

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

THAYSE BATISTA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DUAS LINHAGENS DE *Lactococcus*
lactis NA ANCILOSTOMOSE EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2016

THAYSE BATISTA MOREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DUAS LINHAGENS DE *Lactococcus lactis* NA ANCILOSTOMOSE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia
Orientação: Prof^a. Dr^a. Élide Mara Leite Rabelo
Coorientação: Dr^a Sílvia Regina Costa Dias

Belo Horizonte

2016

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG em colaboração com o Laboratório de Imunobioquímica - Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG, Laboratório TecnoGen – Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e o Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

Dedico este trabalho aos meus pais, à
minha irmã, ao Mateus, aos meus
amigos e a todos que colaboraram para
sua realização.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG.

À Élida, por aceitar o desafio de me orientar em uma nova linha de pesquisa no laboratório.

À Silvia, por me orientar e despertar o meu interesse sobre a pesquisa, principalmente pelo uso dos probióticos. Obrigada pelo carinho e dedicação.

À professora Ana Caetano e ao Laboratório de Imunobiologia pelo auxílio durante os experimentos.

Aos amigos Fernando, William, Talita e Bruna que tornaram a minha jornada mais leve e divertida. Obrigada por todas as risadas e trocas de experiência, tenho certeza que vocês contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos companheiros de laboratório, Vivian, Luciana Serafim, Luciana Werneck, Luciana Soares, Nayara, Carina, Ana Cristina, Júlia e Letícia.

Ao Carlos por sua prontidão em ajudar e sua dedicação ao cuidado dos hamsters, tratando-os com carinho e respeito.

À Gabriella por estar sempre disposta a ajudar, com muita eficiência e dedicação.

À Michelle que a cada dia se torna uma pessoa mais especial. Obrigada pelo seu bom humor e alegria, que torna qualquer ambiente mais fácil de estar.

À minha turma de mestrado, principalmente a Laura, Vanessa, Denise e Andressa, por estarem ao meu lado nesta caminhada.

Aos meus pais, Alencar e Vádna, que sempre me apóiam em minhas escolhas e me ajudam a crescer. Obrigada por acreditarem em mim e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À minha irmã Gabriela, que mesmo distante sempre esteve disposta a me ouvir e me ajudar a tomar as melhores decisões. Obrigada pelo seu apoio e carinho que sempre foram muito importantes na minha vida.

Ao meu companheiro e porto seguro Mateus, que esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por me fazer sentir forte e acreditar que eu sou capaz de tudo que sonhar.

Ao meu alelo Camila, que está ao meu lado há sete anos, em momentos importantes de autodescobrimento e coragem. Obrigada pelo carinho e por nossas conversas que me fazem crescer como pessoa.

À Mariana pela amizade e carinho, e principalmente por me auxiliar em vários momentos durante meus experimentos. Obrigada por me fazer enxergar a pesquisa com encantamento e esperança.

À Juliana pela amizade e companheirismo, nossas conversas e risadas tornaram o caminho mais leve.

À minha gatinha Frida que foi minha companheira, principalmente durante a escrita. Obrigada pelo carinho e amor.

RESUMO

A ancilostomose é uma doença tropical negligenciada que acomete cerca de 740 milhões de pessoas no mundo, sendo a principal causa de anemia em crianças e gestantes. Organismos probióticos atuam no trato gastrointestinal modulando a resposta imune de forma direta ou induzindo a tolerância oral a antígenos. A Hsp65 é uma proteína muito presente em ambientes inflamados, sendo inibida por células T_{REG} específicas. Essa molécula vem sendo utilizada para induzir a expansão deste tipo celular e conferir um ambiente menos propenso a inflamação em doenças com a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do uso de duas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO2118 na ancilostomose experimental, por duas abordagens distintas, usando protocolo para avaliar o feito da tolerância oral à Hsp65 (experimento I) e a modulação direta pelo *L. lactis lactis* NCDO2118 (experimento II) ambos em hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Ancylostoma ceylanicum*. No experimento I, os animais foram divididos em seis grupos: não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio M17 e infectado (T + I), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 contendo o plasmídeo vazio (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (Hsp65 + I). O tratamento foi realizado durante quatro dias, com administração da cultura *ad libitum* e após intervalo de sete dias, infecção com 50 larvas por via oral (gavagem). Esta infecção foi acompanhada durante 30 dias através da aferição de peso, hemograma, proteínas totais no soro e ovos por grama de fezes (O.P.G.). No dia da eutanásia foi realizada a recuperação de vermes adultos do intestino delgado e linfonodo mesentérico. Neste experimento não foi observado diferença entre os tratamentos nos parâmetros avaliados, não permitindo inferir que foi estabelecida a tolerância oral e que ela interferiu no curso da infecção. No experimento II, os animais foram divididos em grupos: não tratado e infectado (NT + I), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem iniciado com zero dia de infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) iniciado com zero dia de infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem iniciado aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) iniciado aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). Os tratamentos foram administrados durante quatro dias *ad libitum*. A infecção com 50 larvas infectantes ocorreu no dia zero em todos os grupos. A Infecção foi acompanhada por 30 dias e foram avaliados os parâmetros descritos anteriormente. Os grupos que foram tratados no dia zero da infecção apresentaram carga parasitária inferior aos demais grupos, interferindo nos demais parâmetros. Os grupos tratados com oito dias de infecção apresentaram uma carga parasitária maior que o controle, com seus parâmetros também sendo alterados em função disso. Este trabalho mostra que o protocolo utilizado para a indução da tolerância oral a Hsp65 não foi efetivo na ancilostomose, porém, a utilização de *L. lactis lactis* NCDO2118 pode interferir na carga parasitária do hospedeiro.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*, *Ancylostoma ceylanicum*, Hsp65.

ABSTRACT

Ancylostomiasis is a neglected tropical disease that affects about 740 million people worldwide and is the leading cause of anemia in children and pregnant women. Probiotic organisms, such *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO2118, act in the gastrointestinal tract by modulating the immune response directly or inducing oral tolerance to antigens. The HSP65 protein is highly present in inflamed environments being inhibited by specific TREG cells. This molecule has been used to induce growth of this cell type and to create an environment less susceptible to inflammation in diseases as ulcerative colitis and Crohn's disease. This study evaluated the effect of using *L. lactis* subsp *lactis* NCDO2118 in experimental ancylostomiasis, by two different approaches, using a protocol to assess the effect of oral tolerance to Hsp65 (experiment I) and by direct modulation of *L. lactis lactis* NCDO2118 (experiment II) both in hamster (*Mesocricetus auratus*) infected with *Ancylostoma ceylanicum*. In the first experiment, the animals were divided into six groups: untreated and uninfected (NT + NI), untreated and infected (NT + I), treated with M17 medium and infected (T + I), wild *L. lactis lactis* NCDO2118 and infected (NCDO + I), *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) and infected (NCDO R + I), *L. lactis lactis* NCDO2118 expressing Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) and infected (HSP65 + I). Treatment was conducted over four days, with the culture administrated to the animals *ad libitum*. After seven days, animals were orally infected with 50 larvae (via gavage). This infection was monitored for 30 days by measuring, the animal's weight; blood cells; total protein in serum and eggs per gram of feces (O.P.G.). On the day of euthanasia adult worms were recovered from the small intestine and mesenteric lymph node kept to later detection of cytokines. In this experiment, no difference was observed among treatments in the evaluated parameters, not allowing to infer that oral tolerance has been established and that it interfered with the course of infection. In the second experiment, the animals were divided into groups: untreated and infected (NT + I) treated with wild *L. lactis lactis* NCDO2118 initiated with zero days of infection (NCDO - 0), treated with *L. lactis lactis* NCDO2118 expressing Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) started with zero day infection (HSP65 - 0) treated with wild *L. lactis* initiated at eight days of infection (NCDO - 8) and treated with *L. lactis lactis* expressing Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) initiated at eight days of infection (HSP65 - 8). Treatments were administered for four days *ad libitum*. All groups were infected with 50 larvae on day zero. The infection was monitored for 30 days and the same parameters described above, were evaluated. The groups that were treated on day zero of infection showed a lower parasite load than the other groups, interfering with the other parameters evaluated. The groups treated with eight days of infection showed a higher parasite load compared to the control group with the related parameters also being changed accordingly. This study shows that the protocol used for the induction of Hsp65 oral tolerance was ineffective in ancylostomiasis, however, the use of *L. lactis lactis* NCDO2118 can interfere with parasite load in the host.

Keywords: *Lactococcus lactis*, *Ancylostoma ceylanicum*, Hsp65.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| ACT-G1 | Gamma-actina |
| ANOVA | Análise de variância |
| APC | <i>Antigen presenting cell</i> |
| CEUA | Comissão de ética no uso de animais |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| D.P.I. | Dias pós a infecção |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ES | Produtos de excreção e secreção |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FoxP3 | <i>Forkhead box P3</i> |
| GALT | <i>Gut-associated lymphoid tissue</i> |
| GRAS | <i>Generally Recognized as Safe</i> |
| HPRT | Hipoxantina fosforibosiltransferase |
| Hsp | <i>Heat shock protein</i> |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IFN- γ | Interferon - gama |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG ₁ | Imunoglobulina G ₁ |

| | |
|-------------------|---|
| IgG ₄ | Imunoglobulina G ₂ |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IL-4 | Interleucina-4 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-13 | Interleucina-13 |
| KCl | Cloreto de potássio |
| kg | Quilograma |
| L1 | Larva de primeiro estágio |
| L2 | Larva de segundo estágio |
| L3 | Larva de terceiro estágio |
| L4 | Larva de quarto estágio |
| LM | Linfonodo mesentérico |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| M | Molar |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| mM | Milimolar |
| mL | mililitro |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade |
| ng | Nanograma |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | <i>Phosphate buffer saline</i> |
| PP | Placa de Peyer |
| qPCR | <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> |

| | |
|-------------------|--|
| q.s.p. | Quantidade suficiente para |
| RT-PCR | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor beta</i> |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| TLR-2 | <i>Toll like receptor-2</i> |
| TLR-4 | <i>Toll like receptor-4</i> |
| TNF- α | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| iT _{REG} | Célula T _{REG} induzida |
| nT _{REG} | Célula T _{REG} natural |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|------------------|
| % | Porcentagem |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| Δ | Delta |
| ® | Marca registrada |
| °C | Graus Celsius |
| μ | Micro |
| <i>g</i> | Gravidade |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Indução da tolerância oral..... | 22 |
| Figura 2. Interações celulares que induzem um mecanismo de regulação através de reação cruzada em células T responsivas a Hsp próprias e a outras Hsp. | 26 |
| Figura 3. Divisão dos grupos no experimento I. | 34 |
| Figura 4. Delineamento experimental no experimento I. | 34 |
| Figura 5. Divisão dos grupos no experimento II. | 35 |
| Figura 6. Delineamento experimental no experimento II..... | 36 |
| Gráfico 1. Consumo da cultura no experimento I..... | 43 |
| Gráfico 2. Variação de peso no experimento 1A..... | 44 |
| Gráfico 3. Variação de peso no experimento 1B..... | 45 |
| Gráfico 4. Ovos por grama de fezes (O.P.G.) no experimento I. | 46 |
| Gráfico 5. Contagem total de hemácias no experimento I..... | 48 |
| Gráfico 6. Hemoglobina no experimento I. | 49 |
| Gráfico 7. Volume globular médio no experimento I. | 50 |
| Gráfico 8. Contagem total de leucócitos no experimento I. | 51 |
| Gráfico 9. Proteínas totais no experimento I. | 52 |
| Gráfico 10. Expressão gênica dos genes referentes às citocinas no experimento I..... | 54 |
| Gráfico 11. Consumo da cultura no experimento II. | 55 |
| Gráfico 12. Variação de peso no experimento II..... | 56 |
| Gráfico 13. Ovos por grama de fezes (O.P.G.) no experimento II..... | 57 |
| Gráfico 14. Contagem total de hemácias no experimento II. | 58 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 15. Hemoglobina no experimento II..... | 59 |
| Gráfico 16. Volume globular médio no experimento II. | 60 |
| Gráfico 17. Contagem total de leucócitos no experimento II..... | 60 |
| Gráfico 18. Proteínas totais no experimento II..... | 61 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Sequência de iniciadores. | 41 |
| Tabela 1. Recuperação de vermes adultos separados por sexo no experimento 1A..... | 47 |
| Tabela 2. Recuperação de vermes adultos separados por sexo no experimento 1B..... | 47 |
| Tabela 3. Recuperação de vermes adultos separados por sexo. | 58 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 Ancilostomose | 19 |
| 1.2 Tolerância oral | 21 |
| 1.3 Probióticos | 23 |
| 1.4 Proteínas de choque térmico – Hsp..... | 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 29 |
| 3. OBJETIVOS..... | 31 |
| 3.1 Objetivo geral | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1 Modelo experimental | 33 |
| 4.2 Linhagens de <i>L. lactis lactis</i> NCDO2118 | 33 |
| 4.3 Delineamento experimental | 33 |
| 4.3.1 Experimento I..... | 33 |
| 4.3.2 Experimento II..... | 35 |
| 4.4 Procedimentos técnicos..... | 36 |
| 4.4.1 Cultivo das linhagens de <i>L. lactis</i> | 36 |
| 4.4.2 Indução da linhagem de <i>L. lactis</i> produtora de Hsp65 | 36 |
| 4.4.3 Consumo da cultura..... | 37 |
| 4.4.4 Peso | 37 |
| 4.4.5 Infecção por <i>Ancylostoma ceylanicum</i> | 37 |
| 4.4.6 Parâmetros parasitológicos..... | 37 |
| 4.4.7 Coleta de sangue..... | 37 |
| 4.4.8 Recuperação do soro | 38 |
| 4.4.9 Hemograma | 38 |
| 4.4.10 Parâmetros bioquímicos | 39 |
| 4.4.11 Eutanásia, necropsia e recuperação de vermes adultos | 39 |
| 4.4.12 Avaliação da expressão de genes referentes às citocinas | 39 |
| 4.4.13 Análises estatísticas | 41 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.1 | Experimento I | 43 |
| 5.1.1 | Consumo da cultura..... | 43 |
| 5.1.2 | Peso | 43 |
| 5.1.3 | Parâmetros parasitológicos..... | 45 |
| 5.1.4 | Hemograma | 47 |
| 5.1.5 | Parâmetros bioquímicos | 52 |
| 5.1.6 | Avaliação da expressão de genes referentes às citocinas | 53 |
| 5.2 | Experimento II | 55 |
| 5.2.1 | Consumo da cultura..... | 55 |
| 5.2.2 | Peso | 55 |
| 5.2.3 | Parâmetros parasitológicos..... | 56 |
| 5.2.4 | Hemograma | 58 |
| 5.2.5 | Parâmetros bioquímicos | 61 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 63 |
| 7. | CONCLUSÕES | 72 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ancilostomose

A ancilostomose é uma doença parasitária, causada por parasitos da família Ancylostomatidae que atinge cerca de 740 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a ancilostomose como uma doença negligenciada, uma vez que está presente, principalmente, em países com baixo desenvolvimento econômico, que possuem condições sanitárias precárias e população com baixo acesso ao sistema de saúde (Asaolu & Ofoezie, 2003; OMS, 2012).

O *Ancylostoma ceylanicum* é um ancilostomídeo que possui uma distribuição mais restrita à Ásia, sendo considerada a segunda espécie de maior importância nesta região, com uma prevalência de 10,2% na Tailândia (Jiraanankul *et al.*, 2011) e 26,6% no Camboja (Inpankaew *et al.*, 2014). Este parasito, além de humanos, infecta animais domésticos, como cães e gatos, que são reservatórios do mesmo e contribuem para altas prevalências destes em regiões rurais (Traub, 2013).

Estes parasitos possuem um ciclo de vida direto, não necessitando de hospedeiro intermediário. Os ovos não embrionados são liberados, através das fezes, no meio ambiente e ali, em condições ideais de oxigenação, temperatura e umidade, embrionam-se, dando origem a uma larva de primeiro estágio (L1), que possui esôfago rabditóide. O ovo se rompe, liberando a L1 no ambiente e, mais uma vez, em condições ambientais favoráveis, sofre muda para o segundo estágio (L2) e, posteriormente, para terceiro estágio (L3), que é a forma infectante do parasito. As larvas infectantes possuem o esôfago filarióide e movimentação ativa, e secretam enzimas que facilitam a penetração na pele do hospedeiro (Soulsby, 1965; Hotez *et al.*, 2004).

A transmissão do parasito ocorre através da penetração ativa na pele e mucosas. Após a penetração, o parasito migra pelos tecidos até atingir o pulmão. No pulmão, ocorre a muda para o quarto estágio (L4) e, posteriormente, a migração pela árvore brônquica. Ao chegar à traquéia, o parasito é deglutido, alcançando o intestino delgado (duodeno e jejuno), onde se fixa e passa a indivíduo adulto jovem que mais tarde atinge a maturidade sexual. Adultos jovens se encontram e, após a cópula, as fêmeas fazem a postura dos ovos na luz intestinal e, estes, são liberados junto com as fezes pelo hospedeiro. O período pré-patente é de, aproximadamente, 30 dias (Bethony *et al.*, 2006; Soulsby, 1965). A infecção pode também ocorrer pela via oral, através da ingestão das larvas L3, e nesse caso, não ocorre o ciclo pulmonar. As larvas sofrem as

mudas nas vilosidades do intestino delgado, e se transformam em vermes adultos (Anderson, 1992).

Clinicamente, a ancilostomose é uma doença que causa anemia do tipo ferropriva, decorrente dos hábitos hematofágicos dos parasitos adultos e devido a pequenas hemorragias na mucosa intestinal. Estas hemorragias são causadas pela constante mudança de lugar que o parasito realiza, decorrente da reação inflamatória local. A reação inflamatória, além de estimular esta mudança, também causa modificações na mucosa, levando a deformação das vilosidades, e, conseqüentemente, prejudicando a absorção de nutrientes, o que acentua ainda mais a anemia (Stoltzfus *et al.*, 1997).

A prevalência da ancilostomose é mais recorrente em homens que em mulheres, uma vez que estão mais frequentemente expostos ao parasito, durante o trabalho rural. No entanto, mulheres e crianças possuem reservas de ferro menores, deixando-as mais suscetíveis a infecção (Hotez *et al.*, 2004). Um estudo realizado por Jardim-Botelho *et al.*, (2008) mostrou que crianças parasitadas com ancilostomídeos ou *Ascaris lumbricoides* apresentavam menor desenvolvimento cognitivo, quando comparadas a crianças não parasitadas. Além disso, os autores revelaram que crianças poliparasitadas apresentavam resultados ainda piores, quando comparadas a crianças com apenas uma espécie de parasito. Estes resultados se relacionam com a deficiência de oxigenação do cérebro, causada pelo baixo nível de ferro e, conseqüentemente, de hemoglobina, principal transportador de oxigênio, causando a perda de concentração e a dificuldade de aprendizado.

Em mulheres, a anemia é uma das principais causas de complicações durante a gravidez, como o aumento das taxas de mortalidade materna e perinatal, parto prematuro e baixo peso do recém nascido (Obiezue *et al.*, 2013). Aproximadamente um terço (44 milhões) destas mulheres estão infectadas com ancilostomídeos, causando impacto no desenvolvimento do feto. Esses dados corroboram com a recomendação das principais organizações de saúde mundiais para a realização de exames de fezes na rotina de pré-natal de gestantes de áreas endêmicas, assim como o tratamento e a suplementação com ferro (Larocque *et al.*, 2005).

A ancilostomose induz uma resposta imunológica característica de helmintos, inicialmente do tipo T_H1 e posteriormente do tipo T_H2/T_{REG} , que coincide com o início da ovoposição. Estas reações são estágio-específico, apresentando perfis diferentes ao longo da infecção (Hawdon, 1996). Ao penetrar na pele, o ancilostomídeo é

reconhecido pelo sistema imune, ativando eosinófilos e neutrófilos presentes no tecido. Durante a passagem pelo pulmão, ocorre a destruição de larvas pelos eosinófilos, fator que determinará a carga parasitária (Loukas, 2001). O início da ovoposição coincide com a produção de citocinas responsáveis por alterações fisiológicas com o propósito de expulsão do parasito (aumento do peristaltismo e da produção de muco, e o recrutamento de células de caráter inflamatório, como eosinófilos e mastócitos), o que caracteriza uma resposta de perfil T_H2 (Gaze *et al.*, 2012; Mendez *et al.*, 2005).

A inflamação da mucosa intestinal é causada, principalmente, pela degranulação de proteases presentes em mastócitos que degradam o colágeno cuticular, expondo mais antígenos do parasito o que intensifica ainda mais a resposta imune. A resposta humoral em humanos é caracterizada pela presença de IgE, IgG₁ e IgG₄, que atuam, principalmente, em produtos de excreção e secreção liberados pelo parasito. Após o tratamento, estes anticorpos são reduzidos (Loukas, 2001).

As drogas de escolha para o tratamento da ancilostomose são comuns a outras parasitoses: benzimidazol, mebendazol e albendazol. Os tratamentos habituais são realizados em grande escala, com a administração em massa, principalmente em áreas de baixo desenvolvimento sócioeconômico (Bennett & Guyatt, 2000; Hu *et al.*, 2013).

A ancilostomose humana pode ser estudada em hamsters (*Mesocricetus auratus*) que reproduzem a doença que ocorre em humanos. Neste modelo, a infecção leva os animais a alterações clínicas típicas da doença em humanos, especialmente a anemia e a perda de peso (Bungiro Jr *et al.*, 2003).

Atualmente, este modelo tem sido utilizado para a caracterização da resposta imunológica frente à infecção, com a aplicação de técnicas de biologia molecular, como a RT-PCR (Mendez *et al.*, 2005) que permite avaliar a expressão de genes referentes às citocinas, haja vista que este modelo enfrenta dificuldades na dosagem direta, devido à falta de kits específicos.

1.2 Tolerância oral

Durante a seleção tímica, as células que reagem a antígenos próprios sofrem apoptose, porém, uma parcela das células T CD4⁺ que expressam o fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3⁺) se diferenciam em células T regulatórias e migram para a periferia, para controlar os ambientes, principalmente, das mucosas, como a mucosa gastrointestinal. (Abbas *et al.*, 2012; Pabst & Mowat, 2012; Wang *et al.*, 2014).

O trato gastrointestinal (TGI) é a maior porta de entrada de antígenos no nosso corpo, pois através da alimentação somos expostos a diferentes moléculas presentes em alimentos e em microrganismos (Pabst & Mowat, 2012). Anualmente, entramos em contato com aproximadamente 30 quilos de proteínas ao longo dos 300 m² de tecido mucoso (Wang *et al.*, 2014). Para lidar com esta constante estimulação, o trato intestinal conta com um sistema imunológico associado, o que o torna o maior órgão linfóide do corpo. Este sistema imune, conhecido como GALT, do inglês *gut-associated lymphoid tissue*, possui órgãos linfáticos periféricos, como o linfonodo mesentérico (LM) e as placas de Peyer (PP). Nestes órgãos, ocorrem a estimulação da produção de células T regulatórias induzidas (iT_{REG}), que são essenciais para o desenvolvimento da tolerância oral (Murphy *et al.*, 2010).

A tolerância oral é definida pela supressão da resposta celular e/ou humoral a antígenos adquiridos através da via oral (Faria & Weiner, 2006). Este evento imunológico pode ser induzido de duas maneiras, (1) através da administração de altas dosagens de antígenos, que levará a anergia de células inflamatórias do tipo T_H1, que é a falta de resposta funcional destas células ou a deleção que é a morte apoptótica; ou (2) por meio da administração de baixas dosagens de antígenos (na alimentação, por exemplo), ou através da interação com organismos residentes no TGI, que levará à indução de células T_{REG} (Figura 1) (Weiner, 1994). Esta segunda forma de indução permite que o sistema imune monte uma resposta imunológica específica, sem causar dano ao hospedeiro (Cobelens *et al.*, 2002).

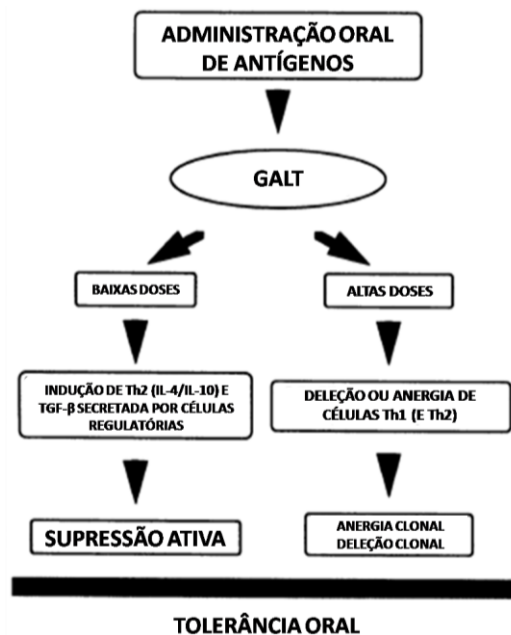


Figura 1. Indução da tolerância oral. Figura adaptada de (Weiner, 1994).

Esses antígenos são captados pelas células M (células micropregas) associadas a folículos linfóides presentes no epitélio intestinal. Essas células são capazes de fazer a transcitose, ou seja, elas são responsáveis por transportar moléculas do lúmen intestinal, por meio de vesículas capazes de atravessar a célula, para a lâmina própria (Mabbott *et al.*, 2013). Após alcançar o espaço extracelular, a molécula é captada por células dendríticas CD103⁺, típicas da lâmina própria, que migram até a placa de Peyer, onde é apresentada a linfócitos T naíve residentes. Estas células dendríticas são frequentemente recrutadas para a lâmina própria pela liberação, através de células epiteliais, de quimiocinas CCL20 e CCL9 que são reconhecidas pelos receptores CCR6 e CCR1. Além disso, as células dendríticas na lâmina própria, em repouso, respondem fracamente a estímulos bacterianos, produzindo IL-10 ao invés de IL-12, que auxilia na prevenção de células T inflamatórias e promovendo a geração de células regulatórias no linfonodo mesentérico. Para que isso ocorra, há a necessidade de ácido retinóico produzido pelas células dendríticas, e do TGF- β produzido pelos enterócitos. (Murphy *et al.*, 2010).

Os linfócitos T ativados nos órgãos linfáticos periféricos caem na circulação, percorrendo o corpo todo. Porém, estes linfócitos possuem receptores de migração intestino-específicas, no caso o CCR9 para o intestino delgado, que foram induzidas pelas células dendríticas. Estes receptores direcionam o linfócito para a mucosa do intestino delgado que expressa CCL25, que não é expresso em outra área, tornando a resposta mais específica. Estes linfócitos também podem ser atraídos para outras mucosas, tornando o efeito dessa indução sistêmico, mas este fenômeno ocorre com menor frequência (Abbas *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2010).

1.3 Probióticos

Probióticos são definidos como grupo de organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, próprias a cada linhagem, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (Goldin & Gorbach, 2008). Um grupo amplo de probióticos engloba as bactérias lácticas, que são Gram-positivas e possuem o ácido láctico como um dos principais produtos do seu metabolismo de carboidratos (Wells & Mercenier, 2008).

As bactérias lácticas mais conhecidas são do gênero *Lactobacillus* sp., e *Lactococcus* sp., que são utilizadas na fermentação de alimentos, como queijos e iogurtes. Este grupo de bactéria não possui LPS (lipopolissacarídeos) na sua parede

celular, o que as torna menos imunogênicas, além de serem bactérias não invasivas e livres de toxinas e, por isso, são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, possuindo o status GRAS (*generally recognized as safe*), que é dado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para organismos seguros para o consumo humano (Adams & Marteau, 1995; Mercenier & Grangette, 2000).

Devido às suas características propícias ao consumo humano, as bactérias lácticas têm sido utilizadas como vetores vivos, para a produção de proteínas recombinantes. *Lactococcus lactis* é uma das espécies mais utilizadas, por ser bem caracterizada e ter seu genoma completamente sequenciado, o que permite a sua utilização como vetor de citocinas (Hanson *et al.*, 2014; Zurita-Turk *et al.*, 2014) e proteínas e enzimas (Baca-Estrada *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2010). Além disso, esta espécie é de fácil manipulação, pode ser produzida em larga escala e possui fácil administração oral. (De Azevedo *et al.*, 2012; Mercenier & Grangette, 2000). Porém, *L. lactis* não pode ser considerado oficialmente um probiótico, pois não adere à parede intestinal e sua taxa de sobrevivência no intestino é baixa. Entretanto, devido ao seu potencial imunorregulatório foi considerada neste trabalho como “tipo-probiótica”.

Vários tipos de moléculas estão sendo produzidas como proteínas recombinantes, expressas por bactérias, principalmente para a modulação direcionada do sistema imune, através do endereçamento feito por estes organismos. Dentre elas, as proteínas de choque térmico têm sido frequentemente escolhidas para desenvolver este papel, pois são conservadas e imunogênicas (Santos *et al.*, 2011).

Vários trabalhos desenvolvidos com este organismo são descritos na literatura. Luerce *et al.*, (2014) demonstraram a modulação da produção de citocinas anti-inflamatórias pelo *L. lactis lactis* NCDO2118 em camundongos com colite induzida.

Oliveira-Sequeira *et al.*, (2014) demonstrou diminuição da carga parasitária em animais infectados com *Strongyloides venezuelensis* previamente tratados com *Bifidobacterium animalis*. Assim como Basualdo *et al.*, (2007) que ao tratar camundongos com *Enterococcus faecalis* e, posteriormente, infectar com *Toxocara canis*, recuperou um menor número de larvas no fígado e pulmões.

1.4 Proteínas de choque térmico – Hsp

As Hsp (*heat shock protein*) são chaperonas que protegem outras proteínas contra danos causados por estresse celular, como aumento de temperatura, estresse oxidativo, inflamação, infecção viral, dentre outros. Além disso, as Hsp também

possuem papel importante na ativação da resposta imune inata e adaptativa, através da ativação de células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos (De Azevedo *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 1992).

As Hsp são classificadas de acordo com o seu peso molecular, sendo divididas, principalmente, em seis famílias, Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100. Estas proteínas são muito conservadas, possuindo correspondência entre vários organismos diferentes (Rajesh & Moudgil, 2010; Rezende *et al.*, 2013).

A Hsp65 de *Mycobacterium leprae* possui homologia com a Hsp60 dos seres humanos, sendo utilizada em trabalhos que visam extrapolar o uso dessa proteína em tratamentos e prevenções de diversas patologias inflamatórias humanas (Marengo *et al.*, 2008).

As proteínas Hsp são antígenos imunodominantes e estão ligadas à manutenção da homeostase, através da manutenção e reparo de tecidos, bem como o controle da expansão clonal de células inflamatórias. Isto ocorre através da interação de células B e T reativas a Hsp próprias ou *self*-Hsp com células reguladoras. Durante a seleção tímica as proteínas Hsp são altamente expressas, porém, não ocorre a deleção clonal, podendo levar a geração de células T_{REG} naturais (nT_{REG}), além de auxiliar na sobrevivência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3 – T_{REG} (Eden *et al.*, 2005).

As Hsp próprias são moléculas intracelulares que em estresse celular são transportadas para o meio extracelular, onde são apresentadas a linfócitos TCD4⁺, gerando células específicas, que quando transferidas para modelo animal, protegem contra a artrite induzida, através da produção de INF- γ , IL-4 e IL-10 (Durai *et al.*, 2004; Eden *et al.*, 2005).

Esta ativação das células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas ocorre, principalmente, por receptores do tipo Toll. Alguns estudos demonstram que essa apresentação pode ser mediada por contaminantes de LPS, porém com rotas de sinalização diferentes. As Hsp necessitam de endocitose, enquanto o mecanismo de ação do LPS seria através da superfície celular (Eden *et al.*, 2005; Vabulas, 2001)

As células T que reagem com Hsp próprias são aquelas que escaparam da seleção tímica e que também reagem as Hsp microbianas, devido a sua homologia com moléculas de mamíferos. Estas células são importantes na manutenção da homeostase do organismo, pois tem papel fundamental na tolerância imunológica, sistêmica e local. Este tipo celular é frequentemente exposto a baixas quantidades de Hsp provenientes da

microbiota intestinal, promovendo a expansão de células T_{REG} e tornando este ambiente mais tolerogênico (Eden *et al.*, 2005).

Além do contato com o ambiente, essas células também recebem outros estímulos, como a de células apresentadoras de antígenos, que em condições de estresse, regulam, positivamente, a expressão de *self*-Hsp e as apresentam para estas células, onde, na ausência de coestimulação dirigem as células T a um estado de anergia (Figura 2) (Eden *et al.*, 2005).

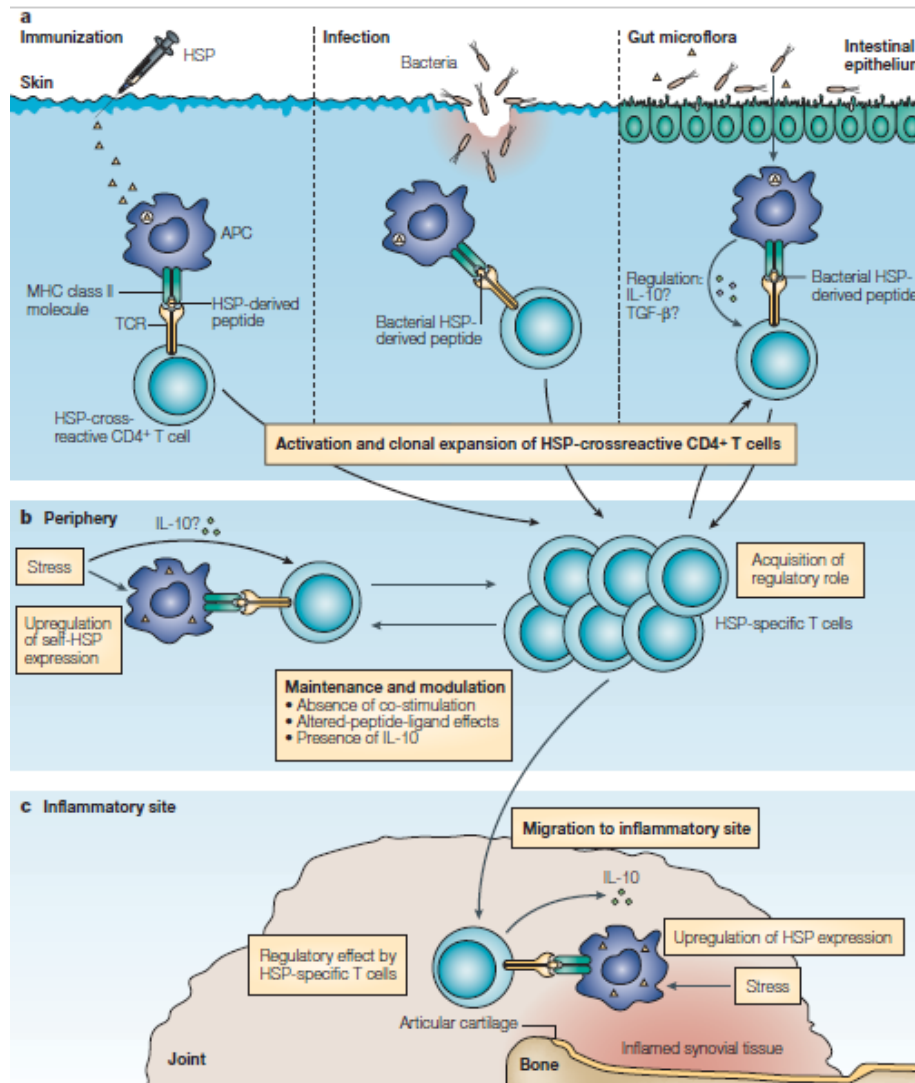


Figura 2. Interações celulares que induzem um mecanismo de regulação através de reação cruzada em células T responsivas a Hsp próprias e a outras Hsp. As células T que apresentam reação cruzada a outras Hsp podem ser ativadas e expandidas após a exposição à Hsp microbianas da microbiota ou durante uma infecção. Isso também pode ocorrer de forma artificial, através de imunização (A). Na periferia, a manutenção e/ou a modulação desse repertório pode ocorrer por meio de células T reguladas positivamente por Hsp próprias ou, na ausência de coestimulação, por APC's (B). Essas células T Hsp específicas, no sítio de inflamação, exercem suas funções regulatórias, como a liberação de IL-10 (C).
Fonte: Eden, *et al.*,2005.

O efeito imunomodulatório destas proteínas já foi relatado em trabalhos utilizando modelos experimentais de doenças, tais como aterosclerose e colite (Gardlik *et al.*, 2012; Maron *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que as Hsp induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , óxido nítrico, IL-12 e IL-15 de macrófagos, através do reconhecimento por receptores como TLR-4, TLR-2, CD14 e CD91 (Kaul & Thippeswamy, 2011). Em contrapartida, Zanin-Zhorov *et al.*, (2003) demonstraram que o tratamento de células T com Hsp60 inibiu a secreção de citocinas do tipo T_H1, como INF- γ e TNF- α , e estimulou a secreção de citocinas do tipo T_H2 como IL-4, IL-10 e IL-13.

Diante deste grande potencial imunorregulatório, as Hsp se tornam uma grande ferramenta para estudos que visam novas alternativas para doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, principalmente, utilizando linhagens que expressem Hsp65.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A ancilostomose é uma doença de grande relevância no cenário mundial, sendo uma das principais causas de anemia em crianças e gestantes com estado nutricional precário. A presença do parasito na mucosa intestinal causa lesões não só pela sua aderência ao epitélio, mas devido às reações inflamatórias aos seus produtos de metabolismo que causam microerosões do epitélio, o que leva à diminuição da capacidade de absorção de nutrientes.

Além da ancilostomose, outras doenças gastrointestinais causam lesões do epitélio intestinal, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Para estas últimas doenças, novas alternativas de tratamento já estão sendo testadas, e, dentre elas, o uso de microrganismos que são capazes de modular a resposta imune através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Esses microrganismos também estão sendo utilizados como vetores de proteínas recombinantes capazes de induzir um estado de tolerância oral, uma vez que aumentam o número de células reguladoras na mucosa intestinal, tornando este ambiente menos propenso a inflamação.

Microrganismos probióticos já são bem conhecidos da população, devido ao seu emprego na indústria alimentícia. Algumas espécies (cepas específicas) são utilizadas comercialmente para a recuperação da microbiota intestinal após surtos de diarreias, e várias outras estão sendo estudadas para aplicação em diversos tipos de enfermidades, dentre elas, as parasitoses.

Tendo em vista que os tratamentos quimioterápicos para ancilostomose não impedem reinfecções e que ainda não existe uma vacina efetiva, o uso de bactérias imunomoduladoras se apresenta como uma possível estratégia para a diminuição da patogenia dessa parasitose. Sendo assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar se o uso de *L. lactis lactis* NCDO2118, bem como a proteína recombinante Hsp65, na ancilostomose experimental poderia trazer benefícios ao hospedeiro, reduzindo a patogenia da doença no modelo experimental.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração de *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e de *L. lactis lactis* NCDO2118 modificado geneticamente para a expressão da proteína Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) na ancilostomose experimental, utilizando o hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o efeito de um protocolo de indução de tolerância oral à proteína Hsp65 na ancilostomose experimental;

3.2.2 Avaliar o efeito das duas linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118 administradas em diferentes fases da infecção;

3.2.3 Comparar os parâmetros parasitológicos dos grupos tratados, comparativamente aos grupos não tratados;

3.2.4 Avaliar o peso de animais tratados com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) comparando-os com animais não tratados;

3.2.5 Avaliar a expressão de citocinas de animais tratados com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) comparando-os com animais não tratados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho seguiu as recomendações da Lei nº 11.794 (2008), que trata do uso científico de animais, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo 30/2015.

4.1 Modelo experimental

Para este trabalho foram utilizados hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* fêmeas com idade variando entre 4-5 semanas, nascidas no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Estes animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular, acondicionados em gaiolas plásticas, em grupos de seis indivíduos, em condições ambientais controladas (temperatura e fotoperíodo). Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab®) e água *ad libitum*, exceto para os grupos tratados.

4.2 Linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118

As linhagens de *L. lactis lactis* utilizadas foram cedidas pelo Laboratório TecnoGen do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Neste trabalho, foram utilizadas duas linhagens de *L. lactis* descritas a seguir:

- a) *L. lactis lactis* NCDO2118: bactéria “selvagem”.
- b) *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc): bactéria modificada geneticamente por (De Azevedo *et al.*, 2012) com plasmídeo vazio.
- c) *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:hsp65): bactéria modificada geneticamente por (De Azevedo *et al.*, 2012), expressando a proteína Hsp65.

4.3 Delineamento experimental

4.3.1 Experimento I

Este experimento avaliou o efeito da tolerância oral a Hsp65 induzida por *L. lactis lactis* recombinante expressando esta proteína. Foram realizados dois experimentos seguindo o mesmo desenho experimental a fim de confirmar os resultados obtidos, denominados experimento 1A e 1B, porém, no experimento 1B o grupo NCDO R foi suprimido.

Foram formados grupos de seis animais (Sampaio, 2015) divididos aleatoriamente, conforme a Figura 3.

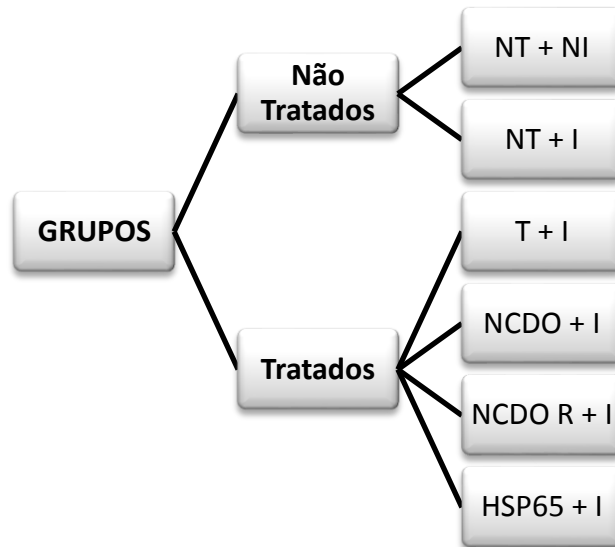


Figura 3. Divisão dos grupos no experimento I. Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 plasmídeo vazio (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

Os grupos tratados receberam os meios de cultura (com ou sem o microrganismo) *ad libitum* durante quatro dias, sendo as garrafas substituídas a cada 24 horas. Sete dias após o final do tratamento, os animais foram infectados com aproximadamente 50 L3, via oral (gavagem) e acompanhados ao longo de 30 dias (Figura 4). Os animais foram pesados semanalmente e a coleta de sangue ocorreu aos 15 e 30 dias após a infecção. A partir do décimo dia de infecção, exames de fezes foram realizados a cada dois dias até o final do experimento.

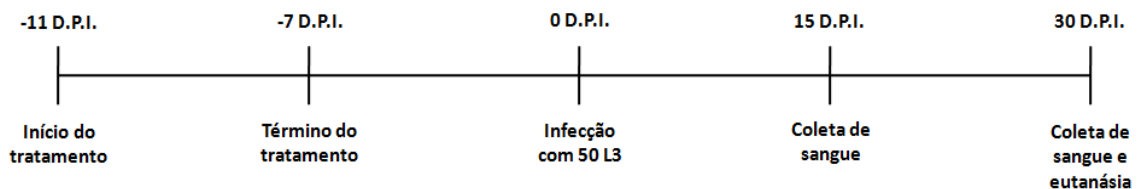


Figura 4. Delineamento experimental no experimento I. D.P.I. – dias pós infecção.

Como descrito adiante, trinta dias pós a infecção (D.P.I.) os animais foram eutanasiados e, na ocasião, foram retirados o intestino delgado (para a recuperação dos vermes adultos) e o linfonodo mesentérico (para avaliar a expressão de citocinas).

4.3.2 Experimento II

O segundo experimento teve como objetivo avaliar o efeito da introdução do *L. lactis* NCDO2118 (selvagem e recombinante), simultaneamente à infecção dos hamsters com *A. ceylanicum* (dia zero) e o efeito após oito dias de infecção, (quando já são encontrados adultos jovens no intestino).

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos de seis animais (Sampaio, 2015), conforme Figura 5.

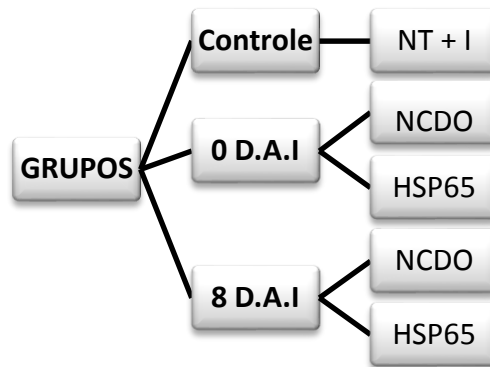


Figura 5. Divisão dos grupos no experimento II. Não tratado e infectado (NT + I), tratado com *L. lactis* *lactis* NCDO2118 selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. Ictis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXy/T:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lacti lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXy/T:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8).

Todos os grupos foram infectados com aproximadamente 50 L3 por via oral (gavagem) e após meia hora, aos grupos NCDO – 0 e HSP65 – 0 foi oferecida a cultura, que permaneceu disponível por quatro dias consecutivos, sendo a garrafa substituída a cada 24 horas. Os demais grupos (NCDO – 8 e HSP65 – 8) iniciaram o consumo da cultura oito dias após da infecção, seguindo o mesmo protocolo de tratamento.

Os grupos foram acompanhados por 30 dias, com pesagens semanais e coleta de sangue aos 15 e 30 dias após a infecção. A partir do décimo dia de infecção, exames de fezes foram realizados a cada dois dias até o final do experimento (Figura 6).

A eutanásia ocorreu com 30 dias, onde houve a recuperação dos vermes adultos do intestino delgado.



Figura 6. Delineamento experimental no experimento II. Aos 0 D.P.I. todos os grupos foram infectados com 50 L3, e após meia hora, iniciou a administração da cultura para os grupos NCDO – 0 e HSP65 – 0 por quatro dias consecutivos. Aos 8 D.P.I., os grupos NCDO – 8 e HSP65 – 8 iniciaram o tratamento com as culturas. D.A.I – Dias pós infecção.

4.4 Procedimentos técnicos

4.4.1 Cultivo das linhagens de *L. lactis*

Para o cultivo das linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118, utilizou-se o meio M17 (Fluka) estéril, suplementado com 0,5% de glicose ou com 1% de xilose (GM17 e XM17, respectivamente). Com exceção da linhagem NCDO2118 selvagem, foi adicionado 10 µg/mL de cloranfenicol (Sigma) ao meio. As bactérias foram cultivadas em estufa a 30° C, sem agitação, por 18 horas.

4.4.2 Indução da linhagem de *L. lactis* produtora de Hsp65

Alíquotas das linhagens *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem, *L. lactis lactis* NCDO2118 contendo o plasmídeo vazio (pXy/T:SEC:nuc) e *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXy/T:SEC:hsp65) foram inoculadas em GM17, onde apenas os meios destinados às linhagens geneticamente modificadas receberam 10 µg/mL de cloranfenicol. Em seguida, os inóculos permaneceram em estufa a 30°C, sem agitação, por 18 horas.

O volume final da cultura induzida depende do número de animais e do volume que é consumido. Para hamsters, o volume individual estimado é de 25 mL de cultura por dia (PACANARO, 2013), sendo o volume total de 150 mL/grupo/dia.

Foi feito o inóculo de 15µL da cultura crescida *over night*, em 150 mL de XM17, acrescido de 10 µg/mL de cloranfenicol, exceto para a linhagem selvagem. A cultura permaneceu em estufa a 30°C, sem agitação, por 18 horas (De Azevedo *et al.*, 2012). As culturas foram administradas como descrito anteriormente.

4.4.3 Consumo da cultura

A avaliação do consumo da cultura foi realizada através da medição, em proveta, do volume consumido por dia em cada grupo, por meio da relação mL/animal.

4.4.4 Peso

O peso corpóreo dos animais foi expresso em grama e avaliado, individualmente, uma vez por semana, ao longo de todo o período experimental.

4.4.5 Infecção por *Ancylostoma ceylanicum*

As larvas infectantes de *A. ceylanicum* (L3) foram obtidas através de coprocultura realizada com fezes de animais, experimentalmente infectados, e mantidos no laboratório. Para isso, as fezes foram homogeneizadas em água, misturadas em vermiculita e mantidas em estufa 27⁰C, por sete dias. Para a recuperação das larvas, a coprocultura foi submetida ao método Baermann Moraes modificado por *Barçante et al.*, (2003). As larvas recuperadas foram contadas e lavadas em PBS (*Phosphate buffer saline*) estéril, de forma que a cada 200 µL de solução, fossem encontradas cerca de 50 L3 utilizadas na infecção, via oral (gavagem).

4.4.6 Parâmetros parasitológicos

4.4.6.1 Número de ovos por grama de fezes (O.P.G.)

O número de ovos por grama de fezes eliminado pelos animais infectados foi realizado através técnica modificada de Gordon & Whitlock (1939). As amostras se constituíram de um “pool” de fezes de cada grupo, coletado a cada dois dias, a partir do décimo dia de infecção até a eutanásia.

4.4.7 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada através de punção venosa sublingual, descrita por Heimann *et al.*, (2009). Os animais foram submetidos à anestesia com 80 mg/kg de cetamina associada a 15 mg/kg de xilazina, administrada pela via intraperitoneal, conforme recomendação do CEUA/ UFMG. Duas amostras de sangue foram coletadas,

com e sem anticoagulante (EDTA 0,5M), para realização do hemograma completo e testes bioquímicos, respectivamente.

4.4.8 Recuperação do soro

Para a realização de testes bioquímicos o soro foi obtido por meio do sangue coletado sem anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o soro foi coletado e transferido para outro tubo e, após a utilização nos testes, foi congelado a -20°C.

4.4.9 Hemograma

As análises hematológicas foram realizadas manualmente no experimento 1A e no experimento II (metodologia descrita a seguir). No experimento 1B as análises foram realizadas por meio de leitura automatizada (AbacusVet Junior Hematology Analyzer), realizada no Laboratório de Patologia Clínica, da Escola de Veterinária da UFMG.

4.4.9.1 Contagem total de hemácias

Para a contagem de hemácias, a amostra foi preparada com solução diluidora (3,8g de Citrato de sódio, 2,0 mL de Formaldeído a 37% e 100 mL q.s.p.), na concentração 1:200 e contada em microscópio na câmara de Neubauer. Foram contadas as células dos cinco campos do quadrante central.

4.4.9.2 Contagem total de leucócitos

Para a contagem de leucócitos, a amostra foi diluída à concentração 1:20 em solução de Turk (1,0 mL solução aquosa de violeta genciana 1%, 1,5 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada q.s.p.). Foram contados os quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer.

4.4.9.3 Hemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada através de kit comercial da marca Doles, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.9.4 Volume globular médio

O volume globular médio foi realizado preenchendo o tubo de micro hematócrito com o sangue, vedando uma das extremidades com massinha de modelar e posteriormente centrifugando por cinco minutos a 10000 g. A leitura foi realizada em prancha própria.

4.4.10 Parâmetros bioquímicos

Foram realizados os testes bioquímicos de dosagem de proteínas totais (Doles). Para a realização deste teste, as amostras foram processadas de acordo com as recomendações de cada kit.

4.4.11 Eutanásia, necropsia e recuperação de vermes adultos

Os animais foram eutanasiados 30 dias após a infecção por meio de sobredose de anestésico (45mg/kg de xilazina associada a 240mg/kg de cetamina, via intraperitoneal). Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta, expondo os órgãos. O linfonodo mesentérico central foi exposto, retirado e acondicionado em tubo para microcentrifuga de 1,5ml contendo 1,0 ml de solução RNAlater® (*Thermo Fisher Scientific*), este material foi congelado a -20°C, até o momento da sua utilização. Depois disto, o intestino delgado foi retirado completamente e acondicionado em placa de Petri contendo PBS.

O intestino delgado foi aberto longitudinalmente, e com a finalidade de não danificar a mucosa intestinal, os vermes adultos foram delicadamente recuperados com o auxílio de uma pinça, armazenados em formol 10%, para posterior contagem e sexagem dos mesmos.

4.4.12 Avaliação da expressão de genes referentes às citocinas

O tecido utilizado para a extração do RNA total foi o linfonodo mesentérico central, armazenado em RNAlater e macerado com homogeneizador tecidual Omni TM125. Para a extração, foi utilizado o kit TRIzol (Invitrogen), conforme a recomendação do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1% e pela leitura (relação 260/280 e 260/230) em aparelho espectrofotômetro Epoch (Biotek).

Após a extração de RNA, as amostras foram tratadas com DNase I (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* – Invitrogen) para degradação de possíveis traços de DNA. Essa reação foi realizada em um volume final de 10 µl contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM MgCl₂, 50 mM de KCl, 0,1 unidade da DNase I e 1 µg da amostra de RNA, a temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Após este processo, ocorreu a inativação da DNase I pela adição de 1 µL de EDTA (25mM) e incubação a 65°C por 15 minutos.

Para a síntese de cDNA, foram utilizados 2 µg de RNA total em um volume final de 20 µl contendo 25 ng/µl de oligo hexâmeros, 500 µM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM de DTT e 200 unidades da transcriptase reversa (*Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* - Life). Esta solução foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, seguidos de 5 minutos a 85°C. Também foram preparados controles da transcrição sem adição da enzima transcriptase reversa para atuarem como controle negativo (RT-).

Para a qPCR, inicialmente foi realizada a curva de eficiência dos iniciadores para cada alvo utilizado. Para isso, o cDNA sintetizado foi diluído seriadamente na proporção de 1:5 até obter as seguintes concentrações: 50 ng/µL, 10 ng/µL, 2 ng/µL, 0,4 ng/µL e 0,08 ng/µL.

As diluições foram utilizadas nas reações de qPCR utilizando *PowerUP SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), composto pelo marcador *SYBR® Green I, AmpliTaq Gold® DNA Polimerase*, dNTPs e tampão otimizado. Estas reações ocorreram em um volume final de 10 µl contendo *PowerUP SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) 1X, 0,3 µM de cada iniciador, 1 µL de cDNA diluído, acrescido de água deionizada. Todas as reações foram feitas em duplicata, e a reação contendo água foi usada como controle negativo.

As reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em placas de polipropileno para 96 amostras cobertas por adesivos ópticos, ambos da empresa Applied Biosystems. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos com 95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 60 segundos para anelamento dos iniciadores e extensão. Um estágio de dissociação foi adicionado ao final do programa para que as análises de amplificação específica pudessem ser realizadas após o término das reações.

Os valores de Ct obtidos para cada amostra foram utilizados para gerar um gráfico de Ct x Quantidade de cDNA (ng). A inclinação (*slope*) desta reta foi utilizada para calcular a eficiência de amplificação dos iniciadores de cada alvo, através da equação: Eficiência = $10^{(-1/slope)} - 1$.

Para determinar o perfil de expressão dos genes de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , foi utilizado o método de quantificação relativa por Ct comparativo, ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando o gene da hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) e Gamma-actina (ACT-G1) como genes de referência. A amostra de referência (calibrador) será o grupo controle. As reações serão realizadas com 10 ng de cDNA por reação. Os experimentos serão analisados com o auxílio do *software Expression Suite v1.0*. Os iniciadores foram desenhados utilizando o *software Primer Express 3.0.1* (Applied Biosystem), com exceção do FoxP3 que foi retirado de (Espitia *et al.*, 2010).

Quadro 1. Sequência de iniciadores.

| Gene | Acesso NCBI | | Iniciadores qPCR | Tm (°C) | Produto (pb) |
|---------------|----------------|---|---------------------------|---------|--------------|
| IL-2 | NM_001281629 | F | CGTGCTGGATTTGGCTCAA | 59 | 98 |
| | | R | CAGAGCCCTTTAGTTTCACAACCTG | 58 | |
| IL-4 | XM_005067769 | F | CATGCACCGAGATGGTTCGTA | 59 | 59 |
| | | R | TTTCTCCGTGGAGTTCTTCCTT | 58 | |
| IL-10 | XM_005079860.1 | F | GCAGCGCTGTCATCGATT | 59 | 56 |
| | | R | CCTGTTCCACAGCCTTGCTT | 59 | |
| IFN- γ | NM_001281631 | F | AACAGCAGCATGGAGAACTCA | 59 | 66 |
| | | R | CTGAAGGTCATTTACCGGAATCTT | 59 | |
| TNF- α | XM_005086799.1 | F | TGAGCCATCGTGCCAATG | 59 | 79 |
| | | R | AGCCCGTCTGCTGGTATCAC | 59 | |
| FoxP3 | FJ_664148 | F | GGTCTTCGAGGAGCCAGA AGA | 58.4 | 72 |
| | | R | GCCTTGCCCTTCTCATCCA | 57.6 | |
| HPRT | XM_005085546.1 | F | TGGAGTGATTATGGACAGGACTGA | 59 | 64 |
| | | R | ATGGCCTCCCATCTCTTTCA | 58 | |
| ACT-G1 | XM_005070180.1 | F | GAAACCTTCAACACCCCAGC | 56.6 | 87 |
| | | R | CATGACAATGCCAGTGGTGC | 57.2 | |

4.4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas a partir dos dados gerados, utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 5. O teste de distribuição de dados utilizados foi o Kolmogorov-Smirnov.

Para testes paramétricos entre dois grupos foi utilizado o teste T pareado ou não pareado e para os dados não paramétricos, Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney. Para a análise de três grupos ou mais, os dados foram submetidos ao teste

ANOVA ou Repeated Measures ANOVA seguido do teste de Tukey para dados paramétricos, e ao teste de Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do teste de Dunns para dados não paramétricos. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de *outliers*.

Os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADO

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I

5.1.1 Consumo da cultura

O consumo da cultura foi avaliado durante os quatro dias de tratamento. No experimento 1A (Gráfico 1A), o consumo foi mais regular entre os grupos, permanecendo em torno de 20 mL. Enquanto no experimento 1B (Gráfico 1B), o grupo tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118, expressando Hsp65, ingeriu aproximadamente 5 ml a menos que os outros grupos.

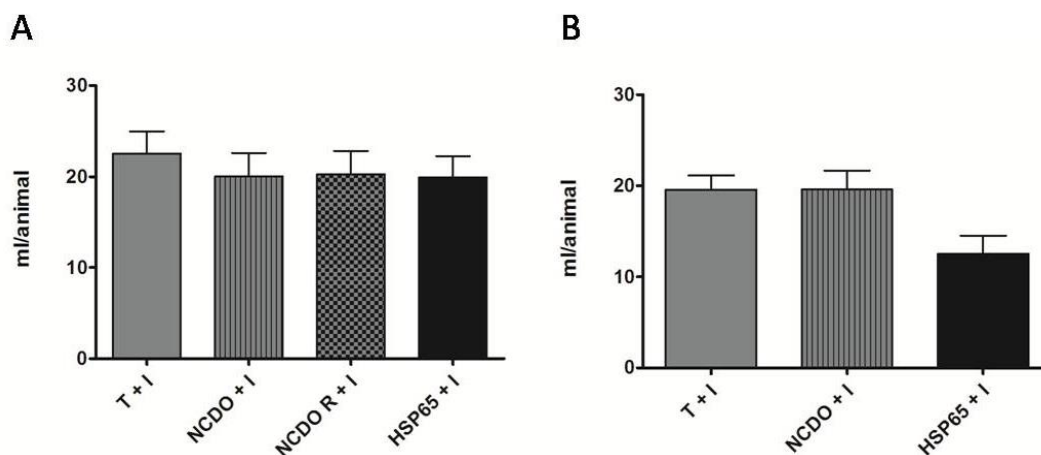


Gráfico 1. Consumo da cultura no experimento I. Tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXy/T:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

5.1.2 Peso

No experimento 1A (Gráfico 2A) o grupo controle (NT + NI) adquiriu peso ao longo de todo o experimento, enquanto nos grupos infectados este aumento aconteceu até nove dias após a infecção.

Essas alterações no peso refletem no peso entre o início e fim do experimento (Gráfico 2B), que mostra diferença significativa quando se compara o grupo controle não infectado (NT + NI), com os grupos infectados, que ao final do experimento ganharam menos peso. Ao comparar o grupo controle infectado e os grupos com os diferentes tratamentos, foi observado que não houve diferença estatística significativa.

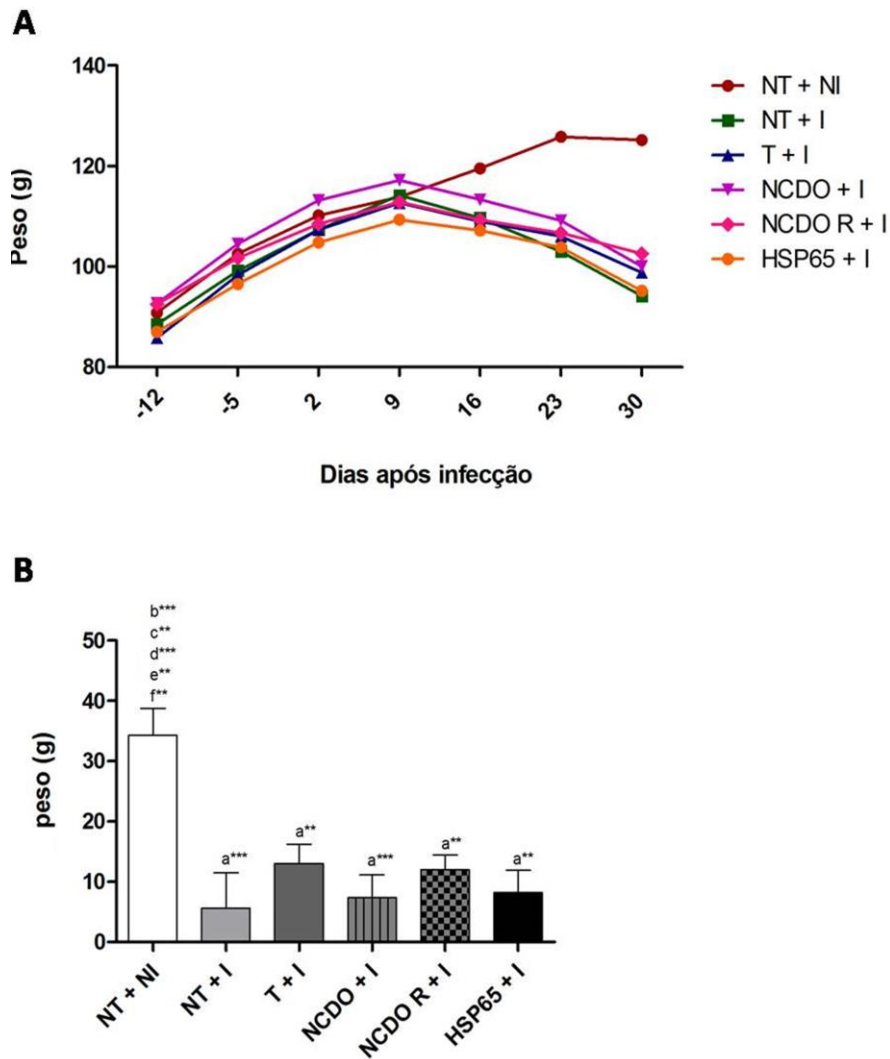


Gráfico 2. Variação de peso no experimento 1A. (A) Variação de peso ao longo do experimento e (B) ganho de peso (peso final - peso inicial) no final do experimento. Grupos: não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I). ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

No experimento 1B, a variação de peso (Gráfico 3A) foi menor em relação ao experimento 1A (Gráfico 2A). Até aproximadamente 13 D.P.I., os grupos ganharam peso ao longo das semanas, a partir deste momento, o peso se estabilizou e não houve diferença entre o grupo controle (NT + NI) e os grupos infectados, assim como não houve diferença entre o controle infectado (NT + I) e os diversos tratamentos. Não houve diferença no ganho de peso dos grupos (Gráfico 3B).

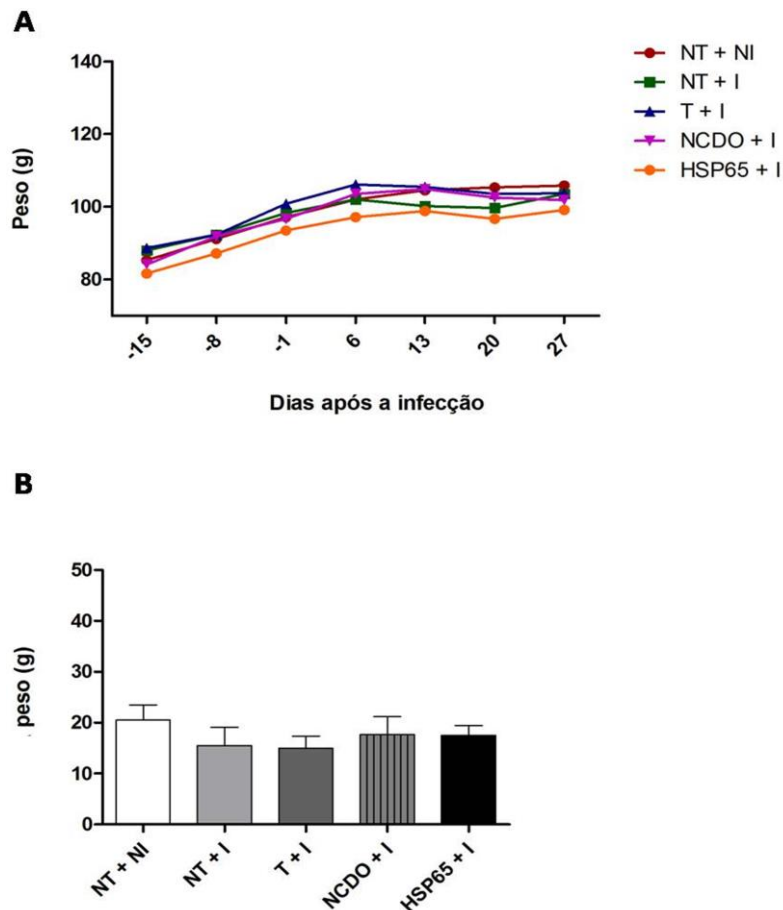


Gráfico 3. Variação de peso no experimento 1B. (A) Variação de peso ao longo do experimento e (B) peso (peso final - peso inicial) no final do experimento. Grupos: não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXy/T:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

5.1.3 Parâmetros parasitológicos

5.1.3.1 Número de ovos por grama de fezes (O.P.G.)

O O.P.G. foi realizado a cada dois dias, a partir do décimo dia dos experimentos. No experimento 1A (Gráfico 4A), a patência foi observada aos 16 D.P.I. para o grupo controle infectado (NT + I), enquanto para os demais grupos ocorreu com 18 D.P.I. O pico de eliminação ocorreu aos 22 D.P.I. com o grupo NT + I apresentando cerca de 10000 ovos por grama de fezes. Um novo pico de eliminação para este grupo ocorreu aos 30 D.P.I., atingindo novamente, 10000 ovos por grama de fezes.

No experimento 1B (Gráfico 4B), a patência foi observada aos 16 D.P.I.. Ao contrário do experimento 1A, nenhum grupo se destacou na quantidade de ovos

eliminados ao longo de todo o período de observação, no entanto, picos de eliminação ocorreram aos 20 D.P.I. (NCDO + I) e 22 D.P.I. (demais grupos). A eliminação durante este experimento foi inferior para todos os grupos em relação ao experimento I.

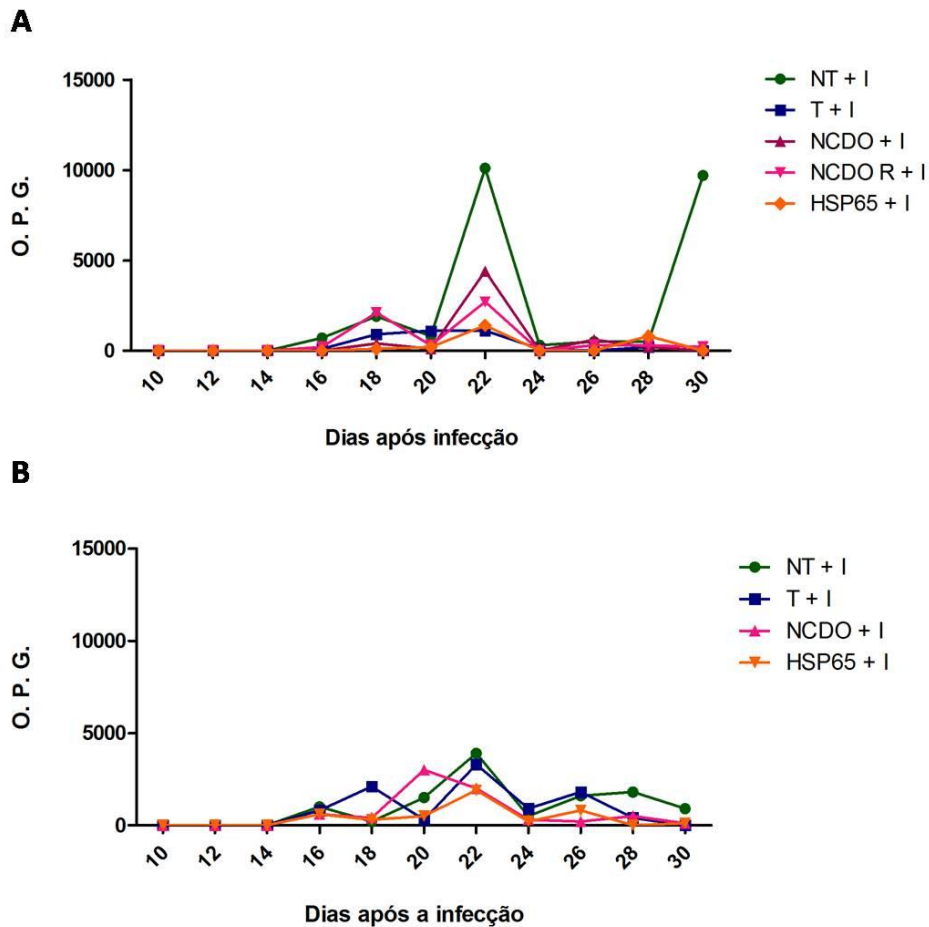


Gráfico 4. Ovos por grama de fezes (O.P.G.) no experimento I. Experimento 1A (A) e experimento 1B (B). Grupos: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO 2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

5.1.3.2 Recuperação de verme adulto

A recuperação dos vermes adultos no experimento 1A (Tabela 1) foi homogênea entre os grupos.

Tabela 1. Recuperação de vermes adultos separados por sexo no experimento 1A. Grupos: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO 2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

| Grupos | Machos | Fêmeas | Total |
|-----------|--------|--------|-------|
| NT + I | 37 | 51 | 88 |
| T + I | 50 | 52 | 102 |
| NCDO + I | 42 | 47 | 89 |
| NCDOR + I | 46 | 50 | 96 |
| HSP65 + I | 23 | 43 | 66 |

Ao contrário do experimento 1A, onde a média de recuperação de vermes foi de cerca de 15 vermes/animal, no experimento 1B (Tabela 2), a recuperação foi menor, com menos de 10 vermes por animal, em média.

Tabela 2. Recuperação de vermes adultos separados por sexo no experimento 1B. Grupos: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I).

| Grupos | Machos | Fêmeas | Total |
|-----------|--------|--------|-------|
| NT + I | 35 | 21 | 56 |
| T + I | 29 | 18 | 47 |
| NCDO + I | 26 | 21 | 47 |
| HSP65 + I | 37 | 17 | 54 |

5.1.4 Hemograma

5.1.4.1 Contagem total de hemácias

A contagem total de hemácias no experimento 1A (Gráfico 5A) mostrou diferença apenas entre o grupo controle (NT + NI) e o grupo tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 contendo o plasmídeo vazio (NCDO R + I) aos 15 D.A.I, enquanto aos 30 D.P.I., não houve diferença entre os grupos. O grupo controle infectado (NT + I) também apresentou uma diminuição no número total de hemácia, quando comparamos os tempos 15 D.P.I. e 30 D.P.I. (Gráfico 5C).

No experimento 1B, não houve diferença entre os grupos aos 15 D.P.I. Aos 30 D.P.I., a diferença ocorreu entre o grupo controle (NT + NI) e os grupos infectados. Quando se compara os valores nos dois tempos da infecção (Gráfico 5D), percebe-se que houve uma diferença nos grupos T + I, NCDO + I e HSP65 + I.

Quando comparamos o valor total de hemácias dos dois experimentos, percebemos que aos 15 D.A.I, o experimento 1A (Gráfico 5A) apresenta valores inferiores em relação aos experimento 1B (Gráfico 5B). Já aos 30 D.P.I. essa diferença ocorre apenas no grupo controle (NT + NI) e no grupo controle infectado (NT + I).

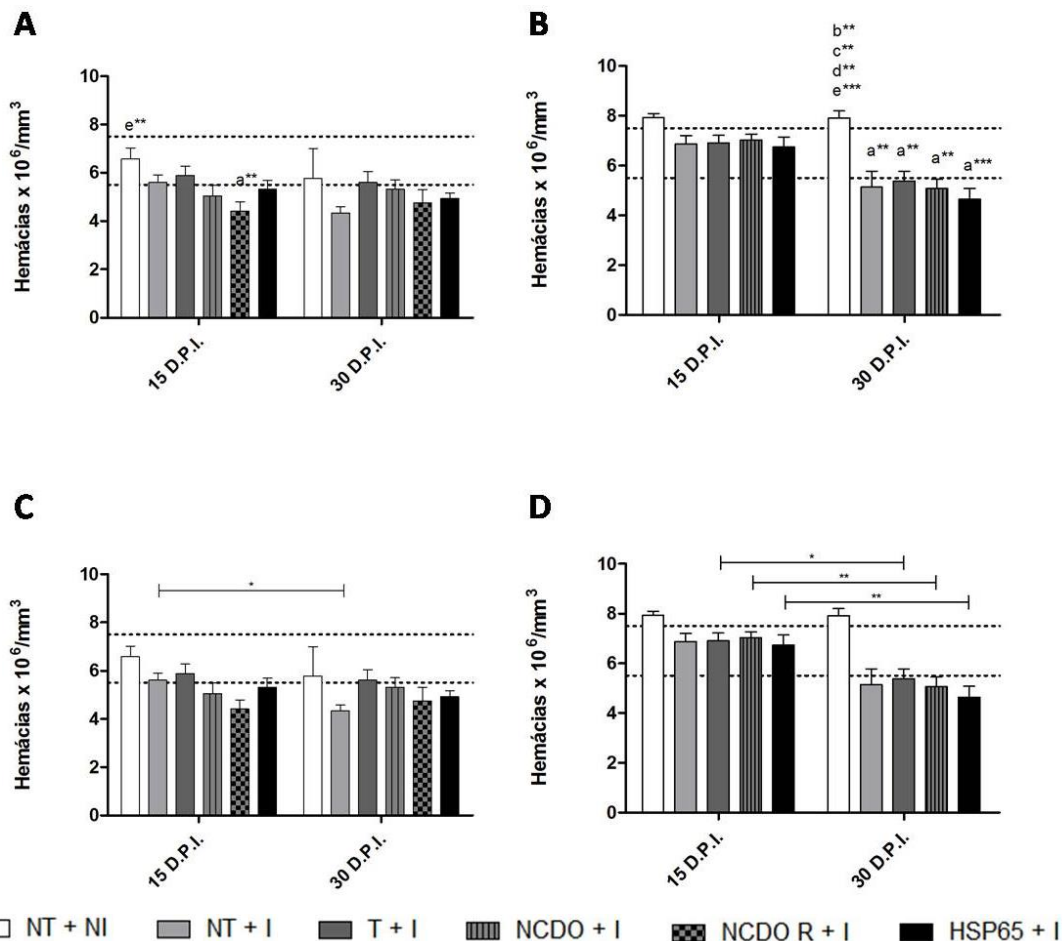


Gráfico 5. Contagem total de hemácias no experimento I. Número de hemácias e diferença entre os tempos de infecção no experimento 1A (A, C) e 1B (B, D). Grupo: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando HSP65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

5.1.4.2 Hemoglobina

No experimento 1A (Gráfico 6A) a diferença se deu apenas aos 15 D.P.I. e entre o controle infectado (NT + I) e o tratado com *L. lactis lactis* expressando Hsp65 (HSP65 + I). Já no experimento 1B (Gráfico 6B), os grupos infectados apresentaram menores valores de hemoglobina apenas aos 30 D.P.I.

Entre os tempos de infecção, no experimento 1A (Gráfico 6C) os grupos controles e o grupo tratado com o meio, e todos os grupos tratados no experimento 1B (Gráfico 6D), apresentaram diminuição nos níveis de hemoglobina. Porém não foi detectada nenhuma diferença entre o grupo não tratado e infectado e os grupos que receberam tratamento.

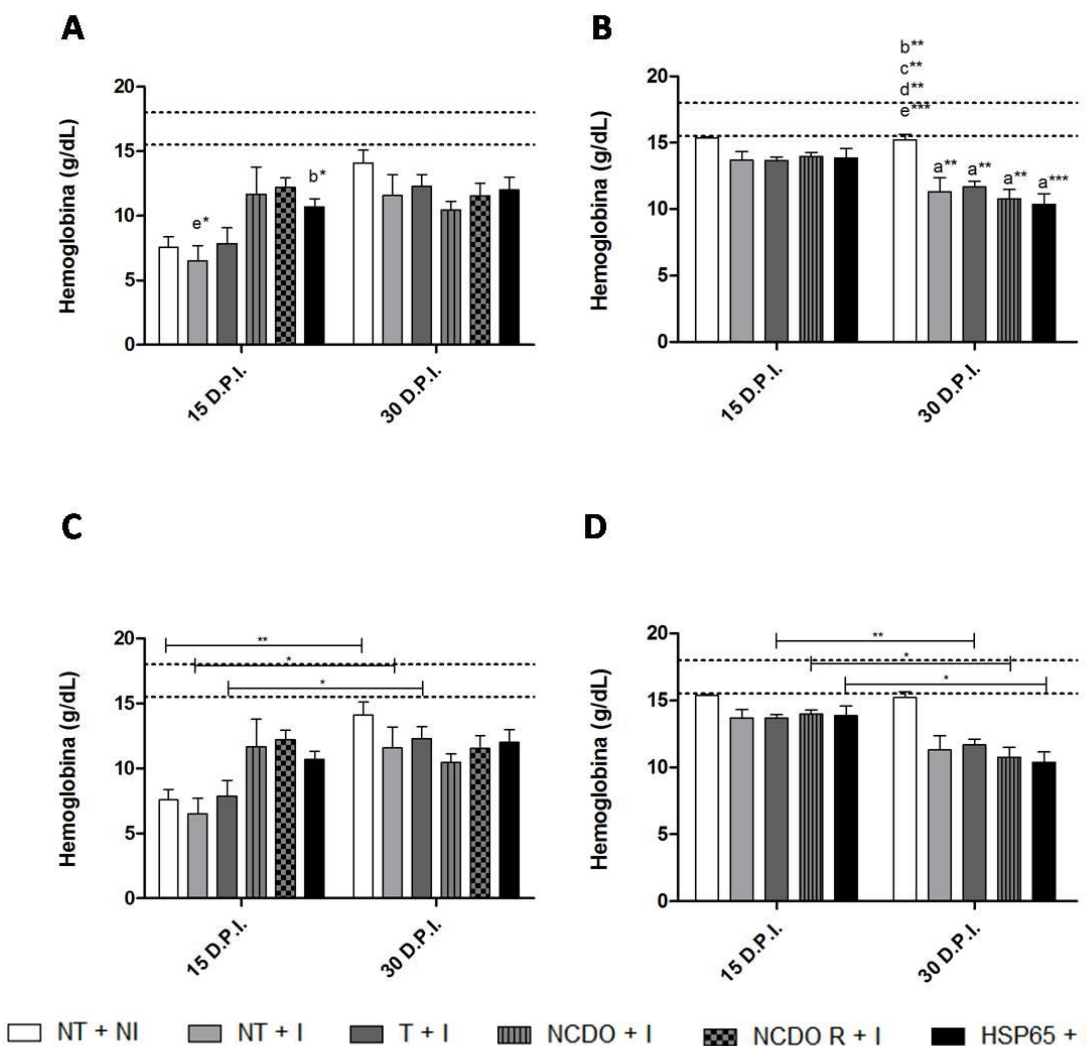
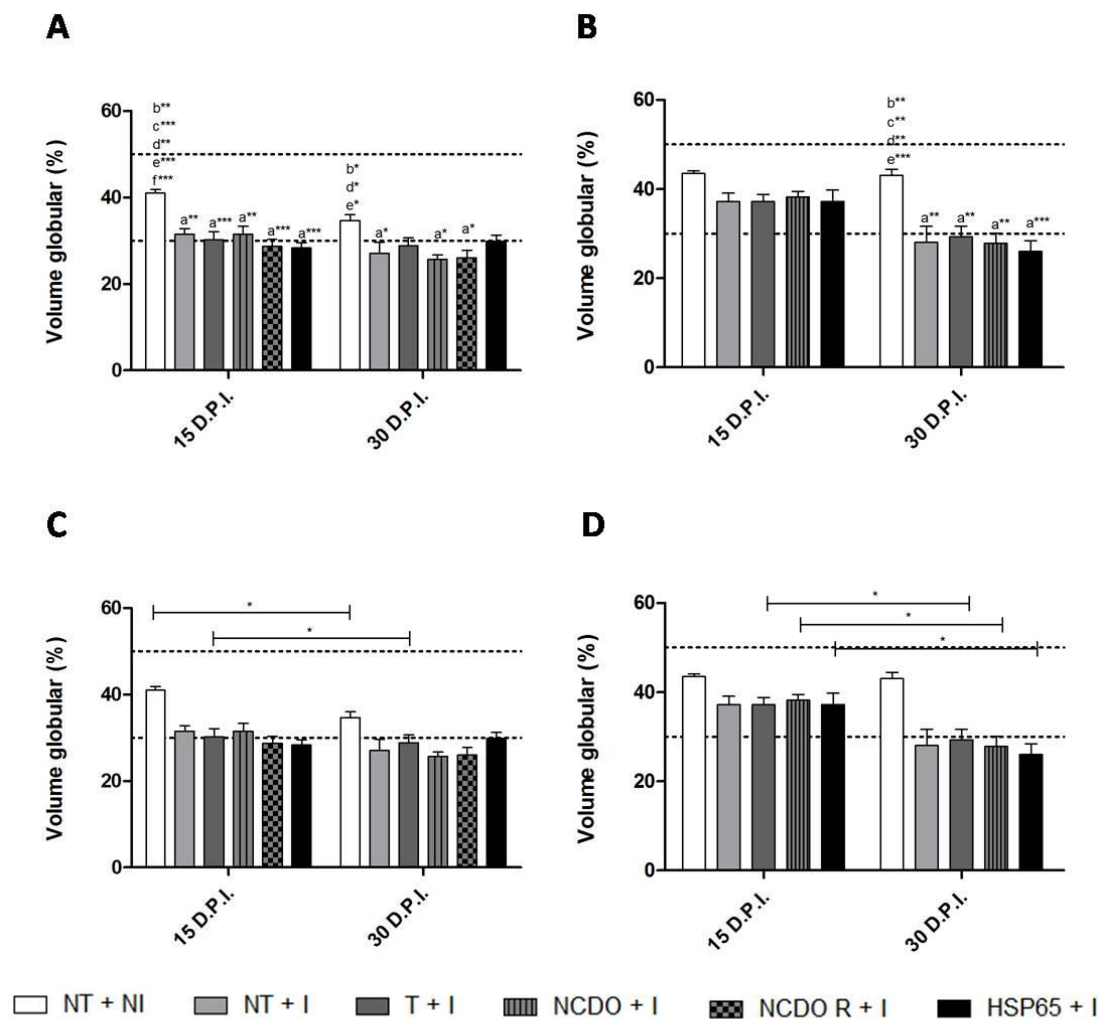


Gráfico 6. Hemoglobina no experimento I. Diferença no valor de hemoglobina entre os grupos e entre os tempos de infecção no experimento 1A (A, C) e 1B (B, D). Grupo: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXyIT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

5.1.4.3 Volume globular médio

O volume globular médio no experimento 1A (Gráfico 7A) se mostrou diminuído para todos os grupos infectados em relação ao grupo controle (NT + NI) aos

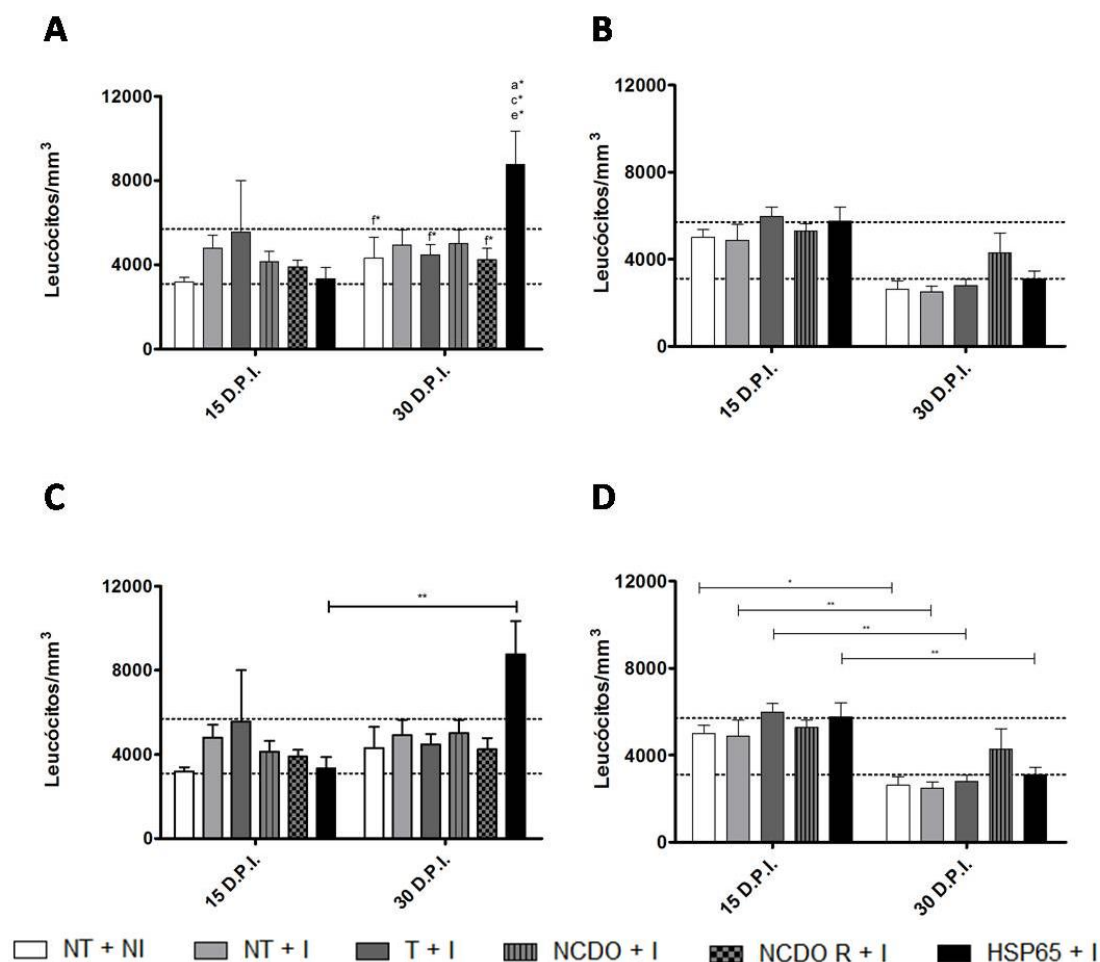
15 D.P.I. Já aos 30 D.P.I., também houve diminuição do volume globular para todos os grupos em relação ao grupo controle, porém com diferença significativa para o grupo não tratado e infectado (NT+I), *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem (NCDO + I) e *L. lactis lactis* com plasmídeo vazio (NCDO R + I). Quando se compara os grupos durante os tempos de infecção 1A (Gráfico 7C), apenas o grupo controle e o grupo tratado com o meio de cultura apresentaram uma diminuição significativa. Para o experimento 1B a diferença entre o controle e todos os grupos infectados, só foi visível aos 30 D.P.I. (Gráfico 7B).



5.1.4.4 Contagem total de leucócitos

No experimento 1A a contagem total de leucócitos (Gráfico 8A) do grupo tratado com o probiótico expressando Hsp65 (HSP65 + I) se destaca aos 30 D.P.I., atingindo aproximadamente 8000 leucócitos/mm³. Esse comportamento é reafirmado quando se compara os grupos entre os tempos de tratamento (Gráfico 8C), pois este grupo foi o único que apresentou diferença entre 15 D.A.I e 30 D.P.I.

No experimento 1B (Gráfico 8B), não foi observado diferença entre os grupos em nenhum dos tempos, porém, aos 30 D.P.I., ocorreu uma queda no número de leucócitos, que reflete no gráfico de comparação entre tempos (Gráfico 8D), onde apenas o grupo NCDO R + I não apresenta diferença.



5.1.5 Parâmetros bioquímicos

5.1.5.1 Dosagem de proteínas totais

Na dosagem de proteínas totais aos 15 D.P.I. no experimento 1A (Gráfico 9A), o grupo controle (NT + NI) mostrou diferença quando comparado com os grupos infectados. Os grupos controle infectado (NT + I), tratado com meio e tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem mostraram diferença quando comparados com o grupo tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 plasmídeo vazio e o tratado com *L. lactis lactis* expressando Hsp65. Aos 30 D.P.I., a diferença é entre o grupo tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 com os grupos controle (NT + NI), tratado com o meio de cultura e tratado com a linhagem selvagem. Todos os grupos, exceto o controle (NT + NI), apresentaram uma diminuição os níveis de proteínas séricas durante a infecção (Gráfico 9C).

No experimento 1B (Gráfico 9B), só é observada diferença entre o controle e os tratamentos aos 15 D.P.I. e no grupo controle entre os tempos de infecção (Gráfico 9D).

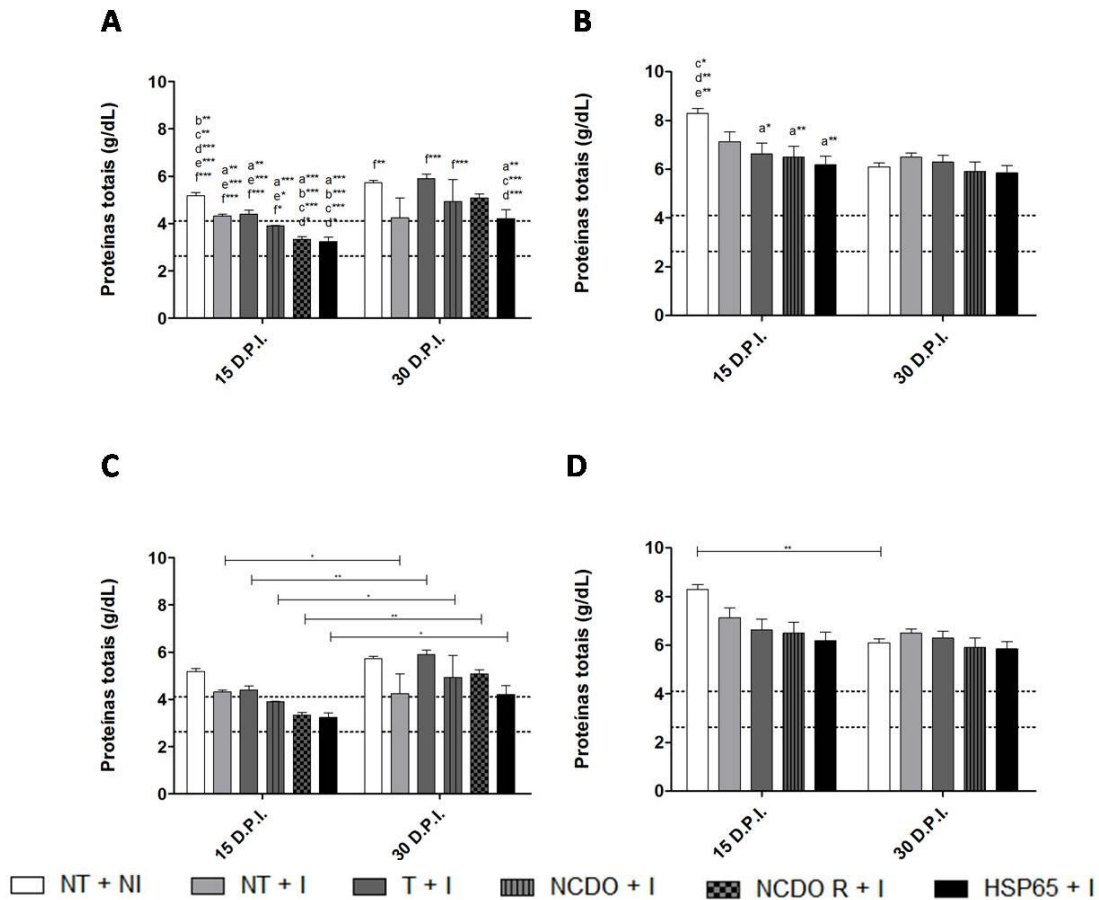


Gráfico 9. Proteínas totais no experimento I. Diferença da dosagem de proteínas totais entre os grupos e entre os tempos de infecção no experimento 1A (A, C) e no experimento 1B (B, D). Grupo: Não tratado

e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

5.1.6 Avaliação da expressão de genes referentes às citocinas

A expressão dos genes referentes às citocinas foi realizada apenas para o experimento 1A.

Na análise das citocinas do tipo T_{H1}, foi observado que para TNF- α (Gráfico 10A), o grupo controle (NT + NI) apresenta diferença quando comparado aos grupos controle infectado (NT + I), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 plasmídeo vazio e tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65. E para a avaliação de IFN- γ (Gráfico 11B), foi observada diferença entre o grupo controle (NT + NI) e todos os grupos infectados.

Para as citocinas do tipo T_{H2}, observou-se que na IL-4 (Gráfico 10C), o grupo controle (NT + NI) se diferenciou de todos os grupos infectados, enquanto o grupo controle infectado (NT + I) também se diferenciou do grupo tratado com o meio de cultura. Para IL-10 (Gráfico 10D), apenas o grupo controle (NT + NI) apresentou uma menor expressão em relação aos grupos infectados. Enquanto para IL-2 (Gráfico 11E), a diferença é observada entre o controle (NT + I) e os grupos tratados com o meio de cultura e tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 plasmídeo vazio. Em relação ao FoxP3 (Gráfico 10F), apenas o grupo tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 plasmídeo vazio apresentou diferença em relação ao grupo controle.

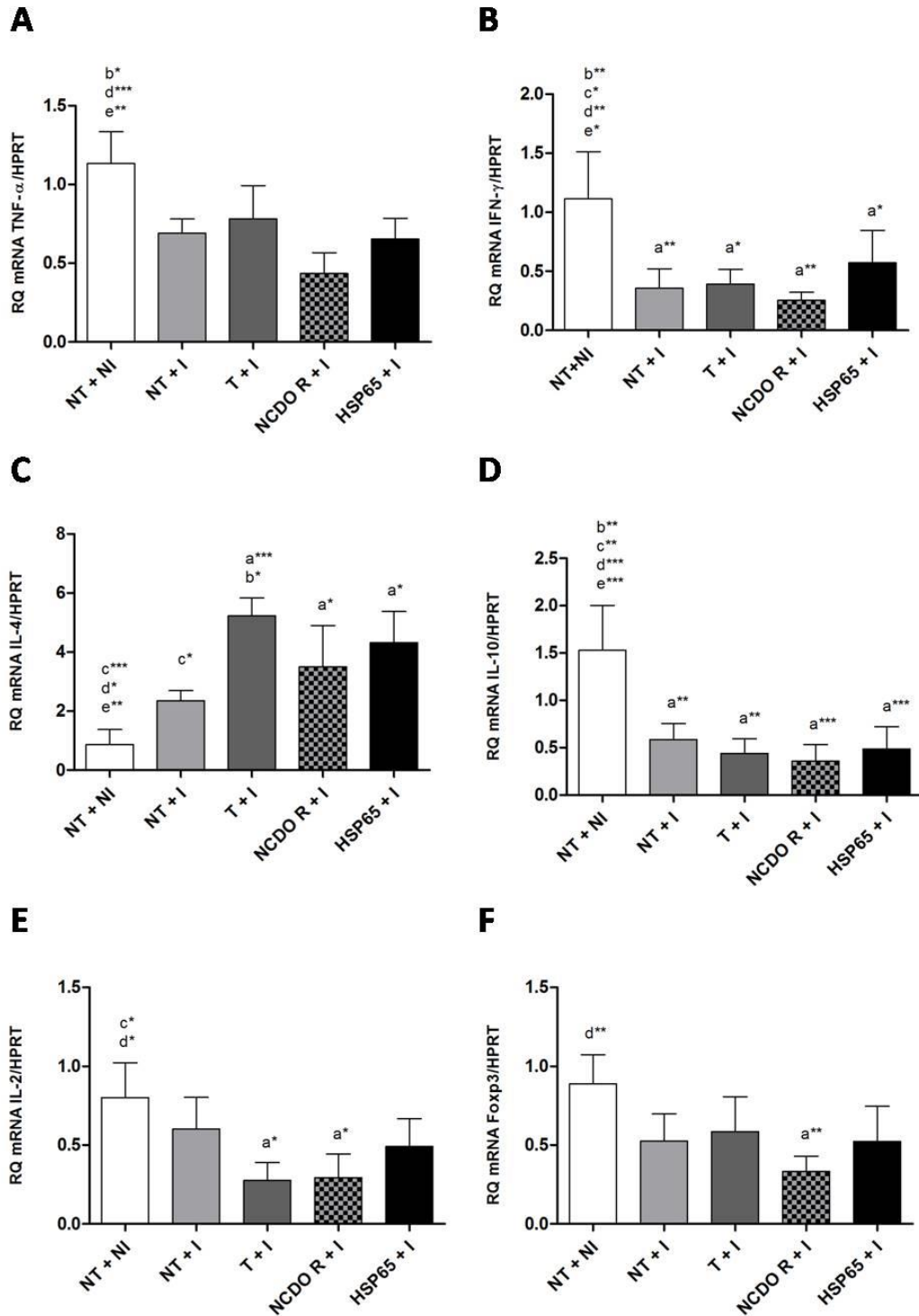


Gráfico 10. Expressão gênica dos genes referentes às citocinas no experimento I. Expressão gênica de genes referente à TNF - α (A), IFN - γ (B), IL - 4 (C), IL - 10 (D), IL - 2 (E) e FoxP3 (F). Grupos: Não tratado e não infectado (NT + NI), não tratado e infectado (NT + I), tratado com meio de cultura M17 e infectado (T + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e infectado (NCDO + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:nuc) e infectado (NCDO R + I); tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) e infectado (HSP65 + I). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

5.2 Experimento II

Neste experimento foi avaliada a ação direta das duas linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118 durante dois momentos da infecção, concomitante a infecção e após oito dias de infecção.

5.2.1 Consumo da cultura

Os animais do experimento II consumiram cerca de 17 mL de cultura, por dia, por animal, em todos os grupos que receberam o tratamento, sem diferença entre os grupos (Gráfico 11).

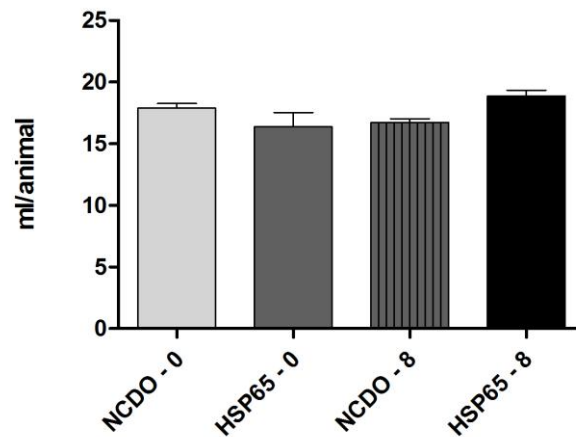


Gráfico 11. Consumo da cultura no experimento II. Consumo da cultura por dia. Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (*pXyIT:SEC:hsp65*) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (*pXyIT:SEC:hsp65*) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8).

5.2.2 Peso

O gráfico 12 mostram as informações sobre a aferição do peso dos animais infectados (tratados ou não). Todos os grupos ganharam peso até oito dias após a infecção, exceto os grupos com tratamento iniciado nesta data, que permaneceram ganhando peso até o final do experimento.

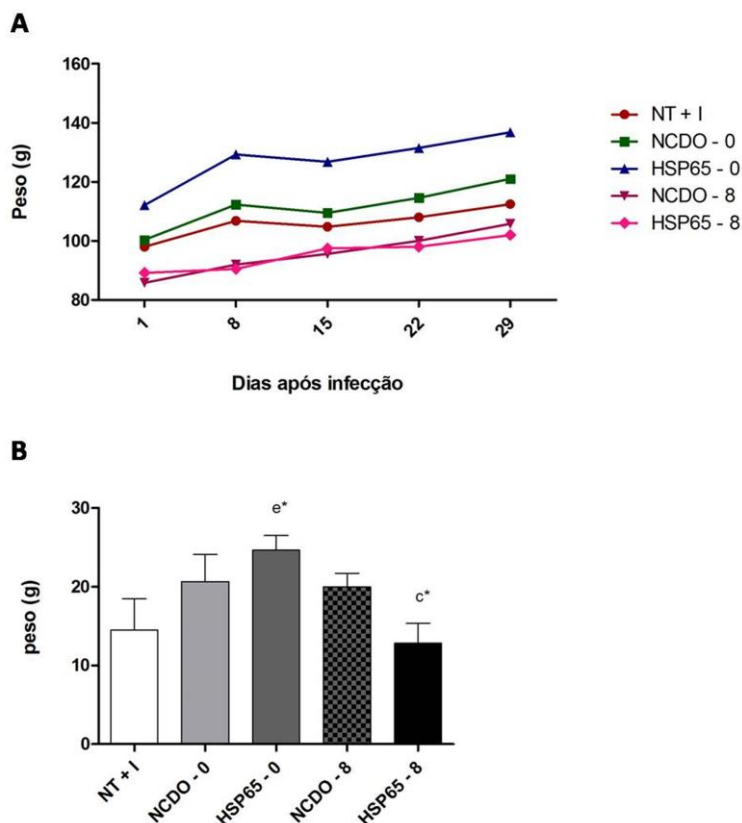


Gráfico 12. Variação de peso no experimento II. Variação de peso ao longo do experimento (A) e peso (peso final - peso inicial) no final do experimento (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8).

5.2.3 Parâmetros parasitológicos

5.2.3.1 Número de ovos por grama de fezes (O.P.G.)

Os grupos apresentaram patência com 16 D.P.I., com exceção do grupo HSP65 – 8 que apresentou patência aos 14 D.P.I.. Aos 18 D.P.I. ocorreu o primeiro pico de eliminação, com o grupo NCDO – 8 apresentando os maiores valores, chegando a aproximadamente 2000 ovos por grama de fezes. Este grupo continuou com alta eliminação por mais quatro dias.

Aos 22 D.P.I. o grupo controle apresentou seu único pico de eliminação, com valores aproximados de 1400 ovos por grama de fezes. Aos 26 D.P.I. ocorreu o maior pico de eliminação do experimento, com o grupo HSP65 – 8 atingindo aproximadamente 3500 ovos por grama de fezes. Além deste, o grupo NCDO – 8

apresentou outro pico de eliminação, com aproximadamente 1500, e o grupo HSP65 – 0, apresentou seu único pico de eliminação, com aproximadamente 200 ovos por gramas de fezes.

Os grupos com o tratamento iniciado no dia da infecção, NCDO – 0 e HSP65 – 0, mantiveram níveis baixos de O.P.G. durante todo o experimento, com o maior pico de eliminação não superando 500 ovos por grama de fezes.

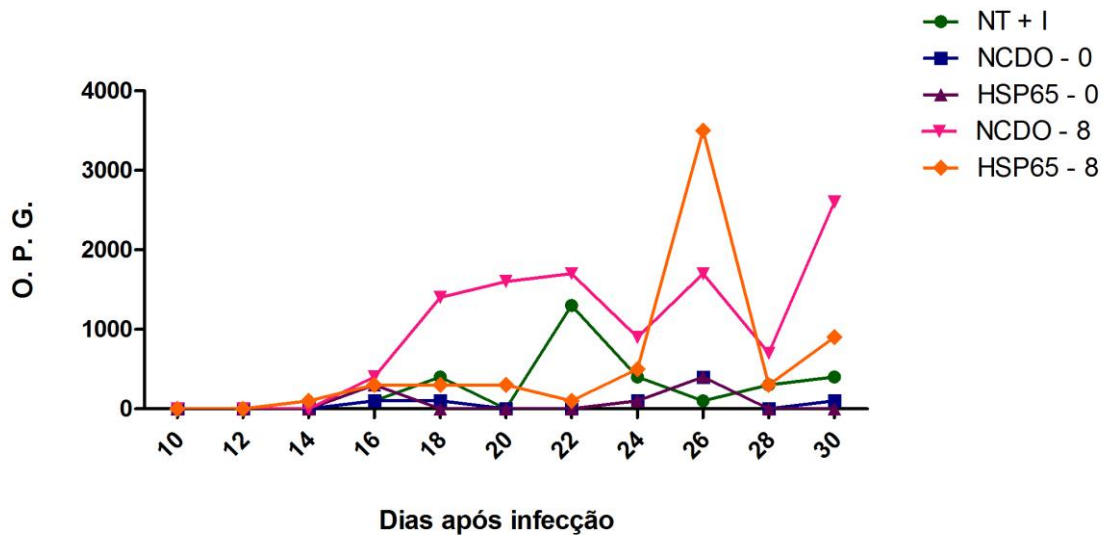


Gráfico 13. Ovos por grama de fezes (O.P.G.) no experimento II. Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8).

5.2.3.2 Recuperação de vermes adultos

Os grupos tratados com oito dias de infecção apresentaram uma recuperação maior quando comparado aos outros grupos, com o grupo NCDO – 8 apresentando duas vezes o valor do controle. Este grupo também apresentou um número de fêmeas 72% maior que o número de machos.

Os grupos com o tratamento iniciado no dia de infecção apresentaram número de vermes recuperados muito abaixo do controle, com o grupo NCDO – 0 com apenas quatro vermes, duas fêmeas e dois machos, e o grupo HSP65 – 0 com sete vermes, porém com a proporção entre machos e fêmeas de 6:1.

Tabela 3. Recuperação de vermes adultos separados por sexo. Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8).

| Grupos | Machos | Fêmeas | Total |
|-----------|--------|--------|-------|
| NT + I | 19 | 11 | 30 |
| NCDO - 0 | 6 | 1 | 7 |
| HSP65 - 0 | 2 | 2 | 4 |
| NCDO - 8 | 22 | 38 | 60 |
| HSP65 - 8 | 21 | 18 | 39 |

5.2.4 Hemograma

5.2.4.1 Contagem total de hemácias

A contagem total de hemácias (Gráfico 14A), nos dois tempos de infecção, apresentou diferença apenas entre os grupos tratados no dia da infecção (NCDO – 0 e HSP65 – 0) e os grupos tratados com oito dias de infecção (NCDO – 8 e HSP65 – 8). Quando comparamos os grupos em relação ao tempo de infecção (Gráfico 14B), todos os grupos, exceto o grupo HSP65 – 8 apresentaram uma diminuição na contagem total de hemácias.

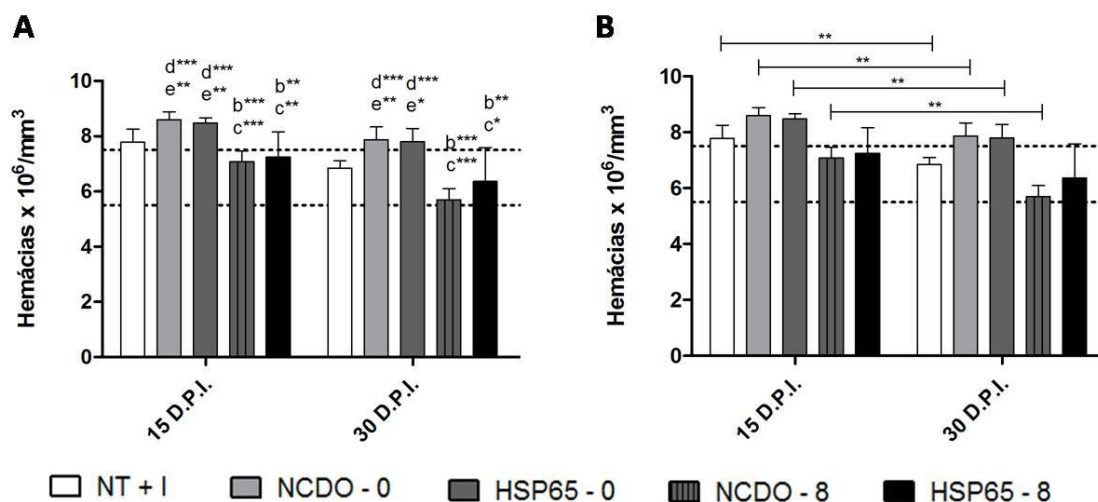


Gráfico 14. Contagem total de hemácias no experimento II. Número de hemácias (A) e diferença entre os tempos de infecção (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5.2.4.2 Hemoglobina

A dosagem de hemoglobina (Gráfico 15A) aos 15 D.P.I. apresentou diferença entre os grupos tratados no dia da infecção (NCDO – 0 e HSP65 – 0) e os grupos tratados com oito dias de infecção (NCDO – 8 e HSP65 – 8).

Aos 30 D.P.I. os grupos tratados no dia da infecção (NCDO – 0 e HSP65 – 0) apresentaram diferença em relação ao grupo controle (NT + I) e aos grupos tratados com oito dias de infecção (NCDO – 8 e HSP65 – 8).

Quando se compara os tempos de infecção (Gráfico 15B), apenas o grupo tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem no dia da infecção apresentou uma diminuição significativa.

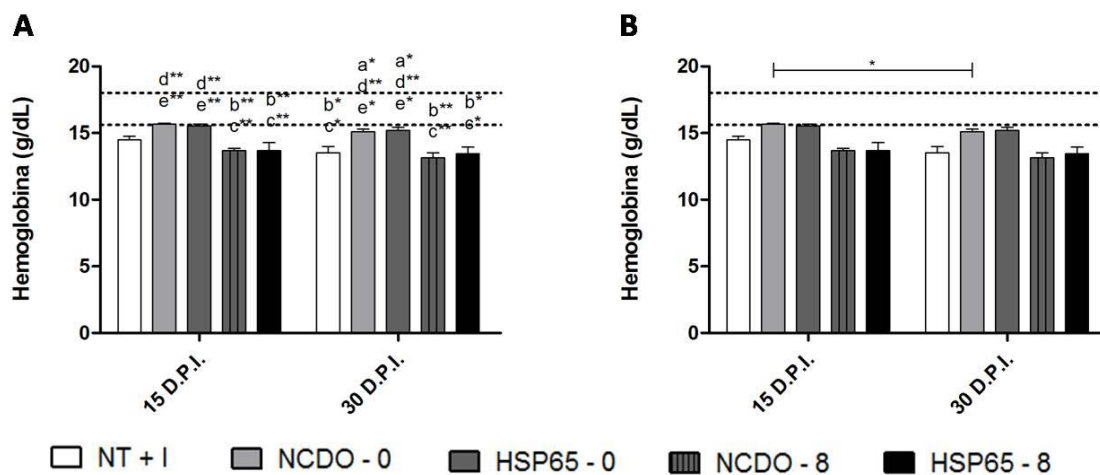


Gráfico 15. Hemoglobina no experimento II. Diferença no valor de hemoglobina entre os grupos (A) e entre os tempos de infecção (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). * = p<0,05; ** = p<0,01.

5.2.4.3 Volume globular médio

O volume globular médio (Gráfico 16A) aos 15 D.P.I. apresentou diferença entre o grupo controle e o grupo NCDO – 0, e entre os grupos tratados no dia da infecção (NCDO – 0 e HSP65 – 0) com os grupos tratados com oito dias de infecção (NCDO – 8 e HSP65 – 8). Aos 30 D.P.I. a diferença ocorreu apenas entre os grupos tratados no dia da infecção (NCDO – 0 e HSP65 – 0) e os grupos tratados com oito dias de infecção (NCDO – 8 e HSP65 – 8).

Quando se compara os grupos entre os tempos de infecção (Gráfico 16B), apenas o grupo NCDO – 0 apresentou diminuição no volume globular.

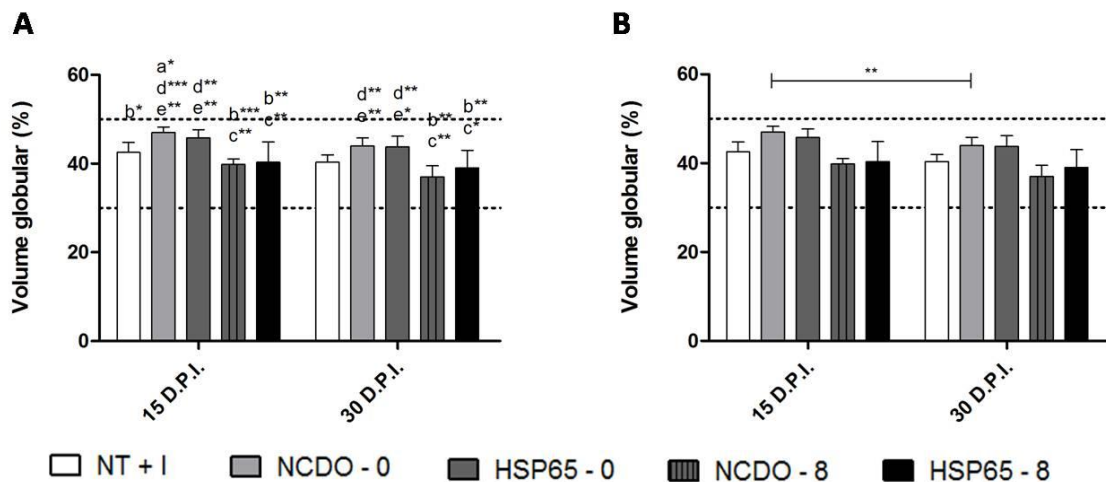


Gráfico 16. Volume globular médio no experimento II. Diferença no valor globular médio entre os grupos (A) e entre os tempos de infecção (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5.2.4.4 Contagem total de leucócitos

Em relação ao número total de leucócitos (Gráfico 17A), não houve diferença entre os grupos em nenhum dos dois tempos de infecção. Quando se compara os grupos entre os tempos de infecção (Gráfico 17B), também não se observa diferença em nenhum dos grupos.

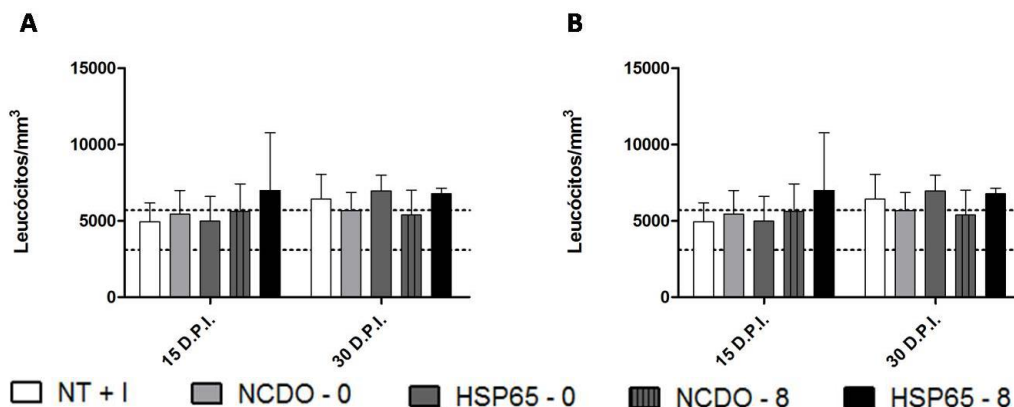


Gráfico 17. Contagem total de leucócitos no experimento II. Diferença no valor de leucócitos grupos (A) e entre os tempos de infecção (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e

tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXyIT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

5.2.5 Parâmetros bioquímicos

5.2.5.1 Proteínas totais

Em relação à dosagem de proteínas totais no sangue (Gráfico 18A), não houve diferença entre os grupos em nenhum dos tempos de infecção. Porém, quando se compara os tempos de infecção (Gráfico 18B), percebe-se que todos os grupos apresentaram um aumento no valor deste parâmetro.

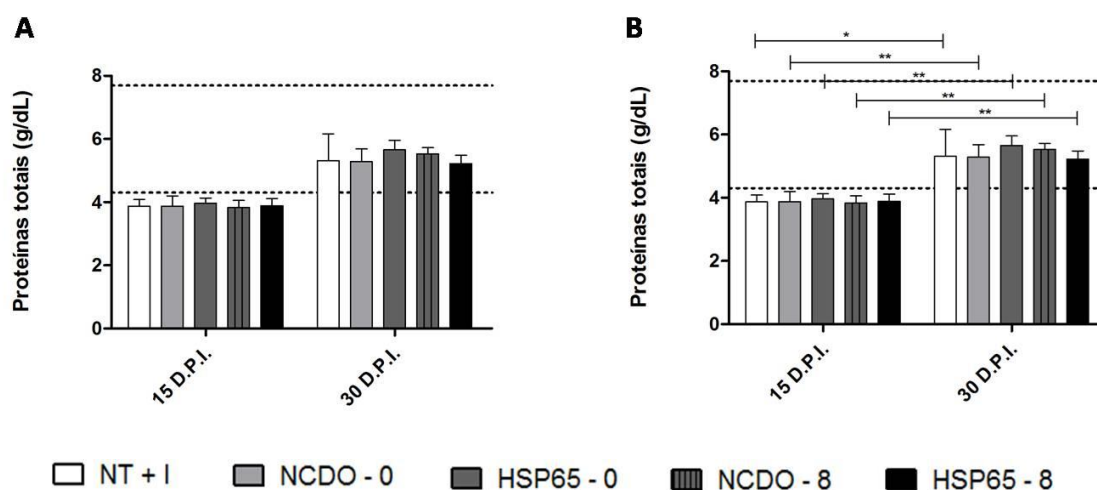


Gráfico 18. Proteínas totais no experimento II. Diferença no valor de proteínas totais (A) e entre os tempos de infecção (B). Grupos: tratado com *L. lactis* selvagem no dia zero da infecção (NCDO – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 expressando Hsp65 (pXyIT:SEC:hsp65) no dia zero da infecção (HSP65 – 0), tratado com *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção (NCDO – 8) e tratado com *L. lactis* expressando Hsp65 (pXyIT:SEC:hsp65) aos oito dias de infecção (HSP65 – 8). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A ancilostomose é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal que afeta cerca de 740 milhões de pessoas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Asaolu & Ofoezie, 2003). Embora existam vários projetos científicos em busca de uma vacina efetiva para essa parasitose, até o momento este objetivo não foi alcançado (Bottazzi, 2015). Uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal é a utilização de microrganismos que podem modular a resposta imunológica do hospedeiro ou induzir a tolerância oral. (Coelho & Faria, 2012; Goldin & Gorbach, 2008).

O fenômeno responsável pela homeostase intestinal é a tolerância oral que é a ausência/minimização de resposta a antígenos próprios da microbiota de cada indivíduo (Faria & Weiner, 2006; Weiner, 1994). Essa tolerância ocorre, principalmente, através da ingestão contínua e em baixas doses de antígenos, feita de forma eficiente pela ingestão de alimentos. Esses antígenos são capazes de estimular o sistema imune a expandir o número de células regulatórias na mucosa intestinal que vão interferir na expansão de células T efectoras, tornando assim o ambiente mais tolerogênico (Faria & Weiner, 2005).

Várias doenças do trato gastrointestinal possuem relação com este ambiente tolerogênico e a autorreatividade do sistema imune. Um exemplo seria a doença de Crohn, que causa inflamação em toda a mucosa intestinal, com presença de dor, diarreia e inchaço. Essa inflamação ocorre por causa de uma resposta exacerbada do sistema imune a microrganismos da microbiota, causado por uma deficiência genética associada a vários outros fatores próprios do hospedeiro. Nesta doença ocorre um desequilíbrio entre a resposta pró-inflamatória T_H1/ T_H17 e a resposta T regulatória (Hrnčířová *et al.*, 2014).

A alimentação tem influência direta em doenças do trato gastrointestinal, tanto por introduzir diferentes tipos de patógenos, como o estado nutricional, que interfere no desenvolvimento da imunidade. Dietas pobres em nutrientes estão intimamente relacionadas a condições socioeconômicas, onde populações carentes possuem pouco acesso a alimentação de qualidade (Darmon, 2008). Além da falta de alimentos, essas populações estão constantemente expostas a agentes infecciosos, por falta de saneamento básico, dentre eles, vários helmintos parasitos. Este cenário é o ideal para o agravamento da desnutrição e do retardo físico e cognitivo de crianças (Papier *et al.*,

2014; Yap *et al.*, 2014). Uma das causas mais comuns para a anemia em populações carentes e rurais é o parasitismo por ancilostomídeos, causando um quadro de inflamação intestinal que resulta em baixa absorção de nutrientes, agravando a anemia (Hotez *et al.*, 2004; Hotez, 2008).

Além do estado nutricional, outro fator importante é a carga parasitária, que pode ser capaz de determinar a gravidade da doença (Albonico *et al.*, 1998). No decorrer da infecção, quando o parasito se estabelece no intestino delgado e inicia a espoliação sanguínea, o hospedeiro começa a perder nutrientes, não apenas pela espoliação em si, mas também pelo dano provocado pelo parasito à mucosa intestinal que tem a superfície de absorção diminuída e inflamada (Alkazmi *et al.*, 2008; Pacanaro *et al.*, 2013). Este fenômeno se agrava quando ocorre a patência (Hotez *et al.*, 2004).

Neste trabalho foi observado, próximo à patência da infecção, diminuição no peso de todos os animais infectados com *A. ceylanicum* e o fato dessa variação não ter sido tão marcante, pode estar relacionada à quantidade de larvas administradas aos animais no momento da infecção. Serafim *et al.*, (2014) mostrou que a carga parasitária interfere diretamente no curso da infecção, no que diz respeito a parâmetros clínicos, dentre eles o peso. A variação de peso não foi tão evidente, porém, é perceptível que a carga parasitária deste experimento é menor, com picos de eliminação atingindo aproximadamente 5000 ovos por grama de fezes, enquanto no experimento 1A os picos de eliminação chegam a 10000 ovos por grama de fezes.

Este dado também é condizente com o número de vermes recuperados do intestino delgado, que no experimento 1A foi superior ao experimento 1B. Esta flutuação no número de vermes recuperados é esperada para este tipo de infecção, Jian *et al.*, (2003) demonstraram que embora seja administrada uma quantidade de larvas, teoricamente, igual aos animais, a recuperação pode ser diferente. Isso pode ser em função de variações no número de larvas administradas e devido ao fato de que hamsters não são animais isogênicos.

No experimento II também foi percebido a relação do peso com a carga parasitária, onde os grupos com maior ganho de peso possuíam uma carga parasitária menor que os grupos com menor ganho de peso. Porém, neste experimento pode-se correlacionar esta carga parasitária com o tempo de tratamento, pois os grupos que iniciaram o tratamento com as linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118 aos oito dias de infecção, apresentaram, durante todo o experimento, uma maior eliminação de ovos. Esta eliminação está diretamente ligada ao número de vermes adultos recuperados, pois

nos grupos com maior eliminação (NCDO – 8 e HSP65 – 8) também foram obtidos um maior número de vermes adultos. Enquanto os grupos que apresentaram valores de O.P.G. muito baixos ao longo de todo o experimento, com vários dias sem eliminação, recuperaram-se poucos vermes. Neste experimento não houve diferença entre os grupos com tratamento iniciado no mesmo tempo de infecção.

A utilização de microrganismos para o controle da carga parasitária tem sido investigada por alguns pesquisadores. Oliveira-Sequeira *et al.*, (2014) publicou um trabalho em que administrava *Bifidobacterium animalis* 14 dias antes de infectar os animais com *Strongyloides venezuelensis* e obteve menores números de vermes adultos e, conseqüentemente, de ovos por grama de fezes. Resultado semelhante foi encontrado por Basualdo *et al.*, (2007) ao infectar camundongos com *Toxocara canis* após tratamento com *Enterococcus faecalis*, recuperando um menor número de larvas no fígado e pulmões.

Organismos com características probióticas auxiliam na manutenção da homeostase intestinal, promovendo, dentre outros fatores, o aumento no trânsito intestinal e na espessura da camada de muco (Ohland & MacNaughton, 2010). Estes dois fatores são importantes para a parasitose, podendo interferir na carga parasitária do hospedeiro (Moreau & Chauvin, 2010). Neste contexto, acredita-se (hipótese que ainda será testada em trabalhos futuros) que quando ocorre à administração do *L. lactis lactis* NCDO2118 junto com a infecção, o peristaltismo intestinal pode ser aumentado, assim como a camada de muco, dificultando a fixação do parasito na parede intestinal. Além disso, pode ter ocorrido o aumento da produção de IgA no intestino delgado, que atua neutralizando as moléculas E/S e estimulando a degranulação de eosinófilos (Bungiro *et al.*, 2008). Estes grânulos poderiam matar as larvas em desenvolvimento na mucosa intestinal, o que refletiria no posterior desenvolvimento dos vermes e na menor recuperação de parasitos e eliminação de ovos. Esses dados são compatíveis com os resultados do experimento II no qual a administração dos tratamentos no dia zero da infecção causou uma diminuição no número de vermes. Por outro lado, a administração dos tratamentos aos oito dias após a infecção causou um aumento no número de vermes.

É sabido pela literatura que helmintos intestinais causam um aumento na população de células T_{REG}, ocasionando um ambiente favorável para a manutenção dos parasitos (Allen & Maizels, 2011). O *L. lactis lactis* NCDO2118 também podem causar aumento dessa população (Zakostelska *et al.*, 2011), porém, no experimento II, quando ocorre a administração dos tratamentos aos 8 D.P.I., os vermes já estavam instalados e

as ações do *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem e expressando Hsp65, que poderiam favorecer a expulsão do parasito, tiveram um menor efeito do que a ação do próprio parasito para ser mantido. Entretanto, apesar do maior número de parasitos recuperados nesse grupo, é provável que a inflamação intestinal tenha sido menos intensa, a exemplo do que ocorre nas doenças inflamatórias do intestino. (Luerce *et al.*, 2014). Seria importante a realização de análises histopatológicas dos intestinos e dosagem de citocinas dos animais destes grupos experimentais para se comprovar essa teoria. Entretanto, por questões de limite de tempo essas análises não puderam ser realizadas. O material se encontra fixado para futuras análises.

Uma alta carga parasitária, além de afetar diretamente o estado nutricional do indivíduo, através do maior consumo de sangue, pode afetar a absorção de nutrientes da alimentação. Os ancilostomídeos quando estão aderidos à mucosa intestinal, produzem metabólitos que são secretados ou excretados no lúmen intestinal, estes metabólitos, em sua maioria enzimas e proteases, atuam diretamente nas microvilosidades intestinais, causando a erosão e diminuindo a área de absorção de nutrientes do hospedeiro. Estas deformações na mucosa intestinal levam ao agravamento da anemia (Papier *et al.*, 2014; Smith & Brooker, 2010).

O hemograma foi utilizado para medir os parâmetros relacionados à anemia causada pelo parasito. No experimento 1A e 1B, os valores de hemácias, hemoglobina e volume globular estão diminuídos nos grupos infectados, porém, não apresentam diferença entre os tratamentos. A anemia causada pelos ancilostomídeos é caracterizada por baixos níveis de hemoglobina no sangue (hipocrômica), assim como diminuição no número e tamanho de eritrócitos (microcítica) (Hotez *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 2012).

A anemia é a principal consequência da infecção, assim como o principal fator de complicações, como a deficiência física e cognitiva em crianças, partos prematuros em gestantes parasitadas e desnutrição em adultos e crianças (McClure *et al.*, 2014). Obiezue e colaboradores (2013), realizaram um estudo que correlacionava os níveis de hemoglobina e de volume globular com a incidência de anemia em gestantes parasitadas. Este trabalho demonstrou a relação entre os baixos níveis de hemoglobina e volume globular com a presença de parasitos, principalmente com ancilostomídeos.

No experimento II, os parâmetros hematológicos se mantiveram maiores nos grupos com o tratamento iniciado no dia da infecção, quando comparados aos grupos com o tratamento iniciado após oito dias de infecção. Estes valores refletem a carga

parasitária e a espoliação causada por cada grupo. Não houve diferença entre os tratamentos iniciados no mesmo tempo de infecção.

Em relação ao número total de leucócitos, no experimento 1A apenas o grupo HSP65 + I apresentou valores altos. No experimento 1B, não houve diferença no valor total de leucócitos quando comparamos os grupos, porém, é possível perceber uma diminuição quando se compara os tempos de infecção. Isto ocorre devido a um maior recrutamento de granulócitos, como neutrófilos e eosinófilos, para o local da infecção, acarretando a diminuição destas células no sangue periférico (Allen & Maizels, 2011; Anthony *et al.*, 2007).

Outro parâmetro importante na avaliação da anemia causada pelo parasito é a dosagem de proteínas totais no soro sanguíneo do hospedeiro. A diminuição dos níveis de proteína sérica esta ligada a baixa produção desta molécula pelo hospedeiro, devido à falta de oxigênio acarretada pela diminuição dos níveis de hemoglobina (Maspes & Tamigaki, 1981).

A infecção por helmintos acarreta uma série de eventos imunológicos, que abrangem desde a fase larval, quando o parasito necessita de migrar pelos tecidos até a corrente sanguínea, até a fase de estabelecimento na mucosa intestinal (Hawdon, 1996; Hotez *et al.*, 2004).

Após se estabelecer no intestino do hospedeiro, o parasito fixa-se e inicia a espoliação sanguínea. Em consequência deste aumento no metabolismo, o parasito libera proteínas e enzimas, que são captadas pelo epitélio intestinal e transportadas até a lâmina própria. Além dessas moléculas, o parasito causa um dano físico à integridade do epitélio intestinal, que acarreta uma cascata de sinalizações imunológicas, como liberação de alarminas, que são características de dano tecidual. Essas moléculas ativam células dendríticas que estimulam a proliferação de células do tipo T_H2 (Allen & Maizels, 2011; Anthony *et al.*, 2007).b

Outro tipo celular presente são os nuócitos, que são os primeiros tipos celulares a produzirem citocinas do tipo T_H2 , como a IL-4 e a IL-13, criando condições favoráveis ao desenvolvimento da resposta T_H2 . Estas células, mesmo após a sinalização para a diferenciação da resposta, continuam liberando citocinas e auxiliando na promoção da resposta T_H2 (Loukas *et al.*, 2005).

Neste ambiente propício, as células apresentadoras de antígenos estimulam a diferenciação das células do tipo T_H2 , que também liberam IL-4 e IL-13. Essas moléculas são capazes de promover a ativação alternativa de macrófagos que inibem

respostas do tipo T_H1 . Além disso, essas moléculas podem estimular fibroblastos a produzirem arginase-1, que promove a reparação tecidual (Allen & Maizels, 2011).

A IL-4 é uma molécula com atuação efetiva no desenvolvimento da resposta do tipo T_H2 , que durante a infecção por helminto tem sua produção aumentada devido aos estímulos recebidos pelos produtos de excreção e secreção. Além destes organismos, outros tipos de estímulos podem promover a produção IL-4, como antígenos alimentares em baixas dosagens, que ocorre durante a tolerância oral (Abbas *et al.*, 2012; Faria & Weiner, 2006).

Assim como na infecção por helmintos, a tolerização da mucosa intestinal promove um aumento na secreção de citocinas que regulam negativamente respostas inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Essas moléculas induzem a diferenciação de células T regulatórias, enquanto na infecção por helmintos, elas induzem células T_H2 . Em ambos os casos, o efeito desta estimulação é um ambiente mais tolerogênico e conseqüentemente, menos inflamado (Anthony *et al.*, 2007; Faria & Weiner, 2005). Esse efeito é percebido quando comparamos os grupos controle (NT + NI) e o grupo controle infectado (NT + I), onde apenas a presença do parasito já é suficiente para o aumento da produção de IL-4.

Outra citocina de caráter regulatório é a IL-10, que está presente em diversos mecanismos. Esta molécula pode ser produzida por diferentes tipos celulares, como macrófagos, monócitos, células dendríticas, linfócitos T_H1 , T_H2 e T_{REG} , além dos linfócitos TCD8. (De Moreno *et al.*, 2011). Em infecções helmínticas, a IL-10 tem papel fundamental no estabelecimento da resposta T_H2 , promovendo a expansão destas células e regulando a produção de citocinas do tipo T_H1 (Allen & Maizels, 2011). Na tolerância oral, o papel da IL-10 também é regular a produção de citocina T_H1 , porém, essa produção é feita por células T_{REG} presentes na lâmina própria. Na tolerização por baixas dosagens de antígenos, essa população está aumentada, propiciando então, um ambiente menos inflamatório para o parasito (Wang *et al.*, 2014). Durante o experimento 1A os níveis de IL-10 dos grupos infectados se apresentaram abaixo dos níveis detectados para o grupo controle não infectado, o que contradiz a literatura. Porém, em outro experimento do grupo (dados não publicados) este padrão se repete, necessitando de uma maior investigação do nosso modelo experimental. Existe um único artigo na literatura o qual mediu citocinas em hamsters infectados por *A. ceylanicum* (Mendez *et al.*, 2005). Nesse trabalho as interleucinas associadas ao perfil T_H2 como IL-4 e IL-10 estavam aumentadas no grupo infectado, em relação ao grupo controle. Entretanto,

nesse trabalho, as citocinas foram avaliadas pela metodologia de PCR-semi quantitativa, uma metodologia menos precisa do que a técnica de PCR em tempo real que foi utilizada no presente trabalho. Além disso, a carga parasitária é duas vezes maior que a escolhida para este trabalho.

A resposta do tipo T_H1 está presente principalmente na fase de pré-patência da infecção, quando estão se estabelecendo na mucosa intestinal, enquanto a resposta do tipo T_H2 ocorre com a patência da infecção (Mendez *et al.*, 2005). O principal objetivo tanto da resposta T_H2 quanto da resposta T_{REG} , é a modulação da resposta T_H1 através da inibição da ativação de células efectoras. Esta inibição é feita principalmente por meio do aumento de IL-10 e IL-4, que são moléculas presente nos dois mecanismos. INF- γ e TNF- α são marcadores de resposta T_H1 , que durante a infecção por helmintos são reguladas negativamente, assim como na tolerância oral (Allen & Maizels, 2011).

Neste trabalho, tanto o TNF- α quanto o INF- γ estão diminuídos em relação ao controle (NT + NI), que corrobora a ideia de que a parasitose regula este tipo de resposta. Porém, não houve diferença entre os tratamentos e o controle infectado (NT + D), o que permite concluir que a regulação feita pela tolerância oral não se somou ao efeito do parasito.

As células T_{REG} expressam a cadeia alfa do receptor para IL-2 (CD25), que captam essa molécula importante para a sobrevivência de linfócitos T, impedindo a sua proliferação (Chen *et al.*, 2013). Podemos perceber que os grupos tratados com *L. lactis lactis* NCDO2118 possuem valores menores de IL-2, sugerindo um maior número de células T_{REG} quando comparados com os controles, inclusive com o controle infectado. Porém, o FoxP3 que é um marcador de T_{REG} , estava diminuído em todos os grupos infectados, não permitindo confirmar que ocorreu a expansão clonal devido ao tratamento com *L. lactis lactis* NCDO2118.

A indução da tolerância oral é um processo que promove a expansão de células T_{REG} específica a um determinado antígeno (Coelho & Faria, 2012), no caso deste trabalho à Hsp65. A Hsp65 é uma proteína presente em ambientes inflamados, que induzem a liberação de TNF- α , óxido nítrico, IL-12 e IL-15 por macrófagos (Kaul & Thippeswamy, 2011). Quando ocorre a liberação destas moléculas, as células T_{REG} se ligam e modulam a inflamação, através da produção de IL-10 e TGF- β , que são moléculas inibidoras de células pró-inflamatórias (Eden *et al.*, 2005).

Neste trabalho não foi evidenciada a indução da tolerância oral pela Hsp65. O protocolo utilizado foi adaptado a partir do utilizado em camundongos que são

organismos menores e, portanto, deve ser considerado que a concentração da cultura e/ou o tempo de tratamento para o hamster possam não ter sido os mais adequados. Além disso, este mecanismo é muito interessante em doenças inflamatórias intensas, onde a presença de Hsp65 é muito aumentada. No caso da ancilostomose a inflamação do intestino delgado é pontual e dependente da carga parasitária. Caso a tolerância tenha sido estabelecida, este tipo de estímulo pode não ter sido suficiente para que este mecanismo seja percebido. Da mesma forma não foi detectado uma ação do *L. lactis lactis* NCDO2118 selvagem. Uma das consequências com o tratamento com o *L. lactis lactis* NCDO2118 é um aumento da resposta T_H2 , como no nosso modelo de infecção, o parasito já causa um aumento dessa resposta, esse mecanismo desencadeado pela bactéria pode ter sido pouco expressivo em relação à situação já estabelecida pelo próprio helminto. Essa ação do *L. lactis lactis* NCDO2118 é mais percebida em situações inflamatórias intensas nas quais o tipo de resposta local é do tipo T_H1 .

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O tratamento realizado com as linhagens *L. lactis lactis* NCDO2118 visando à indução da tolerância oral não interferiu no curso da infecção, permitindo que os grupos completassem o desenvolvimento do parasito e reproduzissem as características da infecção em humanos.

A utilização das linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118 em diferentes tempos de infecção diminuiu a carga parasitária quando realizado no dia da infecção, independente da expressão de Hsp65. Quando o tratamento foi realizado após oito dias de infecção, a carga parasitária foi aumentada nos grupos tratados com as duas de *L. lactis lactis* NCDO2118. Entretanto, sem diferença estatística para ambos os casos.

O consumo da cultura entre os grupos foi homogêneo, permitindo considerar que a estimulação da mucosa intestinal foi equivalente em todos os grupos.

A alteração de peso no decorrer do experimento foi condizente com dados do nosso grupo e de outros grupos, o que é esperado para a infecção e foi unicamente dependente da infecção, não sendo percebida diferença entre os tratamentos em relação aos controles.

Os parâmetros relacionados à anemia, como dados hematológicos e bioquímicos, apresentaram relação apenas com a parasitemia, não apresentando diferença entre os tratamentos.

A análise da citocinas demonstrou que o tratamento com as linhagens de *L. lactis lactis* NCDO2118 não interferiu na resposta imune. Os parâmetros avaliados apresentaram resultados condizentes com a infecção por ancilostomídeos, não permitindo avaliar se houve o estabelecimento da tolerância oral.

Após a análise conjunta dos dados, este trabalho demonstra que o tratamento com *L. lactis lactis* NCDO 2118 selvagem, *L. lactis lactis* NCDO 2118 plasmídeo vazio (pXylT:SEC:nuc) e com a linhagem de *L. lactis lactis* NCDO 2118 expressando Hsp65 (pXylT:SEC:hsp65) visando à tolerância oral a Hsp65, não interferiu no curso da infecção. Porém, quando o tratamento é realizado concomitante à infecção, existe uma tendência na alteração da carga parasitária, independentemente da linhagem utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. [s.l.: s.n.].

ADAMS, M. R.; MARTEAU, P. Letter to the Editor On the safety of lactic acid bacteria from food. v. 27, p. 263–264, 1995.

ALBONICO, M., STOLTZFUS, R.J., SAVIOLI, L., TIESCH, J.M., CHJAWAY, H.M., ERCOLE, E., CANCRINI, G. (1998). . Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* and *Nacator americanus*, on iron status of school children. **International Journal of Epidemiology**, v. 27, p. 530–537, 1998.

ALKAZMI, L. M. M.; DEHLAWI, M. S.; BEHNKE, J. M. The mucosal cellular response to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. **Journal of helminthology**, v. 82, n. 1, p. 33–44, 2008.

ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375–88, 2011.

ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007.

ASAOLU, S. O.; OFOEZIE, I. E. The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. v. 86, 2003.

BACA-ESTRADA, M. E. et al. Intestinal Expression and Cellular Immune Responses to Human Heat-Shock Protein 60 in Crohn ’ s Disease. v. 39, n. 3, p. 498–506, 1994.

BARÇANTE, J. M. P. et al. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitology Research**, v. 89, n. 2, p. 89–93, 2003.

BASUALDO, J. et al. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 101, n. 6, p. 559–562, 2007.

BENNETT, A.; GUYATT, H. Reducing Intestinal Nematode Infection : Efficacy of Albendazole and Mebendazole. v. 16, n. 2, 2000.

BETHONY, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521–32, 6 maio 2006.

BOTTAZZI, M. E. The human hookworm vaccine: recent updates and prospects for success. **Journal of helminthology**, v. 89, n. 5, p. 540–4, 2015.

BUNGIRO, R. D. et al. Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 5, p. 293–303, 2008.

CHEN, S. et al. Regulatory T cell in stroke: a new paradigm for immune regulation. **Clinical & developmental immunology**, v. 2013, p. 689827, 2013.

COBELENS, P. M. et al. Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine

- expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. p. 775–779, 2002.
- COELHO, V.; FARIA, A. M. C. HSP60: Issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. JAN, p. 1–8, 2012.
- DARMON, A. N. Does social class predict diet quality? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1107–1117, 2008.
- DE AZEVEDO, M. S. P. et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1146–1157, 2012.
- DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. **ISRN Gastroenterology**, v. 2011, p. 1–11, jan. 2011.
- DU, Y. et al. *Lactococcus lactis* fabH, encoding beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase, can be functionally replaced by the *Plasmodium falciparum* congener. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3959–66, 2010.
- DURAI, M.; GUPTA, R. S.; MOUDGIL, K. D. The T cells specific for the carboxyl-terminal determinants of self (rat) heat-shock protein 65 escape tolerance induction and are involved in regulation of autoimmune arthritis. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 2795–2802, 2004.
- EDEN, W. VAN; ZEE, R. VAN DER; PRAKKEN, B. HEAT-SHOCK PROTEINS INDUCE T-CELL REGULATION OF CHRONIC. v. 5, n. April, p. 318–330, 2005.
- ESPITIA, C. M. et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC immunology**, v. 11, p. 31, 2010.
- FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. v. 206, p. 232–259, 2005.
- FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clinical & developmental immunology**, v. 13, n. 2-4, p. 143–57, 2006.
- GARDLIK, R.; PALFFY, R.; CELEC, P. Original Article Recombinant Probiotic Therapy in Experimental Colitis in Mice. v. 245, p. 238–245, 2012.
- GAUSE, W. C.; ALLEN, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. v. 13, n. 8, p. 607–614, 2014.
- GAZE, S. et al. Characterising the Mucosal and Systemic Immune Responses to Experimental Human Hookworm Infection. v. 8, n. 2, 2012.
- GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Clinical indications for probiotics: an overview. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S96–S100; discussion S144–S151, 2008.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, 1939.

HANSON, M. L. et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 210–221.e13, 2014.

HAWDON, J. M. Hookworm: developmental biology of the infectious process and Peter J Hotezl. p. 618–623, 1996.

HOTEZ, P. Hookworm and poverty. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1136, p. 38–44, jan. 2008.

HOTEZ, P. J. et al. Hookworm Infection. **The new england journal of medicine**, v. 351, p. 799–807, 2004.

HRNČÍŘOVÁ, L. et al. Crohn's Disease: A Role of Gut Microbiota and NOD2 Gene Polymorphisms in Disease Pathogenesis. **Acta Medica**, n. 3, p. 89–96, 2014.

HU, Y. et al. An Extensive Comparison of the Effect of Anthelmintic Classes on Diverse Nematodes. v. 8, n. 7, p. 1–12, 2013.

INPANKAEW, T. et al. High Prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* Hookworm Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 976 – 982, 2014.

JARDIM-BOTELHO, A. et al. Hookworm, *Ascaris lumbricoides* infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, n. 8, p. 994–1004, 2008.

JIAN, X. et al. *Necator americanus*: maintenance through one hundred generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). II. Morphological development of the adult and its comparison with humans. v. 105, p. 192–200, 2003.

JIRAANANKUL, V. et al. Incidence and Risk Factors of Hookworm Infection in a Rural Community of Central Thailand. v. 84, n. November 2005, p. 594–598, 2011.

JR, R. D. B. et al. Oral Transfer of Adult *Ancylostoma ceylanicum* Hookworms into Permissive and Nonpermissive Host Species Oral Transfer of Adult *Ancylostoma ceylanicum* Hookworms into Permissive and Nonpermissive Host Species. 2003.

KAUL, G.; THIPPESWAMY, H. Role of heat shock proteins in diseases and their therapeutic potential. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 2, p. 124–31, 2011.

LAROCQUE, R. et al. Relationship between intensity of soil-transmitted helminth infections and anemia during pregnancy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 783–789, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOUKAS, A. Immune Responses in Hookworm Infections. v. 14, n. 4, p. 689–703,

2001.

LOUKAS, A.; CONSTANT, S. L.; BETHONY, J. M. Immunobiology of hookworm infection. v. 43, p. 115–124, 2005.

LUERCE, T. D. et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. p. 1–11, 2014.

MABBOTT, N. A. et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 4, p. 666–77, 2013.

MARENGO, E. B. et al. Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

MARON, R. et al. The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at: p. 1708–1715, 2002.

MASPES, V.; TAMIGAKI, M. Anemia ancilostomótica: estudo da fisiopatologia. **Revista de Saude Publica**, v. 15, n. 6, p. 611–622, 1981.

MCCLURE, E. M. et al. The association of parasitic infections in pregnancy and maternal and fetal anemia: a cohort study in coastal Kenya. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2724, fev. 2014.

MENDEZ, S. et al. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3402–3407, 2005a.

MENDEZ, S. et al. Host Cytokine Production , Lymphoproliferation , and Antibody Responses during the Course of *Ancylostoma ceylanicum* Infection in the Golden Syrian Hamster. v. 73, n. 6, p. 3402–3407, 2005b.

MERCENIER, A.; GRANGETTE, C. Lactic Acid Bacteria As Live Vaccines. v. 2, p. 17–25, 2000.

MOREAU, E.; CHAUVIN, A. Immunity against Helminths : Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. v. 2010, 2010.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. [s.l: s.n.].

OBIEZUE, N. R. et al. Gastrointestinal Helminth Infection in Pregnancy : Disease Incidence and Hematological Alterations. v. 42, n. 5, p. 497–503, 2013.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 298, n. 167, p. G807–819, 2010.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 105–9, 2014.

PABST, O.; MOWAT, A M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 3, p. 232–239, 2012.

PACANARO, C. DE P. **Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos decorrentes da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamsters (*M esocricetus auratus*) submetidos à dieta hipoprotéica.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

PAPIER, K. et al. Childhood malnutrition and parasitic helminth interactions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 2, p. 234–243, 2014.

PEARSON, M. S. et al. Molecular mechanisms of hookworm disease: Stealth, virulence, and vaccines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 13–21, 2012.

RAJESH, R.; MOUDGIL, K. D. Heat shock protein can promote as well as regulate autoimmunity. **Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 388–393, 2010.

REZENDE, R. M. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺ LAP⁺ regulatory T cells. **Journal of Autoimmunity**, v. 40, p. 45–57, 2013.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 4. ed. Belo Horizonte: [s.n.].

SANTOS, D. et al. *Lactococcus lactis* as a live vector : Heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 2, p. 165–175, 2011.

SERAFIM, L. R. et al. The crowding effect in *Ancylostoma ceylanicum*: density-dependent effects on an experimental model of infection. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4611–21, 2014.

SMITH, J. L.; BROOKER, S. Impact of hookworm infection and deworming on anaemia in non-pregnant populations: A systematic review: Systematic Review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 7, p. 776–795, 2010.

STEVENS, T. R. J. et al. Circulating antibodies to heat-shock protein 60 in Crohn ' s disease and ulcerative colitis. p. 271–274, 1992.

STOLTZFUS, R. J.; DREYFUSS, M. L.; CHWAYA, H. M. Hookworm Control as a Strategy to Prevent Iron Deficiency. v. 55, n. 6, p. 223–232, 1997.

TRAUB, R. J. *Ancylostoma ceylanicum* , a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1009–1015, 2013.

VABULAS, R. M. Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31332–31339, 2001.

WANG ET AL, 2012/2013/2014. Mechanism of Oral Tolerance Induction to

Therapeutic Proteins. v. 65, n. 6, p. 759–773, 2014.

WEINER, H. L. Commentary Oral tolerance. v. 91, n. November, p. 10762–10765, 1994.

WELLS, J. M.; MERCENIER, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. v. 6, n. may, 2008.

YAP, P. et al. Influence of nutrition on infection and re-infection with soil-transmitted helminths: a systematic review. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 229, 2014.

ZAKOSTELSKA, Z. et al. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 6, p. 3227–36, 2005.

ZURITA-TURK, M. et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73, 2014.