

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TH1XTH2 NA CO-INFECÇÃO COM
STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS E MYCOBACTERIUM BOVIS
EM CAMUNDONGOS BALB/C**

***EVALUATION OF TH1XTH2 PROFILE IN STRONGYLOIDES
VENEZUELENSIS AND MYCOBACTERIUM BOVIS CO-INFECTIOIN
IN BALB/C MICE***

Alyria Teixeira Dias¹, Livia Leite Alves¹, Natália de Andrade Gomes², Juliana da Silva Brandi¹, Aline dos Santos Silva³, Michele Alves Vicentini⁴, Ana Maria do Carmo⁴, Caio César de Souza Alves⁴, Adriana Fernandes⁵, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa⁶, Maria Aparecida de Souza⁷, Henrique Couto Teixeira⁷, Ana Paula Ferreira^{7,8}.

¹ Acadêmico de Farmácia (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF).

² Acadêmico de Medicina (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF).

³ Acadêmico de Ciências Biológicas (UFJF).

⁴ Mestrando (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF).

⁵ Doutoranda (Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG).

⁶ Doutora (Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG).

⁷ Doutor (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF).

⁸ Pesquisador Responsável (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais. e-mail: ana.paula@ufjf.edu.br. endereço: Campus Universitário, Laboratório de Imunologia, Bairro Martelos, Juiz de Fora).

Resumo

Este estudo avaliou o perfil Th1XTh2, na co-infecção com *Strongyloides venezuelensis* (SV) e *M. bovis* (MB) em camundongos BALB/c, através da produção de IFN-g e IL-10 por células esplênicas, estimuladas in vitro com o antígeno da larva L3 do *S. venezuelensis* (AgSV). Foi também avaliada a expressão dos marcadores celulares CD80, CD86, CTLA-4, CD28 e CD25, expressas por células esplênicas dos animais, sete e dez dias após a infecção com o SV. A produção de IFN-g aumentou no 10º dia e a produção de IL-10 diminuiu nos 7º e 10º dias da(s) infecção(ões), quando comparou-se o grupo MBXSV com o grupo SV. Observou-se aumento da expressão de CD80 e CD86 no grupo MBXSV, no 7º dia e diminuição no 10º dia após a(s) infecção(ões) em relação ao grupo SV. Houve diminuição na expressão de CD28 e CTLA-4 nos dois pontos das infecções no grupo co-infectado e, também, diminuição da expressão do marcador CD25 no grupo co-infectado no 7º dia após a infecção. Os resultados sugerem a regulação do perfil Th2 em resposta ao *S. venezuelensis*, através do aumento do perfil Th1 induzido pelo *M. bovis*, com aumento de IFN-g e diminuição de IL-10 e expressão das moléculas CD80, CD86, CD28, CTLA-4 e CD25 por células esplênicas.

Palavras-chave: *M. bovis*, *S. strongyloides*, co-infecção.

Abstract

This study assessed the Th1XTh2 profile in the co-infection with *Strongyloides venezuelensis* (SV) and *M. bovis* (MB) in BALB/c mice, through the production of IFN-g and IL-10 by spleen cells stimulated in vitro with the antigen of L3 larvae (AgSV). It also evaluated the expression of cellular markers CD80, CD86, CTLA-4, CD28 and CD25 expressed by spleen cells, seven and ten days after infection with SV. The production of IFN-g was increased comparing MBXSV to SV in 10 days after infection. Comparing MBXSV to SV, it was observed a decrease in the production of IL-10 in 7 and 10 of days after infection; an increased expression of CD80 and CD86 in MBXSV group, at 7th day and a decrease in the 10th day after infection in relation to SV group. There was a decrease in the expression of CD28 and CTLA-4 in both points of infections in co-infected group and a decrease in the expression of CD25 marker in the co-infected group in the 7th day after infection. The results show the regulation of Th1 profile in Th2 profile induced by *M. bovis* infection, through the increase of IFN-g and reduction of IL-10 production and the expression of CD80, CD86, CD28, CTLA-4 and CD25 molecules.

Keywords: *M. bovis*, *S. strongyloides*, co-infection.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose, causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das doenças infecciosas mais importantes, acometendo vários órgãos e principalmente o pulmão, sendo responsável por aproximadamente 2,9 milhões de óbitos e 8 milhões de novos casos por ano (KOCHI, 1991, p. 1-6). O limite entre proteção e doença está diretamente relacionado com o grau de imunidade mediada por células, principalmente linfócitos Th1, através da produção de IFN- γ (PEARLMAN et al., 1993, p. 4857-4864).

As parasitoses intestinais também representam um importante problema médico-sanitário, tendo em vista o grande número de pessoas acometidas e as alterações orgânicas que podem provocar no hospedeiro (CHAN, 1997, p. 438–443; CROMPTON, 1999, p. 397–403). Estima-se que um quarto da população mundial apresenta infecções causadas por espécies de nematóides gastrintestinais, sendo que essas infecções helmínticas são prevalentes, particularmente, em países tropicais e subtropicais (NEGRÃO-CORRÊA, 2001, p. 291-299). Os mecanismos envolvidos na imunopatologia e na imunoproteção contra parasitos ainda não estão completamente esclarecidos (LAWRENCE, 2003, p. 271-281). Nas infecções intestinais induzidas por nematóides, geralmente ocorre prevalência da resposta imunológica Th2, marcada pela produção de diversas citocinas como, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, associadas à proteção do hospedeiro (FINKELMAN et al., 1997, p. 505-533).

Infecções parasitárias intestinais, que apresentam perfil de resposta imunológica Th2, podem modular a resposta Th1 relacionada à patógenos

intracelulares e, ainda, regular negativamente e prejudicar a resposta à vacinação de infecções que são controladas por este perfil de resposta (PORTO et al., 2001, p. 503–507; FERREIRA, 2002, p. 441-442). Trabalhos vem demonstrando que infecções, como com HTLV-1, que induz o perfil Th1, principalmente com alta produção de IFN-g pode também influenciar no perfil Th2 em resposta ao *Strongyloides stercoralis*, fazendo com que os animais tenham um aumento da carga parasitária (CARVALHO et al. 2004, p. 487–497; PORTO et al, 2001, p. 503 507). Além disto, recentemente foi demonstrado por nosso grupo que camundongos coinfestado com o MB e SV apresentam um aumento do número de ovos e vermes de SV (CARMO, 2008, p. 1-74). Baseado no exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da infecção com o MB, na resposta ao SV, em relação às citocinas (IFN-g e IL-10) produzidas por células esplênicas em resposta ao estímulo in vitro com o antígeno solúvel da larva L3 (AgSV). Além disto, foi realizado um estudo da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, CTLA-4 e CD28 e de CD25 pelas células esplênicas, após os 7^o e 10^o dia após a infecção com o SV.

2. METODOLOGIA

Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea com larvas L3 de SV (L3L). Após 4 dias, foram inoculados por via intravenosa com MB virulento (*M. bovis* cepa 19274 (ATCC)). Três grupos de camundongos foram estudados (5 animais por grupo): controle não infectado (CT), infectados SV (SV), co-infectados (MBXSV). Células esplênicas foram coletadas 7 e 10 dpi com SV e cultivadas por 48

horas na presença do antígeno solúvel da larva L3 (AgSV). A produção de IFN-g e IL-10 nos sobrenadantes de culturas foram determinadas por ELISA. A expressão das moléculas CD80, CD86, CTLA-4, CD28 e CD25 pelas células de baço foi também avaliada através de marcação com os respectivos anticorpos marcados [(anti-CD11b(PE)/anti-CD80(FITC), anti-CD11b(PE)/anti-CD86(FITC), anti-CD3(PCP)/CTLA-4(PE), anti-CD3(PCP)/CD28(PE)] por 45 min utilizando-se citometria de fluxo (BD software CellQuest, Becton Dickinson, San Jose, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Produção de IL-10 e IFN-g por Células Esplênicas*

Os níveis de IFN-g e IL-10 foram avaliados nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas estimuladas por 48 horas com o AgSV. A TABELA 1 apresenta os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de células de baço, os quais foram semelhantes no 7^o dia da infecção, tanto no grupo S V, quanto no grupo MBXSV. Entretanto, no 10^o dia após a infecção, houve diminuição dos níveis dessa citocina em ambos os grupos. Nos animais do grupo MBXSV, os níveis de IFN-g estavam duas vezes maior que nos animais do grupo SV, sugerindo o predomínio da resposta Th1, característica da presença da infecção com *M. bovis* (KAUFMAN, 1999, p. 66- 85). Corroborando com estes dados, destaca-se a observação feita concomitantemente, de que os animais co-infectados apresentaram um aumento do número de ovos nas fezes e vermes no intestino do que o grupo SV, nos mesmos

pontos da infecção com o SV, além de um aumento da produção de IFN-g também por células pulmonares (CARMO, 2008, p. 1-74). Ao contrário do IFN-g, os níveis da citocina antiinflamatória IL-10, estavam diminuídos nos sobrenadantes de cultura de células de baço dos animais do grupo MBXSV em ambos os pontos da infecção, em comparação aos animais do grupo SV, sugerindo que a infecção por *M. bovis* inibiu a produção dessa citocina nos animais co-infectados.

3.2. Expressão de Moléculas Co-Estimulatórias/ Imunomodulatórias

Os resultados apresentados neste estudo mostraram um aumento na expressão de CD80 e CD86 do 7^o para o 10^o dia após a infecção, no grupo de animais SV. Entretanto, no 7^o dia após a infecção a expressão destas moléculas no grupo MBXSV é maior e, no 10^o dia após a infecção, menor em relação ao grupo SV (Figura 1).

Na Figura 1, as barras representam a média da porcentagem \pm erro padrão de expressão de CD80 e CD86 em células de baço de camundongos (n=5) dos grupos controle (C), infectados por *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis* (MBXSV), sete dias após a infecção (7 d.p.i.) e dez dias após a infecção (10 d.p.i.) com *S. venezuelensis*. * p<0,05.

TABELA 1. Níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de células esplênicas estimuladas in vitro com antígeno da larva L3 de *S. venezuelensis*.

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

*As concentrações de citocinas foram determinadas nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas 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. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados. Os valores com a mesma letra são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

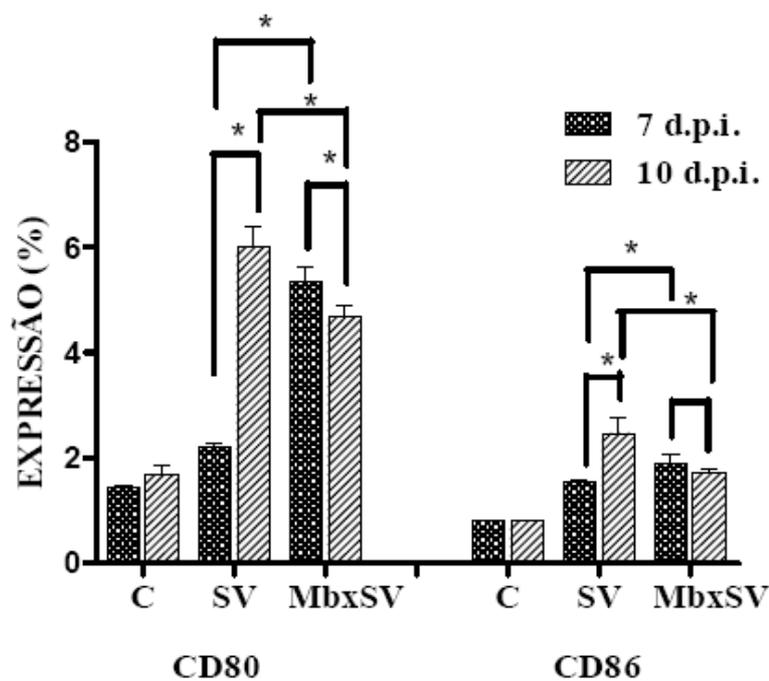


Figura 1. Porcentagem de expressão de CD80 e CD86 em células esplênicas.

Vale ressaltar que a expressão de CD80 foi sempre maior que a de CD86. A diminuição de CD80 e CD86 no 10^o dia coincide com diminuição da IL10 no 7^o dia das infecções, no grupo co-infectado, característica de uma resposta Th2. Outros trabalhos já haviam demonstrado a importância das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 no perfil de citocinas produzidas durante a infecção helmíntica (NAKAJIMA et al., 1996, p. 637-644). Estudos sugerem que o desenvolvimento da resposta imune primária do tipo Th2 é 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 (NAKAJIMA et al., 1996, p. 637-644).

Foi demonstrado que o bloqueio das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 inibe o desenvolvimento da resposta Th2 primária na infecção por *Heligmosomoides polygyrus* (LU et al., 1994, p. 693-698). A expressão de CD28 e CTLA-4 no 7^o dia foi menor do que no 10^o dia após a(s) infecção(ões). Entretanto, tanto a expressão de CD28, quanto a de CTLA- 4 foi maior no grupo SV, quando comparado ao grupo MBXSV (Figura 2).

Na Figura 2, as barras representam a média da porcentagem \pm erro padrão de expressão de CD28 e CTLA-4 em células de baço de camundongos (n=5) dos grupos controle (C), infectados por *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis* (MBXSV), sete dias após a infecção (7 d.p.i.) e dez dias após a infecção (10 d.p.i.) com *S. venezuelensis*. * p<0,05.

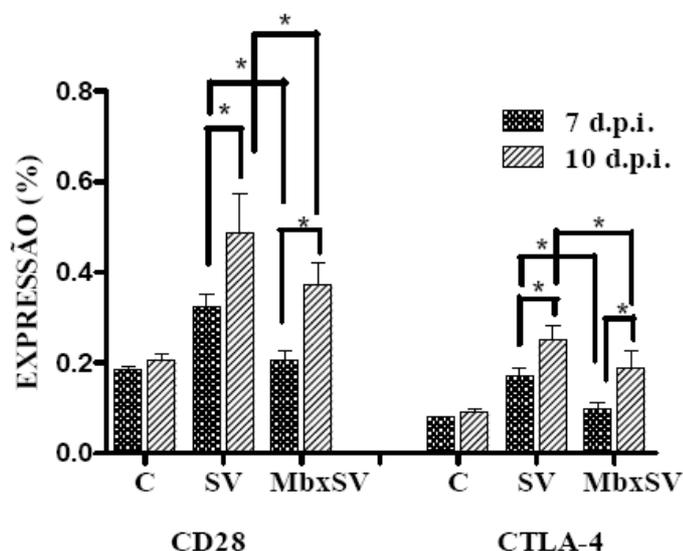


Figura 2. Porcentagem de expressão de CD28 e CTLA-4 em células esplênicas.

As moléculas co-estimulatórias CD80-CD86, expressas em células apresentadoras de antígeno (APC), ligam-se preferencialmente em CTLA-4 quando comparado à molécula CD28, em situações nas quais as células T estão expressando CTLA-4, levando à inativação de linfócitos (SANSOM & WALKER, 2006, p. 131-148). Esta inativação em animais co-infectados poderia estar acarretando a redução da resposta imune protetora do animal. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a diminuição da expressão do marcador CD25 no grupo co-infectado no 7^o dia após infecção quando comparado ao grupo SV (Figura 3). Pode-se sugerir que esta diminuição possa estar relacionada à diminuição da citocina antiinflamatória IL-10.

Na Figura 3, as barras representam a média da porcentagem \pm erro padrão de expressão de CD25 em células de baço de camundongos (n=5) dos grupos controle (C), infectados por *S. venezuelensis* (SV) ou co-infectados com *S.*

venezuelensis e *M. bovis* (MBXSV), sete dias após a infecção (7 d.p.i.) e dez dias após a infecção (10 d.p.i.) com *S. venezuelensis*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

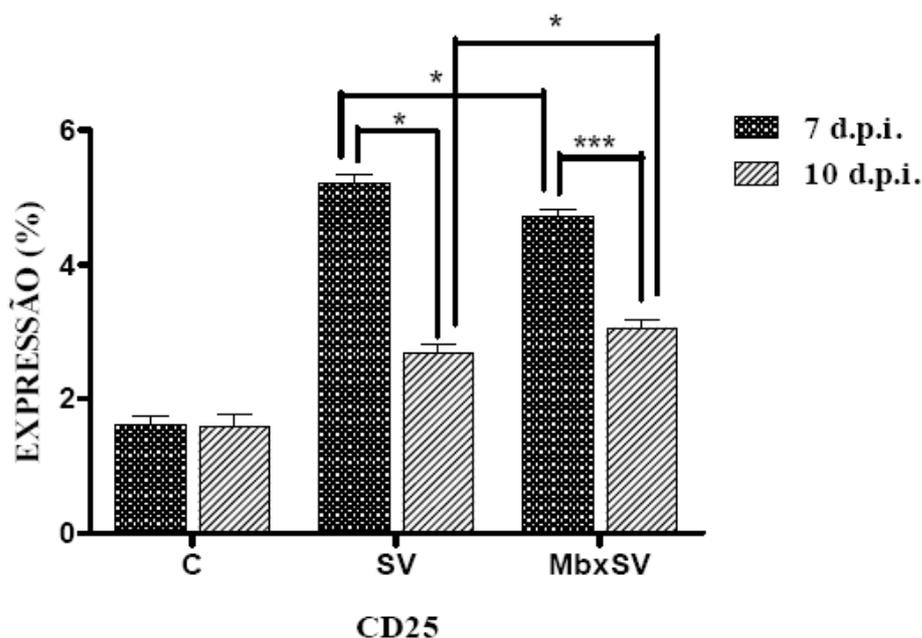


Figura 3. Porcentagem de expressão CD25 em células esplênicas.

Tem sido sugerido que células T regulatórias CD25 apresentam papel importante na modulação da resposta imune a infecções helmínticas, como por exemplo, *Shistosoma mansoni* (WALSH, 2007, p. 293-308) e podem estar envolvidas na patogênese de doenças, tais como por *M. tuberculosis* (HOUGARDY et al., 2007, p. 409-416). Além disso, na infecção experimental de camundongos por *S. mansoni*, as células T CD25 são importantes fontes de produção de IL-10 (SADLER et al., 2003, p. 880-888).

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho, concluiu-se que a presença de *M. bovis*, que apresenta um perfil de resposta imune Th1, interfere no perfil Th2

da resposta imune ao *S. venezuelensis*. Pode-se sugerir que isto se dá através de imunorregulação, com diminuição da expressão de CD25, CD28 e CTLA-4 pelos linfócitos e CD80/CD86 pelas células APCs, bem como pelo balanço da produção de IFN-gama e da citocina anti-inflamatória IL-10 por células esplênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARMO, A. M. **Modulação da resposta imune no pulmão de camundongos coinfetados com Mycobacterium bovis e Strongyloides venezuelensis**. 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.
- CARVALHO, E.M & PORTO, A.F. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 487–497, 2004.
- CHAN, M. S. The global burden of intestinal nematode infections– 50 years on. **Parasitology Today**, v.13, p. 438–443, 1997.
- CROMPTON, D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world? **Journal Parasitology**, v. 85, p. 397–403, 1999.
- FERREIRA, A. P, AGUIAR, A. S, FAVA, M. W. B, CORRÊA, J. O. A, TEIXEIRA, F. M & TEIXEIRA, H. C. Can the Efficacy of Bacille Calmette-Guérin Tuberculosis Vaccine Be Affected by Intestinal parasitic Infections. **The Journal of Infections Disease**, v. 186, p. 441-442, 2002.
- FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE ,T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN C.A.; MORRIS S.C.; MADDEN K.B.; GAUSE W.C.; URBAN JF. JR. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 505-533, 1997.
- HOUGARDY, J.M., PLACE, S., HILDEBRAND, M., DROWART, A., DEBRIE, A.S., LOCH, C., MASCART, F. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 4, p. 409-416, 2007.

- KAUFMANN, S.H.E. Immunity to mycobacteria with in: phases on tuberculosis: implications for national design of an effective tuberculosis vaccine. **Chemical Immunology**, v. 63, p. 66-85, 1999.
- KOCHI. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. **Tuberculosis**. v. 72, n. 1, p. 1-6, 1991.
- LAWRENE, C. E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? **Parasite Immunology**. v. 25, p. 271-281, 2003.
- LU, P., ZHOU, X., CHEN, S.J., MOORMAN, M., MORRIS, S.C., FINKELMAN, F.D., LINSLEY, P., URBAN, J.F., GAUSE, W.C. CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 693-698, 1994.
- NAKAJIMA, A.N., WATANABE, S., YOSHINO, H., YAGITA, K., OKUMA, AZUMA, M. Requirement of CD28-CD86 co-stimulation in the interaction between antigenprimed T helper type 2 and B cells. **International immunology**, v. 9, p. 637-644, 1996.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of Immunoglobulin E (IgE) in the Protective Mechanism Against Gastrointestinal Nematode Infection: Looking at the Intestinal Mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 43, n. 5, p. 291-299, 2001.
- PEARLMAN, E., KAZURA, J. W., HAZLETT, F. E. JR., BOOM, W. H. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. **Journal of Immunology**. v. 151, p.4857-4864, 1993.
- PORTO A.F.; NEVA F.A.; BITTENCOURT H.; LISBOA W.; THOMPSON R.; ALCÂNTARA L.; CARVALHO E.M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 503–507, 2001.
- SADLER, C.H., RUTITZKY, L.I., STADECKER, M.J., WILSON, R.A. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **European Journal of immunology**, v. 33, p. 880-888, 2003.
- SANSOM, D.M., WALKER, L.S. The role of CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T cell biology. **Immunology Reviews**, v. 212, p.131-148, 2006.
- WALSH, C.M., SMITH, P., FALLON, P.G. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. **Parasite and Immunology**, v. 29, p. 293-308, 2007.