

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**ANA MARIA DO CARMO**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO PULMÃO  
DE CAMUNDONGOS CO-INFECTADOS COM *Mycobacterium  
bovis* e *Strongyloides venezuelensis***

**JUIZ DE FORA  
2008**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Ana Maria do Carmo

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO PULMÃO DE  
CAMUNDONGOS CO-INFECTADOS COM *Mycobacterium bovis* e  
*Strongyloides venezuelensis***

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Saúde Brasileira

**ORIENTADORA: PRF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANA PAULA FERREIRA**

**JUIZ DE FORA  
2008**

ANA MARIA DO CARMO

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS CO-INFECTADOS COM *Mycobacterium bovis* e *Strongyloides venezuelensis***

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Saúde Brasileira.

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira**

---

Prf.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira, Doutora em Imunologia pela USP.  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de fora – MG.

**Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa**

---

Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa, Doutor em Parasitologia Veterinária.  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ.

**Prf.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Soares Coimbra**

---

Prf.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Soares Coimbra, Doutora em Biologia Parasitária pela FIOCRUZ - RJ  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de fora – MG.

**Dr.<sup>a</sup> Celeste Silva Freitas de Souza**

---

Dr.<sup>a</sup> Celeste Silva Freitas de Souza, Doutora em Biologia Parasitária pela FIOCRUZ - RJ  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ.

Aos meus pais pelo apoio, compreensão e por  
me ensinarem a lutar pelos meus ideais.

Ao Marcus pelo companheirismo, amor,  
tolerância e pelo incentivo constante.

Às minhas irmãs Tereza, Helena e Célia pelo  
incentivo e apoio.

À professora Ana Paula pela oportunidade e  
confiança.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a oportunidade de realizar mais uma etapa em minha vida.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira por ter me concedido a chance de realizar este trabalho e principalmente pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e por acreditar em meu potencial.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Souza (Cida) pelo incentivo constante, pelos ensinamentos, paciência, pela confiança e por me fazer acreditar em meu potencial.

À amiga de todas as horas Michelle pelo apoio, pelas palavras de incentivo e pela amizade sincera.

Ao Caio pela paciência em ensinar e pela imensa ajuda e colaboração.

Às amigas e companheiras Alyria e Lívia pela colaboração, apoio e incentivo.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Imunologia, Michele Rodrigues, Suelen, Francisco, Juliana e Márcio pela ajuda e colaboração.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Michele Barsante pela colaboração e apoio.

Ao Professor Dr. Henrique Couto Teixeira pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Dr. Cláudio do Departamento de Microbiologia da UFJF pela colaboração.

Ao pessoal da UFMG, Adriana Fernandes e Professora Dr<sup>a</sup>. Déborah Negrão-Corrêa pela colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia da UFJF, que me acompanharam e apoiaram durante a realização deste trabalho proporcionando momentos muito agradáveis.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não importa onde você vai parar...  
Em que momento da vida você cansou...  
O que importa é que sempre é possível  
e necessário recomeçar.  
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e,  
e mais importante...  
Acreditar em você de novo!”

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

Sabe-se que existem inúmeros trabalhos envolvendo a modulação da resposta imune ao *Mycobacterium*. No entanto, o número de indivíduos apresentando tuberculose é cada vez maior. A resposta imune ao *Mycobacterium* é desencadeada principalmente por linfócitos Th1, com a produção de IFN- $\gamma$ . As parasitoses intestinais também 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. Essas infecções helmínticas induzem preferencialmente uma resposta Th2 com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. Este trabalho avaliou a regulação da resposta imune no pulmão de camundongos co-infectados ou não por *S. venezuelensis* (SV) e/ou *Mycobacterium bovis*-BCG (MB), em dois pontos das duas infecções, denominados como ponto 1 (4° e 7° dia pós-imunização [dpi]) e ponto 2 (7° e 10° dpi) por MB e SV, respectivamente. Os animais foram infectados com 700 larvas de SV pela via subcutânea e, após 3 dias, com  $1 \times 10^6$  UFC de MB cepa selvagem pela via intravenosa. Realizou-se a quantificação do número de ovos e vermes, a dosagem de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) e quimiocinas (CCL2 e CCL5), o envolvimento de MPO e EPO, a detecção da infecção pelo MB por PCR, a avaliação histopatológica e a expressão de moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias (CD80, CD86, CD28, CTLA-4 e CD25) em células ou tecidos do pulmão dos animais infectados e/ou co-infectados. Os resultados mostraram que a presença do MB favoreceu para o aumento do número de ovos e vermes do SV observados nos animais nos dias 4° e 7° (ponto 1) e 7° e 10° (ponto 2) após a infecção por MB e SV, respectivamente, nos animais co-infectados (COIN). A reação de PCR foi efetiva em detectar a presença do MB no pulmão dos animais. Foi observado um aumento de IFN- $\gamma$  e uma diminuição de IL-4 e EPO no pulmão dos animais do grupo COIN, além de aumento na expressão da molécula co-estimulatória CD80 no ponto 1 e uma diminuição no ponto 2. Houve uma alta produção de IL-10 no pulmão dos animais dos grupos MB e COIN, sendo que a histopatologia neste sítio mostrou formação de granulomas com grande influxo de neutrófilos, macrófagos e células epitelióides na periferia nos pulmões dos animais do grupo MB e um granuloma bem mais avançado, com centro necrótico nos animais do grupo COIN. Baseado nesses resultados, conclui-se que o MB modula a infecção pelo SV, fazendo com que os animais fiquem mais suscetíveis à infecção helmíntica. Por outro lado, o SV modula a infecção pelo MB, fazendo com haja uma modificação na formação de granuloma no pulmão dos animais do grupo COIN no ponto 1 da infecção pelo MB, que poderia ser justificada pela diminuição de IL-4 nos animais do grupo COIN.

**Palavras-chaves:** *S. venezuelensis*. *M. bovis*. Moléculas co-estimulatórias. Imunomodulação. Infecção helmíntica. Tuberculose.

## ABSTRACT

A rising number of people have been contracting tuberculosis around the world even though a multitude of reports involving a modulation of the immune response to *Mycobacterium* have been published. The response to *Mycobacterium* is mainly mediated by Th1 lymphocytes through IFN-gamma production. Parasitic diseases account for a large proportion of human morbidity and mortality, considering the number of people affected by them and several pathologies associated to parasitic infection. Helminthic infections drive towards Th2 response which leads to IL-4, IL5 and IL-13 production. The present study evaluated the immune response of coinfecting animals or not with *Strongyloides venezuelensis* (SV) and *Mycobacterium bovis*-BCG (MB) on pulmonary cells collected from BALB/c mice at time points 1 (4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days post-immunization [dpi] by MB and SV, respectively) and 2 (7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> dpi by MB and SV, respectively). Animals were infected with 700 SV larvae subcutaneously, and 3 days after, 1x10<sup>6</sup> CFU of wild MB strain intravenously. The number of worms and eggs was counted as well as cytokine (IFN-gamma, IL-4 and IL-10) and chemokine (CCL2 and CCL5) assessments, and the MPO and EPO levels determination on pulmonary tissue from infected and/or coinfecting animals. In addition, PCR for MB detection, the histopathology and the expression of costimulatory molecules such as CD80, CD86, CD28, CTLA-4 and CD25 on pulmonary tissue were also assessed. The results pointed that MB led to increase SV parasite burden in coinfecting mice (COIN) at both time points analyzed. The PCR technique detected effectively MB. Moreover, elevated IFN-gamma and reduced IL-4 and EPO levels were detected on pulmonary tissue in the COIN group. In regard to CD80 molecule, there was an increased expression at time point 1 and diminished expression at time point 2. Also, higher amounts of IL-10 were found on pulmonary tissue in MB and COIN groups. The histopathological analysis revealed pulmonary granulomas with a number of neutrophils, macrophages and epithelial cells-like in the MB group as well as granulomas in an advanced stage with caseous necrosis in the COIN group. Based on these findings, it may be concluded that MB modulated the immune response to SV, leading coinfecting animals to be more susceptible to helminthic infection. On the other hand, SV modulated the MB infection by modifying the characteristics of the pulmonary granulomas in the COIN group at time point 1 probably due the reduced IL-4 production in this group.

Keywords: *S. venezuelensis*. *M. bovis*. Costimulatory molecules. Immunomodulation. Helminthic infection. Tuberculosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
AP	Aprotinina
ABTS	Ethylbenzothiazoline sulfonic acid
BSA	Albumina bovina
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
C	Animais do grupo Controle
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
COIN	Animais Co-infectados
CFU	Unidades formadoras de colônias
CTAB	Trimetil ammonium bromide
D.P.I	Dias após a infecção
EPO	Eoperoxidase
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HE	Hematoxilina - Eosina
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium Bromide
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 13
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase
MB	Animais infectados por <i>Mycobacterium bovis</i>
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido Nítrico
NK	Natural Killer
OPD	O-Phenylenediamine
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
NaEDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético de Sódio
PMSF	Metil Sulfonil Fluoride
PBST	Salina tamponada com fosfatos saponada (Tween)
PPD	Proteína Purificada Derivada
TLRs	Toll-like (receptores celulares)
TREG	Células T regulatórias
SDS	Sodium dodecil sulfato
SV	Animais infectados por <i>Strongyloides venezuelensis</i>
TMB	Tetrametilbenzidina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo vida de <i>S. venezuelensis</i> . Modificado de <a href="http://www.dpd.cdc.gov/dpdx">www.dpd.cdc.gov/dpdx</a> -----	04
Figura 2- Mecanismo de ativação T via interação das moléculas co-estimulatórias e imunomodulatórias presentes na superfície das APCs e dos linfócitos T -----	15
Figura 3- Protocolo de experimento da(s) infecção(ões) realizada(s) -----	20
Figura 4- Determinação da presença do <i>M. bovis</i> por PCR no Pulmão dos Animais Infectados -----	29
Figura 5- Níveis das Citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-10 (B) e IL-4 (C) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) -----	31
Figura 6- Níveis das Quimiocinas CCL2 (A) e CCL5 (B) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) -----	33
Figura 7- Níveis da mieloperoxidase (MPO) para a quantificação de neutrófilos (A) e da eoperoxidase (EPO) para a quantificação de eosinófilos (B) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) -----	35
Figura 8- Porcentagem de marcadores celulares nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) -	38
Figura 9- Histopatologia do pulmão no ponto 1 da infecção -----	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do número de ovos e vermes em camundongos infectados por <i>S. venezuelensis</i> -----	28
Tabela 2 - Porcentagens (%) e números (N <sup>o</sup> ) de células expressando marcadores de superfície -----	39

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1.1 - Características Gerais da Infecção por <i>Strongyloides venezuelensis</i></b>	<b>03</b>
<b>1.1.1 - Resposta Imune na Infecção na Infecção Helmíntica</b>	<b>05</b>
<b>1.2 - Características Gerais da Infecção por <i>Mycobacterium bovis</i></b>	<b>07</b>
<b>1.2.1 - Citocinas Envolvidas na Resposta Imune ao <i>Mycobacterium</i></b>	<b>09</b>
<b>1.3 - Características Gerais das co-infecções entre Helmintos e Bactérias</b>	<b>11</b>
<b>1.4 - Participação das Moléculas Co-estimulatórias/Imnumodulatórias nas Infecções por diferentes patógenos</b>	<b>12</b>
<b>2 - OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1 - Objetivos Gerais</b>	<b>18</b>
<b>2.2 - Objetivos Específicos</b>	<b>18</b>
<b>3 - METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
<b>3.1 - Animais</b>	<b>19</b>
<b>3.2 - Infecções por <i>Strongyloides venezuelensis</i></b>	<b>19</b>
<b>3.3 - Infecção por <i>Mycobacterium bovis</i></b>	<b>20</b>
<b>3.4 - Co-infecção</b>	<b>20</b>
<b>3.5 - Contagem de Ovos e Vermes</b>	<b>23</b>
<b>3.6 - Extração de DNA para PCR de Pulmão para a detecção de <i>M. bovis</i></b>	<b>23</b>
<b>3.7 - PCR para a detecção de <i>M. bovis</i> no Tecido Pulmonar</b>	<b>24</b>
<b>3.8 - Obtenção de Sobrenadante de Macerado de Pulmão</b>	<b>24</b>
<b>3.9 - Dosagem de Citocinas e Quimiocinas por ELISA</b>	<b>24</b>
<b>3.10 - Determinação da Mieloperoxidase (MPO)</b>	<b>24</b>
<b>3.11 - Ensaio de Eoperoxidase (EPO)</b>	<b>27</b>
<b>3.12 - Citometria de Fluxo</b>	<b>27</b>
<b>3.13 - Avaliação Histopatológica</b>	<b>28</b>
<b>3.14 - Análise Estatística</b>	<b>28</b>

<b>4 - RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1 - Cinética da Infecção por <i>Strongyloides. Venezuelensis</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.2 - Determinação da presença do <i>M. bovis</i> por PCR no Pulmão dos Animais Co- infectados</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3 - Níveis de Citocinas presentes no Pulmão de Camundongos BALB/c Infectados ou não por <i>S. venezuelensis</i> e/ou <i>M. bovis</i></b> .....	<b>33</b>
<b>4.4 - Níveis de Quimiocinas (CCL2 e CCL5) no Pulmão de Camundongos BALB/c Infectados ou não por <i>S. venezuelensis</i> e/ou <i>M. bovis</i></b> .....	<b>34</b>
<b>4.5 - Níveis de MPO e EPO no Pumão de Camundongos BALB/c Infectados ou não por <i>S. venezuelensis</i> e/ou <i>M. bovis</i></b> .....	<b>35</b>
<b>4.6 - Expressão de Moléculas Co-estimulatórias e Regulatórias em Células do Pulmão Camundongos BALB/c Infectados ou não por <i>S. venezuelensis</i> e/ou <i>M. bovis</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.7 - Histopatologia do Pulmão no primeiro ponto da Infecção</b> .....	<b>40</b>
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6 - CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## 1- INTRODUÇÃO

A tuberculose, causada por bacilos intracelulares *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, é uma das doenças infecto-contagiosas mais importantes, sendo responsável por aproximadamente 2 milhões de óbitos e 9 milhões de novos casos por ano no mundo. É uma doença que normalmente evolui para a forma crônica progressiva, com comprometimento, principalmente dos pulmões. (KOCHI, 1991; CARVALHO, 1994; KAUFMANN & LADEL, 1994; WHO, 2007). A tuberculose causada por *M. bovis* é clinicamente indistinguível da tuberculose causada por *M. tuberculosis* (USABIAGA, 2001). É também uma das várias doenças causadas por patógenos intracelulares, onde o limite entre proteção e doença está diretamente relacionado com o grau de imunidade mediado por células, isto é, por macrófagos, através da produção de TNF- $\gamma$ , IL-12 e óxido nítrico (NO) e linfócitos Th1, através da produção de IFN- $\gamma$  (PEARLMAN *et al.*, 1993; LIENHARDT *et al.*, 2002). Países como China, Indonésia, Bangladesh e Paquistão contribuem com mais da metade de casos novos no mundo. Sendo que no Brasil, o número de casos novos está próximo dos 100.000/ano (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

As parasitoses intestinais também 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). Essas parasitoses intestinais, especialmente, aquelas provocadas por helmintos, tendem a se tornarem crônicas (ONAH & NAWA, 2000). A cronicidade dessas infecções pode estar relacionada com a fragilidade da imunidade natural e a capacidade desses parasitos em resistir aos processos de eliminação dos vermes (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 & NAWA, 2000; NEGRÃO-CORRÊA, 2001; GAUSE *et al.*, 2003). Dentre as infecções humanas provocadas por helmintos, as espécies mais prevalentes são *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 & HOLLAND, 2000; NEGRÃO-CORRÊA & TEIXEIRA, 2006). *Strongyloides stercoralis*, outro nematódeo com alta capacidade de infectar seres humanos, atinge entre 30 e 100 milhões de pessoas em 70 países, (SIDDIQUI & BERK, 2003; NEGRÃO-CORRÊA & TEIXEIRA, 2006). Estima-se que um quarto da população mundial apresenta infecções causadas por espécies de nematódeos gastrointestinais, sendo que essas infecções helmínticas 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 *et al.*, 2003). Crianças com infecções helmínticas apresentam um quadro de anemia, acompanhado de baixo crescimento e atraso no desenvolvimento cognitivo (COOPER & BRUNDY, 1988 **apud** ONAH & NAWA, 2000). Além de parasitar seres humanos, os helmintos podem parasitar outros animais, como por exemplo, os bovinos e os suínos provocando grandes perdas econômicas. Calcula-se que 1, 7 bilhões sejam gastos anualmente no controle destas parasitoses em animais (LAWRENCE, 2003).

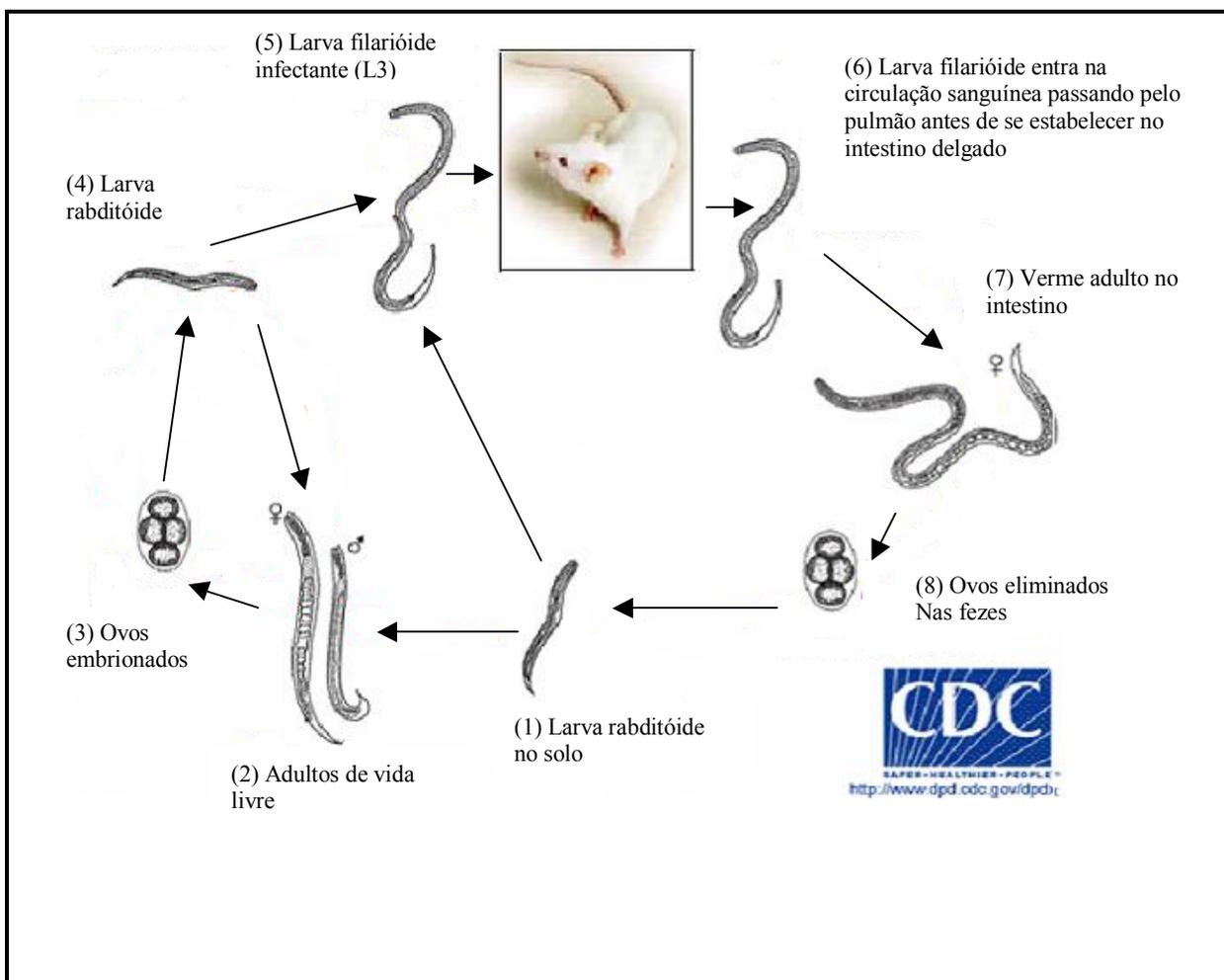
Apesar da alta prevalência e morbidade crônica produzidas pelos nematódeos, os mecanismos envolvidos na imunopatologia e na imunoproteção contra parasitos, ainda não estão completamente esclarecidos (LAWRENCE, 2003). As infecções helmínticas têm como características marcantes, a capacidade de persistência do parasito no hospedeiro e o ciclo de vida complexo, de modo que as interpretações das interações parasito-hospedeiro tornam-se bastante complicadas (MAIZELS *et al.*, 1993 **apud** ENOBE, 2005). Atualmente alguns trabalhos vêm demonstrando a modulação da resposta Th1/Th2 em modelos de co-infecção de helmintos e microrganismos intracelulares, como no caso o "*Mycobacterium*" (FERREIRA *et*

al, 2002; ELIAS *et al.*, 2006; RESENDE *et al.*, 2006; TALAAT *et al.*, 2006). Foi demonstrado que indivíduos que tomaram a 2ª dose da vacina BCG e apresentavam infecções helmínticas produziram menos IFN- $\gamma$ , que indivíduos sem infecção helmíntica, isto é diminuição da resposta protetora para a infecção pelo “*Mycobacterium*”. Portanto, foi sugerido que o aumento da incidência da tuberculose e a alta prevalência de parasitoses intestinais nos países subdesenvolvidos possam ser explicados pela imunorregulação que acontece entre os dois tipos de resposta imune (FERREIRA *et al.*, 2002). Por outro lado, é sugerido que a vacinação com o BCG pode diminuir a incidência, prevalência e a intensidade da infecção pelo *Necator americanus* (BARRETO *et al.*, 2000) em humanos, assim como induzir parcial proteção em ratos infectados com o *Schistosoma mansoni* (SOULSBY, 1987; ELIAS *et al.*, 2005a).

### **1.1 Características Gerais da Infecção por *S. venezuelensis***

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 helminto *S. venezuelensis* (MARUYAMA *et al.*, 2000; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004). Esse helminto possui ciclo de vida bem parecido com *Strongyloides stercoralis*, um nematódeo que parasita o ser humano, podendo provocar a morte de indivíduos imunocomprometidos (GILL *et al.*, 2004). *Strongyloides venezuelensis* (BRUMPT, 1934) é um nematódeo encontrado em diferentes partes do mundo, parasitando diversos roedores como, por exemplo, ratos, camundongos e hamster, 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 *et al.*, 2002; MATSUDA *et al.* 2003).

Na infecção experimental em camundongos, as larvas de *S. venezuelensis* penetram através da pele, alcançando o pulmão em 48 horas, seguindo pelas vias aéreas superiores, sendo posteriormente deglutidas para se fixarem na mucosa duodenal após 5 dias, onde atingem a idade adulta e são espontaneamente eliminados após um período de 10 a 14 dias da infecção (Figura 1).



**Figura 1**-Ciclo vida de *S. venezuelensis*. Modificado de [www.dpdf.cdc.gov/dpdf](http://www.dpdf.cdc.gov/dpdf).

Em ratos a eliminação do verme adulto é um pouco mais demorada, acontecendo após 5 semanas da infecção pela via subcutânea (TAKAMURE, 1995; NEGRÃO-CORRÊA *et al*, 2004). Matsuda e colaboradores (2003) estudaram a migração do *S. venezuelensis* em ratos e

notaram que este parasito aparece em vários órgãos internos, incluindo o fígado, sangue que circula no coração, pulmão e intestino delgado. Estes autores detectaram que as larvas deste parasito, inoculadas por via oral no estômago aparecem no fígado vinte minutos após a infecção. No coração, essas larvas foram observadas após quarenta e cinco minutos da infecção; no pulmão essas larvas puderam ser vistas após 3 horas da infecção; na traquéia foram observadas em um período de 3 a 72 horas depois da infecção; no intestino delgado, apareceram após cento e vinte horas da infecção. Takamura (1995) também estudou a rota migratória do *S. venezuelensis* em ratos Wistar. Neste estudo, os animais foram infectados pela via subcutânea, observando que suas larvas apareceram no pulmão após quarenta e cinco horas da infecção e no intestino, após sessenta horas da infecção.

A infecção experimental de roedores com o *S. venezuelensis* tem sido amplamente utilizada para avaliar os inúmeros aspectos de imunoproteção e imunorregulação das infecções gastrointestinais induzidas por helmintos. As larvas deste parasito são inoculadas pela via subcutânea, em seguida, migram para o pulmão, antes de se estabelecerem no intestino delgado. Nesta rota migratória essas 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). Segundo El-Malky e colaboradores (2003), eosinófilos podem infiltrar dentro da camada do intestino delgado do hospedeiro e atacar o *S. venezuelensis* na fase adulta, podendo ainda, serem efetores contra as infecções crônicas provocadas por nematódeos. A expulsão do *S. venezuelensis* do intestino também é acompanhada por eosinofilia, mastocitose, aumento do número e produção de células caliciformes na mucosa intestinal e a predominância das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (KHAN *et al.*, 1993; CARA *et al.*, 2000; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Resposta Imunológica na Infecção Helmíntica

Os linfócitos T CD4 são divididos em dois grupos, Th1 e Th2, que participam no controle das diversas infecções que podem afetar o organismo dos seres vivos. Para que haja ativação e diferenciação de células T, 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). Além disso, é necessário que haja interação entre moléculas co-estimulatórias presentes na superfície de células APCs e da produção de citocinas por essas células (BLUESTONE, 2006). Na presença dos antígenos protéicos, as células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, macrófagos, neutrófilos ou linfócitos B, são capazes de endocitá-los e convertê-los em peptídeos, que serão apresentados na superfície celular juntamente com as proteínas do MHC. As moléculas de MHC associadas aos 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. Os linfócitos T produzirão citocinas, que estimularão o desenvolvimento de padrões de respostas imunológicas diferentes. Antígenos de natureza intracelular, como vírus e micobactérias, normalmente estimulam a diferenciação dos linfócitos Th0 em linfócitos Th1, com produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e de substâncias derivadas do oxigênio, como o óxido nítrico (NO), levando ao desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo celular (KAUFMAN 1999, NORTH & 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 (STEVENS *et al.* 1988; SILVEIRA *et al.*, 2002; LAWRENCE, 2003).

Assim, a resistência às infecções por nematódeos intestinais está associada ao padrão de resposta imune Th2, enquanto a resposta Th1 se associa à susceptibilidade à infecção. Na infecção helmíntica de *Trichuris trichiura* em camundongos, o bloqueio da resposta Th2 com

anti-IL-4 ou com IL-12, promove a cronicidade da infecção, enquanto que a administração de IL-4 induz a expulsão do parasito. A infecção experimental com *T. muris*, também relacionou a resistência à infecção com padrão de resposta imune Th2 e a suscetibilidade com a resposta Th1 (HELMBY *et al.* 2001; LAWRENCE, 2003; LITTLE *et al.*, 2005). As infecções helmínticas induzem elevação de imunoglobulinas IgG1 e IgE, eosinofilia, mastocitose intestinal e hiperplasia celular em camundongos. Estas respostas são controladas pelas seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-13, IL-3 e IL-10 (FINKELMAN *et al.*, 1997; NEGRÃO-CORRÊA, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002; LAWRENCE, 2003).

## **1.2 Características Gerais da Infecção com *Mycobacterium bovis***

*M. bovis* é um bacilo microaerófilo, desprovido de motilidade, esporos ou cápsulas (MOTA *et al.*, 1992). Este microorganismo pode sobreviver fora de um hospedeiro animal, no meio ambiente, por longos períodos de tempo (acima de 2 anos) sob condições favoráveis (MORRIS *et al.*, 1994; DUMARS *et al.*, 1995). *M. bovis* é o agente responsável pela tuberculose bovina, porém, quando transmitida à espécie humana torna-se muito virulenta, principalmente em pessoas com imunodeficiência (BENENSON, 1992), sendo tão patogênico para o homem quanto o *M.tuberculosis*, determinando as mesmas formas clínicas e lesões patológicas (MOTA *et al.*, 1992; DABORN *et al.*, 1993). A transmissão dessa 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). Além da disseminação pela respiração, o bacilo pode ser eliminado pelo corrimento nasal, leite, fezes, urina, secreção vaginal e uterina e também pelo sêmen (RUGGIERO *et al.*, 2007).

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).

A vacina BCG foi desenvolvida entre 1906 e 1919, por Albert Calmette e Camille Guerin no Instituto Pasteur (Paris). Os pesquisadores obtiveram a cepa atenuada de *M. bovis* original após 13 anos de repicagens sucessivas em meios de cultura, realizadas a cada três semanas, perfazendo o total de 231 passagens. A partir de 1921, a vacina produzida com *M. bovis* atenuado passou a ser utilizada em humanos recebendo o nome de BCG-Bacilo Calmette Guerin- (KARONGA, 1996; GRANGE *et al.*, 1983 **apud** BARRETO *et al.*, 2006). Apesar do

nome idêntico, as vacinas BCG utilizadas mundialmente correspondem a outras cepas cultivadas ao longo dos anos em diferentes laboratórios no mundo. Embora, genotipicamente similares ao *M. bovis*, elas diferem entre si por características genóticas e fenóticas, com distintas expressões em relação à viabilidade, imunogenicidade, reatogenicidade e virulência residual. O número de partículas cultiváveis por dose, por exemplo, varia entre 37.500 a 500.000 na apresentação referente à subcepa Pasteur e entre 200.000 a 3.200.000 na subcepa Copenhague. (STARKE & CONNELLY, 2004). Mesmo não sendo a vacina ideal, o BCG tem um papel importante para o controle, principalmente em locais com alta carga de tuberculose (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os eventos relacionados à resposta inata do hospedeiro iniciam-se com a chegada do *M. tuberculosis* no pulmão, onde macrófagos e células dendríticas rapidamente são invadidos pelo *Mycobacterium*, sendo que o receptor para quimiocina (CCR2) tem um importante papel no recrutamento destas células para o pulmão infectado (OLLEROS *et al.*, 2005; SALGAME, 2005). No que se refere à resposta imune inata, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao sítio da infecção e multiplicação do bacilo, acompanhadas das células natural killer (NK) e macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Apesar dos mecanismos de resposta imune inata contra as micobactérias não estarem totalmente esclarecidos, os receptores celulares do tipo “Toll-like” (TLRs) são importantes no reconhecimento dos antígenos do *Mycobacterium* e na ativação de macrófagos e células dendríticas. 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 suscetibilidade a infecção com o *M. tuberculosis*. Apesar destes animais terem morrido rapidamente em consequência da infecção, eles 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). Os macrófagos e células dendríticas uma vez infectados pelo *M. tuberculosis* produzem altas concentrações de TNF-alfa e IL-12 (HENDERSON *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999).

### 1.2.1 Citocinas envolvidas na Resposta Imunológica a *Mycobacterium*

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 imune a esses patógenos (NORTH & JUNG, 2004). Tem sido demonstrado 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- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  promovem a produção da iNOS-2 que é responsável pelos 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- $\gamma$  em células NK e a expansão de células do perfil Th1 antígeno específica. Essas células Th1 são fontes de IL-2 e de IFN- $\gamma$  na resposta imune adquirida, sendo recrutadas para o controle de infecção na fase crônica, uma vez que são capazes de atuarem sobre células T e macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, se por um lado o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  e IL-12 têm sido associadas com infecções disseminadas por micobactérias do ambiente e *M. bovis*-BCG (SALGAME, 2005) e que crianças com deficiência nos índices dessas citocinas são mais susceptíveis a infecções micobacterianas (TALAAT *et al.*, 2006). Apesar do perfil de citocinas Th1 ser caracterizado na infecção por micobactérias, as citocinas IL-4, IL-10 são outros marcadores de ativação de linfócitos Th2 podem ser identificados em pacientes com tuberculose (JUNG *et al.*, 2002). Portanto, acredita-se que a resposta imune observada na infecção pelo *M. tuberculosis* não

possa ser interpretada apenas levando-se em conta a regulação dos subtipos de linfócitos LTh1 e LTh2.

Apesar dos grandes avanços nos estudos da resposta imune contra a tuberculose, os mecanismos envolvidos na doença ativa ainda permanecem obscuros. A resposta imune na tuberculose é na maioria das vezes caracterizada por uma imunossupressão ativa, particularmente na doença severa, observando-se diminuição de IL-2 e IFN- $\gamma$ , além de anergia específica para o PPD (Proteína Purificada Derivada) (GOLDFELD, 2004; DELGADO *et al*, 2002) sendo também observado um aumento de IL-10 (GOLDFELD, 2004) e de TGF- $\beta$  (GREEN *et al*, 2003) e de IL-4 (MAERTEN, 2005).

### **1.3 Características Gerais das Co-infecções entre Helmintos e Bactérias**

Co-infecção refere-se a uma situação em que um mesmo hospedeiro abriga dois ou mais agentes infecciosos simultaneamente (COX, 2001; SOBOSLAY *et al.*, 2005). As co-infecções com *M. tuberculosis* são freqüentes em várias partes do mundo (RESENDE *et al*, 2006). Essas infecções provocadas por micobactérias, são preferencialmente controladas pela resposta imune do perfil Th1 (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; LAWRENCE, 2003; ELIAS *et al*, 2005b). Já as infecções helmínticas, induzem predominantemente uma resposta imune do perfil Th2, que pode regular negativamente e ainda, prejudicar a resposta a vacinação de infecções que são controladas pela resposta imune do perfil Th1 (COX, 2001). Então, infecções parasitárias intestinais podem modular a resposta Th1 induzida pela revacinação com o BCG. O perfil das citocinas produzidas pelas células dos indivíduos vacinados, sem infecções helmínticas, mostrou um aumento da produção de IFN- $\gamma$  quando comparado com o grupo infectado/vacinado. Assim como na produção de IL-10 em indivíduos com parasitoses intestinais. O tratamento anti-helmíntico foi capaz de aumentar a eficácia da vacina BCG, o

que poderia causar um grande impacto nos países tropicais e subtropicais, onde a tuberculose e as parasitoses intestinais representam um grave problema de saúde pública (FERREIRA *et al*, 2002). O aumento da incidência da tuberculose nesses países coincide com a alta prevalência de parasitoses intestinais, as quais podem desempenhar um efeito modulador sobre o curso de infecções causadas por micobactérias (FERREIRA *et al*, 2002). No entanto, é sugerido que a vacinação com o BCG pode diminuir a incidência, prevalência e a intensidade da infecção pelo *Necator americanus* em humanos (BARRETO *et al*, 2000), assim como induzir parcial proteção em ratos infectados com o *Schistosoma mansoni* (SOULSBY, 1987; ELIAS *et al*, 2005a). Co-infecções com protozoários, helmintos, vírus e bactéria provocam grandes impactos sobre o desenvolvimento, expressão e eficácia da imunidade do hospedeiro (SOBOSLAY *et al*, 2005).

Desse modo, a utilização de novos modelos experimentais que envolvam co-infecções é fundamental para o entendimento dos mecanismos de resposta imune envolvidos no controle e prevenção dessas infecções que afetam a população humana e provocam uma série de danos e prejuízos. Neste contexto, o presente estudo, foi o primeiro a investigar os mecanismos imunológicos locais (pulmão) envolvidos na co-infecção de camundongos BALB/c por *S. venezuelensis* e *M. bovis*, uma vez que ambos os patógenos apresentam um ciclo pulmonar.

#### **1.4 Participação das Moléculas Co-estimulatórias/ Imunomodulatórias nas Infecções por diferentes Patógenos**

Há muitos estudos que apontam à importância das moléculas co-estimulatórias nas mais variadas infecções por patógenos. A ativação e diferenciação de células T dependem de dois sinais. Primeiramente, é necessário que haja o contato entre as Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) e as T com o reconhecimento do complexo peptídeo MHC. O segundo sinal necessita da interação de moléculas co-estimulatórias nas superfícies de células APCs e

da produção de citocinas por essas células (BLUESTONE, 2006). As moléculas co-estimulatórias, como CD28, presentes na superfície de linfócitos T, interagem com as co-estimulatórias B7 (B7-1, B7-2), expressas sobre APCs profissionais e participam da diferenciação e da amplificação da resposta imune, Th-1 e Th-2 (GREENWALD *et al.*, 1999; SOOS *et al.*, 1999). A presença das moléculas co-estimulatórias, B7 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 (B7-1) e CD86 (B7-2) 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, para evitar a anergia clonal (Figura 2). 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; EKKENS *et al.*, 2002). Essas moléculas B7 também podem se ligar à molécula CTLA-4, 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).

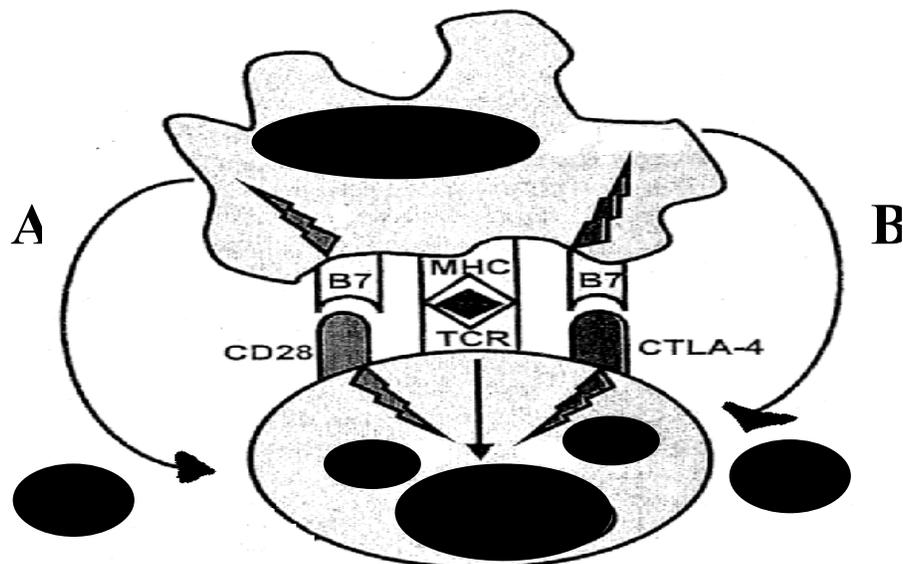
A molécula CTLA-4<sup>+</sup> é expressa em altos níveis sobre superfícies de células T após 48-72 horas de ativação destas células (Figura 2), funcionando também como receptora para moléculas B7-1 e B7-2 (LU *et al.*, 1999). Acredita-se que a CTLA-4 atua na inibição da produção de IL-2 e na progressão do ciclo celular, podendo ainda, mediar a apoptose induzidas por antígenos específicos, e dependendo do nível de sua expressão e da intensidade da sinalização do TCR, pode alterar o perfil da resposta imune. O bloqueio de CTLA-4 ligante pode resultar em um aumento da secreção de citocinas Th2 CD4. Além de contribuir para a regulação negativa para antígenos específicos, esta molécula pode alterar também, o balanço de Th1 e Th2 (STEEL & NUTMAN, 2003). O papel de CTLA-4<sup>+</sup> em infecções parasitárias tem sido estudado em modelos murinos (MCCOY *et al.*, 1997). 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 microfilarial e no contato do parasito com o antígeno (MCCOY *et al.*, 1997; STEEL & NUTMAN, 2003).

Na infecção experimental com o nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, a resposta imune 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<sup>+</sup> com o anticorpo monoclonal (mab) anti CTLA-4, resultou na intensificação da resposta imune, 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 *et al.*, 1997). Outro modelo experimental utilizado para o estudo do papel da molécula CTLA-4<sup>+</sup> em infecções helmínticas é a infecção de camundongos com nematódeo *Helignossomoides polygyrus*. A resposta imune 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, influenciou nos níveis de IgE no soro (LU *et al.*, 1994). Um outro estudo experimental utilizando a molécula CTLA-4<sup>+</sup> na infecção por *Brugia malayi* foi observado que a expressão desta molécula induziu uma 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 (STEEL & NULTMAN, 2003).

Na infecção experimental de camundongos com o nematódeo *H. polygyrus*, as moléculas co-estimulatórias, tanto B7-1<sup>+</sup> quanto B7-2<sup>+</sup>, pode iniciar uma resposta Th2, porém, somente B7-2<sup>+</sup> é necessária na progressão desta resposta (GREENWALD *et al.*, 1999). Estudos usando B7-1/B7-2 mostram que interações B7 são necessárias para o desenvolvimento da resposta imune primária contra *Helignossomoides 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 B7 for interrompida no início da infecção deste parasito. Além disso, ressaltam a importância de estudos futuros para a determinação de mecanismos funcionais de B7-2<sup>+</sup> na resposta imune, incluindo o papel individual de CTLA-4<sup>+</sup> na regulação de células T efetoras na resposta Th2 (GREENWALD *et al.*, 1999; EKKENS,

2002). As moléculas co-estimulatórias atuam também nas infecções induzidas por micobactérias. A expressão das moléculas co-estimulatórias CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> na superfície de macrófagos e células dendríticas, é desencadeada pelo reconhecimento dos receptores “Toll-like” (TLRs) à moléculas específicas derivadas do *M. tuberculosis* (KRUTZIK, 2004).



**Figura 2:** Mecanismo de ativação T via interação das moléculas coestimulatórias/imunomodulatórias, presentes na superfície das APCs e dos linfócitos T. **A:** representa a interação das moléculas CD28, presente na superfície do linfócito T e B7(CD80 ou CD86), presente na superfície da APC, com sinal (+) e conseqüente ativação do linfócito T. **B:** representa a inibição da ativação do linfócito T pela interação de CTLA-4 às molécula B7(CD80 ou CD86), promovendo um sinal (-). Modificado de ALEGRE & FALLARINO, 2006.

A célula T regulatória CD25<sup>+</sup> também, tem um importante papel na imunopatologia de diversos patógenos (WALSH *et al.*, 2007). Na infecção experimental de *Schistosoma mansoni*, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> possuem um importante papel sendo fonte de IL-10, que previne o avanço desta parasitose em camundongos (SADLER *et al.*, 2003; HESSE *et al.*, 2004). Existe alguma evidência também, de que as células T regulatórias (TREG) desempenham um

importante papel na regulação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*, como já demonstrado para outras infecções (BELKAID & 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> durante a fase ativa da doença. Estes autores mostraram ainda que células TREGs se encontrem envolvendo os pulmões dos pacientes com tuberculose. GUYOT-REVOL e colaboradores (2006) mostraram também uma correlação direta na expressão do marcador CD25<sup>+</sup> e a expressão de RNAm de FoxP3 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com tuberculose. Neste trabalho foi observado um aumento de IFN- $\gamma$  *in vitro* quando as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram depletadas, além de mostrar que pacientes com a forma extrapulmonar da doença apresentam uma maior expressão de FoxP3 do que os pacientes com a forma pulmonar.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a resposta imune no pulmão de camundongos co-infectados em dois pontos da(s) infecção (ões) por *S. venezuelensis* e *M. bovis*.

### 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;
- Detectar por reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença do *M bovis* no pulmão dos animais infectados;
- Quantificar os níveis de citocinas do perfil Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4) em células de pulmão de camundongos BALB/c co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*;
- Quantificar os níveis das quimiocinas CCL2 e CCL5 em células de pulmão de camundongos BALB/c co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*;
- Avaliar o envolvimento de eosinófilos e neutrófilos em animais co-infectados através da quantificação de EPO e MPO em células de pulmão;
  - Analisar a expressão de moléculas imunomodulatórias (CD-80, CD-86, CD28, CD25 e CTLA-4), por citometria de fluxo em células do pulmão de camundongos BALB/c infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou com *M bovis*;
- Avaliar alterações histopatológicas em pulmões de animais infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou com *M bovis* por microscopia de luz.

### 3-METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados grupos de 4 a 5 camundongos da linhagem BALB/c, machos, 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 mantidos em gaiolas padrões e estante climatizada, tendo como forma de alimentação exclusivamente ração própria e água.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, protocolado pelo número 034/2006.

#### 3.2 Infecção com *S. venezuelensis*

Para verificar se os animais utilizados nos experimentos apresentavam alguma parasitose intestinal por helmintos, foi realizado em todos os indivíduos, o teste de “swab” anal (BELTRAN *et al*, 2005). Independente do resultado do teste, todos os animais foram tratados com anti-helmínticos, contra cestódeos e nematódeos, e após o período de eliminação residual dos anti-helmínticos (14 dias após a administração dos anti-helmínticos), os animais foram infectados com *S. venezuelensis*. *S. venezuelensis* utilizado nos experimentos foram isoladas

de *Rattus norvegicus* e mantidas no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais por meio de passagens em ratos Wistar, gentilmente cedidas para o presente estudo. Larvas filariformes (L3) foram obtidas de ratos infectados e cultivadas em carvão vegetal. As larvas foram cultivadas por 48-72 horas a 28° C e as formas infectantes coletadas, concentradas pela técnica de Baermam-Moraes, de acordo com Moraes (1948). Em seguida as larvas foram lavadas quatro vezes em salina tamponada com fosfato (PBS), contadas e ajustadas para a concentração de 7000 L3/ml de PBS para serem utilizadas na infecção dos animais. Os animais foram infectados através de injeção por via subcutânea na região peritoneal, com 700 larvas em um volume de 100µl de PBS.

### **3.3 Infecção com *M. bovis***

Os animais foram infectados por via intravenosa, no plexo oftálmico, com  $1 \times 10^6$  CFU (Unidades Formadoras de Colônia) de *M. bovis* virulento (ATCC19274) em 0,2 mL de PBS. A cepa selvagem de *M. bovis* utilizada nesse trabalho foi adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INQS-FIOCRUZ-RJ).

### **3.4 Co-infecção**

Três dias após infecção (d.p.i.) com *S. venezuelensis* por via subcutânea (Figura 3), os camundongos BALB/c foram co-infectados com o *M. bovis* por via intravenosa (grupo COIN). Após 7 e 10 de infecção com *S. venezuelensis* ou 4° e 7° após infecção com *M. bovis*, os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e os pulmões foram coletados para realização das análises. As análises foram realizadas nos tempos de infecção denominados como Ponto 1, correspondente aos 4° e 7°

d.p.i. por *M. bovis* e *S. venezuelensis*, respectivamente. Ponto 2, correspondente aos 7º e 10º d.p.i. por *M. bovis* e *S. venezuelensis*, respectivamente. Os pontos de análise da(s) infecção(ões) foram estabelecidos levando-se em conta o ciclo de vida do *S. venezuelensis*, o pico de postura de ovos (7 dias após a infecção) e o tempo de estabelecimento do *M. bovis* no pulmão.



### 3.5 Contagem de ovos e vermes

A constatação da infecção e a análise da infectividade foram feitas através da contagem de ovos nas fezes e de vermes retirados do intestino delgado nos dois pontos da infecção por *S. venezuelensis*. Para a coleta dos vermes os camundongos foram sacrificados e utilizados a metade superior do intestino delgado de cada um. Foi feito lavado e uma abertura longitudinal para exposição da mucosa intestinal, que foi incubada em PBS por 4 horas a 37°C. As formas emergentes do intestino foram quantificadas através de estereomicroscopia. O tecido intestinal foi deixado novamente sob incubação em PBS por 16 horas a 4°C e o número total de vermes foi determinado. Para a determinação de ovos as fezes foram coletadas individualmente do reto, pesadas e homogeneizadas em igual volume de PBS. Para cada animal, três amostras (100µl) fecais foram avaliadas por microscopia e o número total de ovos determinado e expresso por gramas de fezes/animal (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2003).

### 3.6 Extração de DNA para PCR de pulmão para a detecção do *M. bovis*

Para a obtenção do DNA, 100mg de tecido pulmonar foi macerado em 440µl de Tris EDTA (TE) e incubado a 80°C por 30 minutos em banho-maria. Após esta incubação, foi adicionado 50µl de lisozima na concentração de 10mg/mL e deixado em banho-maria a 37°C por 16 horas. Após esta etapa, foi adicionado 50µl de SDS a 10% e 10µl de proteinase K (10mg/mL), a suspensão foi homogeneizada e incubada novamente em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Em seguida adicionou-se 53µl de CTAB na concentração de 0,5 M, 13µl de NaCl (5M) e 44µl de água destilada. A suspensão foi homogeneizada e acrescida de mais 90µl de NaCl (5M) e incubou-se novamente em banho-maria por mais 10 minutos. Terminada esta

etapa, foi adicionado 750µl de clorofórmio e álcool isoamílico (2:1), agitou-se vigorosamente (vórtex, IKA<sup>®</sup>-Woks). A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 13000g para a separação da fase aquosa, contendo o DNA bacteriano. Um volume de 500µl da fase aquosa, contendo o DNA, foi retirada e o material genético precipitado com 50 µl de acetato de potássio 5M e 1,2 mL de etanol gelado. A mistura foi homogeneizada delicadamente e acondicionada em freezer (-20°C) por 20 minutos, seguido de centrifugação a 14000xg por 30 minutos a 4°C. Após a precipitação, descartou-se o sobrenadante e deixou o sedimento de DNA secar à temperatura ambiente por 10 minutos. O material precipitado foi utilizado como molde para as reações da cadeia da polimerase (PCR), na diluição de 1:10.

### **3.7 PCR para a detecção de *M. bovis* no tecido pulmonar**

Os ciclos objetivaram amplificar a região RD1, utilizando os iniciadores ET1: 5' - AAGCGTTGCCCGCCGACCGACC -3; ET2: 5'- CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG - 3' e ET3: 5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3' (Invitrogen Custom Primer; TALBOT *et al.*, 1997), que gerariam um produto de PCR de 150pb. A reação PCR foi realizada com 5µl de cada DNA para um volume total de 50µl do mix (10 mM de Tris-HCl com PH 8,3, 50 mM de KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de DNTP, 1,25 U de TAQDNA, 5pmol de iniciadores ET1 e ET3 e 25pmol de iniciador ET2 (Invitrogen Ltda Brasil ). As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo de 95°C/3 min, 40 ciclos de 94°/30segundos, 65°C/1 min para o anelamento e 72°C/10 min para a extensão final em termociclador (Apollo, ATC201, USA). Os produtos da amplificação do DNA foram separados no gel de poliacrilamida(6%) e os produtos visualizados após a coloração com Brometo de etídio em transluminador de luz ultravioleta e identificados usando a escala de 150pb. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Promega, USA).

### 3.8 Obtenção de sobrenadante de macerado de pulmão

Camundongos BALB/c infectados com *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis* foram sacrificados com dose letal de xilasina e quetamina por via intra-peritoneal e 100mg de pulmão de cada animal foram macerado em 1mL de tampão de lise (0,4 M de NaCl, 10 mM de NaPO<sub>4</sub>, 0,1 mM de metil sulfonil fluoride, 0,1mM cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 pM de aprotinina e 0,05% de Tween 20). Em seguida, o macerado de pulmão foi centrifugado a 3.000xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e utilizado na detecção de citocinas e quimiocinas por ELISA.

### 3.9 Dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA

Placas de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, incubadas 2 horas à temperatura ambiente e bloqueadas com PBS-Tween 20 (PBST) + 10% SFB, por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes em PBST e, em seguida, adicionadas as curvas padrões para as citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-5) e as quimiocinas (CCL2 e CCL5), diluídas na razão de 1:2. Nas fileiras seguintes as amostras de sobrenadantes de cultura foram distribuídas. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o 2º anticorpo biotilado foi adicionado e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais 4 lavagens foram feitas e colocado o conjugado enzimático que foi incubado por mais 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M, água destilada, cromógeno ABTS e água oxigenada 30%. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 410nm. As quantidades de

citocinas e quimiocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas e quimiocinas recombinantes.

### **3. 10 Determinação da Mieloperoxidase (MPO)**

O nível da peroxidase de neutrófilos, a mieloperoxidase (MPO), presente em amostras de pulmão, foi utilizado para estimar o envolvimento de neutrófilos na infecção de camundongos BALB/c por *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis*. Foi utilizado 100mg de pulmão em 1,9 ml do Tampão 1 (pH =7,4), constituído por: 0,1M de NaCl, 0,2M de Tampão fosfato com o pH 4,7), 0,015M de NaEDTA. Em seguida, a suspensão do homogenizado do pulmão foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1,5 ml de salina 0,2% e após 15 segundos acrescentou-se 1,5mL de salina 1,6% + glicose 0,5%. A suspensão foi novamente centrifugada a 10.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1,9ml para 100mg de tecido do Tampão 2 (pH= 5,4), constituído por: 0,05 M de Tampão fosfato, 0,5% de H-TAB, 1,6% NaCl + 0,5% de Glicose. O material foi armazenado em micro tubos e centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Após esse processo, foi adicionado 25µL das amostras (diluídas em concentração de 1:3) em uma placa de 96 poços, em duplicata. Em seguida, adicionou-se 25µl do substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) e incubou a 37°C por 5 minutos. Após 5 minutos, acrescentou-se 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%) e incubou a 37°C por mais 5 minutos. Finalmente, adicionou-se 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e procedeu-se a leitura no leitor de microplacas a 450nm.

### 3.11 Ensaio de Eoperoxidase(EPO)

O nível da peroxidase de eosinófilos, a eoperoxidase (EPO), presente em amostras de pulmão, foi utilizada para estimar o envolvimento de eosinófilos infecção por *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis*. Foi utilizado 100mg de pulmão homogeneizado em 1,9mL de PBS a 5%. Esta suspensão foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em salina 0,2%. Após 15 segundos foi adicionado salina a 1,6% + glicose a 5%, em um volume de 1,5mL de salina + glicose gelado para 100mg de tecido. O material foi novamente centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em PBS com HTAB (0,5%), em um volume de 1,9ml para cada 100mg de tecido. A suspensão foi homogeneizada e acondicionada em microtubos. Em seguida, foi adicionado 75µL de amostra em placa de 96 poços e em seguida, acrescentou-se 75µl de substrato (1,5mM, de em tampão Tris-HCL- 0.075mM, pH 8 acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6.6mM) e a solução ficou no escuro por aproximadamente 30 minutos. A reação foi interrompida com 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e procedeu-se a leitura no leitor de microplacas a 492 nm.

### 3.12 Citometria de Fluxo

Para a obtenção das células do tecido pulmonar, 100mg de pulmão foram divididos e colocados em tubos de 15mL contendo 5mL de RPMI e em seguida, foi adicionado 500µL da colagenase a 0,5% (Gibco) em salina balanceada de Hanks (HBSS), homogeneizado no vortex (IKA<sup>®</sup>-Woks). Após a incubação de 1 hora, a suspensão foi filtrada, centrifugada a 1.100g por 10 minutos e ressuspensionada em tampão de lise por 4 minutos. As células obtidas foram utilizadas para a marcação e análise por citometria de fluxo.

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 contra linfócitos T com tripla marcação (anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8) e com dupla marcação para avaliação de moléculas co-estimulatórias (anti-CD3/CD28, anti-CD3/CTLA-4) e molécula imunorregulatória (CD3/CD25).

Foi feita também dupla marcação para células APC (anti-CD11/ CD80 e anti-CD11/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 70µl de SFB, e então lavadas três vezes. As células foram ressuspensas em 1mL de paraformaldeído (1% em PBS) coletadas e analisadas em citômetro de fluxo - FACScalibur-BD software CellQuest<sup>R</sup> (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### **3.13 Avaliação Histopatológica**

Para avaliação histopatológica, fragmentos do pulmão dos animais dos grupos controle e infectados foram fixados em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. Após os procedimentos rotineiros para inclusão em parafina, foram realizados cortes de 5µm de espessura, semi-seriados, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus Bx51) e fotografadas na câmara digital (Coolsnap-pro-color) com magnificação de 400x.

### **3.14 Análise Estatística**

As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado também o teste paramétrico ANOVA e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4- RESULTADOS

### 4.1 Cinética da Infecção por *S. venezuelensis*

A tabela 1 expressa o número de ovos e vermes de *S. venezuelensis* coletados respectivamente nas fezes e intestino dos animais infectados. Em ambos os pontos da(s) infecção (ões). O número de ovos e vermes foi maior no grupo de animais co-infectados quando comparado ao grupo de animais infectados apenas com *S. venezuelensis* ( $P < 0,05$ ). Do ponto 1 para o ponto 2, ocorreu uma diminuição do número de ovos nas fezes, tanto nos animais infectados apenas com *S. venezuelensis* quanto no grupo de animais co-infectados. Porém o número de vermes aumentou do ponto 1 para o ponto 2 da(s) infecção (ões).

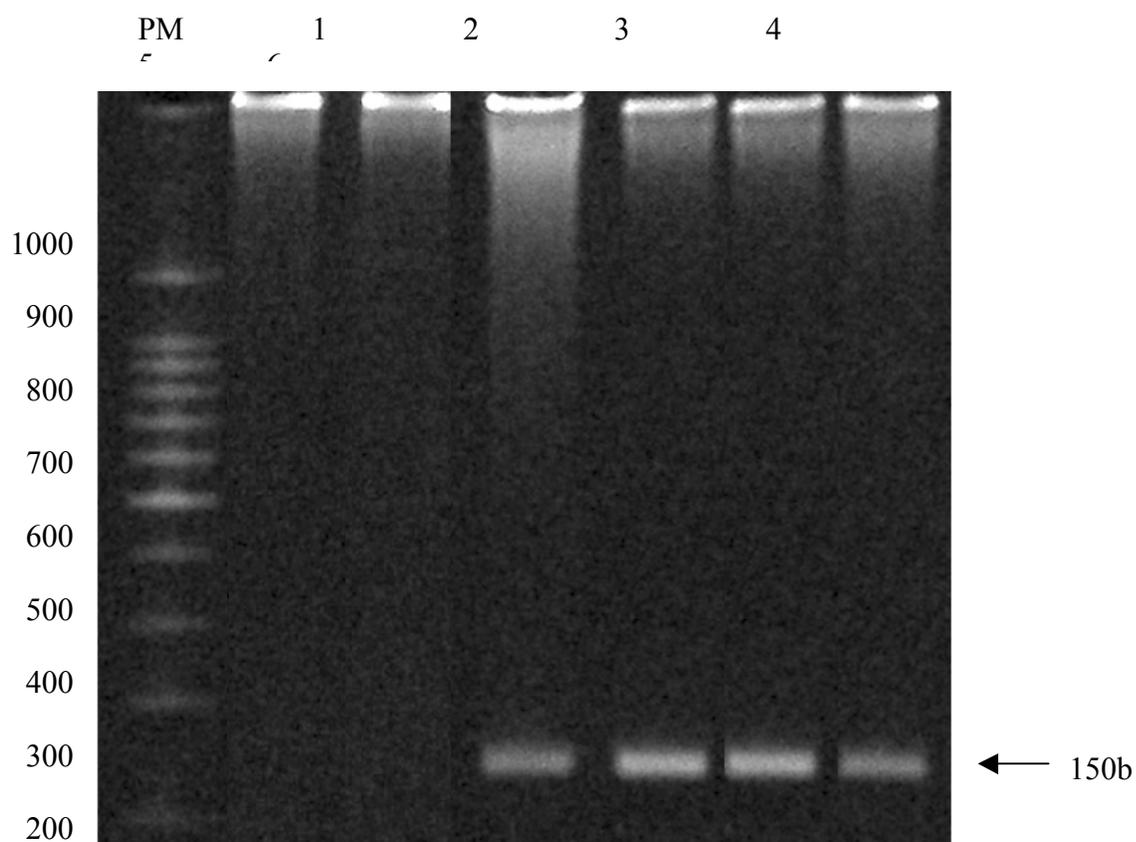
Tabela 1 – Determinação do número de ovos e vermes em camundongos infectados por *S. venezuelensis*

Grupos	Média do Número de ovos e vermes			
	Ovos/gramas de fezes		Vermes	
	1° ponto <sup>1</sup>	2° ponto <sup>2</sup>	1° ponto	2° ponto
SV <sup>3</sup>	35.944 ± 9,5 <sup>a</sup>	1.775 ± 5,6 <sup>b</sup>	141 ± 26 <sup>c</sup>	244 ± 48 <sup>d</sup>
COIN <sup>4</sup>	75.254 ± 7,3 <sup>a</sup>	9.733 ± 1,7 <sup>b</sup>	200 ± 55 <sup>c</sup>	351 ± 80 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>7° dia de infecção por *S. venezuelensis*, <sup>2</sup>10° dia de infecção por *S. venezuelensis*, <sup>3</sup>animais infectados por *S. venezuelensis*, <sup>4</sup>animais infectados por *S. venezuelensis* e *M. bovis*. As letras a, b, c e d representam a diferença estatística entre os grupos com p<0,05.

#### 4.2 Determinação da presença do *M. bovis* por PCR no Pulmão dos Animais Infectados

Através reação da cadeia da polimerase (PCR) foi possível detectar a presença do *M. bovis* no pulmão dos animais infectados (Figura 4). Nas canaletas 1 e 2, foram colocadas as amostras dos animais co-infectados e nas canaletas 3 e 4 amostras de animais infectados apenas com *M. bovis*. A presença do *M. bovis* foi observada na região denominada RD1 apresentando cerca de 150 pb.



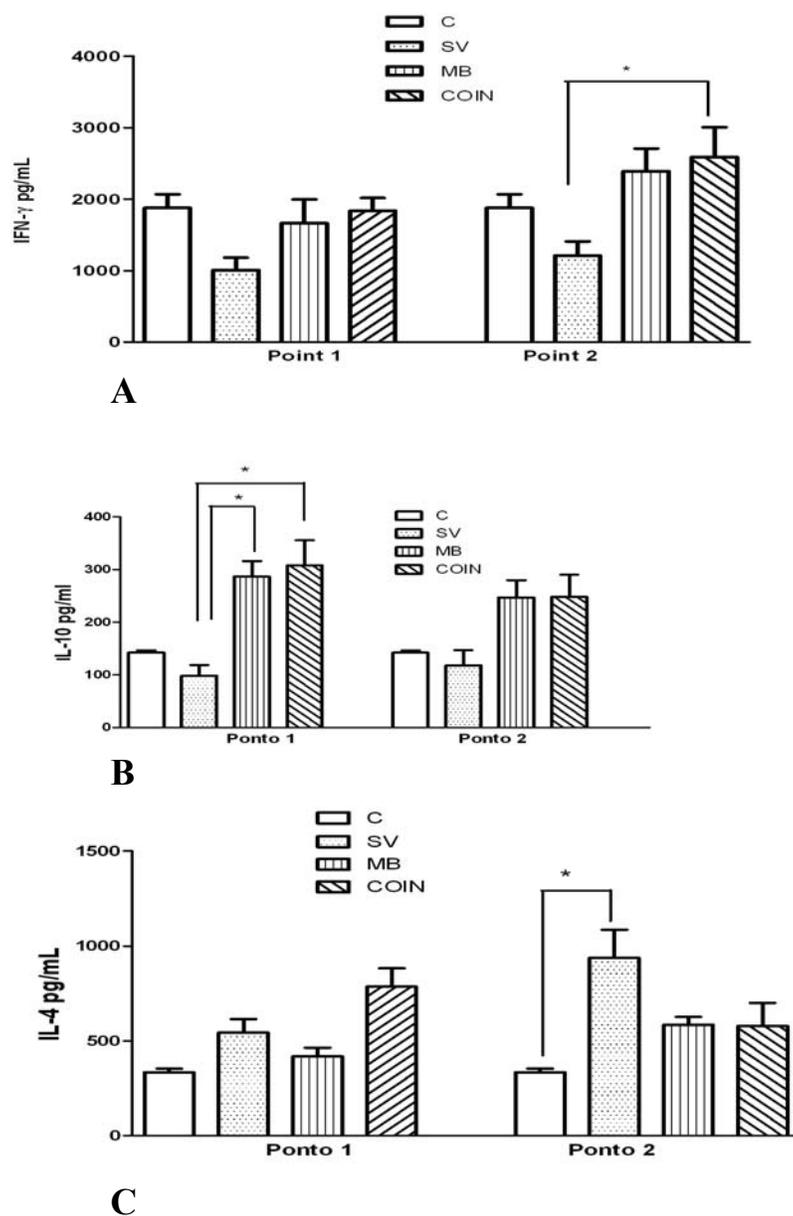
**Figura 4:** Padrão de PM 100bp. Aplicado 20ul de produto de PCR. Canaletas 1 e 2: Animais controles não infectados; 3 e 4: co-infectado com *S. venezuelensis* e *M. bovis*: 3 – extrato de DNA total da amostra de pulmão; 4 – diluição de 1:10 do extrato de DNA total. Canaletas 5 e 6: Animais infectados com *M. bovis*: 5 – extrato de DNA total da amostra de pulmão 6 – diluição de 1:10 do extrato de DNA total.

### **4.3 Níveis de Citocinas presentes no pulmão de Camundongos Balb/c infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis***

Foram avaliados os níveis de IFN- $\gamma$  IL-10, IL-4 e IL-5 em macerados do pulmão dos animais nos dois pontos da(s) infecção (ões). A Figura 5A mostra os valores de IFN- $\gamma$  que não houve diferenças significativas no ponto 1 das infecções, apresentando inclusive uma tendência de diminuição no grupo de animais infectados apenas com *S. venezuelensis*. Entretanto no ponto 2 houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$ , quando se compara o grupo COIN com o grupo SV. Observou-se também uma tendência de aumento entre os dois pontos da(s) infecção (ões) nos grupos MB e COIN.

Com relação à produção de IL-10 (Figura 5B) observa-se uma maior produção dessa citocina no ponto 1 da(s) infecção (ões) nos grupos MB e COIN, quando se compara com o grupo C e SV ( $P < 0,05$ ), sendo que o grupo COIN, foi maior do que o MB. Entretanto no ponto 2 da(s) infecção (ões), apesar do mesmo perfil de produção de IL-10, as diferenças não foram significativas. Comparando-se o ponto 1 com o ponto 2, observou-se uma tendência de diminuição nos níveis de IL-10 nos grupos MB e COIN.

Os níveis de IL-4 apresentados na Figura 5C, mostram uma tendência de aumento dessa citocina já a partir do ponto 1 de análise, nos grupos SV e COIN, sendo este aumento foi maior no grupo COIN. Entretanto no ponto 2 da(s) infecção (ões) houve um aumento significativo apenas no grupo SV ( $p < 0,05$ ) e uma menor produção no grupo COIN, quando comparado com o grupo SV.

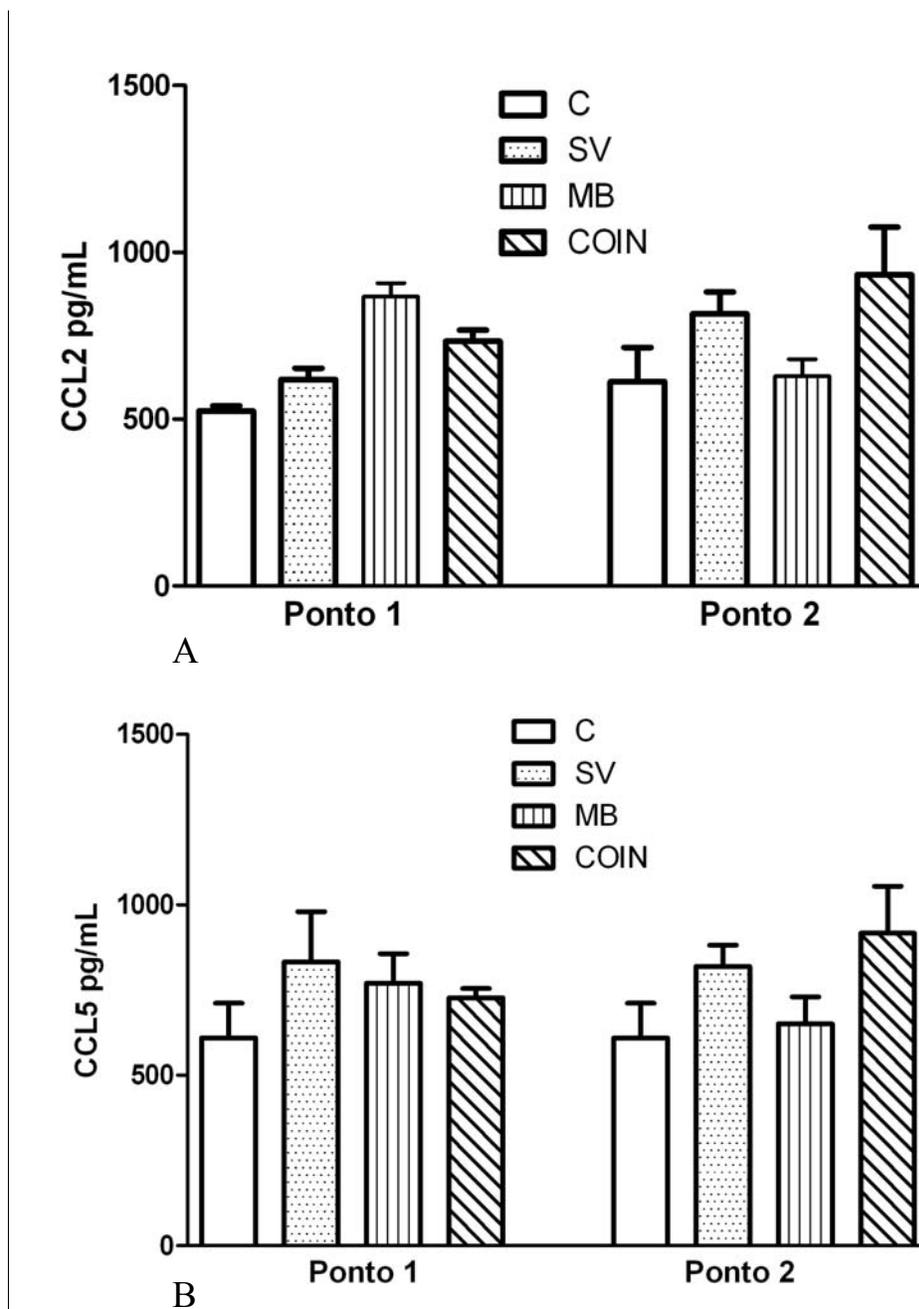


**Figura 5:** Níveis das Citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B) e IL-4 (C) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) com os seguintes grupos: C = animais não infectados; SV = animais infectados apenas com *S. venezuelensis*; MB = animais infectados apenas com *M. bovis*; COIN = animais co-infetados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*. \* Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 Níveis de Quimiocinas (CCL2 e CCL5) do Pulmão de Camundongos Balb/c infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis***

Analisando a produção das quimiocinas CCL2 e CCL5, observa-se que os níveis de CCL2 (Figura 6A) apresentaram uma tendência em aumentar em todos os grupos de animais infectados ou co-infectados, quando comparados ao grupo controle nos dois pontos da(s) infecção (ões), com exceção do grupo MB no ponto 2 da infecção. Entretanto nota-se uma tendência de aumento desta quimiocina do ponto 1 para o ponto 2 nos grupos SV e COIN e uma diminuição no grupo MB.

A análise da produção de CCL5 (Figura 6B) mostra uma tendência de aumento no grupo SV no ponto 1 da infecção, sendo que este aumento é mantido no grupo SV e aumenta quanto no grupo COIN no ponto 2 da(s) infecção (ões).

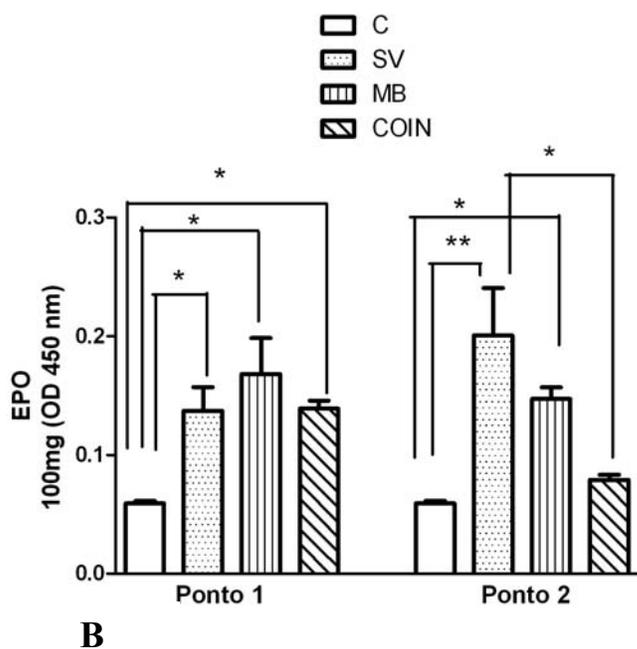
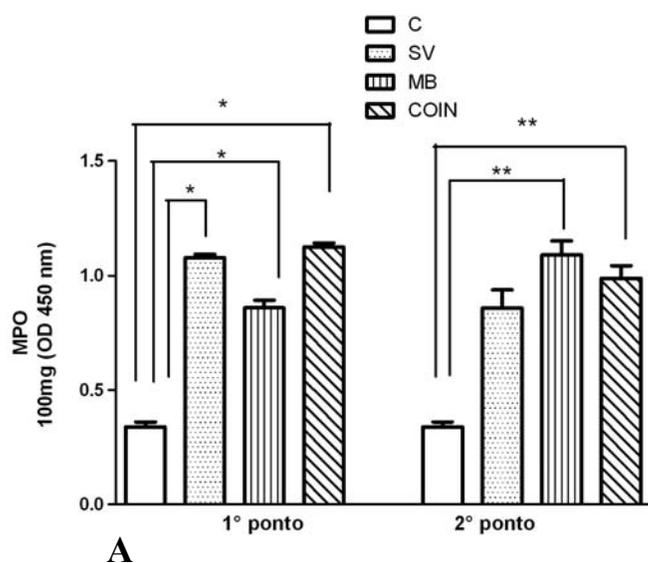


**Figura 6:** Níveis das Quimiocinas CCL2 (A) e CCL5 (B) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) com os seguintes: grupos: C = animais não infectados; SV = animais infectados apenas com *S. venezuelensis*; MB = animais infectados apenas com *M. bovis*; COIN = animais co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*.

#### **4.5 Níveis de MPO e EPO no Pulmão de Camundongos Balb/c infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis***

O envolvimento de neutrófilos foi avaliado através da quantificação MPO. A Figura 7A mostra que houve um aumento de MPO, quando se compara os grupos SV, MB e COIN com o grupo controle, tanto no ponto 1 quanto no ponto 2 da avaliação ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Entretanto não houve diferenças significativas entre os grupos SV, MB e COIN. Os resultados mostram também uma tendência de diminuição de MPO no grupo SV do ponto 1 para o ponto 2 da(s) infecção (ões) e um aumento no grupo MB quando se compara os dois pontos da(s) infecção (ões).

O envolvimento de eosinófilos foi avaliado através da quantificação de EPO. A Figura 7B, mostra que houve aumento de EPO, quando se compara os grupos SV, MB e COIN com o grupo controle, no ponto 1 da infecção ( $p < 0,05$ ). Neste mesmo ponto de infecção houve uma tendência em aumentar a quantidade de EPO nos animais infectados apenas com *M. bovis* em relação aos grupos SV e COIN. Do ponto 1 para o ponto 2 da(s) infecção (ões) o nível de EPO apresentou tendência em aumentar no grupo SV, porém nos animais infectados apenas com *M. bovis* e nos animais infectados ocorreu uma diminuição nos níveis de EPO. No ponto 2 da infecção também ocorreu maior produção de EPO nos animais dos grupos SV e MB quando comparados aos animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, ocorreu uma diminuição significativa nos animais do grupo COIN ( $p < 0,01$ ), quando comparados aos animais do grupo SV.



**Figura 7(A e B):** Níveis da mieloperoxidase (MPO) para a quantificação de neutrófilos (A) e da peroxidase (EPO) para a quantificação de eosinófilos (B) nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) com os seguintes grupos: C = animais não infectados; SV = animais infectados apenas com *S. venezuelensis*; MB = animais infectados apenas com *M. bovis*; COIN = animais co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*. \* Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* Representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

#### 4.6 Expressão de Moléculas Co-estimulatórias e Regulatórias em Células do Pulmão de Camundongos infectados ou não com *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis*

Foi avaliada a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> sobre células APC, isto é marcadas com anti-CD11 e de CD28 e CTLA-4 e da T expressando CD25<sup>+</sup> sobre células T, isto é marcadas também com anti-CD3 nos dois pontos da(s) infecção (ões). As figuras 8A e 8B apresentam as porcentagens da expressão de CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD28, CTLA-4 e CD25 nos dois pontos das infecções. Com relação à expressão de CD80<sup>+</sup> no ponto 1 observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão dessa molécula no grupo de animais COIN, quando comparado ao grupo SV. Já, os animais infectados apenas com *M. bovis*, isto é do grupo MB apresentaram uma tendência em aumentar a expressão dessa molécula em relação aos animais infectados apenas com *S. venezuelensis* (grupo SV), neste 1° ponto da (s) infecção (ções). Do ponto1 para o ponto 2 da (s) infecção (ções) ocorreu um aumento ( $p < 0,001$ ) na expressão de CD80<sup>+</sup>, no grupo SV e uma diminuição ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo MB. No entanto, no ponto 2, ocorreu uma diminuição ( $p < 0,001$ ) na expressão de CD80<sup>+</sup> nos grupos MB e COIN em relação ao grupo SV. A expressão de CD86<sup>+</sup> no ponto 1 foi marcada por um aumento que não foi significativo nos animais do grupo MB e COIN, quando comparados aos animais do grupo SV. No entanto, neste mesmo período de infecção, houve uma maior tendência na expressão dessa molécula nas células dos animais do grupo COIN do que nos animais do grupo MB. Do ponto1 para o ponto 2 da (s) infecção (ções) ocorreu um aumento também não significativo na expressão de CD86 nos animais infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) e co-infectados (COIN) e diminuição na expressão dessa molécula nas células de animais infectados apenas com *M. bovis* (MB). No ponto 2 da (s) infecção (ções) houve um aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão de CD86<sup>+</sup> nos grupos de animais SV e COIN em relação ao grupo controle. Neste mesmo ponto de infecção, a expressão dessa molécula foi menor nos animais infectados apenas com *M. bovis*, embora não tenha significativa (Figura 8).

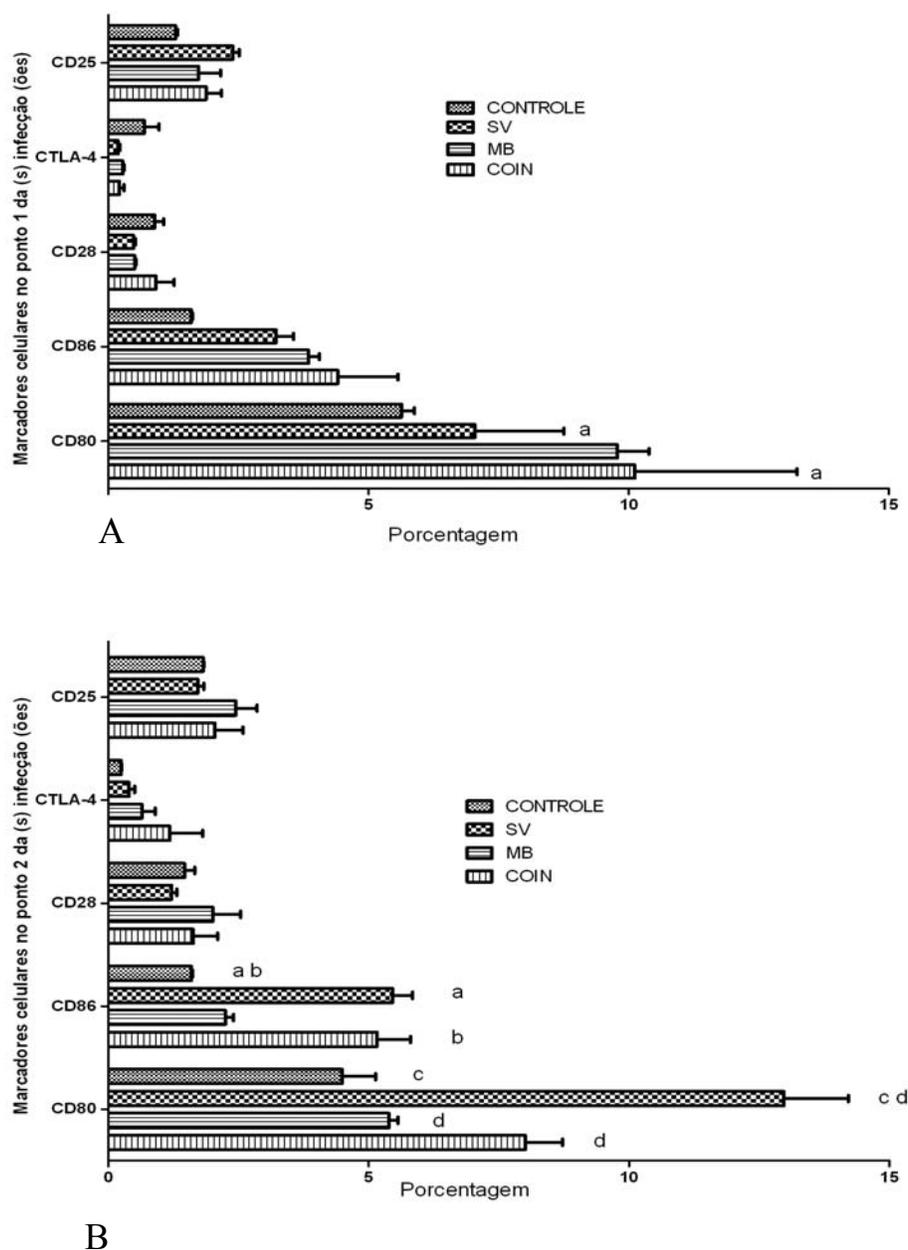
Os níveis da molécula co-estimulatória CD28<sup>+</sup> (Figura 8) expressos no ponto 1 foram baixos em todos os grupos, porém, neste ponto da infecção, houve uma tendência em aumentar o nível de expressão dessa molécula no grupo COIN. Do ponto 1 para o ponto 2, houve uma tendência no aumento da expressão de CD28<sup>+</sup> em todos os grupos, sendo que esta foi mais elevada nos animais infectados apenas com *M. bovis* (grupo MB).

Com relação à CTLA-4<sup>+</sup> no ponto 1, observou-se uma expressão mínima dessa molécula em todos os grupos de animais. Do ponto 1 para o ponto 2 da (s) infecção (ções), houve um aumento que não foi significativo, na expressão de CTLA-4<sup>+</sup> em todos os grupos de animais, sendo que este aumento foi mais elevado nos grupos MB e COIN, quando comparados aos animais do grupo SV. Porém, neste mesmo período de infecção, a expressão de CTLA-4<sup>+</sup> foi um pouco mais elevada no grupo COIN do que nos animais do grupo MB (Figura 8).

No que se refere à expressão de CD25<sup>+</sup> no ponto 1 da (s) infecção (ções), observou-se uma tendência mínima na maior expressão dessa molécula nos animais do grupo SV do que os animais dos grupos MB e COIN. Do ponto 1 para o ponto 2 da (s) infecção (ções), ocorreu um aumento na expressão de CD25<sup>+</sup> nos animais dos grupos MB e COIN, porém, esta expressão parece ter sido diminuída nos animais do grupo SV. Entretanto, os animais do grupo MB expressaram um pouco mais CD25<sup>+</sup> do que os animais do grupo COIN (Figura 8).

A Tabela 2 mostra também as porcentagens e o número total de células marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 nos dois pontos da (s) infecção (ções). Com relação à expressão de CD3<sup>+</sup>, observou-se um aumento de expressão no grupo MB, sendo que os demais grupos não houve alteração na expressão desta molécula. Do ponto 1 para o ponto 2 houve uma diminuição na expressão desta molécula, principalmente no grupo MB. A expressão de CD4<sup>+</sup> foi um pouco maior no grupo SV, sendo que do ponto 1 para o ponto 2 houve um aumento maior nos grupos MB e COIN. A expressão de CD8<sup>+</sup> no ponto 1 foi menor no grupo MB, não apresentando maiores alterações nos grupos na comparação com o ponto 2. A expressão de CD19<sup>+</sup> foi semelhante nos grupos C e SV, um pouco menor no grupo MB e

drasticamente menor no grupo COIN. Já no ponto 2 da (s) infecção (ões) a expressão de CD19<sup>+</sup> aumentou para os 4 grupos, não apresentando diferenças.



**Figura 8:** Porcentagem de marcadores celulares nos pontos 1 e 2 da (s) infecção (ões) com os seguintes grupos analisados: C = animais não infectados; SV = animais infectados apenas com *S. venezuelensis*; MB = animais infectados apenas com *M. bovis*; COIN = animais co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis*. As letras a e b representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e as letras c e d representam diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

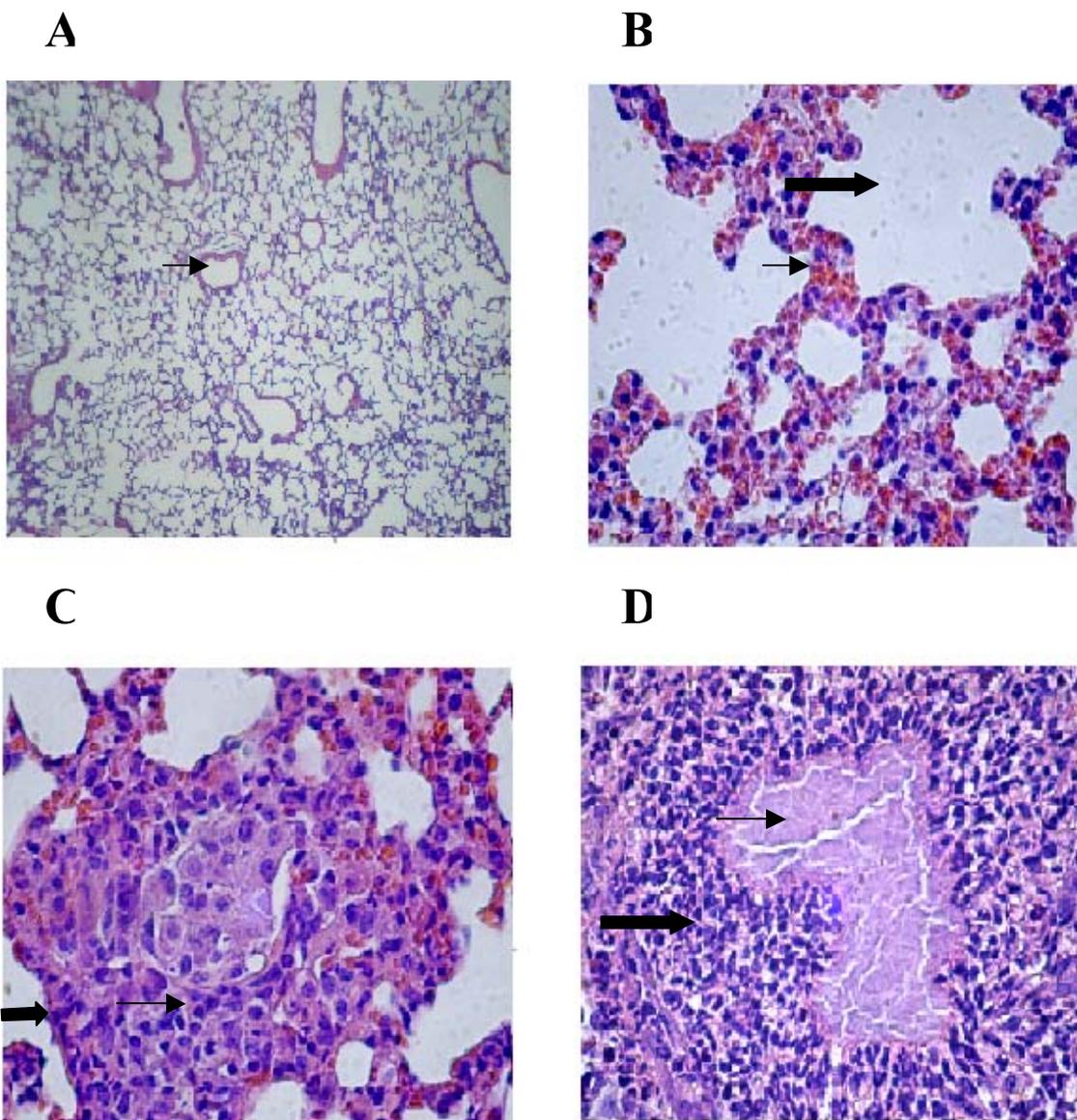
Tabela 2: Porcentagens (%) e números (N°) de células expressando marcadores de superfície

	1° Ponto da (s) infecção (ões)				2° Ponto da (s) infecção (ões)			
	C <sup>1</sup>	SV <sup>2</sup>	MB <sup>3</sup>	COIN <sup>4</sup>	C <sup>1</sup>	SV <sup>2</sup>	MB <sup>3</sup>	COIN <sup>3</sup>
% CD3	27,03 ± 0,07	27,47 ± 4,3	43,315 ± 5,2	27,625 ± 6,8	23,93 ± 0,3	21,56 ± 1,4	25,08 ± 1,8	19,12 ± 1,1
N° CD3	3,434 ± 0,009	2,8 ± 0,3	4,43 ± 0,6	2,7 ± 0,3	2,92 ± 0,06	2,36 ± 0,11	1,341 ± 0,6	1,2 ± 0,5
% CD4	19,405 ± 0,4	23,14 ± 1,2	16,78 ± 2,2	18,11 ± 1,9	24,87 ± 0,4	24,14 ± 0,6	24,88 ± 2,1	25,75 ± 0,3
N° CD4	2,15 ± 0,2	2,0 ± 0,1	1,68 ± 0,1	1,96 ± 0,4	3,12 ± 0,05	2,17 ± 0,4	1,64 ± 0,4	2,55 ± 0,07
% CD8	9,96 ± 0,1	11,09 ± 0,6	8,13 ± 1,5	10,45 ± 0,5	12,76 ± 0	10,08 ± 0,2	11,00 ± 0,2	10,6 ± 0,3
N° CD8	1,11 ± 0,1	1,14 ± 0,03	0,812 ± 0,1	1,11 ± 0,1	1,58 ± 0,01	0,89 ± 0,1	0,972 ± 0,1	1,03 ± 0,06
% CD19	26,55 ± 1,1	29,31 ± 2,0	20,75 ± 2,9	1,11 ± 0,1	38,39 ± 1,1	36,41 ± 0,5	35,43 ± 1,3	35,19 ± 1,9
N° CD19	3,00 ± 0,5	3,10 ± 0,09	2,05 ± 0,2	2,404 ± 0,4	4,86 ± 0,1	4,05 ± 0,1	2,47 ± 0,6	2,38 ± 1,06

<sup>1</sup>animais não infectados (C), <sup>2</sup>animais infectados por *S. venezuelensis* (SV), <sup>3</sup>animais infectados por *M. bovis* (MB), <sup>4</sup>animais co-infectados por *S. venezuelensis* e *M. bovis* (COIN), nos dois pontos da(s) infecções. O ponto 1, referente aos 4° e 7° dias após a infecção por *M. bovis* e *S. venezuelensis*, respectivamente e o ponto 2 referente aos 7° e 10° dias após a infecção por *M. bovis* e *S. venezuelensis*, respectivamente.

#### 4.6 Histopatologia do Pulmão no primeiro ponto da Infecção

A análise histopatológica revela que o pulmão do animal não infectado (controle) está totalmente preservado (Figura 9A). Nos animais infectados apenas com *S. venezuelensis* existe uma acentuada inflamação nos alvéolos e uma grande infiltração de células mononucleares. Além disso, verifica-se também que a luz desses alvéolos está invadida por linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (Figura 9B). No grupo de animais infectados apenas com *M. bovis*, é possível perceber a formação de um granuloma com um grande acúmulo de neutrófilos na região central, macrófagos e células epitelióides na periferia (Figura 9C). Nos animais co-infectados, nota-se um granuloma em estágio bastante avançado com a presença de um centro necrótico (necrose caseosa) característico de infecção com micobactéria (Figura 9D).



**Figura 9:** Histopatologia do pulmão no ponto 1 da infecção, referentes aos 4<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias após a infecção por *M. bovis* e *S. venezuelensis*, respectivamente: **A** = animais não infectados (C), → Tecido sem alteração e com aspecto normal; **B** = animais infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV), → Infiltração celular, ➔ Alvéolos com aspecto alterado; **C** = animais infectados apenas com *M. bovis* (MB), → Infiltração celular, ➔ Granuloma em estágio inicial; **D** = animais co-infectados com *S. venezuelensis* e *M. bovis* (COIN), ➔ Granuloma em estágio avançado, → Centro necrótico (Necrose caseosa). O tecido pulmonar foi fixado em formalina 10% e incluído na parafina e cortes de 5 µm foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas com magnificação 400x.

## 5- DISCUSSÃO

As infecções provocadas por patógenos intracelulares, como por exemplo, por micobactérias, são preferencialmente controladas pela resposta imune com perfil Th1, desencadeando uma resposta imune celular, na qual desempenham importante papel o NO e IFN- $\gamma$ , os quais participam da morte da micobactéria (CONCHEDDA *et al.*, 1997; MACMICKING *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2007; ELIAS *et al.*, 2005b). Por outro lado, as infecções helmínticas, tanto em animais (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004) quanto em humanos (PORTO *et al.*, 2001), induzem um padrão de resposta Th2, do qual participam as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, as quais estão associadas à proteção do hospedeiro (MURRAY & YOUNG, 1999; LAWRENCE, 2003; LITTLE *et al.*, 2005).

A pré-existência da resposta Th2 induzida por diferentes infecções parasitárias pode alterar o perfil da resposta Th1 em detrimento à presença de outros patógenos (SOBOSLAY *et al.*, 2005; TALAAT *et al.*, 2006). Alguns trabalhos sugerem que o desenvolvimento da tuberculose ativa pode ser associado com o aumento da resposta Th2 induzida por infecções helmínticas (TALREJA *et al.*, 2003; ELIAS *et al.*, 2006).

Neste estudo o principal objetivo foi avaliar a influência da co-infecção com o *S. venezuelensis* e o *M. bovis* no perfil de resposta imunológica de ambas as infecções no pulmão dos animais. Observou-se influência direta da infecção por *M. bovis* na suscetibilidade dos animais infectados apenas por *S. venezuelensis*, resultando em aumento significativo do número de ovos e de vermes nos animais co-infectados. Esses dados sugerem que a presença do *M. bovis* nos animais co-infectados, aumenta a suscetibilidade desses animais à infecção pelo verme, consequentemente, resultando no aumento da sobrevivência do parasito. Observou-se também

nos dois grupos, uma diminuição do número de ovos do ponto 1 para o ponto 2 da infecção com *S. venezuelensis*, com um aumento no número de vermes em relação ao ponto 1 da infecção, sugerindo diminuição na fecundidade desses vermes. Relação semelhante entre o aumento de vermes e diminuição de ovos foi observada em ratos infectados com *S. venezuelensis* e tratados com salbutamol, um broncodilatador, onde o número de ovos também diminuiu e o número de vermes recolhido no intestino aumentou após 12 dias de infecção, sugerindo a existência de competição entre os vermes e a diminuição da fecundidade desses parasitos (FERREIRA et al., 2007). Além disso, no presente estudo observou-se maior diferença, principalmente com relação ao número de ovos, entre os dois pontos da infecção analisados, maior no grupo de animais infectados apenas com *S. venezuelensis*, do que no grupo de animais co-infectados sugerindo que a presença do *M. bovis* retardou a fecundidade dos vermes.

Apesar do presente trabalho não mostrar resultados referentes à contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) de *M. bovis* no pulmão dos animais, possibilitando-se avaliar o efeito da infecção por *S. venezuelensis* na infecção com *M. bovis*, foi possível demonstrar a presença do *M. bovis* no pulmão pela reação de PCR, confirmando que os animais estavam infectados com a micobactéria.

Os resultados referentes aos níveis de MPO e EPO no pulmão dos animais utilizados neste estudo, mostraram tendência à diminuição do envolvimento de neutrófilos e eosinófilos do ponto 1 para o ponto 2 das infecções nos animais co-infectados, sugerindo um papel importante destas células na suscetibilidade desses animais à infecção pelo *S. venezuelensis*. Com relação ao EPO, observou-se que no pulmão dos animais infectados apenas por *S. venezuelensis* (SV) houve aumento do ponto 1 para o ponto 2 da infecção, contrastando com a tendência de diminuição nos grupos de animais infectados apenas por *M. bovis* (MB) e co-infectados (COIN), sugerindo assim, que *M. bovis* exerce influência na migração de eosinófilos para o pulmão dos animais co-infectados. Já foi demonstrado que eosinófilos são capazes de infiltrarem dentro da camada do intestino delgado do hospedeiro parasitado por

helmintos e contribuírem na expulsão destes parasitos (EL-MALKY *et al.*, 2002; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006). Com relação ao MPO quantificado no pulmão dos animais, observou-se tendência à diminuição de neutrófilos nos grupos de animais infectados apenas por *S. venezuelensis* (SV) e co-infectados (COIN) do ponto 1 para o ponto 2, contrastando com um aumento no grupo de animais infectados apenas por *M. bovis* (MB). Entretanto, vale ressaltar que os níveis de MPO no pulmão dos animais do grupo SV e COIN, já se encontravam mais elevados do que no grupo MB, no ponto 1 da infecção. Já foi sugerido também, que os neutrófilos participam da resposta imune ao *S. venezuelensis*, atuando no mecanismo de morte de larvas deste helminto em hospedeiros infectados naturalmente (FERNANDES *et al.*, 2008). Nossos resultados apontam aumento no número de vermes no intestino de animais co-infectados, sugerindo que a diminuição dos neutrófilos possa ter contribuído para este fato, uma vez que mais larvas permaneceram vivas e migraram para o intestino. Provavelmente, se a quantidade de neutrófilos fosse maior, talvez evitasse que tantas larvas completassem a rota migratória do pulmão para intestino.

Interessantemente, neste trabalho pode-se observar uma produção de IFN- $\gamma$ , mais alta no pulmão dos animais infectados apenas com *M. bovis* e nos animais co-infectados, confirmando um perfil Th1 em resposta ao *M. bovis*. Esses dados reforçam a hipótese de que a resposta imune contra *M. bovis*, com a produção principalmente de IFN- $\gamma$  modula a resposta Th2 contra *S. venezuelensis*, contribuindo assim, para o aumento do número de ovos e vermes. Outro trabalho demonstrou que indivíduos co-infectados com HTLV-1 e *S. stercoralis* apresentam produção reduzida de citocinas do perfil Th2, associado ao aumento do número de vermes. E ainda, aumentou os níveis de IFN- $\gamma$  induzido pelo vírus em associação com a presença do verme (PORTO *et al.*, 2001). Por outro lado, camundongos com infecção crônica de *Schistosoma mansoni* apresentaram acentuada redução na eficácia da vacina BCG (ELIAS *et al.*, 2005a). Pacientes co-infectados com HIV e *Oncocerca volvulus* não produziram IL-4 e IL-5 em resposta à infecção helmíntica e nem IFN- $\gamma$  em resposta ao *M. bovis* (SENTONGO *et al.*, 1998).

O perfil de resposta Th2, característico de infecção por helmintos foi observado em nosso trabalho e apontou uma tendência de diminuição das citocinas IL-4 e IL-10 nos pulmões dos animais co-infectados, reforçando a hipótese de que o aumento na produção de IFN- $\gamma$  em resposta ao *M. bovis* presente nesses animais, modula a diminuição dessas citocinas do ponto 1 para o ponto 2 da(s) infecção(ões). Vários estudos mostram o papel dessas citocinas na expulsão de helmintos intestinais, incluindo *S. venezuelensis* (KHAN *et al.*, 1993; CARA *et al.*, 2000; LAWRENCE, 2003; LITTLE *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2007). Células Th2 inibem a resposta Th1 principalmente pela produção de IL-4. Foi visto também que camundongos deficientes de IL-4 e infectados com *Schistosoma mansoni* apresentam severa patologia na fase aguda dessa parasitose e que esta citocina tem um papel essencial na prevenção de mortalidade provocada por este helminto (WALSH *et al.*, 2007). Negrão-Corrêa e colaboradores (2006) demonstram que em camundongos deficientes do gene receptor de IL-4 (IL-4R) e infectados com *S. venezuelensis*, o aumento desta citocina no intestino coincidiu com uma baixa produção de ovos e eliminação do verme. Além disso, sabe-se que a IL-10 apresenta papel imunomodulatório, pois já foi sugerido que o aumento da produção de IL-10 pode ser associado com a supressão da imunidade, aumentando assim, a suscetibilidade à infecção micobacteriana (BOUSSIOTIS *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que o desenvolvimento da resposta imune primária do tipo Th2 contra infecções por patógenos seja dependente das moléculas co-estimulatórias CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> expressas por células APCs, que auxiliam na maturação de células T CD4 “naive” que produzem IL-4 (EKKENS *et al.*, 2002). O bloqueio das moléculas co-estimulatórias CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> inibe o desenvolvimento da resposta Th2 primária na infecção por *H. polygyrus* (LU *et al.*, 1994). Os resultados aqui apresentados mostram um aumento na expressão de CD80<sup>+</sup> sobre células pulmonares dos animais em todos os grupos, sendo a expressão maior nos pulmões dos animais co-infectados quando comparados ao grupo de animais infectados apenas com *S. venezuelensis*, no ponto 1 da infecção. No ponto 2 da infecção ocorreu um aumento na expressão da molécula co-estimulatória CD80<sup>+</sup> nas células de pulmão dos animais do grupo infectados apenas com *S. venezuelensis* (SV) e uma diminuição nas células

pulmonares do grupo de animais co-infectados (COIN). A expressão da molécula co-estimulatória CD86<sup>+</sup> foi menor nas células pulmonares dos animais nos dois pontos de infecção, quando se compara com a expressão da molécula CD80<sup>+</sup>. De um modo geral, esta maior expressão da molécula CD80<sup>+</sup> e a menor expressão da molécula CD86<sup>+</sup> nas células pulmonares podem ser correlacionadas com a produção de citocinas, já que houve também aumento na produção de IFN- $\gamma$ , em resposta ao *M. bovis* levando à diminuição de IL-10 e IL-4 produzidas pelas células pulmonares dos animais co-infectados, do ponto 1 para o ponto 2, sugerindo o favorecimento da resposta Th1 local. Já foi descrito que as moléculas co-estimulatórias CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> podem influenciar no perfil de citocinas produzidas durante a infecção helmíntica (LU *et al.*, 1994; NAKAJIMA *et al.*, 1996; EKKENS, *et al.*, 2002). Além disso, existem evidências de que a molécula CD80<sup>+</sup> tem maior influência sobre a produção de citocinas Th1 e a molécula CD86<sup>+</sup> maior influência sobre a produção de citocinas Th2 (NAKAJIMA *et al.*, 1996; MUELLER, 2000; EKKENS *et al.*, 2002). Na infecção experimental de camundongos BALB/c com *Nippostrongylus brasiliensis*, o bloqueio da molécula co-estimulatória CD86<sup>+</sup> com anticorpo monoclonal anti-CD86 diminuiu a produção de IL-4 e não alterou a produção de IFN- $\gamma$  (NAKAJIMA *et al.*, 1996). Em nosso estudo, vale ressaltar a tendência de diminuição na produção de IL-4 nos animais co-infectados, quando comparados aos animais do grupo SV no ponto 2 da(s) infecção(ões).

A molécula co-estimulatória CD28<sup>+</sup> 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 e de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-x (ALEGRE & FALLARINO, 2006; BOISE *et al.*, 1995). CD28<sup>+</sup> 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). Nossos resultados sugerem baixa expressão de CD28<sup>+</sup> em células pulmonares dos animais de todos os grupos analisados. Porém, esta expressão, mesmo baixa, parece ter sido suficiente para ativar a resposta imune, pela produção de citocinas de ambos os perfis, tanto Th1, quanto Th2.

Os níveis de expressão da molécula co-estimulatória CTLA-4<sup>+</sup> foram baixos nos dois pontos das infecções, sendo que no ponto 2 houve um aumento nesta expressão, principalmente nas células pulmonares dos animais dos grupos infectados apenas por *M. bovis* (MB) e co-infectados (COIN), onde o aumento da expressão foi maior nas células dos animais co-infectados. Este fato pode estar correlacionado com a diminuição das citocinas IL-4, e IL-10 nos pulmões dos animais co-infectados no ponto 2 da(s) infecção(ões), favorecendo assim, o aumento do número de ovos e vermes, conforme foi observado. Além disso, foi claramente demonstrado, que a expressão da molécula CTLA-4<sup>+</sup> estava baixa nas células pulmonares dos animais do grupo infectados apenas por *S. venezuelensis*, em ambos os pontos da(s) infecção(ões). E ainda, no pulmão dos animais do grupo SV, os níveis das citocinas IL-4 aumentaram do ponto 1 para o ponto 2 da(s) infecção(ões), coincidindo com a diminuição do número de ovos no grupo de animais infectados apenas por *S. venezuelensis*. Assim, o aumento de CTLA-4<sup>+</sup> parece promover a diferenciação de células Th1 (KATO *et al.*, 2000) e que células T deficientes de CTLA-4<sup>+</sup> produzem preferencialmente citocinas Th2 (OOSTERWEGEL *et al.*, 1999), e o bloqueio desta molécula (CTLA-4<sup>+</sup>) em infecções helmínticas, parece induzir aumento na produção de citocinas Th2 (WASH *et al.*, 2007). Em modelos experimentais utilizando camundongos infectados com *Nippostrongylus brasiliensis* ou com *Schistosoma mansoni* o bloqueio de CTLA-4<sup>+</sup> promoveu aumento das citocinas IL-4 e IL-5 e de eosinófilos (MCCOY *et al.*, 1997; WASH *et al.*, 2007). Indivíduos infectados com a filária do nematódeo *Brugia malay* apresentaram elevada expressão de CTLA-4<sup>+</sup>, quando comparados com indivíduos não infectados, sugerindo supressão na ativação de células T. Porém, quando se fez o bloqueio *in vitro* da molécula co-estimulatória CTLA-4<sup>+</sup> em PBMC (Células mononucleares do sangue periférico) desses pacientes observou-se aumento de IL-5 e decréscimo de IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno deste helminto (STEEL & NUTMAN, 2003). Em modelos experimentais de alergia pulmonar tipo 2, o bloqueio da molécula CTLA-4 com mAb, também induziu aumento de IL-4, IL-5, IgE e de eosinofilia pulmonar (HELLING *et al.*, 2002).

Os resultados aqui apresentados apontam aumento na expressão da célula T regulatória CD25<sup>+</sup> do ponto 1 para o ponto 2 da (s) infecção (ões) em células pulmonares dos animais dos grupos infectados apenas *M. bovis* e co-infectados e, uma diminuição dessas moléculas (CD25<sup>+</sup>) nas células pulmonares dos animais infectados apenas por *S. venezuelensis*. Estes resultados sugerem que a células T expressando CD25<sup>+</sup> estejam aumentando no ponto 2 da(s) infecção (ões) nos pulmões de animais dos grupos MB e COIN, em função da presença do *M. bovis*. Entretanto no ponto 2 há uma tendência de diminuição da expressão desta molécula pelas células pulmonares dos animais do grupo COIN, em comparação aos animais do grupo MB. Tem sido sugerido que essas células T regulatórias CD25<sup>+</sup> apresentam papel importante na regulação da resposta imune contra infecções por diferentes patógenos, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* e *Schistosoma mansoni* (BELKAID & ROUSE, 2005; WALSH *et al.*, 2007). Já foi visto que há aumento na expressão da molécula CD25<sup>+</sup> durante a fase ativa da tuberculose em humanos e que a depleção de células T CD25<sup>+</sup> *in vitro* resulta em aumento de IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno da micobactéria (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006; RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006). Na infecção experimental de camundongos por *Schistosoma mansoni*, as células T CD25<sup>+</sup> têm papel importante, sendo fonte de IL-10 que previne a evolução da infecção deste helminto (SADLER *et al.*, 2003). Em outro trabalho, foi demonstrado que a expressão de CD25<sup>+</sup> em células de camundongos infectados com *S. mansoni* pode contribuir para a polarização de células Th2 durante a infecção. (McKEE & PEARCE, 2004).

Através da análise histopatológica feita no 4º e 7º dia das infecções com o *M. bovis* e o *S. venezuelensis*, respectivamente, foi possível perceber que os animais infectados apenas com *S. venezuelensis* apresentaram inflamação alveolar acentuada, acompanhada de grande infiltração de linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. Durante a migração pulmonar (2º dia após a infecção) foi demonstrado que *S. venezuelensis* induziu severa hemorragia, edema pulmonar e destruição alveolar com infiltração de células mononucleares no parênquima pulmonar, sendo que após cinco dias de infecção ocorreu diminuição da hemorragia, porém, a inflamação permaneceu alta com a presença de grande número de eosinófilos (SILVEIRA *et al.*, 2002).

No presente trabalho, no pulmão dos animais infectados apenas com *M. bovis* (MB) e nos animais co-infectados (COIN) foi detectado a presença de granulomas, indicando forte resposta Th1 em função da presença da micobactéria. Este resultado sugere que a presença do verme nos animais co-infectados interferiu na resposta imune ao *M. bovis*, pois nesses animais o granuloma se apresentou em estágio bastante avançado, com a presença de um centro necrótico (necrose caseosa) característico de infecção com micobactéria. Esta formação granulomatosa mais severa no pulmão dos animais co-infectados (COIN) pode ser justificada pela presença de citocinas do perfil Th2, aumento na expressão de CTLA-4<sup>+</sup> e diminuição da expressão de CD25<sup>+</sup> em células pulmonares, que possivelmente regularam a severidade do granuloma pulmonar. Há fortes evidências de que as citocinas do perfil Th1, como por exemplo, o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e reativos de nitrogênio tais como NO são importantes na ativação dos macrófagos, uma das primeiras barreiras de defesa frente à micobactéria (OTTENHOFF *et al.*, 2005). Porém estas mesmas citocinas induzem a formação de granulomas que acabam levando à destruição do tecido pulmonar, não implicando necessariamente na destruição da bactéria (COOPER *et al.*, 2002).

Portanto, baseado nos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que nos pulmões dos animais co-infectados houve um predomínio da resposta Th1 sobre a resposta Th2. Essa idéia é sustentada pelo aumento do número de ovos e vermes do nematódeo *S. venezuelensis*, pela diminuição das citocinas IL4 e IL-10, e pelo aumento do IFN- $\gamma$ . Além disso, houve aumento da severidade dos granulomas nos pulmões dos animais co-infectados, que pode ser correlacionados com a presença de citocina do perfil Th2 no início da infecção.

## 6- CONCLUSÕES

- As infecções simultâneas com *S. venezuelensis* e *M. bovis* no grupo de animais co-infectados favoreceu aumento do número de ovos e vermes nesses animais;
- A reação da PCR foi efetiva na detecção do *M. bovis* no tecido pulmonar dos animais infectados com *M. bovis* e co-infectados;
- Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, assim como de EPO e MPO, demonstraram modulação entre os perfis de resposta imune Th1 e Th2, observado principalmente, pelo aumento de IFN- $\gamma$  e IL-10 e diminuição de IL-4 e EPO nos animais co-infectados.
- A expressão das moléculas co-estimulatórias/imunomodulatórias CD80 e CD86 em células do pulmão de camundongos infectados ou co-infectados por *S. venezuelensis* e/ou *M. bovis* mostrou modulação da resposta imune frente às infecções helmínticas e micobacterianas;
- A histopatologia evidenciou aumento na severidade da formação de granuloma no pulmão dos animais co-infectados no primeiro ponto da infecção.

## 7- REFERÊNCIAS

ALEGRE, M. L. and FALLARINO, F. Mechanisms of CTLA-4g in tolerance induction. **Cur Pharm Des.** 12: 149-160, 2006.

ALEGRE, M. L. FRAUWIRTH, K. A. and THOMPSON, C. B. T Cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nat Rev Immunol.** 1 (3): 220-228, 2001.

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

BARRETO, M.L.; RODRIGUES, L.C.; SILVA, R.C.R.; ASSIS, A.M.O.; REIS M.G. and SANTOS C.A.S.T.. Lower hookworm incidence, prevalence, and intensity of infection in children with a bacillus Calmette-Guérin vaccination Scar. **The J Infect Disease.** 182:1800-1803, 2000.

BARRETO, M.L., PEREIRA, S.M. and FERREIRA, A.A. Vacina BCG: eficácia e indicação vacinação e revacinação. **J Pediatr (Rio J).** 82 (3): 45-54. 2006.

BELTRAN F, M., HARA, T. and TELLO C. Raúl. Evaluación de los métodos de Graham y pin tape en el diagnóstico de *Enterobius vermicularis*. **Rev Perú med exp sal pub.** 22: 76-78, 2005.

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

BELKAID Y and ROUSE BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol.** 6: 353-360, 2005.

- BLUESTONE, J. A., CLAIR, E. W. and TURKA, L. A. CTLA-4: Bridging the basic immunology with clinical application. **Immunity**. 24: 233-238, 2006.
- BOISE, L. H., MINN, A. J., NOEL, P. J., JUNE, C. H., ACCAVITTI, M. A. and LINDSTEN, T. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the of Bcl-xL. **Immunity**. 3: 87-98, 1995.
- BOUSSIOTIS, V. A., TSAI, E. Y., YUNIS, E. J., THIM, S., DELGADO, J.C., DASCHER, C.C., BEREZOVSKAYA, A., ROUSSET, D., REYNES, .JM. and GOLDFELD, A.E. IL-10- producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest**. 105:1317-25, 2000.
- BRUMPT, E. *Precis de Parasitologie*. 6th ed., Masson et Cie, Paris, France. p.1042, 1934.
- CARA, D. C., D. NEGRÃO-CORRÊA, and M. M. TEIXEIRA. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance *in vivo*. **Histol Histopathol**. 15:899-920, 2000.
- CARVARLHO, F.W. *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*.6ed.**Coopmed**, Belo Horizonte,1994.Cap.21.Estudos dos esfregaços de sangue,p.137-142.
- CONCHEDDA, M., BORTOLLETTI, G., GABRIELE, F., WAKELIN, D. and PALMAS C. Immune response to the cestode *Hymenolepis anan*: cytokine production during infection with eggs or cysts. **Int J Parasitol**. 27(3):321-327, 1997.
- COOPER, A.M., ADAMS, L.B., DALTON, D.K., APPELBERG, R. and EHLERS, S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends Microbiol**. 10: 221-226, 2002.
- COX, F. E. G. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Par Immunol**. 122: 23- 38, 2001.
- CROMPTON, D.W.T. How much human helminthiasis is there in the world? **J of Parasitol**. 85:397-403, 1999.
- DABORN, C.J. and GRANGE, J.M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. **Br Vet J** 149:405-17, 1993.

DELGADO, J.C., TSAI, E.Y., THIM, S., BAENA, A., BOUSSIOTIS, V.A. and REYNES, J.M. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99: 7576-7581, 2002.

DUMARS, A., ROBLLOT, P., BURUCOA, C., ROBLLOT, F.; BRETON, I. and ECQGIRAUDON, B. Tuberculose généralisée à *Mycobacterium bovis* chez une malade âgée en dehors de l'infection à VIH. **Rev. Méd. Interne.** 16(2):143-5, 1995.

EKKENS, M. J., Z, LIU, J. WHITMIRE, J. PESCE, A. H. SHARPE, J. F. URBAN., and W. C. GAUSE. 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 J of Immunol.** 22: 1767-1802, 2002.

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

ELIAS, D., AKUFFO, H., THORS, C., PAWLOWSKI, A. and BRITTON, S. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. **Clin and Exp Immunol.** 139: 398-404, 2005 (b).

ELIAS, D., MENGISTU, G., AKUFFO, H. and BRITTON, S. Are intestinal helminthes risk factors for developing active tuberculosis? **Trop Med and Int Health.** 4: 551-558, 2006.

EL- MALKY, M., MARUYAMA, H., HIRABAYASHI, Y., SHIMADA, S., YOSHIDA, A., AMANO, T., TOMINAGA, A., TAKATSU, K. and OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitol Int.** 52: 71-79, 2003.

ENOBE, C. S. Estudos imunológicos da infecção experimental por *Ascaris suum*. [Tese (Doutorado em Imunologia) ]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

FERNANDES, A., PEREIRA, A. T. M., P. D. ESCHENAZI, P. D., SCHILTER, H. C., SOUSA, A. L. S., TEIXEIRA, M. M. and NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Par Immunol.** 30: 139-149, 2008.

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

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

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

FREMOND, C.M., YEREMEEV, V., NICOLLE, D.M., JACOBS, M., QUESNIA, U.X. V.F. and RYFFEL, B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. **J Clin Invest.** 114: 1790-1799, 2004.

GAUSE, W. C., URBAN, J. F. and STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends Immunol.** 24:269-277, 2003.

GILL, G.V., BEECHING, N.J. and KHOO, S. British second world war veteran with disseminated strongyloidiasis. **Trans. R Soc Trop Med Hyg.** 98: 382-386, 2004.

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

GREEN, E.A, GORELIK L, MCGREGOR, C.M., TRAN, E.H. and FLAVELL, R.A. CD4+ CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100: 10878-10883, 2003.

GREENWALD, R. F., J. F. URBAN, M. J. EKKENS, S. J. CHEN, D., NGUYEN, H., FANG, F. D., FINKELMAN, A.H., SHARPE, and W. C GAUSE . B7-2 Is Required for the progression but not the initiation of the Type 2 immune response to a gastrointestinal nematode parasite. **The J of Immunol.** 22: 1767-1799, 1999.

GREENWALD, R.J., LATCHMAN, Y.E and SHARPE, A.H. Negative co-receptors on lymphocytes. **Cur Opin of Immunol.** 14(3):391-6, 2002.

- GUYOT-REVOL, V., INNES, J.A., HACKFORTH, S., HINKS, T. and LALVANI, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 173: 803-810, 2006.
- HELLINGS, P.W., VANDENBERGHE, P. and KASRAN, A. Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice. **Eur J Immunol.** 32: 585–594, 2002.
- HELMBY, H., TAKEDA, K., AKIRA, S. and GRENCIS, R. K. Interleukin (IL)-18 Promotes the development of chronic gastrointestinal helminth infection by downregulating IL-13. **J Exp Med.** 194 (3): 355-364, 2001.
- HENDERSON, R. A., WATKINS, S. C. and FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** 159:635-643, 1997
- HESSE, M., PICCIRILLO, C.A., BELKAID, Y. *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol** 172: 3157–3166, 2004.
- JUNG, Y.J., LACOURSE, R., RYAN, L. and NORTH, R.J. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. **Infect Immun.** 70: 6436-6443, 2002.
- JUNG, Y.J., RYAN, L., LACOURSE, R. and NORTH, R.J. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Jl of Exp Med**, 201(12):1915-24, 2005.
- KATO, T. and NARIUCHI, H. Polarization of naïve CD4+ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. **J Immunol.** 164 (7): 3554-3562, 2000.
- KARONGA. Prevention trial group, randomized controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. [see comments]. **Lancet.** 348:17-24, 1996.
- KAUFMANN, S. H. and LADEL, C. H. Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. **Immunobiol.** 191(4-5):509-19, 1994.
- KAUFMAN, S. H. E. Immunity to mycobacteria with. In: Phasis on tuberculosis: Implications for national design of an effective tuberculosis vaccine. **Chem Immunol.** Ed. Kager. 63: 66-85, 1999.

KHAN, A. I., Y. HORII, Y. TIURIA, Y. SATO, and Y. NAWA. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. **Int J Parasitol.** 23:551-555, 1993.

KIM, K. D., LEE, H. G., KIM, J. K., PARK, S. N., CHOE, Y. K., KIM, S. J., LEE, E. and LIM, J. S. Enhanced antigen presenting activity and tumour necrosis factor a dependent activation of dendritic cells following treatment with *Microbacterium bovis* bacillus Calmett Guerin. **Immun.** 97: 626, 1999.

KOCHI. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. **Tuber.**72 (1):1-6, 1991.

KRUTZIK, S.R. Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Semin Immunol.** 16(1):35-41, 2004.

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

LIENHARDT, C., AZZURRI, A., AMEDEI, A., FIELDING, K., SILAH, J., SOW, O. Y., BAH, B., BENAGIANO, M., DIALLO, A., MANETTI, R., MANNEH, K., GUSTAFSON, P., BENNET, S., D'ELOIS, M. M., MCACDAM, K. and PRETE, D. G. Active tuberculosis in Africa is associate with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. **Eur J Immunol.** 32:1605-1613, 2002.

LITTLE, M. C., BELL, L. V., CLIFFE, L. J. and ELSE, K. The characterization of intraepithelial lymphocytes, lamina propria leukocytes, and isolated lymphoid follicles in the large intestine of mice infected with the intestinal nematode parasite *Trichuris muris*. **The J of Immunol.** 175: 6713-6722, 2005.

LU, P., ZHOU, X., CHEN, S. J. MOORMAN, M., MORRIS, S. C., FINKELMAN, F. D., LINSLEY, P., URBAN, J. F. and GAUSE, W. C. CTLA-4 Ligands are required to induce an *in vivo* interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. **J Exp Med.** 180: 693-698, 1994.

MACHADO, E. R., UETA, M. T., LOURENÇO, E. V., ANIBAL, F. F., ROQUE-BARREIRA, M. C. and FACCIOLI, L. H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunol.** 29: 549-557, 2007.

MAERTEN P, SHEN C, BULLENS DM, VAN ASSCHE G, VAN GOOL S, GEBOES K, *et al*. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. **J Autoimmun.** 25: 112-120, 2005.

MACMICKING, J.D., NORTH, R.J., LACOURSE, R., MUDGETT, J.S., SHAH, S.K. and NATHAN, C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94:5243-8, 1997.

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

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

MCCOY, B. K., CAMBERIS, M. and GROS, G. L. Protective immunity to nematode is induced by CTLA-4 blockade. **J Exp Med**. 186 (2): 183-187, 1997.

MCKEE, A. S. and PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**. 173: 1224–1231, 2004.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidose no Brasil. **Rev Serv Esp S Púb**. 1: 507-624, 1948.

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

MOTA, P.M.P.C.and NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: Charles, T.P. & Furlong, J. Doenças dos bovinos de leite adultos. **CNPGL**. p 97-122, 1992.

MUELLERR, D. L. A proliferation of costimulatory molecules. **Cur Biol**. 10: 227-230, 2000.

MURRAY PJ, YOUNG RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun**. 67:3087-95, 1999.

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

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Rev Inst Med Trop S. Paulo.** 43 (5): 291-299, 2001.

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

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

NEGRÃO-CORRÊA, D., PINHO, V., SOUZA, D. G., PEREIRA, A. T. M., FERNANDES, A., SCHEUERMANN, K., SOUZA, A. L.S. and TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **Int J for Parasitol.**36: 1185–1195, 2006.

NEGRÃO-CORRÊA, D. and TEIXEIRA, M.M. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chem Immunol.**90: 14-28, 2006.

NORTH, R. J. and JUNG, Y.J. Immunity to Tuberculosis. **Annu Rev Immunol.** (22):599-623, 2004.

OLLEROS, M.L., GULER, R., VESIN, D., PARAPANOV, R., MARCHAL, G., MARTINEZ-SORIA, E., CORZZA, N., PACHE, J. C., MUELLER, C. and GARCIA, I. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Am J Pathol.** 166 (4): 1109-1120, 2005.

O'LORCANN P. and HOLLANO, C.V. The public health importance of *Ascaris lumbricoïdes*. **Parasitol.** 121(suppl):S51-S71, 2000.

ONAH, D. N. and NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean J Parasitol.** 38 (4): 209-236, 2000.

OOSTERWEGEL, M. A., MANDELBROT, D. A., BOYD, S.D. *et al.* The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. **J Immunol.** 163: 2634–2639, 1999.

- OTTENHOFF, T.H., VERRECK, F. A. and HOEVE, M.A. and VOSSE, E. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberc (Edinb)**. 85(1-2):53-64, 2005.
- PEARLMAN, E., KAZURA, J. W., HAZLETT, F. E. Jr. and BOOM, W. H. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. **J Immunol**. 151:4857-64, 1993.
- PEREIRA, S. M., DANTAS, S. O. M., XIMENES, R. and BARRETO, M. L. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Rev S Públ**: 41(Supl. 1): 59-66, 2007.
- PORTO, A. F., NEVA, F. A., BITTENCOURT, H., LISBOA, W., THOMPSON, R., ALCÂTARA, L. and CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of response in patients with strongyloidiasis. **Par Immunol**. 23: 503- 507, 2001.
- QUESNIAUX, V., FREMOND, C., JACOBS, M., PARIDA, S., NICOLLE, D. and YEREMEEV, V. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes Infect**; 6: 946-959, 2004.
- RESENDE, T.C., HIRSCH, C. S., TOOSI, Z., DIETZE, R. and RIBEIRO-RODRIGUES, R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clin and Exp Immunol**. 147: 45-52, 2006.
- RIBEIRO-RODRIGUES, R., RESENDE, C.T., ROJAS, R., TOOSI, Z., DIETZE, R. and BOOM, W.H.. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol**. 144: 25-34, 2006.
- RUGGIERO, A.P., IKUNNO, A.A., FERREIRA, V.C.A. and ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arq Inst Biol**. 74:55-65, 2007.
- SADLER, C.H., RUTITZKY, .L.I, STADECKER, M.J. and WILSON, R.A. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur J Immunol**. 33: 880-888, 2003.
- SALGAME, P. Host innate and th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr Opin Immunol**. 17(4):374-80, 2005.

SENTONGO, E., RUBAALÉ, T., BUTTNER, D. W. and BRATTING, N. W. T cell responses in coinfection with *Onchocerca volvulus* and the human immunodeficiency virus type 1. **Par Immunol.** 20: 15-21, 1998.

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

SIDDIQUI, AA and BERK, S.L. Strongyloidiasis. **Cur Treat Opt.** 5:283-289, 2003.  
SOBOSLAY, P. T., HUMM, D. M., PFAFFLIN, F., FENDT, J., BANLA, M. and SCHULZKEY, H. Cytokine and chemokine responses in patients co-infected with *Entamoeba histolytica/dispar*, *Necator americanus* and *Mansonella perstans* and changes after anti-parasite treatment. **Mic and Infect.** 8: 238-247, 2005.

SOULSBY, E.J.L. Helintos-Trematodos pg.76. – *In: Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* Ed **Interamericana.** México, 1987.

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

STARKE, J.R and CONNELLY, K.K. Bacille Calmette-Guerin vaccine. In: Plotkin MEA, **Vac Philadel:WB Saunders.** 456-89, 2004.

STEEL, C., and T. B. NUTMAN. 2003. CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. **The J Immunol.** 22: 1767-1803, 2003.

STEVENS, T.L., BOSSIE, A., SANDERS, V.M., FERNANDEZ-BOTRAN, R., COFFMAN, R.L., MOSMANN, T.R. and VITETTA, E.S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen specific helper T cells. **Nature.** 334 (6179): 255-258, 1988.

TALBOT, E. A., WILLIAMS, D. L. and FROTHINGHAM, R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. **J ClinMicrobiol.** 35 (3): 566–569, 1997.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol.** 25:907-911, 1995.

TALAAT, K. R., BONAWITZ, R.E., DOMENECH, P. and NUTMAN, T.B. Preexposure to live *Brugia malayi* Microfilariae alters the innate response of human dendritic cells to *Mycobacterium tuberculosis* **The J of Infect Dis.** 193:196–204, 2006.

TALREJA, J., BHATNAGAR, A., JINDAL, S.K. and GANGULY, N.K. Influence of *M. tuberculosis* on differential activation of helper T cells. **Clin and Exp Immunol.** 13: 292–298, 2003.

TEIXEIRA, H.C., ABRAMO, C. and MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J Bras Pneumol.** 33 (3): 323-334, 2007.

USABIAGA, J. Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿control o eliminación? São Paulo: OMS, 2001.

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

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

WANG, Y. C., SASHIDHARAMURTHY, R., NAGARAJAN, S. and SELVARAJ, P. B-7-1 HSA (CD80-CD24), a recombinant hybrid costimulatory molecule retains ligand and costimulatory functions. **Imm Lett.** 2006.

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