

TOXOCARIASE CRÔNICA NÃO ALTERA A RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-5 EM CAMUNDONGOS

YASMINE ALVES MENEGON¹; LUCIANA FARIAS DA COSTA DE AVILA²;
ROMULO SILVA DE OLIVEIRA²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹ Universidade Federal de Pelotas, CDTec - Biotecnologia – yasminealves27@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, PPG em Parasitologia – lucostaavila@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, CDTec - Biotecnologia – deoliveira.romulo@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas, CDTec - Biotecnologia – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os helmintos, considerados por alguns autores como “mestres da imunomodulação”, são capazes de modular o sistema imune e permanecer por até décadas no hospedeiro, o que pode causar interações em mecanismos inflamatórios, respostas vacinais e doenças alérgicas (La Flamme et al., 2002; Maizels et al., 2004; Chauvin 2010). Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a influência de parasitoses sobre a eficácia de vacinas. Infecções por helmintos já foram relacionadas à redução da proteção de diferentes vacinas incluindo Imunodeficiência Humana Adquirida Tipo-1 (HIV-1), tuberculose e malária (Actor et al., 1993; Frantz et al., 2010; Su et al., 2006).

Toxocara canis é um nematódeo intestinal de cães que pode causar infecção crônica em hospedeiros paratênicos como bovinos, ovinos, roedores, além de seres humanos (Despommier, 2003). No Brasil, as taxas de prevalência da toxocaríase podem chegar a 50% (Schoenardie et al., 2013). Contudo, esta zoonose é apontada pelo CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças) como uma das cinco parasitoses mais negligenciadas no mundo.

O herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5) é conhecido por causar meningoencefalite, geralmente fatal. Esse vírus, que afeta várias espécies de hospedeiros, é caracterizado por rápida replicação em cultivo, estabelecendo latência, principalmente, em neurônios de gânglios sensoriais (Rissi et al., 2007). Segundo estudo realizado no Brasil, a morbidade variou entre 0,76% e 6,65%, com um pico de 25% em um determinado surto no Rio Grande do Sul. Também foi relatado que o estresse reativa o vírus e desencadeia a doença (Elias et al. 2004).

Devido à diminuição na eficácia de algumas vacinas atribuída à infecção por helmintos e à coexistência dos patógenos *T. canis* e BoHV-5 na região Sul do Brasil, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da infecção crônica por *T. canis* na resposta imune humoral contra BoHV-5 em camundongos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados neste estudo um total de 20 camundongos BALB/c fêmeas, com sete semanas de idade, procedentes do Biotério Central da UFPEL (CEEAA nº 4068). Estes animais foram separados em dois grupos: infectado (G1) e controle (G2).

Para obtenção de formas adultas de *T. canis*, cães naturalmente infectados foram tratados com pamoato de pirantel. Foi feita histerectomia das fêmeas de *T. canis*, coleta dos ovos e incubação destes em formalina 2%, durante 30 dias a 28° C, para a obtenção de ovos infectantes (Avila et al., 2012).

A vacina foi preparada utilizando como antígeno uma amostra de herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5), isolado no Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel, cultivado em cultura de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). Foi utilizada uma concentração de 1.10^6 dose infectante em cultura de tecido (DICT50)/mL, com inativação por bromoetilamina – BEI (C₂H₇Br₂N - Merck), 20 mM, pH 7,5. Como adjuvante vacinal foi usado 15% de Al(OH)₃.

Na Tabela 1 pode ser observado o desenho experimental referente à infecção com ovos de *T. canis* e a vacinação dos animais contra BoHV-5. Nos dias zero, 7, 14, 21 e 28 foram realizadas coletas de sangue para posterior avaliação de anticorpos totais contra BoHV-5 pelo ensaio imunoenzimático indireto (ELISA).

Tabela 1: Desenho experimental dos grupos infectado e controle

	Dia - 60	Dia zero	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
	Infecção com <i>T. canis</i>	V1 ^a C.S	C.S	C.S	V2 ^a C.S	C.S
G1	X	X	X	X	X	X
G 2		X	X	X	X	X

C.S = coleta de sangue

V1^a = vacina primeira dose

V2^a = vacina segunda dose

A pesquisa de anticorpos anti-BoHV-5 foi realizada através da técnica de ELISA. As placas foram sensibilizadas com suspensão de BoHV-5 (2 mg/mL) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), permanecendo por 18 h a 4 °C. Os soros foram diluídos 1:200 em PBS-T e incubados por 90 min a 37 °C. Após, foi adicionado conjugado de imunoglobulinas totais, ligadas a peroxidase (Sigma), na diluição de 1:2.000 e as placas foram incubada por 90 min a 37 °C. Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas 3x com PBS-T. Ao final, foi adicionado 0,4 mg/mL de Ortho-Phenylenediamine (OPD, Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato (pH 4,0), acrescido de H₂O₂ a 0,1%. A reação foi parada com H₂SO₄ 1N. Cada amostra de soro foi examinada em duplicata. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 450 nm.

A infecção por *T. canis* foi confirmada em todos os camundongos do G1, nos quais foi realizada eutanásia e digestão tecidual do fígado com 1% de pepsina e 1% HCl. A contagem das larvas foi realizada ao microscópio óptico (aumento de 10x).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi detectada soroconversão contra BoHV-5 a partir do 14º dia e os níveis de anticorpos mantiveram-se crescentes até o final do experimento em ambos os grupos, sem diferença estatística (Figura 1).

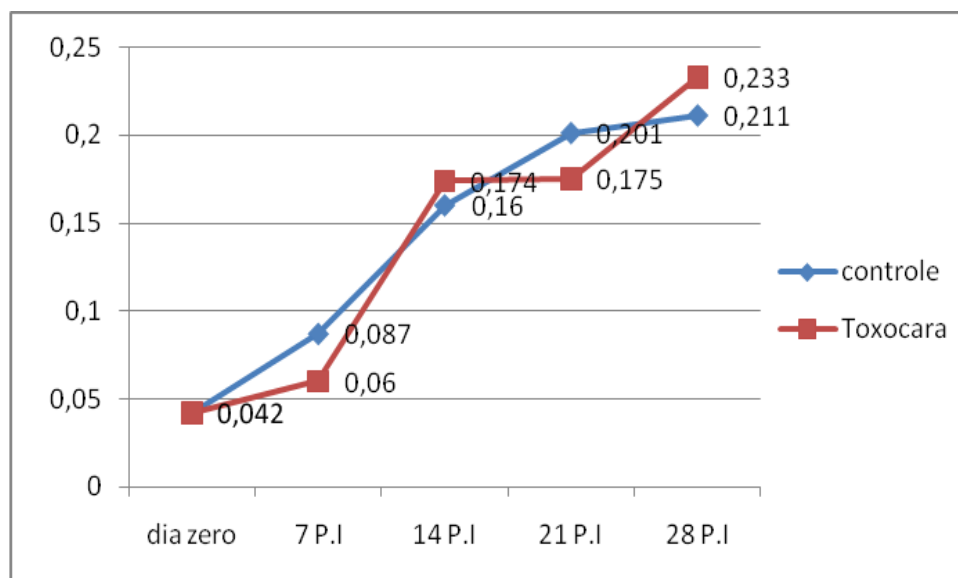


Figura 1- Cinética da produção de imunoglobulinas totais contra BoHV-5 em camundongos BALB/c infectados por *T. canis* e controle (n=10).

Com base nestes dados foi possível observar que a infecção pelo nematódeo *T. canis* não influenciou na resposta humoral contra BoHV-5. Estes dados estão de acordo com os relatados por Frantz et al., (2010), que concluíram que a infecção por *T. canis* não alterou a resposta imune contra *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos BALB/c.

Em contrapartida, existem estudos que comprovam a modulação do sistema imune causada por helmintos, como *Schistosoma mansoni* que aumentou a vulnerabilidade de camundongos a *Mycobacterium tuberculosis* (Frantz et al. 2010). Em estudo realizado por Actor (1993), a infecção por *Schistosoma mansoni* causou diminuição da resposta Th1 em camundongos BALB/c vacinados contra (HIV-1), enquanto o nematódeo *Heligmosomoides polygyrus* reduziu a eficácia da vacina contra a malária em camundongos C57BL/6 (Su et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

A infecção crônica por *T. canis* em camundongos BALB/c não acarretou em alteração da resposta imune humoral contra BoHV-5. Os resultados obtidos são relevantes uma vez que o nematódeo *T. canis* e BoHV-5 são endêmicos na região estudada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACTOR, J.K.; SHIRAI, M.; KULLBERG, M.C.; BULLER, R.M.L.; SHER, A.; BERZOFKY, J.A., Helminth infection results in decreased vírus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed vírus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** v.90, p.948-952, 1993.
2. AVILA L.F.C.; CONCEIÇÃO F.R.; TELMO P.L., DUTRA G.F.; SANTOS D.G.; MARTINS L.H.R.; *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis, **Vet Parasitol.** 187:337-40, 2012.

3. CDC. Infecções parasitárias negligenciadas nos Estados Unidos. CDC – Centers for Disease Control and Prevention; 10 julho, 2014. Online. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/resources/pdf/npi_toxocariasis.pdf
4. CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; Immunity against hHelminths: Interactions with the Host and the Intercurrent infections. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-9, 2010.
5. DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology and Molecular Aspects. **Clin Microbiol Rev.** p.265-272, 2003.
6. ELIAS, F.; SCHILD, A.L. & RIET-CORREA F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.24, p:123-131, 2004.
7. FRANTZ, F.G.; ROSADA, R.S.; PERES-BUZALAF, C.; PERUSSO, F. R. T.; RODRIGUES, V.; RAMOS, S. G.; KUNKEL, S.L.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L. H.; Helminth Coinfection Does Not Affect Therapeutic Effect of a DNA Vaccine in Mice Harboring Tuberculosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2010.
8. MAIZELS, R.M.; BALIC, A.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; NAIR, M.; TAYLOR, M.D.; ALLEN, J.E.; Helminth parasites—masters of regulation. **Immunological Reviews**, v.201, n.1, p.89-116, 2004.
9. PIVIK, J.R.; MCCOMAS, J.; MACFARLANE, I.; LAFLAMME, M., Using virtual reality to teach disability awareness; **Educational Computing Technology**; v.26; p.225- 240; 2002.
10. RISSI, D.R.; Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.27, n.7, 2007.
11. SCHOENADIE E.R., Seroprevalence of Toxocara Infection in Children From Southern Brazil. **J. Parasitol**, v.3, p. 537–539, 2013.
12. SU, Z.; SEGURA, M.; STEVENSON, M.M.; Reduced Protective Efficacy of a Blood-Stage Malaria Vaccine by Concurrent Nematode Infection. **Infection and immunity**, v.74, n.4, p.2138-2144, 2006.