

CITOCINAS PRODUZIDAS POR ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/C EM RESPOSTA À ESTÍMULAÇÃO “*IN VITRO*” COM LARVAS (L3) DE *TOXOCARA CANIS*

¹**AVILA, Luciana;** ¹**ROOS, Talita;** ²**SCAINI, Carlos;** ¹**LEITE, Fábio Leivas**

1. Universidade Federal de Pelotas lufcosta@ig.com.br, fabio@leivasleite.com.br

2. Universidade Federal do Rio Grande

1. INTRODUÇÃO

Os helmintos, considerados por alguns pesquisadores como “Mestres da imunomodulação”, desenvolvem diversos mecanismos para modular e manipular a resposta imune do hospedeiro. Dentre esses mecanismos está a supressão da resposta imune celular e a estimulação da resposta imune humoral, o que os permite promover sua permanência, por até décadas, no hospedeiro. As helmintoses induzem, tanto no homem como em modelos experimentais, aumento de eosinófilos, IgE, aumento de citocinas do tipo Th2 como [interleucina 4 (IL-4) e IL-5], citocinas regulatórias (IL-10) e diminuição de citocinas do tipo Th1 [interferon gama (IFN γ)] (MAIZELS E YASDANBAKHS, 2003).

A toxocaríase, também conhecida como larva *migrans* visceral, é uma zoonose cosmopolita com elevada prevalência em países em desenvolvimento (HOTEZ & WILKINS, 2009), chegando a 54% no Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2005). Esta parasitose se caracteriza pela migração e permanência de larvas de helmintos em tecidos de hospedeiros acidentais (BEAVER, 1969), sendo que o nematóide *Toxocara canis* é o principal agente etiológico (GLICKMAN, 1979).

Os mecanismos pelos quais a infecção por *T. canis* modula a resposta imune ainda são pouco compreendidos, especialmente o perfil de citocinas produzidas, visto que estas variam conforme o tecido parasitado e o tempo de infecção (PINELLI *et al.*, 2007; HAMILTON *et al.*, 2008). É urgente a necessidade de novos medicamentos e de vacinas eficazes para controlar esta parasitose. No entanto, a falta de conhecimento dos componentes da resposta imune que medeiam a proteção contra este parasito torna-se um impedimento. Assim, os estudos “*in vitro*” podem ampliar os conhecimentos sobre a resposta imune frente a este parasito e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle para esta zoonose. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de citocinas produzidas por esplenócitos de camundongos estimulados com larvas (L3) viáveis e inviáveis de *T. canis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de larvas de *T. canis*, ovos foram incubados em formalina 2%, a 28°C, umidade acima de 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias e após foi realizada a extração das larvas conforme De Savigny (1975). Estas foram mantidas em meio RPMI 1640 (acrescido de antibiótico e antifúngico) até o experimento *in vitro*.

Foi realizado cultivo de esplenócitos a partir do baço de quatro camundongos Balb/c, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, a 37°C com 5% CO₂ por 24 h. A seguir, foram feitos três diferentes

estímulos com duas larvas de *T. canis*/ poço: A. larvas viáveis; B. larvas inviáveis e íntegras; C. larvas inviáveis e dilaceradas e Concanavalina A como controle. As células foram retiradas em Trizol e congeladas a -70°C . Após, foi realizada extração de RNA e síntese de cDNA para a realização da técnica de PCR com os primers para IFN γ , IL-12p40, IL-4, IL-10 e β -actina como controle.

Os oligômeros iniciadores utilizados no experimento, sintetizados por MWG-Biotech Inc. (USA), foram:

-actin anterógrado 5'-TGG AATCCTGTGGCATCCATGAAAC;

-actin retrógrado 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG.

IFN- anterógrado 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG;

IFN- retrógrado 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG;

IL-10 anterógrado 5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA;

IL-10 retrógrado 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A;

IL-4 anterógrado 5'-ATGTACCAGCCACTTCGTCC;

IL-4 retrógrado 5'-GAACAGGTCCTTGCCAG;

IL-12p40 anterógrado - GAG GTG GAC TGG ACT CCC GA;

IL-12p40 retrógrado - CAA GTT CTT GGG CGG GTC TG;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 pode ser observada expressão das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-12 após estímulo com larvas de *T. canis*. Foi observado um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-4 em todos os desafios com larvas de *T. canis*, o que já era esperado devido à conhecida indução de resposta Th2 realizada pelos helmintos. Este resultado sugere que a indução da expressão de IL-4 estaria relacionada a secreção de antígenos presentes no interior da larva, uma vez que a maior indução ocorreu com as larvas dilaceradas. Em outro estudo, que avaliou citocinas presentes nos pulmões de animais parasitados com este nematóide, também foi observado aumento na expressão de IL-4, até mesmo em animais com baixa carga parasitária (PINELLI *et al.*, 2007).

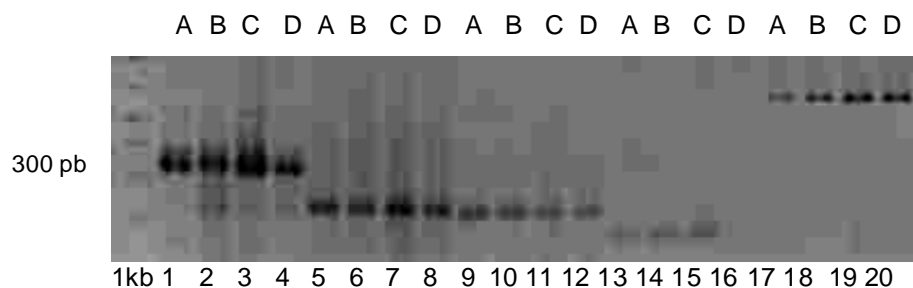


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro*. (1-4) amplificação do controle β -actina, (5-8) IFN- γ (247 pb), (9-12) IL-10 (237 pb), (13-16) IL-4 (181 pb) e (17-20) IL-12 (618 pb). Os estímulos *in vitro* foram realizados com: A. larvas viáveis; B. larvas inviáveis e íntegras; C. larvas inviáveis e dilaceradas; D. Concanavalina A (controle positivo).

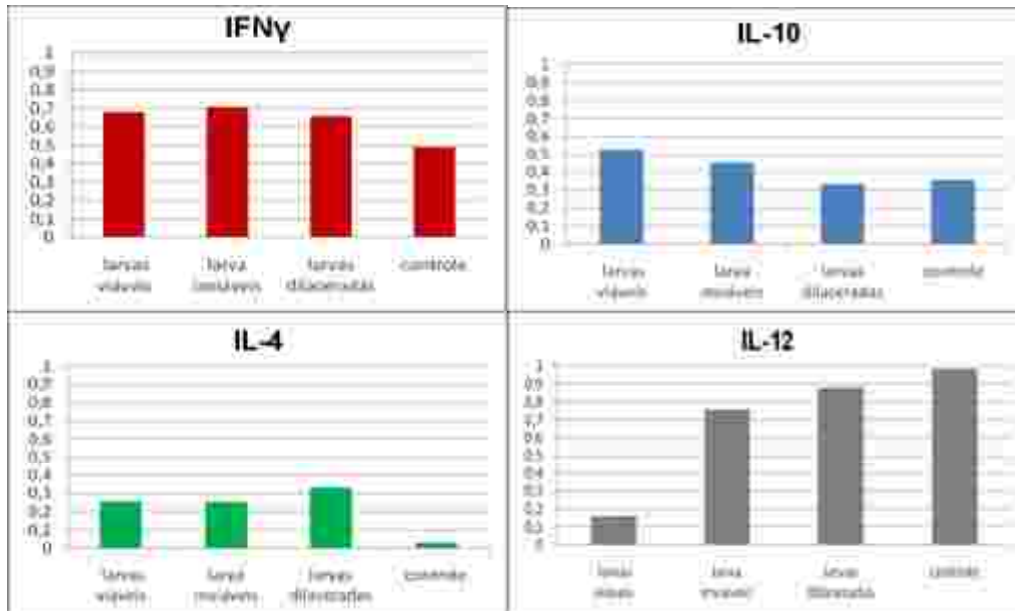


Figura 2: Expressão das citocinas IFN γ , IL-10, IL-4 e IL-12 produzidas em esplenócitos estimulados *in vitro* com: larvas viáveis, larvas inviáveis e íntegras, larvas inviáveis e dilaceradas e Concanavalina A (controle).

Na Figura 2 pode ser observado que, com exceção do estímulo com larvas viáveis, que apresentou produção de IL-12 relativamente inferior ao controle, os demais apresentaram níveis de IL-12 bem próximos ao controle. Este resultado sugere que a supressão na produção desta citocina é dependente da viabilidade das larvas. Além disso, tal supressão parece ter sido exercida pela IL-4, uma vez que esta citocina está relacionada à depressão da imunidade mediada pelas células Th1, responsáveis pela secreção de IL-12 (HERBERT *et al.*, 2010). Em relação à produção de IFN γ e IL-10 não foi observada diferença significativa para o controle. Estes resultados estão de acordo com a análise de citocinas realizada nos pulmões de Balb/c infectados por este nematoide (PINELLI *et al.*, 2007). Entretanto, em estudo que avaliou a expressão destas citocinas no encéfalo de camundongos infectados por *T. canis*, pode-se observar aumento na expressão de IL-10 e IFN γ (HAMILTON *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que a secreção destas duas citocinas está relacionada ao órgão analisado e a carga parasitária.

Os helmintos induzem mecanismos para regular a imunidade do hospedeiro não somente em seu favor, mas em busca de um ambiente mutuamente benéfico para a sobrevivência de ambos - parasito e hospedeiro. Assim, as infecções por helmintos têm sido associadas à alterações sobre a resposta imune às vacinas, alergias, doenças autoimunes (MOREAU E CHAUVIN, 2010), modulação de reações inflamatórias nos pulmões e sintomas de asma (PINELLI, *et al.*, 2006). Com a finalidade de ampliar os conhecimentos da ação de *T. canis* sobre o sistema imune de hospedeiros paratênicos, foi realizado este experimento sobre a influência das larvas na resposta imune celular em camundongos Balb/c.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a estimulação “*in vitro*” com larvas de *T. canis* induz um perfil anti-inflamatório, mediado por células Th2, com aumento de IL-4. A expressão desta citocina provavelmente bloqueia as células Th1, inibindo a expressão de IL-12. Estes resultados poderão contribuir com o conhecimento existente sobre o padrão de resposta imune desenvolvido, ajudando na compreensão da ação moduladora exercida sobre o sistema imune.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAVER, P. C. The nature of visceral larva migrans. **The Journal of Parasitology**, vol 55, n 1, p. 3-12, 1969.
- De SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, vol 61, p. 781-782, 1975.
- FIGUEIREDO, S. D. P.; TADDEI, J. A. A. C.; MENEZES, J. J. C.; NOVO, N. F.; SILVA, E. O. M.; CRISTOVÃO, H. L. G.; CURY, M. C. F. S. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **J Pediat**, vol 81, n 2, p. 126-132, 2005.
- GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M.; CYPESS, R. H. Canine and Human toxocariasis: Review of transmission, pathogenesis, and clinical disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** vol 175, n 12, p. 1265-1269, 1979.
- HAMILTON, C. M.; BRANDES, S.; HOLLAND, C.V.; PINELLI, E. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. **Parasit Immunol**, vol 30, p.181-185, 2008.
- HERBERT, D. B., OREKOV, T., ROLOSON, A., ILIES, M., PERKINS, C., O'BRIEN, W., CEDERBAUM, S., CHRISTIANSON, D., ZIMMERMANN, N., ROTHENBERG, M., FINKELMAN, F. Arginase I Suppresses IL-12/IL-23p40-Driven Intestinal Inflammation during Acute Schistosomiasis. **J Immunol.**, vol 184, p.1-22, 2010.
- HOTEZ; P. J.; WILKINS; P. P. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? **Plos Negl Trop Dis**, vol 3, n 3, p.1-4, 2009.
- MAIZELS, R.; YASDANBAKHSH, M. Immunoregulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Rev Immunol**, vol 3: 733-744, 2003.
- MOREAU, E.; CHAUVIN, A. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. **J Biomed Biotech**, vol 2010, p. 1-9, 2010.
- PINELLI, E.; DORMANS, J.; VAN DIE, I. *Toxocara* and Asthma in: **The Enigmatic Parasite**, UK: Cabi Publishing, 2006.
- PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; FONVILLE, M.; HAMILTON, C. M.; GIESSEN, J. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Exp Parasitol**, vol 115, p. 76-82, 2007.