

## **HELMINTOSE CRÔNICA MODULA A TRANSCRIÇÃO DE IFN- $\gamma$ EM CAMUNDONGOS VACINADOS CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-5**

**RÔMULO SILVA DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, LUCIANA FARIAS DA COSTA DE AVILA<sup>2</sup>,  
YASMINE ALVES MENEGON<sup>3</sup>, TALITA BANDEIRA ROOS<sup>4</sup>, ANA PAULA STORI  
DE LARA<sup>5</sup>, FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas, CDTEC-Biotecnologia- deoliveira.romulo@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas, PPG em Parasitologia- lucostaavila@hotmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas, CDTEC-Biotecnologia- yasminealves27@gmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal do Pará, PPG em Saúde Animal*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas, PPG em Parasitologia- ana.paula.central@hotmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas, CDTEC-Biotecnologia- fabio@leivasleite.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

Os helmintos desenvolvem maneiras de escapar da resposta imune do hospedeiro e causar infecções crônicas o que pode alterar a resposta frente a vários patógenos ou seus抗ígenos (MAIZELS et al., 2004). *Toxocara canis* é um helminto intestinal de cães que pode causar infecção crônica em hospedeiros paratênicos como bovinos, ovinos e hospedeiros acidentais como os seres humanos (LIM, 2010). Assim como *T. canis*, Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), vírus responsável pelo desenvolvimento de uma encefalite aguda em bovinos, também possui elevada prevalência no Brasil (CAMPOS et al., 2009; RISSI et al. 2006).

Pesquisas atuais têm relacionado infecções por helmintos à modulação do sistema imune e à diminuição na eficácia de vacinas, devido à supressão de células T helper tipo 1 (Th1) e ao estímulo de células T helper tipo 2 (Th2) (SU et al., 2006). Este fato é de importância principalmente em enfermidades víricas as quais, geralmente, necessitam de resposta imune celular, com aumento de células Th1 e IFN- $\gamma$ . Devido ao fato de *T. canis* modular o sistema imune do hospedeiro e suprimir a produção de células Th1 (KURODA et al., 2001), o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da infecção crônica por *T. canis* na resposta imune celular de camundongos vacinados contra BoHV-5.

### **2. METODOLOGIA**

Foram utilizados neste estudo um total de 20 *Mus musculus*, da raça BALB/c, fêmeas, com sete semanas de idade, procedentes do Biotério Central da UFPEL. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA nº 4068).

Os camundongos foram divididos em 2 grupos de 10 animais. Grupo 1 foi infectado com 100 ovos de *T. canis* 60 dias antes da primeira dose da vacina (infecção crônica). Grupo 2 foi o controle (sem infecção). No dia zero, todos os animais (grupos 1 e 2) foram vacinados contra BoHV-5, assim como no dia 21. No dia 28, todos foram submetidos à eutanásia para a avaliação da imunidade celular. Os baços foram removidos e os esplenócitos suspensos em solução balanceada de HANK'S, sendo realizada lise celular (cloreto de amônio a 0,8%) e uma nova lavagem em solução de HANK'S. Os esplenócitos foram cultivados em RPMI 1640 (Gibco®) com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) em placas de 24 poços (TPP®), com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 24 h, os esplenócitos foram estimulados com BoHV-5 10<sup>5</sup> dose infectante em cultura de tecido (DICT50)/mL,

com inativação por bromoetilamina ( $C_2H_7Br_2N$  - Merck). Após 24 h, o sobrenadante foi descartado e as células foram armazenadas em Trizol a -70°C.

A seguir, foi realizada extração de RNA e síntese de cDNA com o *Kit High Capacity* (Applied Biosystems®), conforme as instruções do fabricante. O cDNA foi usado como *template* para a reação em cadeia da polimerase (PCR). As condições da PCR e os oligômeros iniciadores ( $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e IL-12p40) foram utilizados de acordo com ROOS et al. (2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada diminuição da transcrição gênica de IFN- $\gamma$  (2,5 vezes) no grupo infectado por *T. canis*, em relação ao controle. As produções de IL-4, IL-10 e IL-12 não apresentaram diferença entre os dois grupos (Figuras 1 e 2).

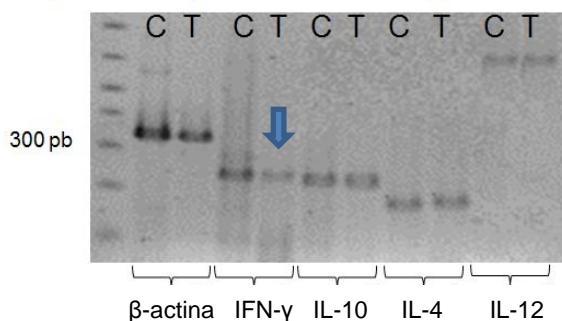


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR amplificados a partir de cDNA de esplenócitos de camundongos vacinados contra BoHV-5, infectados por *T. canis* (T) e controle (C).

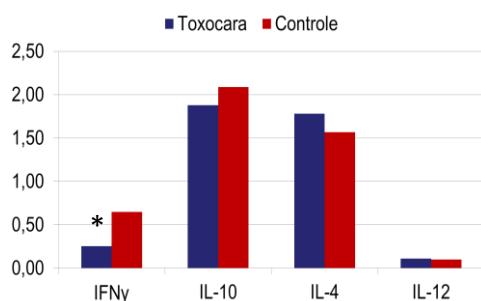


Figura 2: Transcrição gênica de citocinas produzidas por esplenócitos de camundongos infectados cronicamente por *T. canis* e controle, estimulados *in vitro* com BoHV-5

Assim como o presente estudo outros autores já documentaram que a infecção por helmintos prejudica a proteção de diferentes vacinas, incluindo BCG (ELIAS et al., 2008), tétano (NOOKALA et al, 2004), difteria (HASEEB, 1997) e HIV-1 (DA'DARA, 2006). Além disso, infecção por helminto estaria relacionada também a uma maior suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium leprae* (DINIZ et al., 2001), o que não ocorre com *M. tuberculosis* (FRANTZ et al., 2007). Em estudo que avaliou a eficácia de uma vacina contra malária, animais livres de nematódeos obtiveram uma resposta imune protetora superior àqueles que

estavam parasitados. Segundo os autores, os helmintos suprimem as células Th1, consequentemente reduzindo o efeito protetor da vacina (SU et al., 2006).

Em geral as vacinas modernas estimulam a resposta imune Th1, com produção de IFN $\gamma$ , que estaria relacionada a uma melhor eficiência vacinal. Entretanto, nas infecções por helmintos, como o nematódeo *T. canis*, ocorre redução de células Th1 e aumento de Th2 (KURODA et al., 2001; PINELLI et al., 2007), o que pode causar um prejuízo na resposta vacinal e uma maior suscetibilidade a determinadas infecções (CHEN et al., 2005). A partir dos resultados obtidos neste estudo foi possível observar que a infecção crônica por *T. canis* causou modulação do sistema imune de camundongos vacinados contra BoHV-5. Estudos que avaliem a influência de parasitoses sobre respostas vacinais são importantes pois, além da ação direta causada pela presença de um helminto no hospedeiro, a ação moduladora exercida sobre o sistema imune é um fator importante que deve ser sempre considerado.

#### 4. CONCLUSÕES

A infecção por *T. canis* influenciou na resposta celular, uma vez que causou uma redução na transcrição gênica de IFN- $\gamma$ . Isto sugere que a imunomodulação exercida por este nematódeo altera a resposta imune celular contra BoHV-5. Os resultados obtidos são relevantes uma vez que o nematóide *T. canis* e BoHV-5 são endêmicos na região estudada.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- CAMPOS, F.S., FRANCO, A.C., HÜBNER, S.O., OLIVEIRA, M.T., SILVA, A.D., ESTEVES, P.A., et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet Microbiol.** 139:67–73 2009;
- CHEN CC, LOUIE S, MCCORMICK B, WALKER WA, SHI HN. Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric *Citrobacter rodentium* and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. **Infect Immun** 73: 5468–5481; 2005.
- Da'DARA AA, LAUTSCH N, DUDEK T, NOVITSKY V, LEE TH, ESSEX M, et al. Helminth infection suppresses T-cell immune response to HIV-DNA-based vaccine in mice. **Vaccine**, vol 24, p: 5211-9, 2006.
- DINIZ, L. M.; ZANDONADE, E.; DIETZE, R.; PEREIRA, F.E.L.; RODRIGUES, R.R. Short report: Do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol 65, n 6, p: 852–854, 2001.
- ELIAS, D.; BRITTON, S.; ASEFFA, A.; ENGERS, H.; AKUFFO, H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production, **Vaccine**, vol 26, n 31, p: 3897-902, 2008.
- FRANTZ, F.G.; ROSADA, R. S.; TURATO, W. M.; PERES, C. M.; COELHO-CASTELO, A. A. M.; RAMOS, S. G.; ARONOFF, D. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLEI,

- L.H. The Immune Response to Toxocariasis Does Not Modify Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in BALB/c Mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol 77, n 4, p: 691–698, 2007.
- HASEEB MA,CRAIG JP. Suppression of the immune response to diphtheria toxoid in murine schistosomiasis. **Vaccine** vol 15, p: 45 – 50, 1997.
- KURODA, E., YOSHIDA, Y., SHAN, B.E., YAMASHITA, U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasit Immunol** 23: 305-311, 2001.
- LIM, J. H. Hepatic Visceral Larva Migrans of *Toxocara canis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol 82, n 4, p:520–521, 2010.
- MAIZELS, R. M., BALIC, A., GOMEZ-ESCOBAR, N., NAIR, M., TAYLOR, M.D., ALLEN, J. E. Helminth parasites - masters of regulation. **Immunol. Rev.** vol 201, p: 89-116, 2004.
- NOOKALA, S.; SRINIVASAN, S.; KALIRAJ,P.; NARAYANAN, N.; NUTMAN, T. Impairment of Tetanus-Specific Cellular and Humoral Responses following Tetanus Vaccination in Human Lymphatic Filariasis. **Infection and Immunity**, p: 2598–2604, 2004.
- PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; FONVILLE, M.; HAMILTON, C. M.; GIJSEN, J. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Exp Parasitol**, vol 115, 2007.
- PINTO RA, ARREDONDO SM, GAGGERO AA, DIAZ PV. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection as associated with increased endogenous plasma cortisol. **Pediatrics**;117:878–86, 2006.
- REESE, T. A. et al. Competition at a viral promoter Helminth infection reactivates latent g-herpesvirus via cytokine. DOI: 10.1126/science.125451. **Science** 345, 573 (2014).
- ROOS, T.B., STORI de LARA A.P.S., DUMMER L.A., FISCHER, G., LEIVAS LEITE, F.P. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, 30: 2173–7, 2012.
- RISSI D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovino afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesq. Vet. Bras.** 26:123-132.

SU, Z.; SEGURA, M.; STEVENSON, M.M. Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. **Infect Immun** vol 74, n 4, 2138–2144, 2006.

TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BARERA, A.; DIELI, F.; SIRECI, G.; GENCHI, C.; DEPLAZES, P.; SALERNO, A. Toxocara canis infection induces antigen-specific IL-10 and IFN $\gamma$  production in pregnant dogs and their puppies. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 108, n 1-2, 2005.

WENG, M., HUNTLEY, D., HUANG, I.F., FOYE-JACKSON, O., WANG, L., SARKISSIAN, A., ZHOU, Q., WALKER, W.A., CHERAYIL, B.J., SHI, H. N. Alternatively Activated Macrophages in Intestinal Helminth Infection: Effects on Concurrent Bacterial Colitis. **J Immunol**, vol 179, p: 4721-4731, 2007.