico (NO), levando ao desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo celular (KAUFMAN 1999, NORTH e JUNG, 2004). Já os antígenos de natureza extracelular, como alérgenos e helmintos gastrointestinais normalmente estimulam a diferenciação dos linfócitos Th0 em linfócitos Th2, com o desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo humoral, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, resultando na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de altos níveis de anticorpos (NEGRÃO-CORRÊA, *et al.*, 2003). Apesar de ambas as células Th1 e Th2 serem capazes de colaborar com os linfócitos B, elas estimulam a produção de anticorpos de diferentes subtipos (FIGURA 1). Por exemplo, as células Th1 induzem a produção de IgG2a, enquanto subpopulações Th2 induzem IgG1 (Stevens *et al.*, 1988).

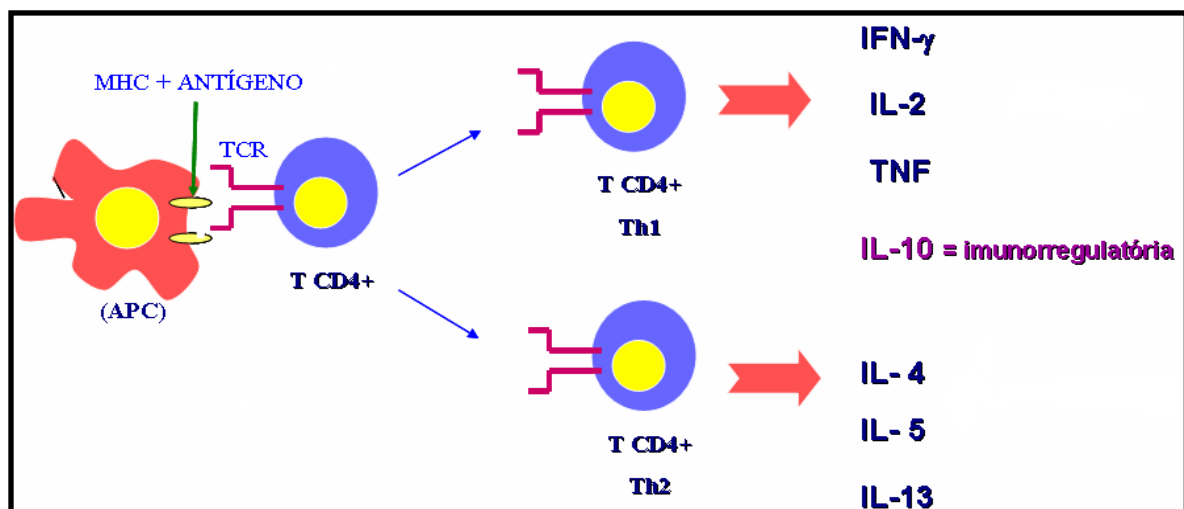


FIGURA 1-Mecanismo de ativação e diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 ou Th2, via apresentação do antígeno associado às proteínas do MHC, com consequente produção de citocinas típicas de cada perfil de resposta imunológica. Modificado de ABBAS e LICHTMAN, 2005.

Além das subpopulações de linfócitos Th1 e Th2, têm sido identificados outros tipos de linfócitos T (como linfócitos Th3 e linfócitos T CD25⁺) com papel imunomodulatório, os quais são importantes fontes de citocinas como a IL-10 e TGF-

β (xerox do Sílvio e colocar outra referencia). Tais linfócitos têm sido associados a fenômenos de imunossupressão (ANDERSON *et al.*, 2007).

É importante salientar que as citocinas produzidas pelos padrões de resposta Th1 e Th2 têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de uma resposta de natureza contrária à qual lhe deu origem. Em relação à essa inibição, dois pesquisadores do instituto Pasteur, Philippe Kourilsky e Paolo Truffa-Bach (2001), estabeleceram o conceito de campo de citocina, que ficou definido como sendo uma área onde se encontra uma determinada concentração de várias citocinas. A intensidade do campo dependeria da intensidade de síntese, consumo e difusão de cada componente neste espaço. Dentro deste quadro, uma célula dendrítica estimulada por um determinado antígeno produz citocinas do perfil Th1, assim como IL-12 levará uma célula Th0 não sensibilizada a produzir uma determinada citocina de forma concordante com o padrão já determinado, gerando um campo elementar de resposta Th1. Novas células Th0 chegando ao local amplificariam o campo, podendo ocorrer migrações para outro local. Dessa forma a polarização poderia ocorrer pela produção de uma citocina que inibisse a produção de outras; como exemplo, a produção de IFN- γ inibiria a proliferação de linfócitos Th2 e conseqüentemente das citocinas correlatas (Kourilsky e Truffa-Bach ,2001).

Nas infecções intestinais induzidas por nematóides, geralmente ocorre predominância da resposta imunológica do tipo Th2, com a produção de elevados níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE em camundongos (IgG4 e IgE em humanos), eosinofilia, mastocitose intestinal e hiperplasia de células caliciformes (FINKELMAN *et al.*, 1997). Essas respostas são controladas principalmente pelas citocinas IL-4, IL-13, IL5, IL-3, IL-9 e IL-10 (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002). Respostas imunológicas do tipo Th2 induzidas por nematóides, têm sido associadas à proteção do hospedeiro na maior parte dos modelos experimentais utilizados (FINKELMAN *et al.*, 1997; ONAH e NAWA, 2000; LAWRENCE, 2003), assim como em alguns estudos de infecções por nematóides em humanos, como nas estrogiloidíases (PORTO *et al.*, 2001). Assim, a resistência às infecções por nematóides intestinais, está geralmente associada ao padrão de resposta imunológica Th2, enquanto a resposta Th1 se associa à susceptibilidade à infecção (HELMBY *et al.*, 2001; LAWRENCE, 2003). Na infecção helmíntica com *Trichuris trichiura* em camundongos, o bloqueio da resposta Th2 com anticorpos anti-IL-4 ou

com a administração de IL-12 (citocina típica do padrão Th1), promove a cronicidade da infecção, enquanto que a administração de IL-4 (citocina típica do padrão Th2) induz a expulsão do parasito. A infecção experimental com *Trichuris muris*, também relacionou a resistência à infecção com o padrão de resposta imunológica Th2 e a susceptibilidade com a resposta Th1 (HELMBY *et al.*, 2001; LAWRENCE, 2003).

1.2 - PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS /IMUNOMODULATÓRIAS NAS INFECÇÕES POR PARASITOS GASTROINTESTINAIS

Há muitos estudos que apontam a importância das moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias nas mais variadas infecções por patógenos gastrointestinais. As moléculas co-estimulatórias, como CD28, presentes na superfície de linfócitos T, interagem com as co-estimulatórias CD80/CD86, expressas sobre APCs profissionais e participam da diferenciação e da amplificação das respostas imunológicas dos tipos Th1 e Th2 (GREENWALD *et al.*, 1999; SOOS *et al.*, 1999). A presença das moléculas co-estimulatórias, CD80 e CD28, pode ter um importante papel na geração de células T citotóxicas para o reconhecimento de antígenos específicos e para a produção e manutenção de células T CD4 de memória. A interação de CD28 com CD80/CD86 tem um papel central no sinal co-estimulatório para a proliferação e ativação de células T primárias, para a produção de proteínas anti - apoptóticas e de citocinas, como a IL-2 e para evitar a anergia clonal. Porém, CD86 apresenta maior capacidade de ativar células Th2 e aumentar a produção de suas citocinas, como por exemplo, IL-4, do que CD80, que é menos eficiente na ativação destas células (NAKAJIMA *et al.*, 1996; MUELLER, 2000; WANG, 2000; EKKENS *et al.*, 2002). Essas moléculas CD80/CD86 também podem se ligar à molécula CTLA-4, presente na membrana dos linfócitos T, e neste caso, promovem um sinal negativo com baixa ativação de células T (NAKAJIMA *et al.*, 1996; GREENWALD *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006; FIGURA 2).

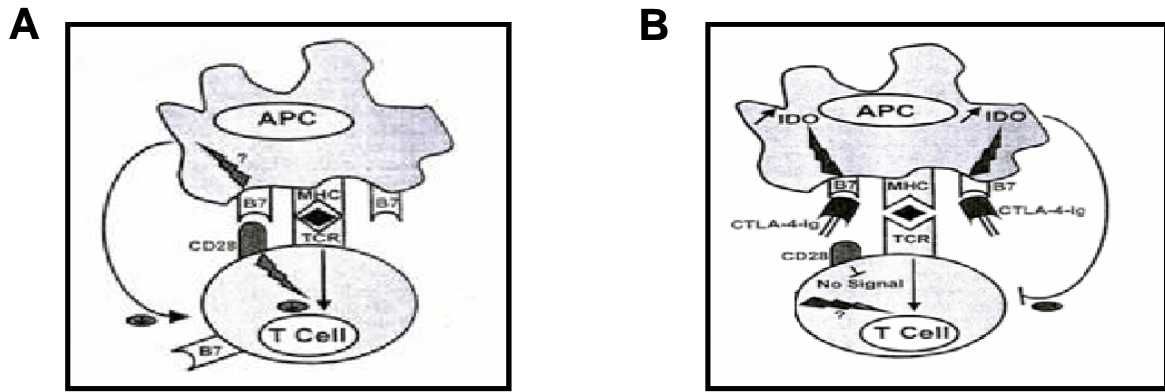


FIGURA 2 - Mecanismo de ativação de linfócitos T via interação das moléculas coestimulatórias/imunomodulatórias, presentes na superfície das APCs e dos linfócitos T. Em **A** está representado a interação das moléculas CD28, presente na superfície do linfócito T e B7(CD80 ou CD86), presente na superfície da APC, com conseqüente ativação do linfócito T. Em **B**: representação da inibição da ativação do linfócito T, pela utilização de proteína homóloga à molécula de CTLA-4 (CTLA-4-Ig), a qual se liga às molécula B7(CD80 ou CD86) impedindo sua interação com o CD28, na superfície do linfócito T. Modificado de ALEGRE e FALLARINO, 2006.

A molécula CTLA-4 é estruturalmente homóloga à molécula CD28, sendo expressa em altos níveis após 48-72 horas de ativação das células T, funcionando também como receptora para moléculas CD80 e CD86 (LU *et al.*, 1999). Acredita-se que a CTLA-4 atua na inibição da produção de IL-2 e na progressão do ciclo celular, podendo ainda, mediar a apoptose induzida por antígenos específicos, e dependendo do nível de sua expressão e da intensidade da sinalização do TCR, pode alterar o perfil da resposta imunológica. Por exemplo, o bloqueio de CTLA-4 com a utilização de CTLA-4 ligante (anticorpo que se liga à molécula de CTLA-4 impedindo sua interação com CD80 e CD86) pode resultar em um aumento da secreção de citocinas Th2 (STEEL e NUTMAN, 2003). Além de contribuir para a regulação negativa para antígenos específicos, esta molécula pode alterar também, o balanço de Th1 e Th2 (STEEL e NUTMAN, 2003).

O papel de CTLA-4 em infecções parasitárias tem sido recentemente estudado em modelos murinos. Esta molécula parece ter um papel na hiperatividade de células T e na produção de IL-4 em infecções por nematóides gastrointestinais. Além disso, nas infecções filariais, pode contribuir para a regulação de antígeno específico na resposta celular, podendo também interferir no tempo de exposição do hospedeiro ao verme, no desenvolvimento das microfilárias e no contato do parasito com o antígeno (MCCOY, 1997; STEEL e NUTMAN, 2003). Na infecção experimental com o nematóide *Nippostrongylus brasiliensis*, a resposta imunológica é mediada por células Th2, caracterizada pela produção de citocinas IL-4 e IL-5,

resultando ainda, em eosinofilia, mastocitose e produção de IgE. Nesta infecção, o bloqueio de CTLA-4 com o anticorpo monoclonal anti CTLA-4, resultou na intensificação da resposta imunológica, com o aumento da produção de IL-4 e IL-5, reduzindo também o número de vermes adultos no intestino, a postura de ovos e a fecundidade destes vermes (MCCOY, 1997). Outro modelo experimental utilizado para o estudo do papel da CTLA-4 em infecções helmínticas é a infecção de camundongos com o nematóide *Helignossomoides polygyrus*. A resposta imunológica a este parasito é restrita à região entérica, sendo caracterizada pela elevação de IgE, eosinófilos, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-9. Neste modelo, a administração de CTLA-4 Ig em cada estágio da infecção, inibiu o desenvolvimento de células B e T e a eosinofilia, e ainda, diminuiu os níveis de IgE no soro (LU *et al.*, 1994). CTLA-4 Ig é uma proteína homóloga à CTLA-4, que se liga com alta afinidade às moléculas de CD80 e CD86, impedindo a interação dessas moléculas com a molécula de CD28, com a consequente geração de um sinal negativo no processo de interação da APC com o linfócito T. Steel e Nutman (2003) analisaram o papel da CTLA-4 no modelo experimental com *Brugia malayi*, e observaram que a expressão desta molécula induziu baixa regulação da resposta inflamatória, aumentando a debilidade da doença, e ainda, preveniu ou evitou a eliminação do parasito, alterando o perfil de citocinas e a ativação de células Th1 e Th2.

Na infecção experimental de camundongos com o nematóide *H. polygyrus*, tanto CD80 quanto CD86, pode iniciar uma resposta Th2, porém, somente CD86 é necessária na progressão desta resposta (GREENWALD *et al.*, 1999). Estudos usando CD80/CD86 mostram que interações desse tipo são necessárias para o desenvolvimento da resposta imunológica primária contra *H. polygyrus*, incluindo o aumento de células T CD4, IL-4, IgG1 e IgE, e ainda, que a elevação de antígenos específicos pode ser inibida durante a resposta de memória, quando a interação CD80 ou CD86 for interrompida no início da infecção deste parasito. Além disso, ressalta-se a importância de estudos futuros para a determinação de mecanismos funcionais da molécula CD86 na resposta imunológica, incluindo o papel individual de CTLA-4 na regulação de células T efectoras na resposta Th2 (GREENWALD *et al.*, 1999; EKKENS *et al.*, 2002).

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFECÇÃO COM O *Strongyloides venezuelensis*

Strongyloides venezuelensis (BRUMPT, 1934) é um nematódeo encontrado em diferentes partes do mundo, parasitando diversos roedores como, por exemplo, ratos, camundongos e hamster, e tem sido recentemente utilizado para vários propósitos e protocolos de pesquisas para os estudos de biologia, imunologia, morfologia, características bioquímicas, mecanismos de expulsão de vermes e atividade nematicida, facilitando também a análise de mecanismos imunológicos durante a migração larval e a fase de infecção intestinal (ATTAMIMI, 2002; MATSUDA *et al.*, 2003). Desse modo, um modelo experimental bastante utilizado para se estudar os inúmeros aspectos de imunoproteção e imunorregulação durante as infecções gastrointestinais é a infecção de roedores com *S. venezuelensis*, o qual apresenta o ciclo de vida bastante similar ao do nematóide *Strongyloides stercoralis*, um parasita humano que apresenta grande disseminação em indivíduos imunossuprimidos, podendo levar à morte (NEVES *et al.*, 2003).

Na infecção experimental com camundongos, as larvas de *S. venezuelensis* penetram através da pele, migram para o pulmão, atingem as vias aéreas superiores, sendo posteriormente deglutidas. Então, se fixam na mucosa duodenal, onde atingem a idade adulta e são espontaneamente eliminados após um período de 10 a 14 dias da infecção (FIGURA 3).

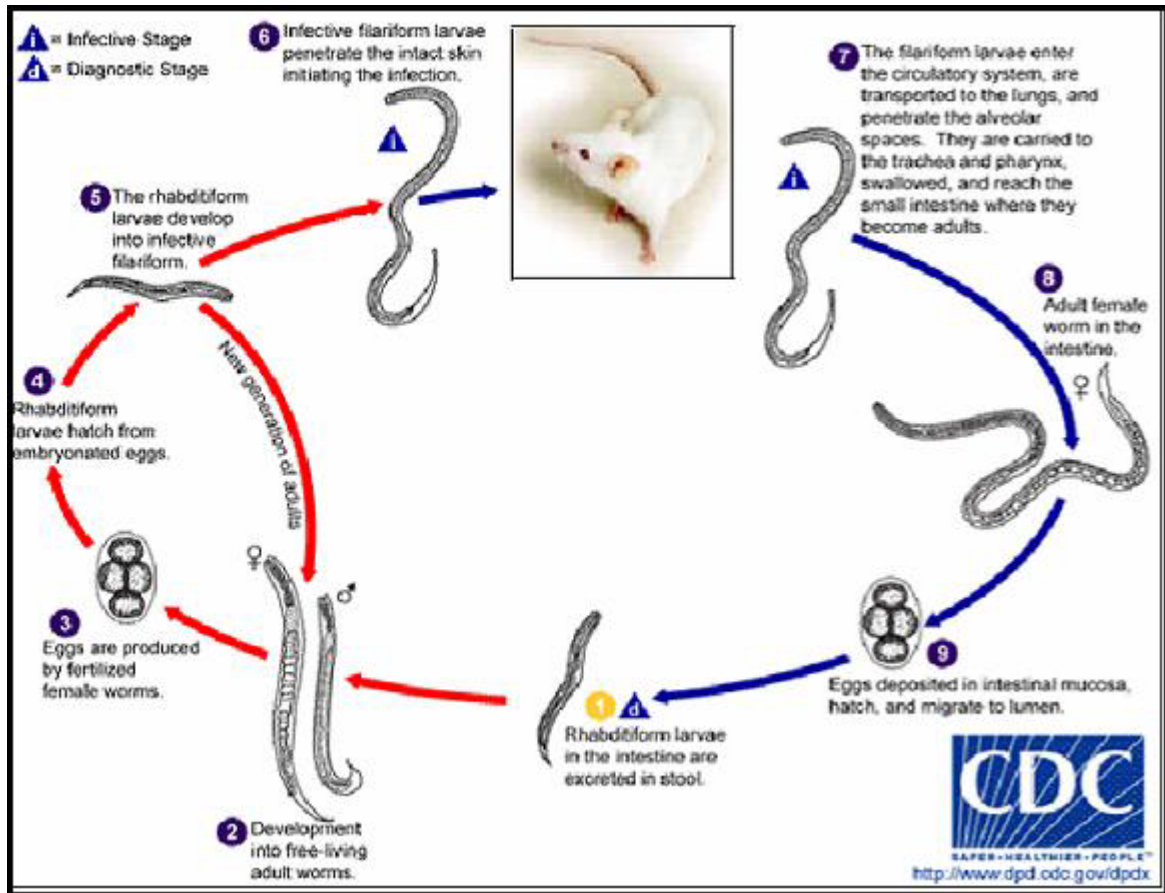


FIGURA 3- Ciclo vida de *S. venezuelensis*. Modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Em ratos, a eliminação do verme adulto é um pouco mais demorada, ocorrendo após 5 semanas da infecção pela via subcutânea. (TAKAMURE, 1995; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004). A migração do *S. venezuelensis* em ratos aparece em vários órgãos internos, incluindo o fígado, sangue que circula no coração, pulmão e intestino delgado, sendo que as larvas quando inoculadas por via oral no estômago aparecem no fígado vinte minutos após a infecção. No coração, as larvas foram observadas após quarenta e cinco minutos da infecção; no pulmão puderam ser vistas após 3 horas da infecção; na traquéia foram observadas em um período de 3 a 72 horas depois da infecção e no intestino delgado, apareceram após cento e vinte horas da infecção (MATSUDA *et al.*, 2003). Em infecção de ratos Wistar com *S. venezuelensis* pela via subcutânea, as larvas apareceram no pulmão após quarenta e cinco horas da infecção e no intestino, após sessenta horas da infecção (TAKAMURE, 1995). Nesta rota migratória as larvas induzem eosinofilia, produção de muco, aumento da concentração de IgE e hiperresponsividade das vias aéreas (MARUYAMA *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004).

Eosinófilos podem infiltrar na camada do intestino delgado do hospedeiro e atacar o *S. venezuelensis* na fase adulta, podendo ainda, serem efetores contras as infecções crônicas provocadas por nematóides (EL-MALKY *et al.*, 2003). A expulsão do *S. venezuelensis* do intestino também é acompanhada por eosinofilia, mastocitose, aumento do número de células caliciformes na mucosa intestinal, com aumento da produção de muco por essas células, e pela predominância das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (KHAN *et al.*, 1993; CARA *et al.*, 2000; NEGRÃO-CORRÊA, 2004;). Há evidências que o mecanismo responsável pela eliminação intestinal de *S. venezuelensis* seja dependente do receptor de IL-4 (IL-4R) e de ativação da molécula transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT6) (ONAH e NAWA, 2000; FINKELMAN *et al.*, 2004). É possível que a ativação do IL-4R/STAT6 cause danos aos parasitos, pela indução da liberação de sulfato-glicanos por mastócitos e/ou células caliciformes, os quais impediriam a aderência do verme na mucosa intestinal (NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006). Investigações sobre uma possível participação de resposta Th1 na infecção do *S. venezuelensis* utilizando-se camundongos deficientes em IL-12, os quais não produzem IFN- γ , demonstraram que tais animais conseguiram eliminar os vermes adultos de forma similar aos animais normais (NEGRÃO-CORRÊA e TEIXEIRA, 2006). Apesar da resposta Th2 parecer ser dominante na conferência de proteção ao *S. venezuelensis*, é necessário a investigação de um maior número de parâmetros que ajudem a esclarecer a dinâmica da infecção.

1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO COM *Mycobacterium*

A tuberculose é uma doença infecciosa e contagiosa causada pelos bacilos da família Mycobacteriaceae, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis*, de evolução normalmente crônica e progressiva, acometendo em especial os pulmões. É uma das doenças infecciosas de maior impacto mundial, sendo responsável por aproximadamente 2 milhões de óbitos e 9 milhões de novos casos por ano (WHO, 2007). China, Indonésia, Bangladesh e Paquistão contribuem com mais da metade de casos novos no mundo. No Brasil, o número de casos novos está próximo dos 100.000/ano (TEIXEIRA, ABRAMO E MUNK, 2007).

M. tuberculosis tem o homem como único reservatório e *M. bovis*, que causa a tuberculose bovina, quando transmitida à espécie humana torna-se muito virulenta, principalmente em pessoas com imunodeficiência (BENENSON, 1992). A transmissão da doença é predominantemente por via aérea. O contágio pode ser direto, através de finas gotículas de secreção oronasal (contendo os bacilos que são eliminados pela pessoa contaminada durante a tosse, o espirro e a fala), que ficam em suspensão no ar e são inaladas por pessoas suscetíveis à infecção. Estas gotículas, contendo as bactérias, chegam até os bronquíolos e os alvéolos, dando início ao processo infeccioso. A transmissão também pode ser feita por contato oral com os bacilos (VERONESI, 1991).

Da infecção ao aparecimento da lesão primária decorrem cerca de 6 a 12 semanas. O risco da tuberculose pulmonar progressiva ou extrapulmonar é maior dentro de 1 a 2 anos após a infecção inicial, podendo persistir durante toda a vida sob a forma latente. A infecção inicial passa, em geral, despercebida na maioria dos casos; porém, pode evoluir para as diferentes formas de tuberculose, como a pulmonar ou mesmo extrapulmonar, causando lesões, principalmente, nas meninges, cérebro, intestino, coração, ossos, traquéia e fígado (VERONESI, 1991). Conforme a gravidade das lesões, a sintomatologia é caracterizada por febre, tosse, expectoração, inapetência, emagrecimento, dores torácicas e hemoptises. Em outras localizações, estas manifestações são variáveis, em decorrência da área do corpo afetada. O diagnóstico é geralmente estabelecido pelos exames clínico, laboratorial e radiológico, pela pesquisa do agente infeccioso no escarro e em outros

materiais biológicos. A prevenção e o controle são feitos com medidas de higiene geral e com a aplicação da vacina BCG (BENENSON, 1992).

O limite entre proteção e doença está diretamente relacionado com o grau de imunidade mediada por células, isto é, por macrófagos, principalmente através da produção de TNF- α , IL-12 e óxido nítrico (NO), linfócitos Th1 e linfócitos CD8+, através da produção de IFN- γ (KAUFMANN E LADEL, 1994; ERB *et al.*, 1998; THOMPSON-SNIPES *et al.*, 1998; KAUFMAN, 1999). Assim, macrófagos e células dendríticas uma vez infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* produzem altas concentrações de TNF- α e IL-12 (HENDERSON *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999).

Apesar dos grandes avanços nos estudos da resposta imunológica na tuberculose, os mecanismos envolvidos na doença ativa ainda permanecem obscuros. A resposta imunológica na tuberculose é na maioria das vezes caracterizada por uma imunossupressão ativa, particularmente na doença severa, observando-se diminuição de IL-2 e IFN- γ , além de anergia específica para a proteína purificada derivada do *Mycobacterium bovis* (PPD) (GOLDFELD, 2004; DELGADO *et al.*, 2002) sendo também observado um aumento de IL-10 (GOLDFELD, 2004) de TGF- β (GREEN *et al.*, 2003) e de IL-4 (MAERTEN, 2005) .

Assim, as citocinas representam um componente de extrema importância na defesa contra as micobactérias, podendo atuar tanto nas funções reguladoras quanto nas funções efetoras da resposta imunológica a esses patógenos (NORTH E JUNG, 2004; TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK, 2007). Vários trabalhos mostraram que o *M. tuberculosis* induz a produção de citocinas com um perfil predominantemente Th1, sendo esta ativação importante no controle da infecção, visto que, a produção de IFN- γ e TNF- α promovem a produção da enzima iNOS-2 que é responsável pelas altos níveis de óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos infectados com o *M. tuberculosis* (COOPER *et al.*, 2002). A IL-12 promove a produção de IFN- γ em células natural killer (NK) e a expansão de células do perfil Th1 antígeno específicas. Essas células Th1 são fontes de IL-2 e IFN- γ na resposta imunológica adquirida, sendo recrutadas para o controle de infecção na fase crônica, uma vez que são capazes de atuar sobre células T e macrófagos (TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK, 2007). Entretanto, se por um lado o IFN- γ , TNF- α e NO são importantes na ativação dos macrófagos, estas mesmas citocinas induzem a formação de granulomas que

acabam levando a uma destruição do tecido pulmonar, não implicando necessariamente na destruição da bactéria (COOPER *et al.*, 2002).

Mutações afetando a expressão de receptores para IFN- γ e IL-12 tem sido associadas com infecções disseminadas por micobactérias do ambiente e *M. bovis*-BCG (SALGAME, 2005) e crianças com deficiência nos níveis dessas citocinas se mostram mais susceptíveis a infecções micobacterianas (TALAAT *et al.*, 2006). Apesar do perfil de citocinas Th1 ser caracterizado na infecção por micobactérias, sabe-se que a IL-4, IL-10 e outros marcadores de ativação de linfócitos Th2 podem ser identificados em pacientes com tuberculose (JUNG *et al.*, 2005). Portanto, acredita-se que a resposta imunológica observada na infecção pelo *M. tuberculosis* não possa ser interpretada apenas levando-se em conta a regulação dos subtipos de linfócitos Th1 e Th2.

Os eventos relacionados à resposta inata do hospedeiro iniciam-se com a entrada do *M. tuberculosis* no pulmão, onde macrófagos e células dendríticas rapidamente são invadidos pela micobactéria, sendo que o receptor 2 para quimiocina (CCR2) tem um importante papel no recrutamento destas células para o pulmão infectado (SALGAME, 2005; OLLEROS *et al.*, 2005). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao sítio da infecção e de multiplicação do bacilo, acompanhadas das células NK e macrófagos (TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK, 2007).

Apesar dos mecanismos de resposta imunológica inata contra as micobactérias não estarem totalmente esclarecidos, alguns trabalhos têm demonstrado que os receptores do tipo “Toll-like” (TLRs) são importantes no reconhecimento dos antígenos do *Mycobacterium* e na ativação de macrófagos e células dendríticas (QUESNIAUX *et al.*, 2004). Os receptores celulares TLR2 e TLR4 estão envolvidos principalmente no reconhecimento da micobactéria íntegra e também dos componentes desta, como as lipoarabinomananas, lipomanas, e a lipoproteína de 19 kDa (QUESNIAUX *et al.*, 2004). A importância dos TLRs no controle da infecção causada pelo *Mycobacterium* foi demonstrada em camundongos deficientes do fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), que mostraram maior susceptibilidade a infecção com o *M. tuberculosis*. Apesar desses animais terem morrido rapidamente em consequência da infecção, ainda assim, foram capazes de gerar uma resposta Th1 específica para o *M. tuberculosis*, o que

demonstra um envolvimento do MyD88 na regulação da infecção (FREMOND *et al.*, 2004).

1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis*

A infecção por *M. bovis* quando transmitida ao homem, acontece em geral, pela ingestão do leite de vaca contaminado, o que tem se tornado muito raro em muitos países, devido à vacinação dos animais e à pasteurização do leite (BENENSON, 1992). Em 1889 Theobald Suit isola o *M. bovis* e em 1902, Ravenel obteve a 1ª prova definitiva da transmissão da tuberculose bovina ao homem (FELDMAN, 1955). Em 1938, Torres e Pacheco informaram sobre o isolamento do bacilo do tipo bovino de lesões humanas, tratando-se da primeira publicação na literatura médica nacional sobre o assunto. No homem, o órgão preferencial do bacilo é o pulmão, ocorrendo uma evolução da doença muito semelhante àquela provocada pelo *M. tuberculosis*.

Indiscutivelmente, a ingestão de leite cru contaminado, constitui uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino. O risco para a Saúde Pública de se contrair o agente pela ingestão de produtos cárneos contaminados torna-se menor, devido a baixa incidência do agente em tecidos musculares e do hábito de não se comer carne crua no Brasil. Porém, tal risco não deve ser ignorado, quando se leva em consideração o grande número de abates clandestinos, ou mesmo o abate de animais descartados de rebanhos positivos em matadouros municipais, que não atendem as normas de inspeção exigidos pelo rigor da lei. Trabalhos realizados na Nigéria incriminam a ingestão de carne contaminada como responsável por cerca de 45% dos casos de tuberculose em humanos causada pelo *M. bovis* (GRIFFIN, 1995). Quando a contaminação se dá por ingestão, pode ocorrer uma infecção inicial das amígdalas, prosseguindo então para as cadeias de linfonodos cervicais. A lesão inicial não passa de uma amigdalite; entretanto lesões supurativas podem ocorrer nas cadeias cervicais, afetando linfonodos pré-auriculares, tonsilares e supraclaviculares, com posterior envolvimento da pele subjacente. Tais lesões, são comumente conhecidas como "scrofulodermia" ou "lupus vulgaris" (FELDMAN, 1955). A localização óssea e articular também é comum nos casos extra-pulmonares, provocando lesões ósseas localizadas e artrite. Em

crianças, é comum se encontrar acometimento intestinal. As formas gênito-urinárias são menos freqüentes (GRANGE E YATES, 1994). Quanto ao acometimento pulmonar, resultados obtidos de estudos experimentais demonstram que cinco, e provavelmente um único bacilo, são capazes de produzir lesões pulmonares quando atingem as vias aéreas inferiores, principalmente os alvéolos, por inalação de aerossóis (CHAUSSÉ, 1913 apud MORRIS, 1994). A maior ocorrência da forma pulmonar da tuberculose bovina, em indivíduos da área rural, pode ser explicada por tais resultados, sendo considerada principalmente uma doença ocupacional (GRANGE E YATES, 1994). Médicos-veterinários e trabalhadores de frigoríficos, que mantêm um contato direto com o animal, também estão sujeitos a infecção pelo bacilo bovino devido a inalação de aerossóis. Outra forma de manifestação da tuberculose bovina em humanos é o acometimento cutâneo. A contaminação se dá pelo contato direto com carcaças contaminadas e as classes mais acometidas são os magarefes, auxiliares de inspeção e médicos-veterinários. Tais lesões, na maioria das vezes, são pouco extensas e regressivas, manifestando-se na forma de pequenas pápulas, semelhantes a verrugas, sendo conhecidas como "butcher's wart", ou verruga do magarefe (GRANGE E YATES, 1994). Tal benignidade da tuberculose cutânea, talvez se deva à resistência que os adultos possuem ao bacilo e não à menor virulência do mesmo.

A contaminação pode ocorrer na infância e permanecer silenciosa, porém em algum momento da fase adulta podem ocorrer manifestações dos sintomas. Na Alemanha, 09 de 70 pacientes com tuberculose por *M. bovis* manifestaram a doença após 1961, ano no qual todo o rebanho daquele país foi considerado livre de tuberculose (SALFELDER *et al.*, 1983 apud GRANGE E YATES, 1994). No Brasil, a escassez de trabalhos epidemiológicos recentes em humanos, que realizam tipagem do agente causador da tuberculose, associadas a possibilidade de uma infecção primária silenciosa, que pode sofrer reativação em momento oportuno como ocorre por exemplo em pacientes com HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), impedem que se tenha uma idéia da real situação do progresso da doença (MORRIS, 1994).

Devido às semelhanças na evolução da doença causada pelo *M. bovis* em relação ao *M. tuberculosis* e pela menor virulência do primeiro em relação ao segundo na manipulação laboratorial, utilizou-se nesse trabalho a cepa selvagem de

M. bovis (ATCC 19274). A cepa utilizada nesse estudo foi adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INQS-FIOCRUZ-RJ).

1.6 PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/IMUNOMODULATÓRIAS NAS INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS

A expressão das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 na superfície de macrófagos e células dendríticas, é desencadeada pelo reconhecimento dos TLRs, moléculas específicas derivadas do *M. tuberculosis*. A célula T regulatória CD25⁺ (linfócito TCD4⁺ CD25⁺) tem um importante papel na imunopatologia de diversos patógenos (WALSH; SMITH e FALLON, 2007). Existe alguma evidência de que as células T regulatórias (TREGs) desempenham um importante papel na regulação da resposta imunológica do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*, como já demonstrado para outras infecções (BELKAID E ROUSE, 2005). Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado o envolvimento das TREGs na tuberculose humana (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006; GUYOT-REVOL *et al.*, 2006).

Ribeiro-Rodrigues e colaboradores (2006) mostraram que há um aumento da frequência de células T expressando CD4⁺CD25⁺ durante a fase ativa da doença. Estes autores mostraram ainda que células TREGs foram observadas envolvendo os pulmões dos pacientes com tuberculose. Parece que há uma correlação direta na expressão do marcador CD25⁺ e a expressão de RNA mensageiro de FoxP3 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com tuberculose. Além disso, foi observado um aumento de IFN- γ *in vitro* quando as células CD4⁺CD25⁺ foram depletadas, além de mostrar que pacientes com a forma extra pulmonar da doença apresentaram maior expressão de FoxP3 do que os pacientes com a forma pulmonar (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006).

1.7 *Mycobacterium* E COINFECÇÕES

A interação entre infecções helmínticas e micobacterianas em modelos experimentais tem sido pouco estudada. Animais C57BL/6 infectados com o *M. bovis*-BCG apresentaram aumento na produção de IFN- γ por células esplênicas somente após 3 semanas de infecção, não sendo observado produção de IL-4 (TEIXEIRA *et al.*, 1995). Foi verificado, em camundongos BALB/c, que o perfil de resposta Th1 induzido pela imunização com o PPD é modificado para Th2, com aumento na produção de IL-4 e IL-5, quando os animais são previamente infectados com a filária *Brugia malayi*. No entanto, quando a imunização de animais foi feita simultaneamente com helmintos e antígenos micobacterianos não houve modulação de resposta Th2, sendo a resposta ao PPD predominantemente do tipo Th1 (PEARLMAN *et al.*, 1993). Embora a infecção com helmintos possa influenciar o perfil Th1/ Th2 de citocinas, a influência da resposta Th2 sobre a proteção contra infecções por micobactérias ainda não está clara.

Utilizando infecções experimentais com *N. brasiliensis* (por via intraperitoneal) e BCG (via intranasal), observou-se que linfócitos T de linfonodos de camundongos co-infectados produziram menos IFN- γ *in vitro*, que os infectados somente com BCG, reduzindo os níveis da resposta Th1, sem afetar a eliminação do BCG, verificado através da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) nos pulmões (ERB, *et al.*, 2002). Camundongos da linhagem C57Bl/6, quando infectados com BCG e injetados simultaneamente com extrato de *Ascaris suum*, apresentaram um grande aumento dos níveis de TNF- α e NADPH diaphorase no estágio inicial da infecção ao BCG, sendo que isto levou a uma diminuição de CFU no baço destes animais (FERREIRA *et al.*, 1999).

Diversos autores têm destacado o efeito das infecções por helmintos na modulação da resposta imunológica frente à imunização pelo BCG. Foi demonstrado que crianças nascidas de mães com infecções helmínticas, tiveram alteração da resposta à primeira dose da vacina BCG. Linfócitos T destas crianças produziram 10 vezes menos IFN- γ , em resposta ao PPD, quando comparadas às crianças de mães sem infecções helmínticas (MALHOTRA *et al.*, 1999). Foi demonstrado que infecções parasitárias intestinais que induzem um perfil de resposta do tipo Th2 podem modular a resposta Th1 induzida pela revacinação com o BCG (FERREIRA

et al., 2002). Os autores avaliaram a produção de IFN- γ e IL-10 por células de sangue periférico de 14 adolescentes, entre 12 e 15 anos de idade, que receberam a segunda dose da vacina BCG. Sete desses indivíduos apresentavam diagnóstico positivo para parasitoses intestinais. O perfil das citocinas produzidas pelas células dos indivíduos vacinados, sem infecções helmínticas, mostrou um aumento da produção de IFN- γ , quando comparado com o grupo infectado/vacinado, havendo aumento significativo da produção de IL-10 no grupo com parasitoses intestinais (FERREIRA *et al.*, 2002).

Apesar do possível impacto que a alta prevalência de helmintos na população humana pode exercer na eficácia da vacinação ou do tratamento contra tuberculose e outras infecções de perfil Th1, poucos estudos têm sido realizados neste campo. Estes resultados em conjunto sugerem que o tratamento anti-helmíntico poderia aumentar a eficácia da vacina BCG, o que causaria um grande impacto nos países tropicais e subtropicais, onde a tuberculose e as parasitoses intestinais representam um grave problema de saúde pública. Em contraste, alguns autores sugerem também que a vacinação com o BCG pode diminuir a incidência, prevalência e a intensidade da infecção pelo *Necator americanus* em humanos, assim como induzir alguma proteção em ratos infectados com o *Schistosoma mansoni* (BARRETO *et al.*, 2000; SOULSBY, 1987; ELIAS *et al.*, 2005).

Diante dos impactos causados pelos helmintos e dos mecanismos complexos que envolvem tais infecções, é imprescindível a utilização de modelos experimentais, que permitam o esclarecimento das diversas infecções que podem afetar a população humana. A partir desses estudos pode-se esclarecer a forma de interferência dos parasitos sobre o organismo, permitindo a busca de soluções no controle, tratamento e na prevenção dessas infecções. É de extrema importância se estabelecer novos modelos experimentais para o estudo de co-infecções que apresentam o perfil Th1xTh2, para um melhor entendimento dos mecanismos de resposta imunológica envolvidos no controle das infecções. Nesse sentido, o presente trabalho, foi o primeiro a investigar os mecanismos imunológicos envolvidos na co-infecção por *S. venezuelensis* e *Mycobacterium bovis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a influência da coinfeção por *Mycobacterium bovis* selvagem na resposta imunológica de camundongos BALB/c co-infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice de infectividade do *S. venezuelensis* através da contagem do número de vermes no intestino e do número de ovos nas fezes dos animais infectados;
- Avaliar os níveis de IgE específica ao antígeno da larva L3 de *S. venezuelensis* no soro dos animais infectados nos 7^o e 10^o dias após infecção pelo *S. venezuelensis* e 4^o e 7^o dias após a infecção pelo *M. bovis* selvagem;
- Avaliar a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 em culturas de células de baço e de IL-4, IL5 e IL-13 no intestino de animais co-infectados 7^o e 10^o dias após a infecção com *S. venezuelensis*, 4^o e 7^o dias após a infecção com *M. bovis* selvagem;
- Quantificar os níveis de EPO no intestino dos animais co-infectados.
- Avaliar a expressão de moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD80, CD86, CD28, CTLA-4 e CD25) em células do baço e de linfonodos mesentéricos dos animais infectados, através de citometria de fluxo;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, com aproximadamente 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF) e mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF. Os camundongos foram acondicionados em gaiolas-padrão, exceto aqueles infectados com *M. bovis* selvagem, os quais foram acondicionados em micro-isoladores. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas, sendo alimentados exclusivamente com ração apropriada e água, sendo utilizados 4 a 5 animais por grupo: grupo controle não infectado (grupo CONTROLE); grupo infectado somente com *S. venezuelensis* (grupo SV) e grupo co-infectado com *S. venezuelensis* e *M. bovis* (grupo COIN). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, protocolado pelo número 034/2006 .

3.2 INFECÇÃO E ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO COM *S. venezuelensis*

Para verificar se os animais obtidos apresentavam alguma parasitose intestinal por helmintos, foi realizado em todos os indivíduos, o teste de “swab” anal . Independente do resultado do teste, todos os animais foram tratados com anti-helmínticos, contra cestóides e nematóides, e após o período de eliminação residual dos anti-helmínticos, os animais foram infectados com *S. venezuelensis*. *S. venezuelensis* utilizado nos experimentos foi isolado de *Rattus norvegicus* e é mantido no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais através de passagens em ratos Wistar. As larvas filariformes infectivas (larvas L3) foram obtidas através de fezes de ratos infectados tendo sido cultivadas em carvão vegetal. As culturas foram deixadas de 48 -72 horas a 28 °C e as larvas infectivas, coletadas e concentradas através da técnica de Baermann-Moraes, conforme

Moraes (1948). Em seguida, as larvas foram lavadas várias vezes em tampão PBS, contadas e ajustadas na concentração de 5000 L3/ml de PBS para serem utilizadas na infecção dos animais. Os animais foram infectados por via subcutânea, na região peritoneal, com 100µl de PBS contendo aproximadamente 700 larvas. Para evitar possíveis reinfecções por coprofagia, todas as gaiolas foram higienizadas semanalmente.

3.3 DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO PELO *S. venezuelensis* E ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO

A constatação da infecção e a análise da infectividade foram realizadas através da contagem de ovos nas fezes 7, 10, 12 e 14 dias pós-infecção (d.p.i.) com *S. venezuelensis* e de vermes retirados do intestino delgado no 7^o e 10^o d.p.i. (FIGURA 4). Após necrópsia dos animais, para a coleta dos vermes do intestino delgado, a metade superior do intestino (compreendendo o duodeno e porção inicial do jejuno) de cada camundongo foi retirado, lavado com PBS e feito uma abertura longitudinal para exposição da mucosa, ficando incubada em PBS por 4 horas a 37 °C. As formas emergentes do intestino foram quantificadas através de estereomicroscopia. Para a determinação de ovos eliminados nas fezes, estas foram coletadas individualmente do reto (no dia da necrópsia) ou de gaiolas onde os animais foram acondicionados individualmente para a coleta de fezes frescas (nos dias anteriores ao necrópsia). As fezes foram pesadas e homogeneizadas em igual volume de PBS, sendo avaliadas três amostras (100µl) fecais por animal, através de microscopia de luz, a fim de se determinar o número total de ovos. O número de ovos de *S. venezuelensis* foi expresso como número de ovos/grama de fezes.

3.4 CO-INFECÇÃO

Os animais foram infectados com *S. venezuelensis* por via subcutânea (grupo SV) e no dia 3 um grupo desses animais foi co-infectado com 10⁶ CFU de *M. bovis* selvagem (ATCC19274), adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade e

Saúde (INQS-FIOCRUZ-RJ). Cada animal recebeu o inóculo diluído em 0,2 ml de PBS (grupo COIN) por via endovenosa, no plexo oftálmico. Após 7^o e 10^o d.p.i. com o *S. venezuelensis* (respectivamente, 4^o e 7^o d.p.i. com *M. bovis*), os animais foram necropsiados e realizadas as análises propostas (FIGURA 4). A coinfeção com *M. bovis* foi realizada no 3^o d.p.i. com *S. venezuelensis* no intuito de haver uma co-localização dos parasitos no pulmão. De acordo com estudos sobre a rota migratória de *S. venezuelensis* em roedores (ratos wistar), na infecção subcutânea, as larvas apareceram no pulmão após quarenta e cinco horas da infecção (TAKAMURE, 1995). Dessa forma, inoculando o *M. bovis* no 3^o dia após a infecção com *S. venezuelensis*, não haveria dúvidas sobre a co-localização dos parasitos no pulmão dos animais a partir desse ponto da infecção.

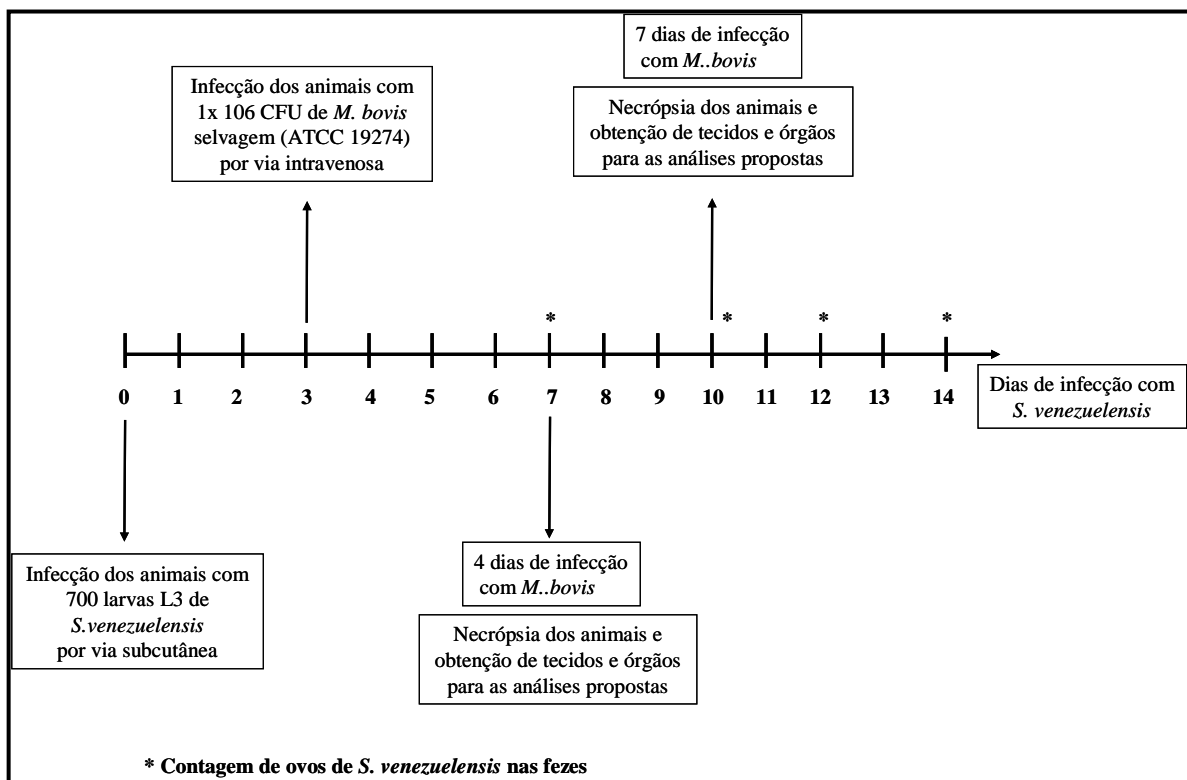


FIGURA 4- Desenho experimental das infecções realizadas

3.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO de *S. venezuelensis*

Para a obtenção do antígeno solúvel da larva L3 (AgL3), um grande número de larvas infectivas foram extensivamente lavadas em PBS e ressuspensas em PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases. Estas larvas foram rompidas em vortex com esferas de vidro (cinco ciclos de 1 minuto cada) e posteriormente submetidas a sonicação (10 ciclos de 1 minuto). Após as partículas insolúveis serem removidas através de centrifugação do homogeneizado de larvas (400xg por 30 minutos), o sobrenadante foi removido e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, 1951. As alíquotas foram então mantidas à -20° C, para posterior utilização no estímulo das culturas de células *in vitro*.

3.6 OBTENÇÃO DE SORO PARA DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA AO ANTÍGENO DA LARVA L3 DE *S. venezuelensis*

Amostras de sangue do plexo oftálmico dos animais foram coletadas nos dias 7 e 10 após a infecção com *S. venezuelensis*. As amostras foram centrifugadas em a 500xg por 10 minutos. Os soros foram coletados e congelados a -20° C, para posterior dosagem de IgE específica ao antígeno da larva L3 de *S. venezuelensis*.

3.7 CULTURA DE CÉLULAS

Após a lise das hemácias, as células do baço foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 100 ug/ ml de penicilina, 0.1 mM de aminoácido não essencial e 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas BR). Estas células (1x10⁶ células/ml) foram estimuladas ou não *in vitro*, com AgL3 de *S. venezuelensis* (100 µg/mL) em placas de cultura de 96 poços (Corning). Após 48 hs de cultivo em estufa de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20° C, para posterior dosagem das citocinas IFN-γ e IL-10.

3.8 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE MACERADO DE INTESTINO

Camundongos BALB/c infectados com *S. venezuelensis* (grupo SV) e co-infectados com *M. bovis* (grupo COIN) foram necropsiados com dose letal de xilasina e quetamina por via intra-peritoneal e 100 mg intestino de cada animal foram macerados em 1 ml de tampão de lise (0,4 M de NaCl, 10 mM de NaPO₄, 0,1 mM de metil sulfonil fluoreto, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 pM de aprotinina e 0,05% de Tween 20). Em seguida, o macerado de intestino foi centrifugado a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e utilizado na detecção de citocinas por ELISA.

3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Os sobrenadantes de cultura das células de baço e de macerado de intestino foram submetidos à técnica de ELISA de captura para determinação dos níveis de IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 (kit BD OptEIA, CA, USA). Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão segundo as normas do fabricante, e incubadas por 18h a 4°C. Após este período os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-Tween 20 (PBST) + 10% SFB, por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes em PBST e adicionadas as curvas-padrão para as respectivas citocinas, diluídas na razão de 1:2. Nos poços seguintes as amostras dos sobrenadantes de cultura foram distribuídas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o 2^o anticorpo biotilado + streptavidina foi adicionado e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram feitas e a reação foi revelada pela adição do substrato contendo TMB. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas recombinantes.

3.10 DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA POR ELISA

A IgE específica foi quantificada em amostras de soro de animais infectados com *S. venezuelensis* e/ou co-infectados por *M. bovis*. As concentrações de IgE foram determinadas por ELISA em amostras de soro diluídas 1:200 utilizando kit comercialmente disponível (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX). Os níveis de IgE nas amostras de soros dos animais foram expressos em ng/ml calculados de acordo com a curva padrão construída utilizando-se IgE recombinante.

3.11 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDASE (EPO)

O nível da peroxidase de eosinófilos (EPO), presente em amostras de intestino, foi utilizado para estimar o número de eosinófilos nesse tecido. Para tanto, 100 mg de intestino dos animais foi pesado e homogeneizado em 1,9 ml de PBS e centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspendido em 1,9 ml de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%, diluído em PBS; congelado três vezes em nitrogênio líquido, descongelado a 37°C e centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado numa reação enzimática, pela adição de quantidades iguais de substrato (1,5 mM o-fenilenediamina, 6,6 mM H₂O₂ em 0,075 mM Tris-HCl [pH 8]). A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ a 1 M, e a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA). Os resultados foram expressos em absorbância.

3.12 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/IMUNOMODULATÓRIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação da expressão de moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias, foi feito um pool de células dos baços e linfonodos de cada grupo dos animais estudados, numa concentração de 1x10⁶ células/ml. As células foram lavadas em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (tampão de

lavagem) e os sedimentos de células foram marcados com anticorpos monoclonais contra linfócitos T (anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8), moléculas co-estimulatórias (anti-CD3/CD28, anti-CD3/CTLA-4), molécula imunoregulatória (CD3/CD25) e células APCs (anti-CD19/CD80, anti-CD19/CD86). A marcação das células ocorreu em um período de 45 minutos. Foram utilizados controles isotípicos de rato marcados com ficoeritrina e fluoresceína. Em seguida foi adicionado 70 µl de SFB, e então lavadas três vezes. As células foram ressuspensas em 1 ml de paraformaldeído (1% em PBS) coletadas e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur-BD, software CellQuest^R, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados 4 a 5 animais em cada um dos 3 grupos estudados : grupo CONTROLE, SV e COIN. Para cada parâmetro avaliado, foi calculado para cada grupo: a média das variáveis numéricas apresentadas pelos indivíduos e o desvio e erro-padrão das médias de cada grupo. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson para distribuição gaussiana dos dados. Foram utilizados os testes paramétricos ANOVA ou t student, de acordo com a análise de variância dos dados e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para determinação das diferenças significantes entre os grupos estudados, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 NÚMERO DE OVOS E VERMES DE *S. venezuelensis*

O número de vermes coletados do intestino dos animais infectados somente com *S. venezuelensis* (grupo SV), no 7º d.p.i. e 10º d.p.i. por *S. venezuelensis*, foi maior no grupo co-infectado com *M. bovis* (grupo COIN) quando comparado ao grupo SV (TABELA 1, $P < 0,05$). A mesma relação foi observada na contagem de ovos no 7º e 10º d.p.i. com *S. venezuelensis* (TABELA 1, $P < 0,05$). O número de vermes coletados no intestino foi maior no 10º d.p.i. por *S. venezuelensis*, tanto no grupo SV quanto no COIN (TABELA 1, $P < 0,05$). Já o número de ovos nas amostras fecais foi significativamente menores nos grupos SV e COIN no 10º d.p.i. por *S. venezuelensis* (TABELA 1, $P < 0,001$). Não foi observado nenhum ovo nas amostras fecais analisadas no 12º e 14º dias de infecção com *S. venezuelensis* (dados não demonstrados).

TABELA 1-Número de ovos e vermes de *S. venezuelensis* de camundongos infectados com *S. venezuelensis* (SV) e co-infectados com *M. bovis* selvagem (COIN).

Grupos	Número de vermes*		Número de ovos (ovos/grama de fezes)**	
	Dias após a infecção com <i>S. venezuelensis</i>			
	7	10	7	10
SV	115±26 ^a	196±48 ^b	35.900±9,5 ^c	1.770 ± 5,6 ^d
COIN	145±55 ^a	271±80 ^b	75.150±7,3 ^c	9.700 ± 1,7 ^d

*Vermes localizados no intestino delgado e **ovos encontrados nas fezes de camundongos BALB/c nos dias 7 e 10 após a infecção com *S. venezuelensis* (4 e 7 dias após a infecção com *M. bovis*, respectivamente). Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de quatro a cinco animais em cada grupo.

Os resultados são representativos de dois experimentos realizados. Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

4.2 NÍVEIS DE IgE NO SORO

Os níveis de IgE quantificados no soro dos animais foram significativamente maiores no grupo SV quando comparado ao grupo COIN ($P < 0,05$) nos dois pontos da infecção avaliados (7 e 10 d.p.i. com *S. venezuelensis*, TABELA 2). Os soros dos animais do grupo SV apresentaram aumento na produção de IgE do 7º para o 10º d.p.i. com *S. venezuelensis* ($P < 0,05$). (TABELA 2). Já nos soros dos animais do grupo COIN, a imunoglobulina só foi detectada no 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, (TABELA 2).

TABELA 2 - Níveis de IgE do soro de camundongos BALB/c infectados com *S. venezuelensis* (grupo SV) e co-infectados com *M. bovis* selvagem (grupo COIN).

Níveis de IgE em amostras de soros (ng/mL)*		
GRUPOS	Dias após a infecção com <i>S. venezuelensis</i>	
	7	10
SV	693 ± 44 ^a	2.240 ± 190 ^b
COIN	108 ± 20 ^a	0 ± 0 ^b

*Amostras de soros foram coletadas nos dias 7 e 10 d.p.i com *S. venezuelensis* (4 e 7d.p.i. com *M. bovis*, respectivamente). Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de quatro a cinco animais em cada grupo.

Os resultados são representativos de dois experimentos realizados. Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

4.3 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

A produção de IFN- γ por células de baço estimuladas *in vitro* com o antígeno da larva L3 de *S. venezuelensis* (AgL3), foi semelhante nos grupos SV e COIN no 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis* (TABELA 3). Já no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, os níveis da citocina foram significativamente maiores no grupo COIN quando comparado ao grupo SV ($P < 0,05$ – TABELA 3). Os maiores níveis de IFN- γ , foram observados no 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, nos dois grupos estudados (TABELA 3). Inversamente, a produção de IL-10 pelas células de baço estimuladas *in vitro* com o AgL3, se mostrou significativamente diminuída no grupo COIN quando comparado ao grupo SV nos dois pontos da infecção ($P < 0,05$, TABELA 3). Os níveis de IL-10, assim como os de IFN- γ , foram maiores no 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, nos dois grupos estudados (TABELA 3).

As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 foram determinadas em sobrenadante de macerado de intestinos de animais dos grupos SV e COIN. Observou-se que os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 estavam aumentados no 7^o d.p.i. nos intestinos dos animais do grupo SV (Figura 5 A-C). No entanto, no 10^o d.p.i. as citocinas IL-4 e IL-13 estavam em níveis bem menores (Figura 5A e 5C) nos intestinos dos animais do grupo SV. Por outro lado, nos intestinos dos animais do grupo COIN, no 7^o os níveis de IL-4 estava diminuído em comparação ao grupo SV no mesmo período (Figura 5A). Porém, não houve variação expressiva dos níveis de IL-5 e IL-13, quando se compara animais dos grupos SV e COIN no 7^o d.p.i. (Figura 5B e 5C). Já no 10^o d.p.i. houve diminuição dos níveis IL-4, IL-5 e IL-13 nos intestinos dos animais de ambos os grupos SV e COIN (Figura 5A - C), sendo mais expressivo a IL-13 (Figura 5C).

TABELA 3 - Níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas *in vitro* com antígeno da larva L3 de *S. venezuelensis*

Citocina	Grupos	Níveis de citocinas (pg/mL)*	
		7 d.p.i. <i>S. venezuelensis</i>	10 d.p.i. <i>S. venezuelensis</i>
IFN- γ	SV	1.247 \pm 7,5	386 \pm 38 ^a
	COIN	1.241 \pm 16	674 \pm 41 ^a
IL-10	SV	900 \pm 67 ^b	87 \pm 7 ^c
	COIN	170 \pm 33 ^b	63 \pm 1,5 ^c

*As concentrações de citocinas foram determinadas nos sobrenadantes de cultura de células de baço após 48 horas de cultivo. O experimento foi realizado nos dias 7 e 10 após a infecção com *S. venezuelensis* (4 e 7 dias após a infecção com *M. bovis*, respectivamente). Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de quatro a cinco animais em cada grupo: SV= animais infectados somente com *S. venezuelensis* e COIN= animais co-infectados com *M. bovis*.

Os resultados são representativos de dois experimentos realizados. Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

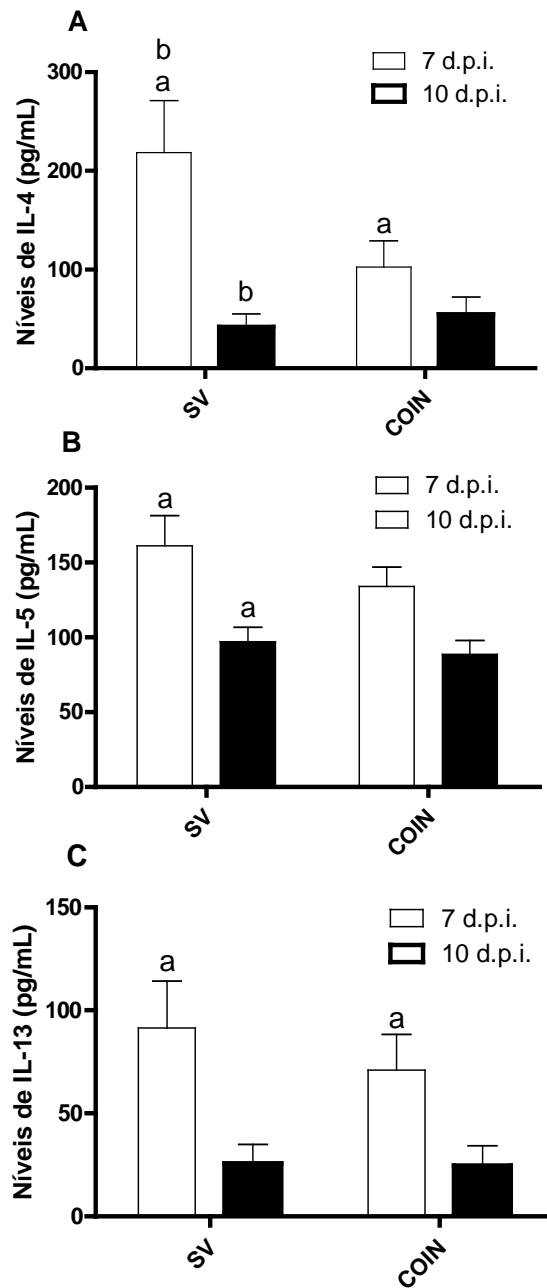


FIGURA 5 – Níveis de citocinas (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-13, em macerado de intestino de animais infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *M. bovis* (COIN) por ELISA, 7 e 10 dias após a infecção com *S. venezuelensis* (4 e 7 dias após a infecção com *M. bovis*, respectivamente). Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de quatro a cinco animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados. Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

4.4 NÍVEIS DE EPO NO INTESTINO NO 7º E 10º D.P.I. COM *S. venezuelensis*

O nível da peroxidase de eosinófilos (EPO), presente em amostras de intestino, foi utilizado para estimar o nível de EPO nesse tecido. A EPO é uma enzima peroxidase secretada por eosinófilos ativados, e parece ter um papel central na defesa contra patógenos invasores. Tal enzima usa o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o íon brometo (Br^-), para formar substâncias citotóxicas. No 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, observou-se um aumento significativo no nível de EPO no intestino dos animais dos grupos SV ($P < 0,05$) e COIN ($P < 0,0001$) quando comparados com o grupo CONTROLE (animais não infectados, FIGURA 6). Observou-se também um nível estatisticamente maior de EPO no grupo COIN quando comparado ao grupo SV (FIGURA 6, $P < 0,0001$). No 10º d.p.i. com *S. venezuelensis*, assim como no 7º d.p.i., observou-se um aumento significativo no nível de EPO no intestino dos animais dos grupos SV ($P < 0,001$) e COIN ($P < 0,001$) quando comparados com o grupo CONTROLE (FIGURA 6). O nível de EPO do grupo COIN foi estatisticamente maior que o do grupo SV ($P < 0,01$) assim como no 7º d.p.i. (FIGURA 6).

O nível de EPO do grupo CONTROLE foi semelhante nos dois pontos da infecção avaliados (FIGURA 6B). Já nos grupos SV e COIN, houve um aumento significativo do nível de EPO no intestino dos animais do 7º para o 10º d.p.i. com *S. venezuelensis* (FIGURA 6, $P < 0,0001$).

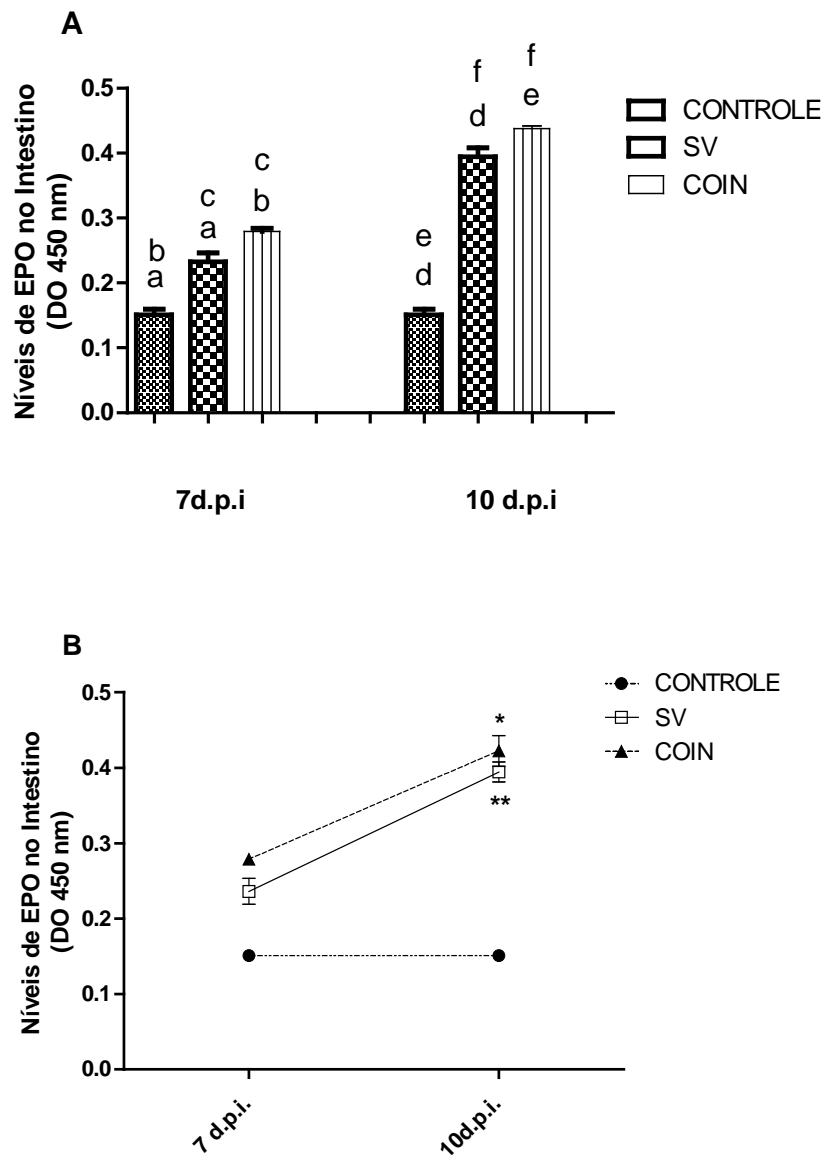


FIGURA 6 - Níveis da peroxidase de eosinófilos (EPO) - figuras A e B - no intestino de camundongos BALB/c não infectados (CONTROLE), infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *M. bovis* (COIN), nos dias 7 e 10 após a infecção com *S. venezuelensis* (4 e 7 dias após a infecção com *M. bovis*, respectivamente). Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de quatro a cinco animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados.

Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$); * e ** representam $P < 0.05$ quando comparado com o 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*.

4.5 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS /IMUNOMODULATÓRIAS EM CÉLULAS ESPLÊNICAS

Nas células esplênicas, no 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE, SV e COIN quanto à expressão de CTLA-4 e CD28. Tais moléculas apresentaram os menores níveis de expressão nos três grupos estudados, quando comparadas às demais moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD25, CD80 e CD86). Em relação à CD25, houve um aumento significativo em sua expressão nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 7A, $P < 0,001$), sendo que a expressão no grupo SV foi estatisticamente maior que no grupo COIN (FIGURA 7A, $P < 0,05$). A expressão de CD80 e CD86 foi maior nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 7A, $P < 0,001$). Mas ao contrário da molécula CD25, no grupo SV a expressão de CD80 e CD86 foi estatisticamente menor que no grupo COIN (FIGURA 7A, $P < 0,0001$).

Nas células esplênicas, no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, também não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE, SV e COIN quanto à expressão de CTLA-4 e CD28. Semelhante ao 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, tais moléculas, apresentaram os menores níveis de expressão nos três grupos estudados, quando comparadas às demais moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD25, CD80 e CD86). Em relação à CD25, também houve um aumento significativo de sua expressão nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 7, $P < 0,05$). Entretanto, ao contrário do 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, no grupo COIN sua expressão foi estatisticamente maior que no grupo SV (FIGURA 7A, $P < 0,05$). Semelhante ao 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, a expressão de CD80 e CD86 foi maior nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 7A, $P < 0,001$). Tal como no 7^o d.p.i., a expressão de CD25 apresenta um comportamento inverso ao da expressão das moléculas CD80 e CD86, visto que o grupo COIN expressou níveis estatisticamente menores dessas moléculas quando comparado ao grupo SV (FIGURA 7A, $P < 0,0001$).

Nota-se que do 7^o para o 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis*, houve uma diminuição da expressão de CD25 nos grupos SV e COIN (FIGURAS 7B; $P < 0,05$).

Além disso, percebe-se que no 7^o d.p.i., o grupo SV expressou mais CD25 que o grupo COIN, o que é revertido no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis*. Quanto às moléculas CD80 e CD86, percebe-se um comportamento contrário do 7^o para o 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis* em relação aos grupos SV e COIN, visto que no 7^o d.p.i., o grupo COIN apresenta uma maior expressão dessas moléculas, o que é revertido no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis* (FIGURAS 7A e B) .

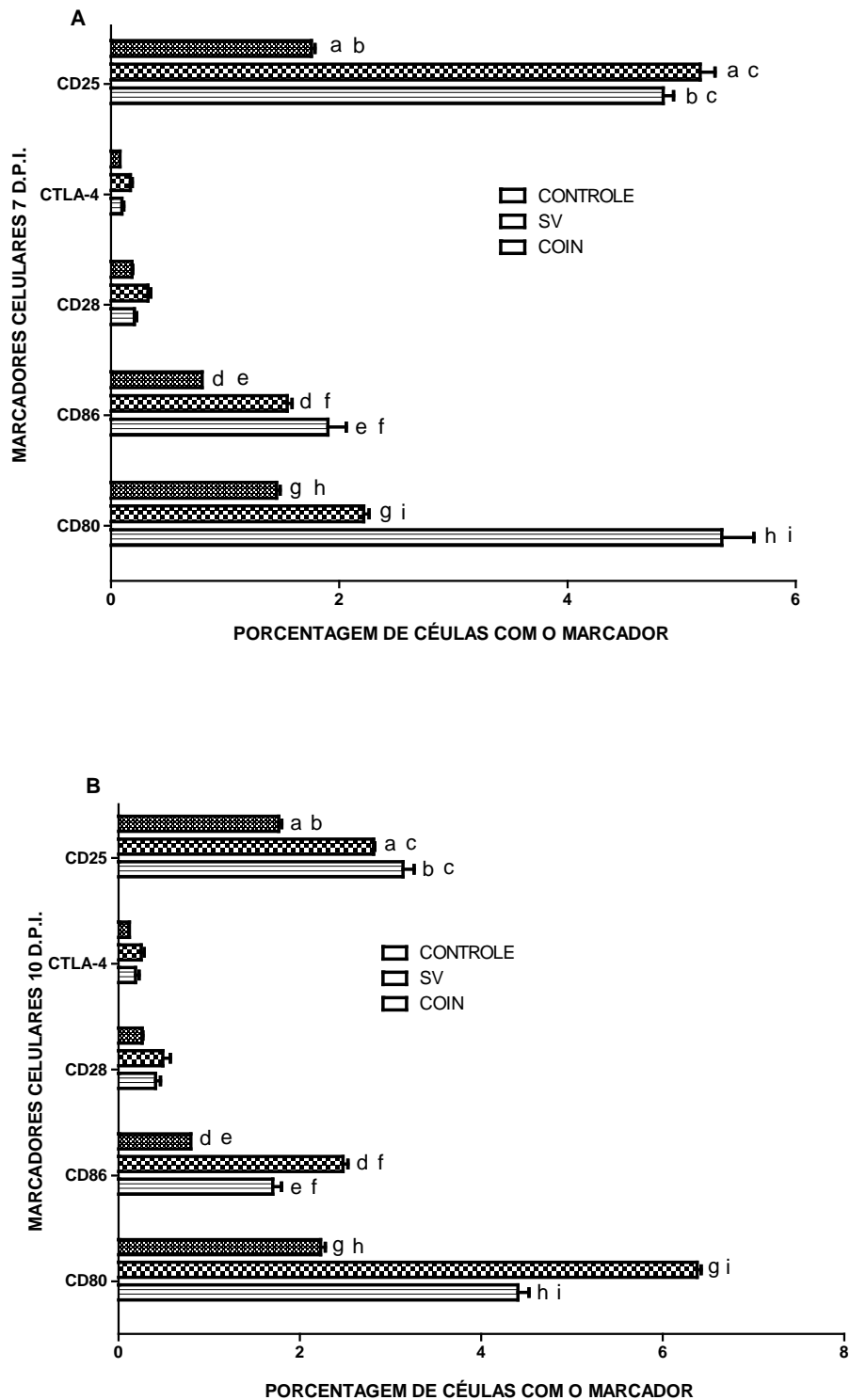


FIGURA 7 - Porcentagem de marcadores celulares em células de baço de camundongos BALB/c não infectados (CONTROLE), infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *M. bovis* (COIN). (A): 7 d.p.i. com *S. venezuelensis* (4 d.p.i. com *M. bovis*); (B) : 10 d.p.i. com *S. venezuelensis* (7 d.p.i. com *M. bovis*). Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de quatro a cinco animais em cada grupo de experimentos realizados independentes. Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

4.6 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS/IMUNOMODULATÓRIAS EM CÉLULAS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS

Nas células de linfonodos mesentéricos, assim como nas células esplênicas, no 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE, SV e COIN quanto à expressão de CTLA-4. Ainda, referente à expressão de CD28, os grupos SV e COIN apresentaram maior expressão dessa molécula quando comparados com o grupo CONTROLE (FIGURA 8A, $P < 0,05$). Semelhante às células esplênicas, as moléculas CTLA-4 e CD28, apresentaram os menores níveis de expressão nos três grupos estudados, quando comparadas às demais moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD25, CD80 e CD86). Em relação à expressão de CD25, assim como nas células esplênicas, houve um aumento significativo de sua expressão nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 8A, $P < 0,05$), sendo que no grupo SV sua expressão foi estatisticamente maior que no grupo COIN (FIGURA 8A, $P < 0,01$). A expressão de CD80 e CD86 foi maior nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 8A, $P < 0,001$). Mas ao contrário da molécula CD25, no grupo SV sua expressão foi estatisticamente menor que no grupo COIN (FIGURA 8A, $P < 0,001$).

No 10º d.p.i. com *S. venezuelensis*, não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE, SV e COIN quanto à expressão de CTLA-4 e CD28, tal como nas células de baço no mesmo ponto de infecção (FIGURA 8B).

Semelhante ao 7º d.p.i., tais moléculas, apresentaram os menores níveis de expressão nos três grupos estudados, quando comparadas às demais moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD25, CD80 e CD86). Vale ressaltar, contudo, que a expressão de CD28 foi, em média, seis vezes maior no 10º, do que no 7º d.p.i. em todos os grupos estudados (FIGURA 8B, $P < 0,05$). Em relação à expressão de CD25, assim como no 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, houve um aumento significativo de sua expressão nos grupos SV e COIN quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 8B, $P < 0,05$). Contudo, ao contrário do 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, no grupo COIN sua expressão foi estatisticamente maior que no grupo SV (FIGURA 8B, $P < 0,01$). Da mesma forma que no 7º d.p.i. com *S. venezuelensis*, a expressão de CD80 e CD86 foi maior nos grupos SV e COIN

quando comparados ao grupo CONTROLE (FIGURA 8B, $P < 0,001$). Semelhante ao primeiro ponto, a expressão de CD25 apresenta um comportamento inverso ao da expressão das moléculas CD80 e CD86, visto que o grupo COIN expressou níveis estatisticamente menores dessas moléculas quando comparado ao grupo SV (FIGURA 8B, $P < 0,0001$).

Percebe-se que no 7^o d.p.i. com *S. venezuelensis* as células de linfonodos mesentéricos dos animais do grupo SV expressaram mais CD25 que aquelas dos animais do grupo COIN, o que é revertido no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis*. Quanto às moléculas CD80 e CD86, percebe-se também, um comportamento contrário do 7^o para o 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis* em relação aos grupos SV e COIN, visto que no 7^o d.p.i., o grupo COIN apresenta uma maior expressão dessas moléculas, o que é revertido no 10^o d.p.i. com *S. venezuelensis* (FIGURAS 8A e B) .

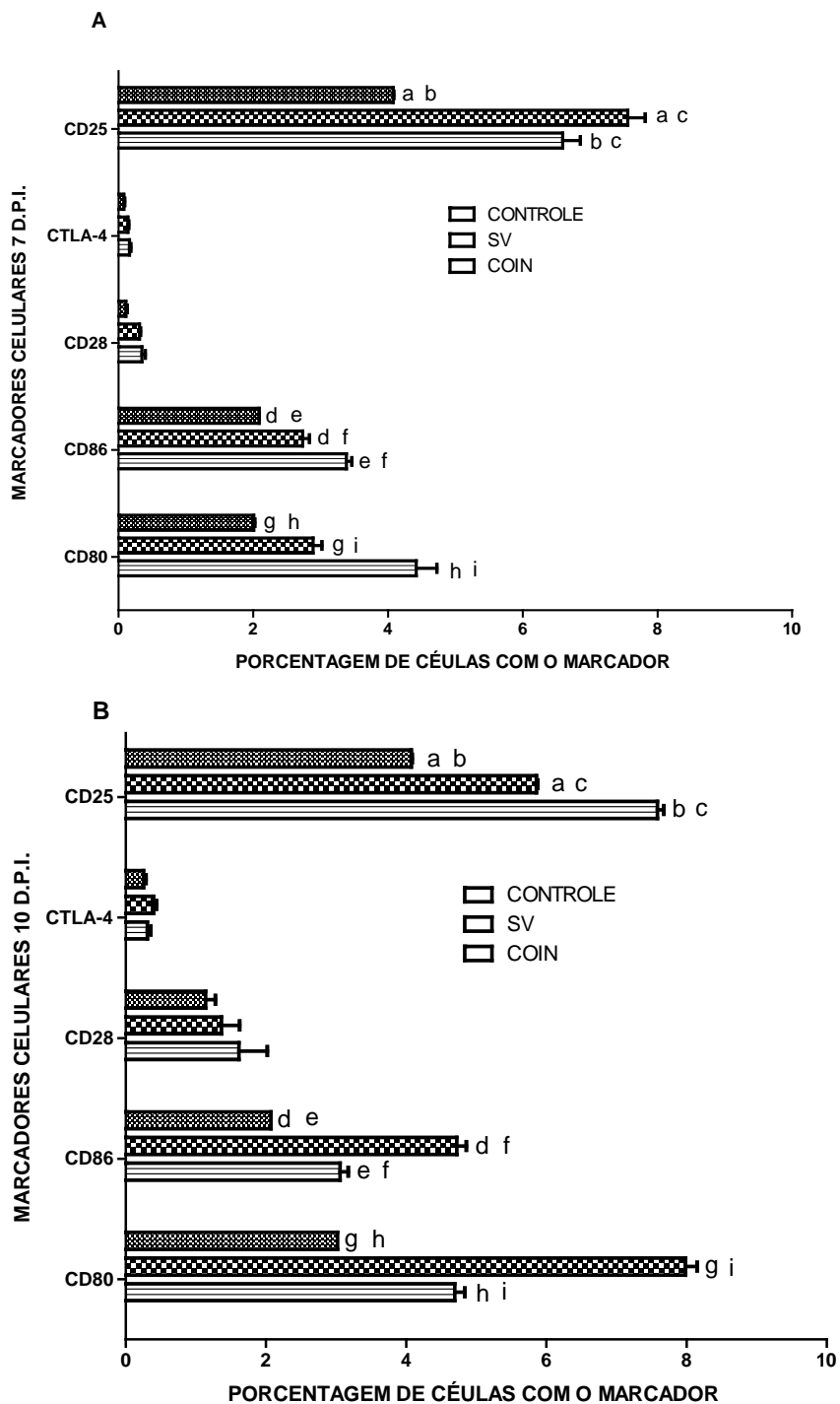


FIGURA 8 - Porcentagem de marcadores celulares em células de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c não infectados (CONTROLE), infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *M. bovis* (COIN). (A): 7 d.p.i. com *S. venezuelensis* (4 d.p.i. com *M. bovis*); (B) : 10 d.p.i. com *S. venezuelensis* (7 d.p.i. com *M. bovis*). Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de quatro a cinco animais em cada grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados.

Os valores com a mesma letra são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

5 DISCUSSÃO

Vários trabalhos, utilizando modelos animais, têm demonstrado que infecções provocadas por *S. venezuelensis* apresentam uma resposta imunológica local, tanto nos pulmões quanto no intestino, predominantemente do tipo Th2. Estes trabalhos demonstram que os hospedeiros apresentam um aumento significativo dos níveis séricos e teciduais das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, resultando em eosinofilia, aumento da produção de muco, mastocitose e altas concentrações de IgE (MARUYAMA *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002; NEGRÃO-CORRÊA, 2004; NEGRÃO-CORRÊA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007). Por outro lado, a infecção provocada pelo *M. bovis* estimula uma imunidade predominantemente do tipo Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e óxido nítrico (KAUFMAN 1999, NORTH e JUNG, 2004). O IFN- γ é uma citocina chave no controle da infecção à tuberculose, que por sua vez, é produzida pelos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK sendo importante na apresentação antigênica, ao ativar macrófagos e células dendríticas. Esse evento, conseqüentemente leva ao aumento do recrutamento celular, pela necessidade de destruição do bacilo (PEARL *et al.*, 2001). Nesse sentido, em função da diferença de resposta imunológica entre esses dois patógenos, e da atividade inibitória mútua que tais perfis de resposta imunológica apresentam, o presente trabalho foi o primeiro a investigar a influência da co-infecção por *Mycobacterium bovis* sobre a infecção helmíntica por *Strongyloides venezuelensis* em modelo murino.

No presente trabalho, o aumento significativo do número de ovos e vermes no grupo de animais infectados com *S. venezuelensis* e co-infectados com *M. bovis* (grupo COIN) em relação ao grupo infectado somente com *S. venezuelensis* (grupo SV), sugere que a presença da micobactéria, diminuiu a resposta imunológica dirigida ao verme, propiciando o aumento de sua fecundidade e o conseqüente agravamento da infecção.

Por outro lado, o menor número de ovos e vermes nos animais infectados apenas com *S. venezuelensis*, em comparação ao grupo coinfestado, sugere que houve o desenvolvimento de uma resposta imunocompetente dirigida contra o verme, diminuindo sua fecundidade. A diminuição da fecundidade de parasitos

intestinais tem sido associada aos efeitos da imunidade do hospedeiro sobre os órgãos reprodutivos dos parasitos, como o ovário (KELLY E OGILVIE, 1972; SOULSBY, 1987; BAEK *et al.*, 2003). A participação de mecanismos imunes do hospedeiro na diminuição da fecundidade de *S. venezuelensis*, em ratos, foi demonstrada utilizando-se o tratamento com dexametasona, um agente anti-inflamatório supressor da resposta humoral. Tal tratamento, foi capaz de aumentar o tamanho dos vermes, recuperar sua fecundidade, bem como atrasar a expulsão dos mesmos (BAEK *et al.*, 2003).

Os níveis séricos de IgE específica à antígenos das larvas de *S. venezuelensis* estiveram aumentados com a evolução da infecção no grupo SV, reforçando a idéia de que esses animais foram capazes de montar uma resposta imune efetiva contra o verme. Em contrapartida, os níveis séricos de IgE nos animais co-infectados com *M. bovis* mostraram-se significativamente reduzidos, fato que certamente influenciou na diminuição da eliminação dos vermes, uma vez que o aumento dos níveis de IgE em amostras de soro de animais infectados com *S. venezuelensis* está correlacionado com a redução no número de larvas recuperadas do intestino desses animais (FERNANDES *et al.*, 2007). A resposta imunológica contra *S. venezuelensis* atua na fase de migração das larvas, principalmente antes da fase pulmonar, e é capaz de limitar o estabelecimento e maturação das larvas remanescentes que conseguem atingir o intestino delgado. Apesar da importância da atuação da resposta imunológica durante a fase migratória do verme, o estabelecimento das larvas na mucosa intestinal é necessário para promover uma imunidade completa contra o helminto (FERNANDES *et al.*, 2007). Os altos níveis de IgE observados no grupo SV, provavelmente contribuiu para a eliminação das larvas em migração e para o menor número de larvas que conseguiram alcançar o intestino e se desenvolver em vermes adultos. As infecções helmínticas estão relacionadas, de modo geral, com aumento dos níveis de IgE séricas e conseqüentemente com a eliminação de vermes (FERNANDES *et al.*, 2007). Roedores infectados com *Strongyloides sp* apresentam elevados níveis de IgE (KORENAGA *et al.*, 1986), eosinofilia tecidual e sanguínea (OVINGTON *et al.*, 1998) e hiperplasia de mastócitos e células caliciformes do intestino (KHAN *et al.*, 1993; ISHIKAWA *et al.*, 1995) fatores que têm sido associados com a proteção do hospedeiro.

A atuação da IgE na eliminação de *S. venezuelensis*, provavelmente está associada à sua interação com eosinófilos teciduais, promovendo a desgranulação,

dessas células através da ligação dependente de anticorpo e/ou por ativação do complemento. Tais mecanismos poderiam contribuir para o mecanismo responsável pela eliminação das larvas de *S. venezuelensis*, como sugerido previamente em estudos utilizando *S. stercoralis* em camundongos (ROTMAN *et al.*, 1996; HERBERT *et al.*, 2000) e em humanos (CARVALHO *et al.*, 1983; PORTO *et al.*, 2001).

Dados da literatura mostram que em animais transgênicos para IL-5, a eosinofilia no intestino é observada antes da implantação dos vermes adultos na mucosa intestinal e que essas células são capazes de invadir a parede epitelial desse órgão e se dispor em torno dos vermes implantados. Ainda, a eliminação de larvas mediada por eosinófilos e anticorpos tem sido demonstrada em várias infecções (ABE *et al.*, 1997; MARUYAMA *et al.*, 2000).

De acordo com o esperado, no grupo de animais infectados apenas com *S. venezuelensis*, houve em conjunto aumento dos níveis de IgE sérica e aumento nos níveis de EPO no intestino. Anteriormente, foi evidenciado que a proteção imunológica induzida pelas larvas de *S. venezuelensis* age durante a migração das mesmas e nos vermes adultos e está associada com a produção preferencial de IL-4 pelas células do baço, influxo de eosinófilos na pele, pulmões e intestino, com grande produção de IgE e IgG1, tendo uma resposta imunológica predominantemente Th2 que é importante tanto na infecção primária, quanto na infecção secundária (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006).

Apesar dos níveis de IgE séricos estarem reduzidos nos animais co-infectados, os níveis de EPO intestinal aumentou com o decorrer da infecção, mostrando-se maior que os animais infectados somente com *S. venezuelensis*. Esses dados sugerem que esse aumento nos níveis de EPO seja um mecanismo compensatório do hospedeiro em eliminar vermes adultos do intestino, visto que seus níveis de IgE séricos estiveram baixos ao longo da infecção, impedindo uma eficiente desgranulação dos eosinófilos teciduais durante a fase de migração das larvas.

Por outro lado, apesar dos níveis de EPO estarem elevados no grupo COIN, a produção das citocinas IL-4 e IL-13 no intestino desses animais, foi estatisticamente menor que no grupo SV, havendo também uma tendência de queda na produção de IL-5, reforçando a idéia de que a resposta imune protetora contra o verme esteve diminuída nos animais co-infectados. A indução de resposta imunológica

predominantemente do tipo Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 está associada com a imunidade protetora contra nematóides gastrointestinais em modelos de infecção por *Trichuris spiralis*, *Trichuris muris*, *Heligmosomoides polygirus* e *Necator braziliensis* (ELSE *et al.*, 1994; BANCROFT *et al.*, 1998; LAWRENCE *et al.*, 1998; GAUSE *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que a IL-4 age em sinergia com a IL-13 regulando a mastocitose intestinal (LANTZ *et al.*, 1998; WATANABE *et al.*, 2001) e que a IL-13 está associada com o controle da hiperplasia das células caliciformes (MCKENZIE *et al.*, 1998) fenômenos estes, observados durante a eliminação do *S. venezuelensis*. Ainda, o aumento nos níveis de IL-5 tem sido associado com a proteção de hospedeiros infectados com *Strongyloides* (CARA *et al.*, 2000; MARUYAMA *et al.*, 2000; EL-MALKY *et al.*, 2003).

Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 estavam aumentados nos sobrenadantes de cultura de células de baço dos animais do grupo SV em ambos os pontos da infecção, em comparação aos animais do grupo COIN, sugerindo que a infecção por *M. bovis* inibiu a produção dessa citocina. Assim, os dados aqui apresentados corroboram com o perfil de resposta Th1 propiciado pela presença de *M. bovis* com conseqüente inibição de citocinas como a IL-10 (KAUFMAN, 1999; NORTH E JUNG, 2004).

Interessantemente, a redução dos níveis sistêmicos de IL-10 nos animais infectados com *S. venezuelensis* e nos co-infectados, no decorrer da infecção, coincidiu com a redução nos níveis locais de IL-4, IL-5 e IL-13 no intestino, sugerindo que a IL-10 pode ter atuado como moduladora da produção dessas citocinas. Alguns trabalhos têm demonstrado o papel regulatório da IL-10, sobre a resposta imune a diferentes patógenos (ANDERSON *et al.*, 2007; JANKOVIC *et al.*, 2007). A IL-10 é uma citocina chave na limitação do desenvolvimento de fortes respostas inflamatórias do tipo Th1 contra alguns patógenos, prevenindo dessa forma imunopatologias que podem levar o hospedeiro à morte. Todavia, a IL10 também é capaz de suprimir respostas Th1 protetoras, resultando em infecções crônicas. Várias células podem ser fontes dessa citocina tais como: TREGs, linfócitos B e linfócitos Th1 (ANDERSON *et al.*, 2007; JANKOVIC *et al.*, 2007).

Ao contrário do IL-10, os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de células de baço foram semelhantes no 7º dia da infecção tanto no grupo SV quanto no grupo COIN. Entretanto, no 10º d.p.i. houve diminuição dos níveis dessa citocina em ambos os grupos, porém nos animais do grupo COIN, os níveis de IFN- γ estavam

duas vezes maior que nos animais do grupo SV, sugerindo o predomínio da resposta Th1 possivelmente devido a presença da infecção com *M. bovis*. Foi verificado que camundongos deficientes de IL-12, são capazes de expulsar o *S. venezuelensis* tal como os animais normais (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006) reforçando a idéia de que a resposta do tipo Th1 tem pouca importância no controle da infecção por *S. venezuelensis*.

É notório que a expressão de marcadores de superfície celular foi similar, tanto a nível sistêmico, observado em células esplênicas, quanto local, observado em células dos linfonodos mesentéricos que drenam o intestino. Assim, todos os dados discutidos a seguir, refletem os resultados obtidos em células de ambos os órgãos.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram um perfil semelhante na expressão do marcador CD25 em células esplênicas e de linfonodos. A diminuição da expressão desse marcador no grupo co-infectado no 7º dia após infecção provavelmente está relacionada com a diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 sistêmica, bem como de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no intestino. Supressão essa, que aumentou a susceptibilidade dos animais à infecção do helminto, visto que resposta imunológica protetora de perfil Th2 foi suprimida. Tem sido sugerido que células T regulatórias CD25⁺ apresentam papel importante na modulação da resposta imunológica a infecções helmínticas, como por exemplo, *Shistosoma mansoni* (WALSH, 2007) e podem estar envolvidas na patogênese de doenças tais como por *M. tuberculosis* (HOUGARDY *et al.*, 2007). Além disso, na infecção experimental de camundongos por *S. mansoni*, as células T CD25⁺ são importante fonte de IL-10 (SADLER *et al.*, 2003).

Já no 10º dia após a infecção com *S. venezuelensis*, a expressão de CD25 nos animais co-infectados apresentou um aumento significativo em relação ao 7º dia de infecção, contrastando com a diminuição da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Vale ressaltar, que a redução da expressão de tais moléculas coincidiu com a redução das citocinas de perfil Th2 observadas no intestino dos animais co-infectados. Estudos sugerem que o desenvolvimento da resposta imunológica primária do tipo Th2 contra infecções por patógenos seja dependente das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 expressas por células APC, que auxiliam na maturação de células T CD4 “naive” que produzem IL-4 (EKKENS *et al.*, 2002). O bloqueio das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86

inibe o desenvolvimento da resposta Th2 primária na infecção por *H. polygyrus* (LU *et al.*, 1994). Logo, as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 podem influenciar no perfil de citocinas produzidas durante a infecção helmíntica (LU *et al.*, 1994; NAKAJIMA *et al.*, 1996; EKKENS, *et al.*, 2002). Há evidências de que a molécula CD80 tem maior influência sobre a produção de citocinas Th1 e a molécula CD86 maior influência sobre a produção de citocinas Th2 (NAKAJIMA *et al.*, 1996; MUELLER, 2000; WANG, 2000; EKKENS *et al.*, 2002), já que, na infecção experimental de camundongos BALB/c com *Nippostrongylus brasiliensis*, o bloqueio de CD86 com anticorpo monoclonal anti-CD86 diminuiu a produção de IL-4 e não alterou a produção de IFN- γ (NAKAJIMA *et al.*, 1996). Contudo, no presente modelo experimental não foi possível observar tal tendência.

Em todos os pontos avaliados não foi observado níveis relevantes da expressão dos marcadores CTLA-4 e CD28 na superfície das células de baço e linfonodos mesentéricos. Contudo, sabe-se que a molécula CTLA-4 é de difícil marcação por citometria de fluxo, devido a rápida endocitose sofrida por essas moléculas na superfície celular (ALEGRE, *et al.*, 1996). Portanto, os dados aqui apresentados podem não estar refletindo os acontecimentos *in vivo*. Uma possível solução para a determinação dos níveis de expressão de CTLA-4, seria a marcação intra-citoplasmática dessas moléculas, eliminando assim a imprecisão do método de marcação na superfície celular. As moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 ligam-se preferencialmente na molécula CTLA-4, quando comparado à molécula CD28, em situações nas quais as células T estão expressando CTLA-4, levando à inativação de linfócitos (SANSOM E WALKER, 2006). Visto que houve uma expressão muito maior de CD80/CD86 em relação ao CD28 nos animais co-infectados no 7º dia de infecção, seria possível supor que essas moléculas se ligaram preferencialmente à CTLA-4 e que portanto, os níveis de expressão de CTLA-4 seriam bem maiores que os detectados. A interação CD80/CTLA-4 ou CD86/CTLA-4 e a conseqüente inativação linfocitária nos animais co-infectados poderia estar acarretando a redução dos níveis de citocinas locais (IL-4, IL-5 e IL-13), gerando redução da resposta imunológica protetora do animal, tendo como conseqüência menores níveis séricos de IgE e maiores quantidades de vermes e ovos.

A molécula co-estimulatória CD28 possui papel importante na ativação de células T, além de participar da produção de IL-2 e do aumento da expressão de proteínas do ciclo celular (BOISE *et al.*, 1995; ALEGRE, 2006). Tal molécula

também é necessária para otimizar a produção e a proliferação de citocinas (GREENWALD *et al.*, 2002), além de promover a diferenciação da célula T em seus subtipos Th1 e Th2 (ALEGRE *et al.*, 2001). No presente trabalho, não foi observado expressão significativa dessa molécula, apesar de haver uma tendência de menor expressão de tal molécula nos animais do grupo COIN em relação ao grupo SV, nos dois pontos da infecção estudados.

Portanto, baseado nos resultados deste trabalho conclui-se que a presença do *M. bovis* interferiu no curso da resposta imunológica ao *S. venezuelensis*, através da imunorregulação via IL-10, observada principalmente pelo aumento da expressão de CD25 pelos linfócitos dos animais co-infectados e pela diminuição das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 nas células APCs.

6- CONCLUSÕES

- O aumento significativo do número de ovos nas fezes e vermes no intestino, no grupo de animais infectados com *S. venezuelensis* e co-infectados com *M. bovis* em relação ao grupo infectado somente com *S. venezuelensis*, sugere que a presença da micobactéria, diminuiu a resposta imunológica dirigida ao verme, propiciando o aumento de sua fecundidade e o conseqüente agravamento da infecção.
- Os níveis séricos de IgE específica à antígenos das larvas de *S. venezuelensis* estiveram aumentados durante o curso da infecção no grupo infectado somente com *S. venezuelensis*, reforçando a idéia de que esses animais foram capazes de montar uma resposta imune efetiva contra o verme. Em contrapartida, os níveis séricos de IgE nos animais co-infectados com *M. bovis* mostraram-se significativamente reduzidos, fato que certamente influenciou na diminuição da eliminação dos vermes, uma vez que o aumento dos níveis de IgE em amostras de soro de animais infectados com *S. venezuelensis* está correlacionado com a redução no número de larvas recuperadas do intestino desses animais.
- Apesar dos níveis de IgE séricos estarem reduzidos nos animais co-infectados, os níveis de EPO intestinal aumentaram com o decorrer da infecção, mostrando-se maiores que aqueles observados nos animais infectados somente com *S. venezuelensis*. Esses dados sugerem que esse aumento nos níveis de EPO seja um mecanismo compensatório do hospedeiro em eliminar vermes adultos do intestino, visto que seus níveis de IgE séricos estiveram baixos ao longo da infecção, impedindo uma eficiente desgranulação dos eosinófilos teciduais durante a fase de migração das larvas.

- Apesar dos níveis de EPO estarem elevados no grupo co-infectado, a produção das citocinas IL-4 e IL-13 no intestino desses animais, foi estatisticamente menor que no grupo infectado com *S. venezuelensis*, havendo também uma tendência de queda na produção de IL-5, reforçando a idéia de que a resposta imune protetora contra o verme esteve diminuída nos animais co-infectados.
- Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 estavam aumentados nos sobrenadantes de cultura de células de baço dos animais do grupo SV em ambos os pontos da infecção, em comparação aos animais do grupo co-infectado, sugerindo que a infecção por *M. bovis* inibiu a produção dessa citocina. Além disso, a redução dos níveis sistêmicos de IL-10 nos animais infectados com *S. venezuelensis* e nos co-infectados, no decorrer da infecção, coincidiu com a redução nos níveis locais de IL-4, IL-5 e IL-13 no intestino, sugerindo que a IL-10 pode ter atuado como moduladora da produção dessas citocinas.
- Ao contrário da IL-10, os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de células de baço foram semelhantes no 7º dia da infecção tanto no grupo infectado com *S. venezuelensis* quanto no grupo co-infectado. Entretanto, no 10º d.p.i. houve diminuição dos níveis dessa citocina em ambos os grupos, sendo maior contudo, nos animais co-infectados, sugerindo o predomínio da resposta Th1 possivelmente devido a presença do *M. bovis*.
- Os resultados obtidos neste estudo mostraram um perfil semelhante na expressão do marcador CD25 em células esplênicas e de linfonodos. A diminuição da expressão desse marcador no grupo co-infectado no 7º dia após infecção provavelmente está relacionada com a diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 sistêmica, bem como de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no intestino. Já no 10º dia após a infecção com *S. venezuelensis*, a expressão de CD25 nos animais co-infectados apresentou um aumento significativo em relação ao 7º dia de infecção, contrastando com a diminuição da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86.

- Em todos os pontos avaliados não foi observado níveis relevantes da expressão dos marcadores CTLA-4 e CD28 na superfície das células de baço e linfonodos mesentéricos. Tal observação pode não estar refletindo os acontecimentos *in vivo*, visto que a molécula CTLA-4 é de difícil marcação por citometria de fluxo, devido a rápida endocitose sofrida por essas moléculas na superfície celular.
- Portanto, baseado nos resultados deste trabalho conclui-se que a presença do *M. bovis* interferiu no curso da resposta imunológica ao *S. venezuelensis*, através da imunorregulação via IL-10, observada principalmente pelo aumento da expressão de CD25 pelos linfócitos dos animais co-infectados, pela diminuição das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 nas células APCs e redução das citocinas de perfil Th2 observadas no intestino dos animais co-infectados. Tal interferência foi capaz de modular o perfil de resposta imunológica do tipo Th2 contra *S. venezuelensis* nos animais co-infectados, diminuindo sua resistência ao verme e consequentemente aumentando a carga de infecção pelo *S. venezuelensis*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. 2005. *Imunologia Celular e molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro. **Editora Elsevier**. 580p.

ABE, T., SUGAYA, H., YOSHIMURA, K. 1998. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti*-infected mice. **Journal of Helminthology**, Mar;72(1):1-8.

ALEGRE, M.L., NOEL, P.J., EISFELDER, B.J., CHUANG, E., CLARK, M.R., REINER, S.L., THOMPSON, C.B. 1996. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cells. **Journal of Immunology**, 157(11): 4762-70.

ALEGRE, M.L., FRAUWIRTH, KA, THOMPSON, C.B. 2001.T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews Immunology**, 1 (3):220-8.

ALEGRE, M.L., FALLARINO, F. 2006.Mechanisms of CTLA-4-Ig in tolerance induction. **Current Pharmaceutical Design**, 12(2):149-60.

ANDERSON, C.F., OUKKA, M., KUCHROO, V.J., SACKS, D. 2007. CD4(+)CD25(-) Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**. Feb 19;204(2):285-97.

ATTAMIMI, F., NOVIANA, D., MUKTIANDINI, A.,JAMILAH, A Y. P., TSUCHIYA, K, TIURIA, R, YAMAUCHI, K, RIVERO, J. C., HORII, Y. 2002. Enhanced protection against the migratory phase, but defective protection against the intestinal phase of *Strongyloides venezuelensis* infection in cotton rats, *Sigmodon hispidus*. **Parasitology**, 64 (11): 1031-1035.

BAEK,B.K,ISLAM,MK, KIM, B.S., UM, C.W., HUR, J., OLUOCH, AO., KIM, C.H., KAKOMA, 1. 2003.Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Veterinary Parasitology**, May 1, 113(3-4):217 -27.

BANCROFT, AJ., MCKENZIE, AN., GRENCIS, RK. 1998.A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **Journal of Immunology**, 1

,160(7):345361.

BARRETO, M.L., RODRIGUES, L.C., SILVA, RC.R, ASSIS, AM.O., REIS M.G., SANTOS C.A.S.T. 2000. Lower hookworm incidence, prevalence, and intensity of infection in children with a bacillus calmette-guérin vaccination scar. **The Journal of Infections Disease**, 182: 1800-1803.

BELKAID, Y, ROUSE, B.T. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology**, 6:353-360.

BENENSON, A.S. 1992. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. 15ª Edição. Washington: **OPAS**, OMS, 618 p.

BLUESTONE, J. A, CLAIR, E. W., TURKA, L. A 2006. CTLA-4: bridging the basic immunology with clinical application. **Immunity**, 24: 233-238.

BOISE, L.H., NOEL, P.J., THOMPSON, C.H. 1995. CD28 and apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, 7(5):620-5.

BRUMPT, E. 1934. *Precis de Parasitologie*. 6ª edição. Paris. **Editora Masson et Cie**.1042 p.

CARA, D. C., NEGRÃO-CORRÊA, D., TEIXEIRA, M. M. 2000. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histology and Histopathology**, 15:899-920.

CARVALHO, E.M., ANDRADE, TM., ANDRADE, J.A, ROCHA, H. 1983. Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 77(3):346-9.

COOPER, AM., ADAMS, L.B., DALTON, D.K., APPELBERG, R., EHLERS, S. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends of Microbiology**, 10: 221-226.

CROMPTON, D.W.T 1999. How much human helminthiasis is there in the world? **Journal of Parasitology**, 85:397-403.

DELGADO, J.C., TSAI, E.Y., THIM, S., BAENA, A, BOUSSIOTIS, V.A, REYNES, J.M. 2002. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99: 7576-7581.

EKKENS, M.J., LIU, Z., LIU, Q., FOSTER, A, WHITMIRE, J., PESCE, J., SHARPE, AH., URBAN, J.F., GAUSE, W.C. 2002. Memory Th2 effector can develop in the absence of B7-1/ B7 -2, CD28 interaction, and effector Th cells after priming with an intestinal nematode parasite. **The American Association of Immunology**, 22: 1767-1802.

ELIAS, D., AKUFFO, H., THORS, C., PAWLOWSKI, A, BRITTON, S. 2005. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, 139: 398-404.

ELIAS, D., AKUFFO, H., HAILE, M., SCHON, T, BRITTON, S. 2005. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *M. tubercu/osís*. **Vaccine**, 23: 1326-1334.

EL-MALKY, M., MARUYAMA, H., HIRABAYASHI, Y., SHIMADA, S., YOSHIDA, A, AMANO, T, TOMINAGA, A, TAKATSU, K., OHTA, N.2003. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitology International**, 52(1):71-9.

ELSE, K.J., FINKELMAN, F.D., MALISZEWSKI, C.R., GRENCIS, R.K. 1994. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **Journal of Experimental Medicine**, 179(1):347 -51.

ENOBE, C. S. 2005. Estudos epidemiológicos da infecção experimental por *Ascaris suum*. Tese de doutorado em Imunologia. São Paulo: **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**.

ERB, K. J., HOLLOWAY, J. W., SOBECK, A, MOLL, H., GROS, G. L. 1998. Infection of mice *Mycobacterium bovis*-bacillus calmett-guérin (BCG) sppsressews allergeninduced airway eosinophilia. **Journal of Experimental Medicine**, 187: 561-569.

ERB, K. J., TRUJILLO, C., FUGATE, M., MOLL, H. 2002. Infection with the helminth *Nippostrongylus brasiliensis* does not interfere with efficient elimination of *Mycobacterium bovis* BCG from the lungs of mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Mar;9(3):727-30.

FELDMAN, W. H. 1955. Recruitment and training of veterinary research pathologists. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. Jan; 126 (934): 10-3.

FERNANDES, A, PEREIRA, A. T M., ESCHENAZI, P. D., SCHILTER, H. C., SOUSA, A L. S., TEIXEIRA, M. M., NEGRÃO-CORRÊA, D. 2007. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, 30(3): 139-49.

FERREIRA, A P., AGUIAR: A S., FAVA, M. W. B.: CORRÊA, J. O. A, TEIXEIRA, F. M.: TEIXEIRA. H. C. 2002. Can the efficacy of bacille calmette-gérin tuberculosis vaccine be affected by intestinal parasitic infections? **The Journal of Infections Diseases**, 186: 441-442.

FERREIRA, AP., AARESTRUP, F.M., BONECINI-ALMEIDA, M.G., SOUZA, E.E., GOMES, E.A, CORRÊA, J.O., TEIXEIRA, H.C. 1999. Effect of the injection of an extract of *Ascaris suum* on macrophage activation during the early phase of *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57Bl/6 mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32(11):1429-36.

FERREIRA, C.M., PEREIRA, T M., SOUZA, R S., CASSALI, G. O., SOUZA, O. G., LEMOS, V. S., TEIXEIRA, M.M., NEGRÃO-CORRÊA, O. 2007. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, 9: 813-820.

FINKELMAN, F.O., SHEA-OONOHUE, T, GOLOHILL, J, SULLIVAN, C.A, MORRIS, S.C., MAOONEN, K.B., GAUSE, W.C., URBAN, J.F. 1997. Cytokine regulation of host defence against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, 15:505-533.

FINKELMAN, F.O., SHEA-OONOHUE, T, MORRIS, S.C., GILOEA, L., STRAIT, R, MADDEN, K.B., SCHOPF, L., URBAN, J.F. JR 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunology Reviews**, 201: 139-55.

FREMOND, C.M., YEREMEEV, V., NICOLLE, O.M., JACOBS, M., QUESNIAUX, V.F., RYFFEL, B. 2004. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. **Journal of Clinical Investigation**, 114(12): 1790-9.

GAUSE. W. C.' URBAN: J. F., STAOECKER, M. J. 2003. The immune response to parasitic helminthes: insights from murine models. **Trends of Immunology**, 24:269-277.

GRANGE, J.M., YATES, M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**. Maio;40(1-2):137-51.

GOLDFELD, A. E. 2004. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **Tuberculosis**. 84: 76-81.

GREEN, E.A., GORELIK, L., MCGREGOR, C.M., TRAN, EH., FLAVELL, RA. 2003. CD4+ CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta/TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100: 10878-10883.

GREENWALD, R. F., URBAN, J. F. M., EKKENS, J., CHEN S. J., NGUYEN, O., FANG, H., FINKELMAN, F. O., SHARPE, A.H., GAUSE, W. C. 1999. CD8⁺ T cells are required for the progression but not the initiation of the Type 2 immunological response to a gastrointestinal nematode parasite. **The American Association of Immunology**, 22: 1767-1799.

GREENWALD, R.J., LATCHMAN, Y.E., SHARPE, A.H. 2002. Negative co-receptors on lymphocytes. **Current Opinion of Immunology**, 14(3):391-6.

GRIFFIN, J.F., MACKINTOSH, C.G., BUCHAN, G. 1995. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines. **Trends of Microbiology**. Nov;3(11):418-24.

GUYOT-REVOL, V., INNES, J.A, HACKFORTH, S., HINKS, T., LALVANI, A. 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 173 (7):803-10.

HELMBY, H., TAKEO, K., AKIRA, S., GRENCIS, R K. 2001. Interleukin (IL)-18 promotes the development of chronic gastrointestinal helminth infection by downregulating IL-13. **Journal of Experimental Medicine**, 194 (3): 355-364.

HENDERSON, R A, WATKINS, S. C., FLYNN, J. L. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Micobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, 159:635-643.

HERBERT, O.R, LEE, J.J., LEE, N.A, NOLAN, T.J., SCHAO, G.A, ABRAHAM, O.J. 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Immunology**, 165(8):4544-51.

HOUGARDY, J. M., PLACE, S., HILDEBRAND, M., DROWART, A., DEBRIE, A.S., LOCHT, C., MASCART, F. 2007. Regulatory T cells depress immune responses in

protective antigens in active tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 176 (4): 409-416.

ISHIKAWA, N., SHI, B.B., KHAN, A.I., NAWA, Y. 1995. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. **Journal of Immunology**, 160(7):3453-61.

JANKOVIC, D., TRINCHIERI, G. 2007. IL-10 or not IL-10: that is the question. **Nature Immunology**. Dec; 8(12):1281-3.

JUNG, Y.J., RYAN, L., LACOURSE, R., NORTH, R.J. 2005. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Journal of Experimental Medicine**, 201(12):1915-24.

KAUFMANN, S. H. e LADEL, C. H.1994. Role of T cell subsets in Immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. **Immunobiology**, 191 (4-5):509-19.

KAUFMANN, S. H. E. 1999. Immunity to mycobacteria with. in: phasis on tuberculosis: implications for national design of an effective tuberculosis vaccine. **Chemical Immunobiology**, 63: 66-85.

KHAN, A. T., HORII ,Y., TIURIA, Y., SATO, Y., NAWA, Y. 1993. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Sfrongy/oides venezuelensis*. **International Journal of Parasitology**, 23:551-555.

KELLY, J.D., OGILVIE, B.M. 1972. Intestinal mast cell and eosinophil numbers during worm expulsion in nulliparous and lactating rats infected with *Niposfrongylous brasiliensis*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, 43: 497-509.

KIM, K.D., LEE, H.G., KIM, J.K., PARK, S. N., CHOE, Y.K., KIM, S. J., LEE, E., LIM, J. S. 1999. Enhanced antigen presenting activity and tumor necrosis factor a dependent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmett Guerin. **Immunology**, 97 (4): 626-633.

KORENAGA, M., NAWA, Y., TADA, I. 1986. IgE response in *Strongyloides ratti* infected rats with special reference to the life cycle of the parasite. **Zeitschrift Für Parasitenkunde**, 72 (2): 213-220.

KOURILSKY, P.; TRUFFA-BACH, P. 2001. Cytokine fields and the polarization of the immune response. **Trends of Immunology**. Sep;22(9):502-9.

LANTZ, C.S., YAMAGUCHI, M., OETTGEN, H.C., KATONA, I.M., MIYAJIMA, I., KINET, J.P., GALLI, S.J. 1997. IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. **Journal of Immunology**. Mar 15;158(6):2517-21.

LARSEN, M.J., BENN, C.S., FILLIE, Y., VAN DER KLEIJ, O., AABY, P., YAZOANBAKHSH, M. 2007. BCG stimulated dendritic cells induce an interleukin-10 producing T-cell population with no T helper 1 and T helper 2 bias *in vitro*. **Immunology**, 121(2):276-82.

LAWRENCE, C. E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? 2003. **Parasite Immunology**, 25: 271-281.

LAWRENCE, C.E., PATERSON, J.C., HIGGINS, L.M., MACCOONALD, T. T., KENNEDY, M.W. 1998. Garside PIL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. **European Journal of Immunology**, 28(9):2672-84.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDOALL, R. J. 1951. **The Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275.

LU, L., LI, W., ZHONG, C., OIAN, S., FUNG, J.J., THOMSON, A.W., STARZL, T.E. 1999. Increased apoptosis of immunoreactive host cells and augmented donor leukocyte chimerism, not sustained inhibition of B7 molecule expression are associated with prolonged cardiac allograft survival in mice preconditioned with immature donor dendritic cells plus anti-CD40L mAb. **Transplantation**. 68(6):747-57.

LU, P., ZHOU, X., CHEN, S. J. MOORMAN, M., MORRIS, S. C., FINKELMAN, F. O., LINSLEY, P., URBAN, J. F., GAUSE, W. C. 1994. CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. **Journal of Experimental Medicine**, 180: 693-698.

MAERTEN, P., SHEN, C., BULLENS, O.M., VAN ASSCHE, G., VAN GOOL, S., GEBOES, K. 2005. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. **Journal of Autoimmunity**, 25: 112-120.

MAIZELS, R.M., BUNDY, D.A, SELKIRK, M.E., SMITH, D.F., ANDERSON, R.M.

1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, 365(6449): 797 -805.

MALHOTRA, I., MUNGAI, P., WAMACHI, A, KIOKO. J., OUMA. J. H., KAZURA, J. W., KING, C. L. 1999 Helminth-and bacillus calmette-guérin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and shistosomiasis. **Journal of Immunology**, 162:6843-6848.

MARUYAMA, H. Y, YABU, A, YOSHIDA, M., FUTAKUCHI, H., KAWAGUCHI, R., ZHANG, J., Fu, T., SHIRAI, S., KOJIMA, OHTA ,N. 2000. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Shistosoma japonicum*- infected mice. **Parasite Immunology**, 22:279-286.

MARUYAMA, H., HIRABAYASHI, Y, EI-MALKY, M., OKAMURA, S., AOKI, M., ITAGAKI, T., NAKAMURA-UCHIYAMA, F., NAWA. Y., SHIMADA, S., OHTA, N. 2002. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, 100(3):179-85.

MATSUDA, K, KIM, B. S., WHANG, I. S., UM, C. W., BAEK, B. K 2003. Migration of *Strongyloides venezuelensis* in rats after oral inoculation of free- living infective larvae. **Parasitology**, 65 (9): 971-975.

MCCOY, B. K, CAMBERIS, M., GROS, G. L. 1997. Protective Immunity to nematode is induced by CTLA-4 blockade. **Journal of Experimental Medicine**, 186 (2): 183187.

MCKENZIE. G.J.: EMSON. C.L.: BELL. S.E.: ANDERSON. S.: FALLON. P.: ZURAWSKI. G. MURRAY R' GRENCIS R' MCKENZIE. A. N. 1998. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. **Immunity**, 9 (3):423-32.

MORAES, R. G., 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública, 1:507-624.

MORRIS, R.S., PFEIFFER, D.U., JACKSON, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**. 40:153-77.

MUELLER, O. L. A. Proliferation of co-stimulatory molecules. 2000. **Current Biology**, 10: 227 -230.

NAKAJIMA, A. N., WATANABE, S., YOSHINO, H., YAGITA, K., OKUMA, AZUMA, M. 1996. Requirement of CD28 - CD86 co-stimulation in the interaction between antigen - primed T helper type 2 and B cells. **International Immunology**, 9: 637-644.

NEGRÃO-CORRÊA, O. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. 2001. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 43 (5): 291-299.

NEGRÃO-CORRÊA, O., SILVEIRA, M. R., BORGES, C. M., SOUZA, O. G., TEIXEIRA, M. M. 2003. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. **Infection and Immunity**, 71 (5): 2607-2614.

NEGRÃO-CORRÊA, D., SOUZA, O. G., PINHO, V., BARSANTE, M. M., SOUZA, A .L. S., TEIXEIRA, M. M. 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* - infected mice. **Infection and Immunity**, 72: 1135-1142.

NEGRÃO-CORRÊA, D. E., TEIXEIRA, M.M. 2006. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, 90:14-28.

NEGRÃO-CORRÊA, D. ; PINHO, VANESSA ; SOUZA, DANIELLE G. ; PEREIRA, ANA TERESINHA DE MOURA ; FERNANDES, A. ; SCHEURMANN, KARINA ; HAMER, FABIANA ; SOUZA, ADRIANO L.S. ; MARTINS, M. M. 2006. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice. **International Journal for Parasitology**, 36: 1185-1195.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. 2003. Parasitologia Humana. 10ª Edição. **Editora Atheneu**. 428 p.

NORTH, R.J., JUNG, Y.J. 2004. Immunity to tuberculosis. **Annual review of Immunology**, 22:599-623.

O'LORCANN P., HOLLANO, C.v. 2000. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, 121(suppl):S51-S71.

OLLEROS. M.L.: GULER R: VESIN. D.: PARAPANOV, R, MARCHAL. G.: MARTINEZ-SORIA E.: CORZZA N. PACHE, J. C., MUELLER C., GARCIA I. 2005. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against

Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. **American Journal of Pathology**, 166 (4): 1109-1120.

ONAH. D.N.: NAWA Y. 2000. Mucosal Immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **Korean Journal of Parasitology**, 38:209-236.

OVINGTON, K.S., MCKIE, K., MATTHAEI, K.I., YOUNG, I.G., BEHM, C.A 1998. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. **Immunology**, 95(3):488-93.

PEARL, J.E., SAUNDERS, B., EHLERS, S., ORME, I.M., COOPER, A.M. 2001. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. **Cellular Immunology**.10,211 (1):43-50.

PEARLMAN, E, KAZURA, J. W., HAZLETT, F. E Jr., BOOM, W. H. 1993. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth - induced T helper 2 cell responses. **Journal of Immunology**, 151 :4857-64.

PORTO, A.F., NEVA, F.A, BITTENCOURT, H., LISBOA, W., THOMPSON, R, ALCANTARA, L., CARVALHO, EM. 2001. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, 23:503-507.

QUESNIAUX, V., FREMOND, C., JACOBS, M., PARIDA S., NICOLLE, D., YEREMEEV, V. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes and Infection**, 6: 946-959.

RIBEIRO-RODRIGUES, R, RESENDE, C.T., ROJAS, R, TOOSI Z, DIETZE, R, BOOM, W. H. 2006. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, 144: 25-34.

ROTMAN. H.L., YUTANAWIBOONCHAI, W., BRIGANDI, RA, LEON, O., GLEICH, G.J.: NOLAN: T.J., SCHAD, G.A, ABRAHAM, D.S. 1996. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, 82(3):267-78.

SADLER C.H .. RUTITZKY. L.I.: STADECKER, M.J., WILSON. RA 2003. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Shistosoma mansoni*. **European Journal of Immunology**, 33: 88ü-888.

SALGAME, P. 2005. Host innate and Th1 responses and micobacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current in Opinion Immunology**, 17: 374-380.

SANSOM, D.M., WALKER, L.S. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. **Immunology Reviews**, 212:131-48.

SIDDIQUI, A. A. BERK, S.L. 2003. Strongyloidiasis. **Current Treatment Option**, 5:283-289.

SILVEIRA, M.R., NUNES, K.P., CARA, D.C., SOUZA, D.G., CORREA, A Jr., TEIXEIRA, M.M., NEGRÃO-CORRÊA, D. 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunology**, 70:6263-6272.

SOOS, J.M., ASHLEY, TA, MORROW, J., PATARROYO, J.C., SZENTE, B.E, ZAMVIL, S.S. 1999. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. **International Immunology**, 11 (7):1169-79.

SOULSBY, E.J.L. 1987. Helintos-Trematodos em: Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. **Editora Interamericana**. México. p.76.

STEVENS, T.L., BOSSIE, A., SANDERS, V.M., FERNANDEZ-BOTRAN, R., COFFMAN, R.L., MOSMANN, T.R. and VITETTA, E.S. 1998. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen specific helper T cells. **Nature**. 334 (6179): 255-258.

STEEL, C. e NUTMAN, T. B. 2003. CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. **American Association of Immunology**, 22: 1767-1803.

TAKAMURE, A. 1995. Migration route of *Strongylides venezuelensis* in rodents. **International Journal of Parasitology**, 25:907-911.

TALAAAT, K. R, BONAWITZ, RE, DOMENECH, P, NUTMAN, TB. 2006. Preexposure to live *Brugia malayi* microfilariae alters the innate response of human dendritic cells to *Mycobacterium tuberculosis* .**The Journal of Infectious Diseases**, 193: 196-204.

TEIXEIRA H. C., ABRAMO. C., MUNK, M. E. 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 33 (3): 323-334.

TEIXEIRA, H. C.: MUNK. M. E.: KAUFMAN. S. H. E. 1995. Frequencies of INF- δ and IL-4 producing cells during *Mycobacterium bovis* BCG infection in two genetically susceptible mouse strains: role of α/β T cells and NK1.1. cells. **Immunology Letters**, 46:1.

Thompson-Snipes, L. Skamene, E., Radzioch, D. 1998. Acquired resistance but not innate resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin is compromised by interleukin-12 ablation. **Infection and Immunity**. Nov;66 (11):5268-74.

VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 1991. 8ª.Edição. Rio de Janeiro : **Guanabara Koogan**. 325-343 p.

WALSH, C. M., SMITH, P., FALLON, P. G. 2007. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. **Parasite and Immunology**, 29: 293-308.

WANG, B., FUJISAWA, H., ZHUANG, L., FREED, I., HOWELL, B.G., SHAHID, S., SHIVJI, G.M., MAK, T.W., SAUDER, D.N. 2000. CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, 15,165(12):6783-90.

WANG, Y. C., SASHIDHARAMURTHY, R, NAGARAJAN, S., SELVARAJ, P. 2006. B-7 -1 HAS (CD80-CD24), a recombinant hybrid costimulatory molecule retains ligand and costimulatory functions. **Immunology Letters**, 105(2):185-92.

WATANABE, K., HAMANO, S., YADA, S., NODA, K., KISHIHARA, K., NOMOTO, K., TADA, I.2001. The effect of interleukin-4 on the induction of intestinal mast cells and chronological cytokine profiles during intestinal nematode *Strongyloides ratti* infection. **Parasitology Research**. Feb;87(2):149-54.

WILKES, C.P., THOMPSON, F.J., GARDNER, M.P., PATERSON, S., VINEY, M.E. 2004. The effect of the host immune response on the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Parasitology**. Jun;128(Pt 6):661-9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control**. HO/HTM/TB/376, 2007.