

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

*Influência do antígeno solúvel de ovos de Schistosoma
mansoni sobre a ativação e progressão do ciclo celular de
linfócitos T de indivíduos infectados e não infectados por
Schistosoma mansoni e/ou Necator americanus*

Ana Carolina Campi Azevedo

Belo Horizonte
Outubro/2007

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

*Influência do antígeno solúvel de ovos de Schistosoma
mansoni sobre a ativação e progressão do ciclo celular de
linfócitos T de indivíduos infectados e não infectados por
Schistosoma mansoni e/ou Necator americanus*

Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de doutor em
Ciências, na área de
concentração Biologia Celular e Molecular
Orientação: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira
Co-orientação: Dra. Iramaya Rodrigues Caldas

Ana Carolina Campi Azevedo

Belo Horizonte
Outubro/2007

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C196i
2007 Campi-Azevedo, Ana Carolina.

Influência do antígeno solúvel de ovos de Schistosoma mansoni sobre a ativação e progressão do ciclo celular de linfócitos T de indivíduos infectados e não infectados por Schistosoma mansoni e/ou Necator americanus / Ana Carolina Campi-Azevedo. – Belo Horizonte, 2007.

XXIV, 162 f.: il; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 122-157

Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansônica 2. Ciclo celular 3. Ciclina D I. Título. II. Correa-Oliveira, Rodrigo (Orientação). III. Caldas, Iramaya Rodrigues (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

*Influência do antígeno solúvel de ovos de Schistosoma
mansoni sobre a ativação e progressão do ciclo celular de
linfócitos T de indivíduos infectados e não infectados por
Schistosoma mansoni e/ou Necator americanus*

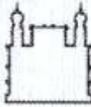
apresentada por

Ana Carolina Campi Azevedo

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Orientador/Presidente)
Profa. Dra. Iramaya Rodrigues Caldas (Co-orientadora)
Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (Membro Titular)
Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (Membro Titular)
Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Membro Titular)
Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes (Membro Titular)

Tese defendida e aprovada em 8 de Outubro de 2007.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

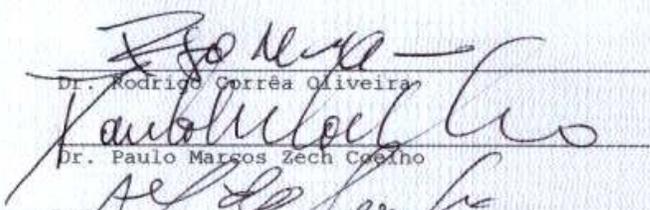
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

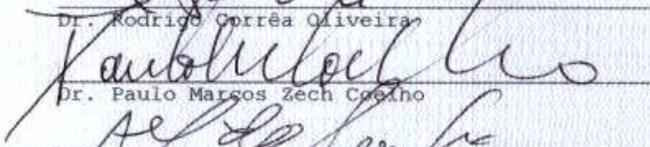
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da sétima defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Ana Carolina Campi Azevedo, sob a orientação do Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira e co-orientação da Dra. Iramaya Rodrigues Caldas.

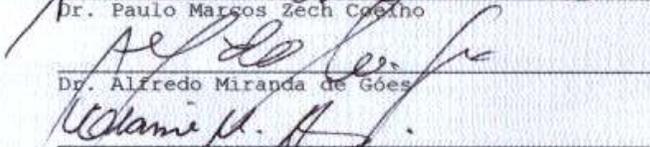
Aos oito dias do mês de outubro do ano de dois mil e sete, às nove horas, realizou-se no auditório do Instituto René Rachou, o exame da sétima tese de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese da aluna Ana Carolina Campi Azevedo intitula-se "Influência do antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* na progressão do ciclo celular de linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores da infecção crônica pelo *S. mansoni* residentes em área endêmica de Minas Gerais". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira - IRR/Fiocruz, (orientador e presidente da banca), Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - IRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Paulo Marcos Zech Coelho - IRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Alfredo Miranda de Goes - UFMG (membro titular), Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes - UFMG (membro titular) e Dra. Cristina Toscano Fonseca - IRR/Fiocruz (suplente). Após arguir a aluna e considerar se a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada aprovada. Uma vez encerrado o exame, eu, Rodrigo Corrêa Oliveira, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, oito de outubro de dois mil e sete.



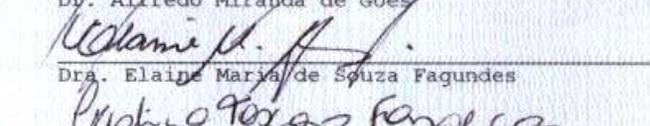
Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira



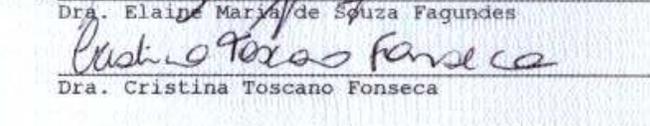
Dr. Paulo Marcos Zech Coelho



Dr. Alfredo Miranda de Goes



Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes



Dra. Cristina Toscano Fonseca

**Dedico a minha pequenininha *Ingrid*,
filha amada, que me ilumina
e me ensina a viver
todos os dias!**

Agradecimentos

Agradeço aos meus amigos, além de orientadores, *Dra. Iramaya* e *Dr. Rodrigo*, pela confiança, pelos inúmeros ensinamentos, inspiração, respeito, carinho e constante dedicação, que sempre tiveram com este trabalho e comigo.

Ao *professor Giovanni* e a *Andréa Teixeira*, fontes inspiradoras para todo e qualquer estudante que deseja ser um grande cientista, obrigada pela amizade e enorme participação e colaboração.

A todos os pesquisadores e estudantes do *LICM*, pela agradável convivência e aprendizado. Mas em especial a *Dê, Fê, Jú, Sol, Luanda, Roberta, Vanessa, Ariane, Haroldo, Polly, Alex, Anna, Vlad, Jack, Si, Paulinha, Lú Maria, Stefan, Rodolfo, Zezé, Molica, Pedro* pela amizade, apoio constante, incentivo e pelos bons momentos compartilhados.

Ao corpo técnico, psicológico e estimulador compreendido pela minha eterna amiga *Clari*, que comanda a alegria no laboratório e que, com jeitinho tanto me ajudou. A *Li*, que adotei como uma verdadeira mãe com pulso firme, mas sempre cheia de carinho. E as meninas *Ló, Lú, Tiza* e *Dani* e ao *Walisson* pela amizade, carinho, colaboração e disponibilidade convivência diária, além de muita competência e presteza.

À *Ana Pacheco, Sérgio, Ricardo* e *Rita* pelo importante serviço de apoio prestado ao *LICM*.

Aos amigos do *Laboratório de Doença de Chagas*, muito obrigada pela colaboração e carinho. Em especial ao *Dr. Olindo Assis*, pelos enormes ensinamentos e a *Bia* (Beatriz Nascimento) e a *sua irmã Patrícia* do Banco de Sangue “Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho”, pelo apoio na obtenção das amostras de sangue, tão importantes para a conclusão deste trabalho.

Aos *colegas e professores* da *Pós-graduação* pelo ótimo convívio durante o período em que cursamos as disciplinas e em todos os momentos compartilhados no Instituto.

À Coordenadoria de Pós-graduação do Instituto René Rachou, representada, inicialmente pela coordenadora *Dra. Virgínia Schall*, pela possibilidade de integrar o curso e a coordenadora *Dra. Cristiana Brito*, por todo o apoio oferecido. Às assistentes da Pós-graduação, *Cris* e *Andréa*, obrigada pela cordialidade e serviços a todos os momentos prestados.

A todos os funcionários do Instituto René Rachou, representado por seu diretor *Dr. Álvaro Romanha*.

À *Carol Lustosa*, pela paciência e auxílio na análise estatística. Ao *Segemar*, obrigada pelo empenho e profissionalismo que me auxiliaram na revisão bibliográfica e padronização desta tese. Ao *João*, obrigada pelo trabalho de formatação e finalização da arte da tese.

À *Dra. Andréia Gazzinelli*, ao *Léo* e ao *Wesley*, da Faculdade de Enfermagem da UFMG, a *Maria de Fátima*, *Marlucy* e *Lilian* da UNIVALE, pela coleta de dados e aquisição do material biológico.

Agradeço aos *participantes/voluntários* do projeto de pesquisa “Papel de antígenos derivados do *S. mansonii* na regulação da progressão do ciclo celular e proliferação *in vitro* de linfócitos”.

Aos *apoios financeiros*: UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Conselho Nacional de Pesquisas do Brasil (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

À *agência financiadora* CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Em especial, agradeço a minha mãe, *Marilene*, pelo amor, incentivo e apoio durante todos os dias de uma doutoranda estressada. Obrigada por me ensinar a ter perseverança mesmo nos momentos mais complicados da vida.

À *Ingrid*, pela paciência e compreensão nestes últimos quatro anos. Sempre a espera de carinho e atenção. É por você que conquisto mais esta etapa.

Ao *Fred*, muito obrigada! Você me ajudou a ser firme e a não desistir quando tudo parecia perdido. Obrigada pelo amor, respeito e compreensão.

Sumário

1	Introdução.....	24
1.1	-Esquistossomose mansônica.....	27
1.1.1	- A resposta imune na esquistossomose mansônica.....	28
1.2	- Ancilostomíase.....	32
1.2.1	- A resposta imune na ancilostomíase.....	32
1.3	- Estudo das co-infecções helmínticas.....	34
1.3.1	- A resposta imune em co-infecções.....	35
1.4	- Ciclo Celular.....	37
2	Justificativa & Objetivos.....	39
2.1	- Justificativa e objetivo geral.....	40
2.2	- Objetivos específicos.....	41
3	Materiais & Métodos.....	42
3.1	- Caracterização da população.....	43
3.1.1	- Definição da população em estudo.....	44
3.2	- Exame parasitológico de fezes.....	46
3.3	- Preparo do antígeno solúvel de ovos do <i>S. mansoni</i>	47
3.4	- Hemograma.....	47
3.5	- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	47
3.6	- Ensaio de proliferação celular.....	48
3.7	- Determinação das fases do ciclo celular e proliferação celular.....	49
3.7.1	- Aquisição e análise dos dados da avaliação das fases do ciclo celular e proliferação celular.....	50
3.8	- Imunofenotipagem celular - Bulk Blast.....	53
3.8.1	- Aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem celular – Bulk Blast.....	55

3.9 - Obtenção dos sobrenadantes de cultura para identificação das citocinas.....	57
3.10 - Caracterização das citocinas presentes no plasma e sobrenadantes de culturas de PBMC.....	57
3.10.1 - Aquisição e análise dos dados de avaliação dos níveis de citocinas.....	58
3.11 - Avaliação da expressão da Ciclina D ₁ , D ₂ , D ₃ (Ciclina D _{1,2,3}).....	60
3.11.1 - Aquisição e análise dos dados de avaliação da expressão da Ciclina D _{1,2,3}	60
3.12 - Análise Estatística.....	62
4 Resultados.....	63
4.1 - Comparação do perfil hematológico do sangue periférico de indivíduos DS, XTO e NEG.....	64
4.2 - Caracterização do perfil imunológico por dosagem de citocinas de indivíduos DS, XTO e NEG.....	65
4.2.1 - Produção de citocinas no plasma.....	65
4.2.2 - Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC dos indivíduos DS, XTO e NEG.....	67
4.2.2.1 - Comparação, da produção de citocinas, entre as culturas com e sem estímulo antigênico.....	67
4.2.2.2 – Comparação, da produção de citocinas no sobrenadante, entre os grupos de indivíduos DS, XTO e NEG.....	71
4.3 - Comparação do fenótipo celular induzido por SEA entre os grupos DS, XTO e NEG.....	74
4.4 - Caracterização da progressão do ciclo celular e resposta de proliferação de PBMC de indivíduos DS, XTO e NEG.....	80
4.4.1 - Comparação do ciclo celular entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/anti-CD28 ou SEA.....	80
4.4.2 - Comparação do ciclo celular entre os grupos DS, XTO e NEG.....	83

4.5 - Comparação da expressão de Ciclina D _{1,2,3} em linfócitos T dos grupos DS, XTO e NEG.....	86
<i>Estudo da influência do N. americanus em pacientes co-infectados com S. mansoni.....</i>	86
4.6 - Comparação do perfil hematológico do sangue periférico de pacientes MONO e CO.....	88
4.7 - Caracterização do perfil imunológico por dosagem de citocinas de pacientes MONO e pacientes CO.....	88
4.8 - Comparação do fenótipo celular induzido por SEA entre os grupos MONO e CO..	89
4.9 - Caracterização da progressão do ciclo celular e resposta de proliferação de PBMC pacientes MONO e CO.....	91
4.9.1 - Comparação do ciclo celular entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/anti-CD28 ou SEA.....	95
4.9.2 - Comparação do ciclo celular entre os grupos de pacientes MONO e CO.....	95
4.10 - Comparação da expressão de Ciclina D _{1,2,3} em linfócitos T pacientes MONO e CO.....	97
<i>Resumo dos Resultados DS, XTO e NEG.....</i>	99
<i>Resumo dos Resultados MONO e CO.....</i>	100
5 Discussão.....	102
5.1 - Avaliação do perfil hematológico do sangue periférico.....	104
5.2 - Avaliação das citocinas no plasma.....	106
5.3 - Avaliação das citocinas no sobrenadante de culturas de PBMC.....	109
5.4 - Avaliação do fenótipo celular em culturas de PBMC.....	111
5.5 - Avaliação da progressão do ciclo celular e proliferação de células T de indivíduos DS, XTO e NEG.....	114
<i>Conclusões</i>	122
6 Referências Bibliográficas.....	123

7 Anexos.....	158
<i>Resumo esquemático do ciclo celular.....</i>	<i>159</i>
Parecer: Comitê de Ética do Instituto René Rachou – FIOCRUZ (CEPSH/CpqRR: 012/2003)	160
Parecer: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: 598/2004)	161

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da análise da progressão do ciclo celular de PBMC do sangue periférico, após 3 dias de cultura na presença de anti-CD3/anti-CD28 por citometria de fluxo.....	52
Figura 2	Representação esquemática da análise de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, de PBMC do sangue periférico estimulados, por 5 dias na presença de SEA.....	55
Figura 3	Representação esquemática da análise de citocinas, do soro, através do ensaio com microesferas por citometria de fluxo.....	59
Figura 4	Representação esquemática da análise da população CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺ , por citometria de fluxo, de leucócitos do sangue periférico estimulados por 5 dias na presença de SEA.....	61
Figura 5	Análise citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ do plasma de indivíduos DS, XTO e NEG.....	66
Figura 6	Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos DS.....	68
Figura 7	Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos XTO.....	69
Figura 8	Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos NEG.....	70
Figura 9	Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de cultura não estimulada de indivíduos DS, XTO e NEG.....	72
Figura 10	Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de cultura estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG..	73
Figura 11	Freqüência de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.....	76
Figura 12	Razão entre células CD4 ⁺ /CD8 ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.....	77

Figura 13	Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de marcadores de ativação (CD69 ⁺ , HLA-DR ⁺ e CD25 ⁺ e CD28 ⁻) em subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de indivíduos DS, XTO e NEG.....	78
Figura 14	Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de células T reguladoras CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} de indivíduos DS, XTO e NEG.....	79
Figura 15	Cinética da frequência de células CD3 ⁺ Ciclina D _{1,2,3} ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos XTO e NEG.....	87
Figura 16	Análise da frequência de células CD3 ⁺ Ciclina D _{1,2,3} ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.....	87
Figura 17	Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ no plasma e no sobrenadante de cultura não estimulada e estimulada por SEA de pacientes MONO e CO.....	90
Figura 18	Frequência de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.....	92
Figura 19	Razão entre células CD4 ⁺ /CD8 ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.....	93
Figura 20	Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de marcadores de ativação (CD69 ⁺ , HLA-DR ⁺ e CD25 ⁺ e CD28 ⁻) em subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de pacientes MONO e CO.....	93
Figura 21	Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de células T reguladoras CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} de pacientes MONO e CO.....	94
Figura 22	Análise da frequência de CD3 ⁺ Ciclina D _{1,2,3} ⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1	Caracterização da população em estudo.....	46
Tabela 2	Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem celular.....	54
Tabela 3	Relação dos anticorpos utilizados, em cada poço da placa de poliestireno, em fundo em U, para análise da imunofenotipagem celular.....	55
Tabela 4	Caracterização do perfil hematológico da população estudada.....	64
Tabela 5	Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de indivíduos DS.....	82
Tabela 6	Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de pacientes XTO.....	82
Tabela 7	Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de indivíduos NEG.....	82
Tabela 8	Distribuição das fases do ciclo celular de células T dos grupos DS, XTO e NEG.....	85
Tabela 9	Caracterização do perfil hematológico dos pacientes MONO e CO.....	85
Tabela 10	Correlação entre IL-10 do sobrenadante e a frequência de células CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} dos pacientes MONO e CO.....	94
Tabela 11	Distribuição das fases do ciclo celular de células T de pacientes MONO.....	96
Tabela 12	Distribuição das fases do ciclo celular de células T de pacientes CO.....	96
Tabela 13	Distribuição das fases do ciclo celular de células T dos grupos MONO e CO...	98

Lista de Abreviaturas & Símbolos

7-AAD	7- amino-actinomicina-D
AB	Antígenos A, B do sistema sangüíneo eritrocitário ABO
ANOVA	Análise de variância
Anti-CD3/CD28	Estímulo inespecífico com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28
BD	Becton Dickinson
BrdU	5-Bromo-2-deoxiUridina
CBA	Cytometric Bead Array, método para detecção de citocinas por citometria de fluxo
CERC	Antígeno solúvel de cercárias de <i>S. mansoni</i>
CD	do inglês, “Cluster of differentiation”, ou seja, grupamento de diferenciação, nomenclatura normalizada para as diversas moléculas de superfície de células do sistema imune
CD3⁺CyD_{1,2,3}⁺	Célula T positiva para ciclina D _{1,2,3}
CD4⁺CD25^{HIGH}	Linfócitos T CD ⁺ expressando alta densidade da molécula CD25 na superfície
cdc2	Quinase dependente de ciclina 2. O mesmo que cdk1_ quinase dependente de ciclina 1
cdks	Quinases dependentes de ciclinas
Cy	Ciclina D
CMBlast	Meio de cultivo celular suplementado
CO	Sigla para identificar pacientes co-infectados com <i>S. mansoni</i> e <i>N. americanus</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase I	Desoxirribonuclease I
DS	Sigla para identificar indivíduos doadores de sangue, residentes em área não endêmica para esquistossomose
E₂F	Fator de transcrição essencial à maquinaria de replicação de DNA
epg	Ovos por grama de fezes
<i>et al</i>	do latim, significa colaboradores
Facs	do inglês, “Fluorescence Activated Cell Sorte”
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro verde da luz visível
FL1	Canal de detecção da fluorescência verde, classificada como fluorescência do tipo 1 nos ensaios de citometria de fluxo
FL2	Canal de detecção da fluorescência laranja, classificada como fluorescência do tipo 2 nos ensaios de citometria de fluxo
FL3	Canal de detecção da fluorescência vermelha, classificada como fluorescência do tipo 3 nos ensaios de citometria de fluxo
FoxP3	Fator de transcrição da família “forkhead”
FSC	Sigla para parâmetro de tamanho celular em ensaios de citometria
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Grama
g/dL	Grama por decilitro
g/L	Grama por Litro
G₀	do inglês, “Gap ₀ ”, fase ou estado no qual as células viáveis permanecem sem comprometimento com a progressão no ciclo celular-quiescência

G₁	do inglês, “Gap ₁ ”, fase ou estado no qual as células viáveis encontram-se entre o término da última mitose e a próxima fase de replicação do DNA
G₀/G₁	Fases ou estados nos quais as células viáveis encontram-se ou em quiescência ou entre o término da última mitose e a próxima fase de replicação do DNA
G₂	do inglês, “Gap ₂ ”, fase ou estado no qual as células viáveis encontram-se entre o término da última replicação do DNA e a próxima divisão mitótica
G₂/M	Fases ou estados nos quais as células viáveis encontram-se entre o término da última replicação do DNA e a próxima fase G ₁
GITR	Proteína de superfície celular, relacionada a receptor de TNF
HCV	Vírus da hepatite C
HIGH	Alta densidade de fluorescência por citometria de fluxo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	Vírus linfotrópico humano do sorotipo 1
HLA-DR	Produtos dos genes do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II, marcadores de ativação tardia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
km	Kilômetro
L	Litro
L + B	Linfócitos e blastos
L3	3º estágio larval de ancilostomídeos
LE	do nome, “Luis Evangelista”, paciente infectado que fornecia os ovos para os ensaios experimentais

LT	Linfócitos T
M	Molar
MEK 1/2	do inglês, “mitogen-activated protein kinase”, ou seja uma proteína quinase que participa e nomeia uma das vias de transdução de sinal no interior da célula
MEM	Minimal Essential Medium
MFF	Max Facs Fix, solução fixadora de células para ensaios de citometria
mg	Miligrama, 10^{-3} grama
mg/kg	Miligrama por quilo
µg	Micrograma, 10^{-6} grama
MHC	do inglês, Main Histocompatibility Complex, ou seja, Complexo de Histocompatibilidade Principal
mL	Mililitro, 10^{-3} litro
mg/mL	Micrograma por mililitro
µg/mL	Micrograma por microlitro
µL	Microlitro
mmol	Milimolar, 10^{-3} molar
MONO	Sigla para identificar pacientes mono-infectados com <i>S. mansoni</i>
NEG	Sigla para identificar indivíduos com fezes ovos-negativa para <i>N. americanus</i> e <i>S. mansoni</i> , denominados por “negativos” de área endêmica
p130	Membro da família da proteína retinoblastoma – pRB. Uma vez fosforilada por complexos ciclinas/cdks, torna-se inativa e permite a liberação de fatores de transcrição
p21	Inibidor da fosforilação da pRB do ciclo celular
p27	Inibidor da fosforilação da pRB do ciclo celular
PBMC	do inglês, “Peripheral Blood Monocuclear Cells”, ou seja, células

	mononucleadas do sangue periférico
PBS	do inglês, “Phosphated Buffer Solution”, ou seja, solução tampão salínico fosfatado
PBS-P	Solução tampão salínico fosfatado permeabilizadora
PBS-Wash	Solução tampão salínico fosfatado para lavagem de células
PCE	Programa de Controle a Esquistossomose
PE	Ficoeritrina, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro laranja da luz visível
pg/mL	Picogramas (10^{-9} grama) por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA-P	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI3K	do inglês, “phosphatidyl inositol 3-kinase”, ou seja uma proteína quinase que participa e nomeia uma das vias de transdução de sinal no interior da célula
pRB	Proteína retinoblastoma - Uma vez fosforilada por complexos ciclinas/cdks, torna-se inativa e permite a liberação de fatores de transcrição
PercP	Clorofila piridinina, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro vermelho da luz visível
Q1-Q4	Quadrantes 1 a 4
RPMI 1640	Solução nutritiva para cultivo celular e que não contém timidina na sua composição química
r	Coefficiente de correlação
Rh	Antígeno Rh ₀ (D) do sistema sangüíneo eritrocitário Rh
S	Fase de síntese do DNA no ciclo celular
SEA	Antígeno solúvel de ovos de <i>S. mansoni</i>
SEB	Superantígeno enterotoxina estafilocócica B

SOM	Antígeno solúvel de esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>
SHuN	soro humano normal AB Rh ⁺
SSC	Sigla para parâmetro de complexidade ou granulosidade intracelular em ensaios de citometria de fluxo
SWAP	Antígeno solúvel de vermes adultos totais de <i>S. mansoni</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TC	Tricolor, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro vermelho da luz visível
TEG	Antígeno solúvel de tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>
Th₁	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 1
Th₂	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR I	Receptor do tipo I do fator de necrose tumoral
TNFR II	Receptor do tipo II do fator de necrose tumoral
x g	Giros por minuto
XTO	Sigla para identificar pacientes infectados por <i>S. mansoni</i>
VDRL	do inglês, “Venereal Disease Research Laboratories. Nome do teste empregado para detecção de doenças sexualmente transmissíveis
WHO	do inglês, Organização Mundial de Saúde
α	Alfa, letra a do alfabeto grego
β	Beta, letra b do alfabeto grego
γ	Gama, letra g do alfabeto grego
μ	Micro, letra m do alfabeto grego
ρ	Rô, letra r do alfabeto grego
°C	Graus centígrados

© Marca registrada Caltag

< Menor que

% Percentual

Resumo

A infecção pelo *S. mansoni* é muito freqüente em regiões com condições precárias de saneamento básico, resultando em elevadas prevalências de esquistossomose nas populações entre 10 e 20 anos de idade. A patologia desta infecção é caracterizada pela formação de granulomas em torno dos ovos liberados pelos vermes adultos, no interior do sistema porta-hepático. Sabe-se que, os pacientes portadores da infecção crônica apresentam uma modulação da capacidade proliferativa em resposta ao antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA) e, este estado parece ser benéfico para o hospedeiro e tem sido considerada fundamental para o equilíbrio hospedeiro-parasito. Em contrapartida, indivíduos não infectados residentes em área endêmica para esquistossomose apresentam uma elevada reatividade celular em resposta a estes antígenos. Neste trabalho, comparamos a influência do SEA na progressão do ciclo celular de linfócitos T do sangue periférico de pacientes portadores de infecção crônica pelo *S. mansoni* (**XTO**), de indivíduos não infectados residentes em área endêmica (**NEG**) e de indivíduos não infectados, porém não residentes em área endêmica, denominados por **DS**. Nossos resultados mostraram que pacientes **XTO** apresentam uma modulação da resposta ao SEA e, sugerem que esta imunossupressão pode ser devido a participação das células T reguladoras, que secretam IL-10 em resposta ao SEA. A citocina IL-10 pode atuar inibindo a ativação celular de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, por meio do bloqueio destas células nas fases G₀/G₁ do ciclo celular, promovendo a anergia nestas células. Este bloqueio da progressão do ciclo celular se dá por inibição da expressão da ciclina D_{1,2,3} nos linfócitos T. Por outro lado, nas culturas celulares dos indivíduos **NEG** estimuladas com SEA, foram detectados níveis elevados de TNF- α , ativação celular dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e um aumento da expressão da ciclina D_{1,2,3}, promovendo a progressão através do ciclo celular em resposta ao SEA. Em áreas endêmicas, existe uma alta prevalência de ancilostomídeos co-infectando pacientes portadores de *S. mansoni*. Neste contexto, avaliamos também a influência da presença da co-infecção pelo *N. americanus* na resposta imunológica ao SEA de pacientes infectados por *S. mansoni*. Nossos resultados mostraram que tanto as PBMC de pacientes mono-infectados (**MONO**) quanto as de co-infectados (**CO**) apresentaram anergia celular em resposta ao SEA, sugerindo que a presença da infecção por *N. americanus* não influencia na resposta imune ao SEA.

Abstract

S. mansoni infection is frequent in regions where factors such as poor sanitary conditions occur and may lead to high prevalence of the disease mainly in individuals of the age groups of 10 to 20 years. The pathology caused by the infection is characterized by granulomatous reactions around the eggs eliminated by the parasites that are trapped in the tissues and the hepatic-portal system. It is well known that during the chronic phase individuals that harbor the infection modulate their cellular immune response to soluble egg antigens (SEA) and this immune reactivity is highly accepted to be beneficial to the host and fundamental for the maintenance of equilibrium of the host-parasite interaction. In contrast to infected individual, those not infected but living in an endemic area for the disease show high cellular reactivity to the same antigens. In this thesis, we evaluate the effect of that the response to SEA has on the cell cycle progression of peripheral blood T lymphocyte from patients in the chronic phase of the disease (**XTO**), non-infected individuals living in endemic areas (**NEG**) and of non-infected individuals that do not reside in endemic areas (**DS**). Our results show that cells from **XTO** have a modulated response to SEA and suggest that this immunosuppression may be due to regulatory T cells that secrete IL-10 in response to SEA. IL-10 may act via the inhibition of the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by blocking these cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle promoting anergy of these cells. The blockage of cell cycle progression occurs via the inhibition of the expression of cyclin D_{1,2,3} by the T lymphocytes. On the other hand, cells from **NEG** stimulated *in vitro* with SEA, high levels of TNF- α secretion was detected, together with the activation of both CD4⁺ and CD8⁺ cells and increase on the expression of cyclin D_{1,2,3} with consequent progression of these cell through the cell cycle. In endemic areas, there is a high prevalence of hookworms co-infecting individuals with *S. mansoni*. We therefore, evaluated the putative influence of the co-infection with *N. americanus* on the immune response of *S. mansoni* infected patients to *in vitro* SEA stimulation. Our results show that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from mono-infected patients (**MONO**) as well as of co-infected (**CO**) were anergic to SEA, suggesting that the presence of the infection by *N. americanus* does not influence the response to SEA.

1. Introdução

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO) estima-se que, aproximadamente, dois bilhões de indivíduos no mundo estão infectados por helmintos transmitidos pelo solo (geohelmintos) como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* e pelo trematoda *Schistosoma* (Savioli *et al.*, 2002). Aproximadamente 400 milhões destes indivíduos são crianças em idade escolar e 300 milhões apresentam carga parasitária elevada, resultando em várias deficiências cognitivas e motoras em consequência da anemia (WHO, 2002).

A esquistossomose é endêmica em 74 países, com mais de 650 milhões de indivíduos pertencentes ao grupo de risco à infecção e com cerca de 200 milhões de infectados (Engels *et al.*, 2002). Ainda que a infecção seja “benigna” (manifestação clínica detectável somente durante exame físico) na maioria dos pacientes, em alguns, com intensidade de infecção elevada, pode ocorrer o desenvolvimento de fibrose periportal. Neste sentido, a hipertensão porta, em termos de morbidade e mortalidade, é a seqüela mais importante da infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Martins *et al.*, 1998; van der Werf *et al.*, 2002).

De acordo com os últimos dados epidemiológicos, a área endêmica para esquistossomose mansoni no Brasil, abrange 19 estados com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco de infecção e cerca de 2,5 milhões de indivíduos infectados (FUNASA, 1999; Coura & Amaral, 2004). Embora a doença esteja em expansão, houve uma redução da mortalidade causada pela forma hepatoesplênica da esquistossomose, provavelmente devido a implantação do Programa de Controle a Esquistossomose na década de 70 (PCE), todavia, a morbidade ainda é considerada elevada (Cota *et al.*, 2006; Lapa *et al.*, 2006; de Farias *et al.*, 2007).

Um aspecto importante da esquistossomose mansoni refere-se à prevalência e a intensidade de infecção. Estudos epidemiológicos sugerem que, em área endêmica, a infecção aumenta progressivamente com a idade, alcançando um pico máximo entre dez e vinte anos de idade, diminuindo progressivamente nas décadas subsequentes. Alguns pesquisadores consideram que essa redução reflete o desenvolvimento de uma imunidade adquirida com a idade (Butterworth *et al.*, 1985; Wilkins *et al.*, 1987; Ouma *et al.*, 1998; Kabatereine *et al.*, 1999; Massara *et al.*, 2006). Outros acreditam, que essa queda seja atribuída a mudanças no comportamento, ou seja, uma redução nos níveis de exposição dos indivíduos mais velhos a águas contaminadas (Dalton & Pole, 1978; Gazzinelli *et al.*, 2001; Massara *et al.*, 2004; Bethony *et al.*, 2004), à disposição genética (Dessein *et al.*, 1992; Bethony *et al.*, 1999; 2002b) ou ainda,

mudanças fisiológicas, tais como alterações na espessura da pele, conteúdo lipídico ou hormonal (Gryseels, 1994; Gryseels *et al.*, 2006).

Acredita-se que, juntamente com a esquistossomose, outras helmintoses, transmitidas pelo solo, são responsáveis por cerca de 40% da morbidade causada pelas infecções parasitárias em todo o mundo (Savioli *et al.*, 2002). Em geral, estas helmintoses são mais prevalentes nas populações pobres, que vivem em condições que favorecem a transmissão e, muitas vezes, não têm acesso ao tratamento ou a medidas efetivas de prevenção (WHO, 2002; Matthys *et al.*, 2007).

A infecção por ancilostomídeos tem despertado grande interesse dos governantes devido às conseqüências, principalmente nas crianças, acarretando déficit cognitivo e educacional, desnutrição e retardo intelectual (Stephenson *et al.*, 1989; Lozoff *et al.*, 2000; Beasley *et al.*, 2002; Brooker *et al.*, 2007), e também conseqüências na gravidez e na produtividade dos trabalhadores (Pawlowski *et al.*, 1991; Gyorkos *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004).

A estimativa de casos de infecções por ancilostomídeos em países tropicais e subtropicais é de 740 milhões de indivíduos (de Silva *et al.*, 2003). Na América Latina, 135 milhões de indivíduos estão infectados com ancilostomídeos e no Brasil não existem dados oficiais da prevalência (Sabin Vaccine Institute, 2004), mas estima-se uma prevalência de 10 a 68,2%, dependendo da região endêmica (de Silva *et al.*, 2003; Boia *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2006; Fleming *et al.*, 2006).

Estudos recentes sugerem que o pico de prevalência e de intensidade de infecção por ancilostomídeos ocorre, freqüentemente, em indivíduos de meia idade ou mais idosos. Esta relação foi claramente demonstrada em duas diferentes regiões endêmicas: China (Província de Hainan) e Brasil (Estado de Minas Gerais) (Bethony *et al.*, 2002 a; b). Estas regiões representam áreas de alta transmissão de ancilostomídeos e de endemicidade (Gandhi *et al.*, 2001; Bethony *et al.*, 2002 a; b; Brooker *et al.*, 2004) e demonstram que tanto o aumento da prevalência, quanto da intensidade de infecção ocorrem em função do aumento da idade. Estudos sugerem que ancilostomídeos podem apresentar algum mecanismo de escape por induzir supressão da resposta imune, através da secreção de moléculas pelo verme adulto, incluindo fatores apoptóticos em linfócitos (Humphries *et al.*, 1997; Loukas & Prociv, 2001; Bethony *et al.*, 2002a; Brooker *et al.*, 2004). Estes estudos mostram, claramente, que os perfis das curvas de prevalência e intensidade de infecção para ancilostomídeos diferem significativamente das observadas para o *S. mansoni*.

As medidas de controle mais utilizadas na esquistossomose e na ancilostomíase, no momento, são a quimioterapia específica, seletiva ou em massa, medidas sanitárias, suprimento

de água adequado, eliminação do hospedeiro intermediário (no caso da esquistossomose) e educação em saúde. A quimioterapia tem sido altamente efetiva na redução das formas graves, mas não previne a re-infecção destas helmintoses.

Assim, devido à expansão da prevalência, transmissão e morbidade da esquistossomose e da ancilostomíase, estudos dos fatores imunológicos, associados aos eventos celulares e moleculares da resposta aos helmintos, têm sido estimulados na tentativa de desenvolver métodos eficazes e convenientes de controle destas doenças ou vacinas anti-helmínticas.

Além disso, tendo em vista que a presença de co-infecções é freqüente em áreas endêmicas (Buck *et al.*, 1978; Keusch & Migasena 1982; Chamone *et al.*, 1990; Ashford *et al.*, 1992; Chunge *et al.*, 1995; Booth *et al.*, 1998; Petney & Andrews, 1998; Needham *et al.*, 1998; Brooker *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2002; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a; 2002; Tchuem Tchuenté *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2006; Raso *et al.*, 2004; 2006; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007) e que cada uma destas helmintoses tem conseqüências particulares no sistema imune do hospedeiro, abordaremos, inicialmente, os principais aspectos imunológicos da esquistossomose e da ancilostomíase, cuja compreensão é indispensável para a análise da resposta imune presente nos indivíduos co-infectados.

1.1-Esquistossomose mansoni

A infecção pelo *S. mansoni* ocorre quando a cercária, estágio larval do parasito, eliminada em riachos e lagos por caramujos do gênero *Biomphalaria*, penetra através da pele do hospedeiro definitivo e se transforma em esquistossômulo (parasito jovem). Após 72 horas, o esquistossômulo chega aos pulmões através da corrente sanguínea. No sistema porta os parasitos desenvolvem-se sexualmente, acasalam-se e migram até às veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas iniciam sua postura (cerca de 300 ovos/fêmea /dia) (Barbosa *et al.*, 1978). Aproximadamente metade dos ovos atravessa a parede do intestino e é eliminada com as fezes, eclodindo em contato com água. A outra parte é drenada para o fígado ou outros órgãos, instalando-se nos ramos intra-hepáticos mais finos da veia porta, ou mesmo, permanecem na parede do intestino, onde se tornam alvos da resposta imune celular do hospedeiro, desenvolvendo em torno dos mesmos uma reação granulomatosa típica (Bogliolo, 1959; Warren, 1967).

A formação do granuloma em torno dos ovos depositados nos tecidos é a principal causa da patologia na esquistossomose. Em 1964, Andrade & Warren constataram que os granulomas em torno dos ovos contendo o embrião, depositados no fígado de camundongos com 25 semanas de infecção pelo *S. mansoni* eram consideravelmente menores do que aqueles que ocorriam nos animais com 8 semanas de infecção, ocasião em que os granulomas atingem o máximo de seu desenvolvimento.

Esse fenômeno, denominado de modulação, também já foi descrito em pacientes e envolve a participação de células T (Pearce *et al.*, 1991; Flores-Villanueva *et al.*, 1994a; Chensue *et al.*, 1994; Montesano *et al.*, 1997; Pancré *et al.*, 1999), a anergia de células T (Stadecker, 1994), células T reguladoras (McKee & Pearce, 2004; Hesse *et al.*, 2004; Baumgart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006), monócitos e/ou macrófagos (Flores-Villanueva *et al.*, 1994a; b; Wynn, 2003; Comin *et al.*, 2007; van Liempt *et al.*, 2007), fatores solúveis e anticorpos (Doughty *et al.*, 1989; Parra *et al.*, 1991; Montesano *et al.*, 1989; Hesse *et al.*, 2000; 2001), citocinas como a IL-10 (Flores-Villanueva *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Rezende *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Sadler *et al.*, 2003) e imunocomplexos (Goes *et al.*, 1989).

O número e a dimensão dos granulomas estão diretamente envolvidos no processo de fibrose periportal, responsável pela hipertensão porta e suas conseqüências e, portanto, sua diminuição, quer em tamanho ou número, é altamente benéfica para o hospedeiro (Domingo & Warren, 1968; Boros *et al.*, 1975).

1.1.1 - A resposta imune na esquistossomose mansoni

O estudo *in vitro* da reatividade de células mononucleares de pacientes portadores de esquistossomose, na presença de antígenos isolados de *S. mansoni* tem-se mostrado de extrema utilidade na elucidação dos mecanismos de reação do sistema imune ao parasito. Assim desde a década de 80, vêm sendo realizados ensaios de reatividades celulares aos antígenos solúveis de diferentes estádios evolutivos do *S. mansoni*, entre estes os de vermes adultos totais (SWAP), tegumento de vermes adultos (TEG), cercárias (CERC), esquistossômulos (SOM) e ovos (SEA) (Gazzinelli *et al.*, 1983).

Desde então, alguns trabalhos demonstraram que a reatividade celular aos antígenos do parasito é muito mais acentuada na fase aguda do que na fase crônica da doença (Ottesen *et al.*,

1978; Gazzinelli *et al.*, 1985), a qual é caracterizada por um “estado” de imunorregulação. Além disto, quando avaliadas as diferentes formas clínicas da esquistossomose crônica, foram reveladas reatividades celulares mais intensas em pacientes portadores de formas clínicas graves (hepatoesplênica) do que as observadas em pacientes assintomáticos (intestinais) (Ellner *et al.*, 1981).

A exposição de células dos pacientes cronicamente infectados aos diferentes antígenos de *S. mansoni* também foi amplamente estudada. Em geral, observa-se uma intensa resposta proliferativa direcionada ao SWAP e uma fraca resposta ao SEA (Nash *et al.*, 1982; Gazzinelli *et al.*, 1985; 1987; Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1993; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998b; 2002; Joseph *et al.*, 2004; Talaat *et al.*, 2007). Esta redução da capacidade proliferativa, de células do sangue periférico de pacientes cronicamente infectados, em resposta ao SEA, foi altamente, relacionada à produção de fatores séricos (Colley *et al.*, 1977; Ottesen & Poindexter, 1980; Cottrell *et al.*, 1980; Rocklin *et al.*, 1980; Barral-Netto *et al.*, 1982; Doughty *et al.*, 1989; Parra *et al.*, 1991; Montesano *et al.*, 1989; Hesse *et al.*, 2000; 2001). Contudo, Goodgame e colaboradores, desde 1978, observaram que o grau de supressão mediado pelo soro não tem correlação com o título de anticorpos anti-SEA. Desta forma, a supressão da reatividade celular pelo soro não foi convenientemente esclarecida, mostrando que a supressão não depende apenas do soro, mas também da natureza dos linfócitos e de células acessórias envolvidas (Todd *et al.*, 1979; Ottesen & Poindexter, 1980).

Alguns trabalhos na literatura caracterizaram fenotipicamente as células presentes no sangue periférico de pacientes portadores da esquistossomose. Em um primeiro relato, uma redução na razão de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ foi observada, sugerindo que a infecção pelo *S. mansoni* induziria um aumento na frequência de células T CD8⁺ em pacientes portadores da esquistossomose hepatoesplênica (Colley *et al.*, 1983). Já Martins - Filho e colaboradores (1997) demonstraram que pacientes portadores desta forma clínica, apresentam níveis menores de linfócitos T CD8⁺ quando comparados aos pacientes portadores de outras formas clínicas mais brandas. Estes autores mostraram também que indivíduos infectados, em geral, apresentam uma menor porcentagem de células T CD3⁺ e T CD4⁺ do que os não infectados (Martins-Filho *et al.*, 1997). Mais estudos, realizados por estes autores, mostraram que pacientes cronicamente infectados pelo *S. mansoni* apresentam um aumento da expressão de moléculas de ativação celular na superfície de linfócitos T em comparação a indivíduos não infectados (Martins - Filho *et al.*, 1997; 1999).

Estudos em camundongos demonstraram que a infecção por *S. mansoni* promove a elevação da frequência de células T CD4⁺CD25⁺. Estes trabalhos mostraram, ainda que, há uma evidente proliferação de células Foxp3⁺, caracterizando estas células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ como T reguladoras (Treg). De acordo com estes trabalhos, as Treg podem suprimir o desenvolvimento de uma resposta Tipo1 e também limitar a magnitude da resposta Tipo2 em resposta aos antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (McKee & Pearce, 2004; Hesse *et al.*, 2004; Baumgart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006), sendo que, alguns deles demonstraram que esta polarização ocorre por meio da secreção de IL-10 (McKee & Pearce, 2004; Hesse *et al.*, 2004).

Os mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune são mediados por células dendríticas, as quais estão presentes nos tecidos, e após a maturação, migram para os linfonodos para ativar as células T *naive*, induzindo a diferenciação destas em células Tipo1, Tipo2 ou Treg (Kapsenberg, 2003). Recentemente, em um trabalho realizado no sentido de compreender como ocorre a polarização da resposta Tipo2 em esquistossomose humana crônica, demonstrou-se que há uma rápida internalização do SEA pelas células dendríticas expostas a este antígeno. Porém, este trabalho mostrou que na presença de SEA, há uma inibição da maturação destas células, caracterizada pelo decréscimo de moléculas co-estimulatórias CD80, CD83 e CD86, além da redução da produção das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α (van Liempt *et al.*, 2007). De fato, estes autores confirmaram os resultados observados por Cervi e colaboradores (2004), que demonstraram que as células dendríticas imaturas ou parcialmente maduras induzem uma resposta Tipo2 em infecções helmínticas. Por outro lado, tem sido sugerido que o SEA induz a hiper-expressão de receptores CD83 em células dendríticas, levando as células T *naive* a se diferenciarem em Treg, importantes produtoras de IL-10 (van der Kleij *et al.*, 2002).

A IL-10 foi identificada como uma importante citocina na regulação da resposta imune humana durante a infecção por *S. mansoni*, uma vez que esta foi associada ao controle da morbidade (Araújo *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 1999; Joseph *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2007). Em trabalho desenvolvido por nosso grupo, uma alta produção de IL-10 foi associada à resposta celular de pacientes intestinais, enquanto uma secreção reduzida foi relacionada à resposta celular de pacientes portadores das formas clínicas crônica hepatoesplênica e aguda (Malaquias *et al.*, 1997). Mais recentemente, demonstrou-se que na presença de SEA, células mononucleares de pacientes intestinais produzem quantidades elevadas de IL-10 e secretam níveis significativamente menores de IFN- γ do que indivíduos não infectados (Silveira *et al.*, 2004).

De forma geral, altos níveis de IFN- γ foram associados à resistência a esquistossomose em indivíduos conhecidos por normais endêmicos (Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Viana *et al.*, 1994), assim como à resistência a infecção após o tratamento (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998b). Estes indivíduos são identificados por apresentarem sorologia positiva, além de alta reatividade celular aos antígenos do parasito, exames de fezes repetidamente negativos, contato freqüente com águas infestadas por cercárias e nenhuma história prévia de tratamento. A ausência de antígeno anódico circulante (CAA) no soro reforça a classificação destes indivíduos como indivíduos não infectados ou putativamente resistentes (Viana *et al.*, 1994).

Em contrapartida, trabalhos na literatura sugerem que as citocinas IFN- γ e TNF- α estariam envolvidas no desenvolvimento da forma clínica hepatoesplênica (Mwatha *et al.*, 1998). De fato, Mwatha e colaboradores demonstraram que quanto maior a concentração de receptores tipo I e II de TNF (TNFR1 e TNFR2) no plasma, maior a gravidade da doença. O papel do TNF- α também foi associado à fase aguda da esquistossomose, o qual revelou que a presença desta citocina é capaz de desenvolver lesão ao redor dos ovos de *S. mansoni* (Amiri *et al.*, 1992; Cheever *et al.*, 1999).

Neste contexto, a exposição ao *S. mansoni* pode induzir diferentes padrões de resposta imune. Uma resposta predominante Tipo1, com secreção elevada de citocinas IFN- γ e TNF- α , estaria relacionada a formas clínicas mais graves da esquistossomose, como a hepatoesplênica (Mwatha *et al.*, 1998; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2002). Enquanto uma resposta imune Tipo2, induzida pela ação da IL-10, possivelmente secretada por células Treg, estaria relacionada a forma clínica intestinal (Araújo *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 1999; Joseph *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2007). E uma resposta imune balanceada entre Tipo1, com a produção de TNF- α e IFN- γ , e Tipo2, com produção de IgE, estaria relacionada a indivíduos não infectados residentes em área endêmica (Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Viana *et al.*, 1994; Brito *et al.*, 2000).

1.2 - Ancilostomíase

A infecção por ancilostomídeos ocorre quando larvas infectantes L3 entram em contato com o homem e penetram ativamente na pele (*N. americanus* e *A. duodenale*) ou são ingeridas (*A. duodenale*) pelo hospedeiro. Em seguida, as larvas alcançam os capilares sanguíneos ou linfáticos, migram até os pulmões, atravessam a parede dos alvéolos e caem na luz dos mesmos, onde iniciam a sua migração até a faringe. Nesta fase, podem ser expelidas junto à expectoração ou deglutidas. As larvas entram no trato gastrointestinal, onde se transformam duas vezes, desenvolvendo-se para o estágio adulto. Aproximadamente 5 a 8 semanas, após a infecção da larva L3 no homem, estas atingem a maturidade sexual e iniciam a sua postura dos ovos. Os vermes adultos permanecem no interior do trato gastrointestinal, sugando o sangue dos capilares que irrigam a parede do intestino (Hoagland & Schad, 1978; Schad *et al.*, 1984; Hawdon *et al.*, 1996).

A patogenia da ancilostomíase é proporcional ao número de parasitos presentes no intestino delgado. Logo, a anemia e hipoproteinemia, causadas pelo intenso hematofagismo exercido pelos vermes adultos, são os principais sinais de ancilostomíase. A anemia é de evolução lenta e acompanhada de perturbações gastrointestinais. O estado orgânico do hospedeiro agrava-se com a instalação e persistência da anemia, da leucocitose, da eosinofilia, além de várias mudanças fisiológicas e bioquímicas. Os indivíduos podem apresentar diversos graus de infecção, desde os mais leves com ligeiros sinais clínicos, aos mais graves em que a sintomatologia alcança as mais variadas formas (Schad *et al.*, 1984; Stoltzfus *et al.*, 1997 a; b).

1.2.1 - A resposta imune na ancilostomíase

Existem poucos trabalhos a respeito da resposta imune celular na ancilostomíase, principalmente humana sendo que, sua maioria, restringe-se à avaliação do perfil de citocinas frente aos antígenos de ancilostomídeos ou mesmo a estímulos inespecíficos (Quinnell *et al.*, 2004; Geiger *et al.*, 2004; Wright & Bickle, 2005). A ausência de um estudo, causado por *A. duodenale* e *N. americanus*, em modelo experimental adequado tem limitado significativamente os estudos sobre estas helmintoses humanas. Os poucos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos em modelos experimentais utilizam, principalmente, a infecção por *Ancylostoma caninum*.

Neste contexto, ensaios de reatividade celular em cães vacinados revelaram uma elevada proliferação em resposta ao antígeno recombinante da larva de *N. americanus* (Fujiwara *et al.*, 2006). Contudo, trabalhos demonstraram que a reatividade de células de pacientes portadores de ancilostomíase, em resposta ao antígeno solúvel de verme adulto de *A. caninum*, é muito baixa, caracterizando um estado de imunorregulação (Geiger *et al.*, 2004; Bethony *et al.*, 2006) ou mesmo de anergia celular.

Sobre a caracterização fenotípica, poucas informações estão disponíveis para a compreensão da modulação ou mesmo da capacidade proliferativa de células de pacientes portadores da doença. Em um primeiro trabalho realizado na África, foi demonstrado que as populações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ estão reduzidas nestes pacientes em comparação aos indivíduos não infectados (Onyemelukwe & Musa, 2001). Foi demonstrado também que a proteção à infecção por ancilostomídeos pode ser devido a um processo dependente de IL-4 produzida por linfócitos T CD4⁺, tendo estas células um papel importante e essencial no processo de resistência à infecção (Finkelman *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 1998).

Recentemente, Geiger e colaboradores mostraram que apesar dos pacientes portadores de ancilostomíase apresentarem baixas frequências de células T e B, estas células estão altamente ativadas (Geiger *et al.*, 2007). Além disso, estes autores também mostraram que em culturas de células mononucleares na presença de diferentes antígenos de *A. caninum*, não houve o predomínio de uma resposta imune Tipo2 e sim de uma resposta mixta (Geiger *et al.*, 2007).

Outros autores já haviam observado que, em ancilostomíase, há uma resposta imune mista de citocinas (Maizels *et al.*, 2004), com produção tanto de IFN- γ e IL-12 (Tipo1) quanto de IL-4, IL-5 e IL-13 (Tipo2) (Quinnell *et al.*, 2004; Geiger *et al.*, 2004; 2007). Apesar do perfil misto observado, alguns trabalhos demonstraram que a resposta Tipo2, com acentuada produção de IL-5, está intimamente relacionada à resistência à infecção tanto em modelos experimentais (Girod *et al.*, 2003; Fujiwara *et al.*, 2006) quanto em humanos (Quinnell *et al.*, 2004).

Em relação a IL-10, sabe-se que há um aumento da concentração desta citocina, em comparação às citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 com o desenvolvimento da infecção crônica (MacDonald *et al.*, 2002). Em contrapartida, após o tratamento foi verificado o declínio da mesma (MacDonald *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2004). Por outro lado, uma elevada produção de IL-10 e TNF- α , e uma redução de IL-5, IL-12, IL-13 e IFN- γ foram demonstradas em células mononucleares de indivíduos normais endêmicos para ancilostomíase, frente ao antígeno solúvel de verme adulto de *A. caninum* (Geiger *et al.*, 2004).

Portanto, os dados indicam que uma resposta celular Tipo2 está diretamente associada à proteção contra ancilostomídeos, enquanto uma resposta mista de citocinas, inclusive ação da citocina reguladora IL-10 é encontrada em pacientes cronicamente infectados com ancilostomídeos. Entretanto, assim como na esquistossomose, o mecanismo de modulação da resposta celular, em pacientes cronicamente infectados, ainda não foi esclarecido.

1.3 - Estudo das co-infecções helmínticas

A presença de poliparasitismo é freqüente em regiões tropicais e subtropicais onde as infecções com helmintos são endêmicas. Normalmente, nas comunidades destas regiões vários helmintos estão presentes e um grande número de indivíduos é portador de pelo menos duas espécies (Buck *et al.*, 1978; Keusch & Migasena 1982; Chamone *et al.*, 1990; Ashford *et al.*, 1992; Chungue *et al.*, 1995; Booth *et al.*, 1998; Petney & Andrews, 1998; Needham *et al.*, 1998; Brooker *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2002; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a; 2002; Tchuem Tchuenté *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2006; Raso *et al.*, 2004; 2006; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007).

Recentes estudos têm demonstrado que para algumas helmintoses houve um aumento da intensidade de infecção quando os pacientes apresentam co-infecção em relação àqueles que apresentam mono-infecção (Booth *et al.*, 1998; Needham *et al.*, 1998). Sendo assim, estes pacientes apresentam um maior risco de morbidade e, em condições extremas, até de mortalidade. Howard e colaboradores (2002) revisando os dados da literatura sobre associações parasitárias observaram uma significativa heterogeneidade geográfica das associações, embora estas associações dentro de pequenas localidades, tais como vilarejos, distritos e zonas ecológicas fossem bem homogêneas (Howard *et al.*, 2002). Estes autores, também, observaram associação entre o aumento da intensidade de infecção e a presença do poliparasitismo.

Evidências, obtidas de estudos laboratoriais, demonstraram que helmintos podem influenciar, direta ou indiretamente, na infecção por outra espécie (Cox, 2001). Inúmeras publicações sugerem a ocorrência de antagonismo ou sinergismo entre infecções com o *S. mansoni* (Pritchard *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1997; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1988; 2002; Cox, 2001). Nesse contexto, alguns estudos mostraram que a infecção por ancilostomídeos está associada positivamente com a infecção pelo *S. mansoni* (Chamone *et al.*, 1990; Keiser *et al.*,

2002 a; b; Raso *et al.*, 2004), bem como à filariose, estabelecendo, portanto, uma relação sinérgica (Faulkner *et al.*, 2005).

No Brasil os helmintos mais comumente encontrados co-infectando pacientes portadores de esquistossomose são os ancilostomídeos (Chamone *et al.*, 1990; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007). Um trabalho, realizado em uma comunidade rural no Brasil, mostrou uma associação positiva para as co-infecções por *N. americanus* e *S. mansoni* e, também, para co-infecção por *N. americanus* e *A. lumbricoides*, além de uma relação antagônica entre as infecções por *S. mansoni* e *A. lumbricoides*. Estes autores sugeriram que estas associações podem ter implicações na epidemiologia, resposta imune e no controle do poliparasitismo (Fleming *et al.*, 2006).

As investigações realizadas até o momento sugerem claramente a influência de uma infecção helmíntica sobre a outra, bem como a influência das infecções por helmintos sobre a resposta imune a outras infecções parasitárias, tal como a malária (Nacher, 2004). Esta associação pode ser sinérgica ou antagônica (Fleming *et al.*, 2006) e apresentar efeitos benéficos ou maléficos para o hospedeiro.

1.3.1 – A resposta imune em co-infecções

Entre os trabalhos a respeito da resposta imune descritos até o momento, a maioria avaliou as infecções por *S. mansoni* e outras infecções de maneira isolada, sem considerar suas possíveis interações. Dentre os estudos que consideraram tais interações, grande parte restringe-se em avaliar a reatividade cruzada entre antígenos e anticorpos (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1988; Pritchard *et al.*, 1991; Timothy *et al.*, 1992; Noureldin *et al.*, 2000).

Neste sentido, alguns trabalhos demonstraram que anticorpos séricos de pacientes infectados com *A. lumbricoides* ou ancilostomídeos apresentam reatividade cruzada a antígenos de *S. mansoni*, provavelmente por compartilhamento de epítomos (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1988; Pritchard *et al.*, 1991). Noureldin e colaboradores, em 2000, também observaram reatividade cruzada entre os anticorpos de *Schistosoma* e *Fasciola hepática* em co-infectados (Noureldin *et al.*, 2000).

O primeiro trabalho sobre a resposta efetora em co-infecção por *S. mansoni* e *Trichuris muris* (indutora de resposta Tipo1) experimental demonstrou a presença de elevados níveis de IL-

4, IL-5 e IL-10, além de baixa concentração de IFN- γ . Este ambiente, predominante Tipo2, possivelmente induzido por *S. mansoni*, foi protetor contra *T. muris*, sendo estes helmintos completamente eliminados pelo hospedeiro (Curry *et al.*, 1995).

Ensaio de reatividade celular de pacientes portadores de *T. trichiura*, residentes em uma área de baixa prevalência para *S. mansoni* revelaram que as células mononucleares dos pacientes respondem fortemente aos antígenos solúveis de ovo e do verme adulto do *S. mansoni* (Geiger *et al.*, 2002). Também em 2002, um trabalho, desenvolvido pelo nosso grupo, demonstrou que em áreas onde o *S. mansoni* é prevalente, independente de outras helmintoses, a resposta imune é dirigida, principalmente, contra antígenos do *S. mansoni*. Ao contrário, em áreas onde a prevalência para *A. lumbricoides* ou *N. americanus* são predominantes e não há infecção para o *S. mansoni*, a resposta imune, tanto celular como humoral, são dirigidas principalmente contra os parasitos mais prevalentes. Estes resultados sugerem que a infecção pelo *S. mansoni* tem efeito significativo sobre outras helmintoses (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002).

A predominância de um ambiente Tipo2 ou de um perfil misto de citocinas em co-infecção por *S. mansoni* e vírus também foi observada, ao contrário da mono-infecção virótica, cuja resposta é predominante é Tipo1 (Santos *et al.*, 2004; El-Kady *et al.*, 2005). Neste contexto, pacientes portadores de co-infecções por *S. mansoni*, *Strongyloides stercoralis* e HTLV-1 apresentam células mononucleares com menor capacidade de produção de IFN- γ e maior secreção de IL-10, em resposta ao SWAP, do que as células dos pacientes portadores de infecções pelo HTLV-1 (Santos *et al.*, 2004). El-Kady e colaboradores estudaram as co-infecções por *S. mansoni* e o vírus da hepatite C (HCV), relatando menor nível de IFN- γ e aumento da IL-4 e IL-10 nos pacientes mono-infectados por *S. mansoni* ou co-infectados quando comparado aos pacientes mono-infectados por HCV (El-Kady *et al.*, 2005).

As investigações fenotípicas revelaram que pacientes co-infectados por diversos helmintos apresentam um decréscimo da população de linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺, mas não de linfócitos T CD8⁺, quando comparados aos pacientes não infectados. Em contraste a esta redução da população T CD3⁺ e CD4⁺, a resposta imune celular em co-infectados foi caracterizada por um aumento de células ativadas e de memória (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Estes autores sugeriram que infecções helmínticas crônicas promovem um “estado” constante de ativação celular, o que implicaria na ausência de resposta e anergia das células.

Recentemente, em um amplo estudo foi observado que não há diferença na caracterização fenotípica entre pacientes mono- e co-infectados por *S. mansoni*, *A. lumbricoides* e

ancilostomídeos em resposta aos antígenos solúveis de ovos e verme adulto de *S. mansoni* (Oliveira, 2006). Neste contexto, apenas a caracterização do perfil fenotípico, não é suficiente para identificar os mecanismos envolvidos na resposta imune em co-infecção por estes helmintos, portanto, há necessidade de se avaliar também a expressão de citocinas nos processos de ativação/regulação celular.

É importante ressaltar ainda, que deve ser explorada uma maior abordagem da reatividade celular aos antígenos dos helmintos presentes na co-infecção, bem como, os processos celulares que ocorrem entre a ativação celular e a resposta efetora.

1.4 - Ciclo Celular

A modulação da reatividade celular, em pacientes cronicamente infectados por *S. mansoni*, foi associada a um “estado” de total inativação celular, promovendo a anergia (Stadecker, 1994) ou mesmo a uma ativação celular permanente que induziria morte celular por apoptose (Carneiro-Santos *et al.*, 2000; Rutitzky *et al.*, 2003). Em esquistossomose mansoni, faltam trabalhos que focalizem o papel destes efeitos imunomodulatórios no ciclo celular.

A ativação dos linfócitos é determinada pelo aumento da expressão de diversas moléculas na superfície celular, que normalmente, não são expressas ou são pouco expressas nas células quiescentes (estado G₀) (Judd *et al.*, 1980; Cebrián *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1993). Uma vez ativadas, os linfócitos podem progredir através do ciclo celular. Este processo é altamente organizado e composto por diversos pontos de controle da progressão das fases (*checkpoints*), que são controlados por proteínas, cujas funções são a de garantir uma completa e correta sequência de eventos antes da mitose e divisão celular (Gillet & Barnes, 1998). Por outro lado, a ativação celular também pode induzir apoptose dos linfócitos, causando a supressão de sua capacidade proliferativa (Carneiro-Santos *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2003).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: fase G₀, período quiescente, no qual os linfócitos não estão proliferando, a fase G₁, que define a entrada no ciclo celular, a fase S, que é a síntese de DNA e as fases G₂/M, caracterizadas pela mitose e divisão celular. A fidelidade e o controle da progressão do ciclo celular é amplamente dependente dos eventos que ocorrem na fase G₁, envolvendo um grande número de ciclinas (reguladores positivos) e de inibidores de quinases dependente de ciclinas (reguladores negativos) (Pardee, 1989).

Sucintamente (ver anexo), a ligação ao receptor TCR ou ao receptor de co-estimulação CD28 não induz a síntese de DNA, enquanto a ocupação simultânea destes dois receptores resulta em uma proliferação amplificada de linfócitos T, dependente de diversas vias de transdução de sinal (Appleman *et al.*, 2002). Os linfócitos são mantidos no estado quiescente (G_0) e a saída do estado quiescente e progressão para a fase G_1 deve-se, em parte, ao aumento da expressão das ciclinas D e E. No período inicial da fase G_1 , a ciclina D associa-se à quinases dependentes de ciclina D (cdk4 e cdk6), enquanto no período intermediário da fase G_1 , a ciclina E associa-se a cdk2, ocorrendo a ativação dos complexos CyD/cdk4, CyD/cdk6 e CyE/cdk2 (Sherr, 1996). A ativação dos complexos citados promove a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRB), que se encontra na forma hipofosforilada (Chellappan *et al.*, 1991; Dynlacht *et al.*, 1994; Hatakeyama *et al.*, 1994). A fosforilação da pRB é um dos principais *checkpoints* do ciclo celular, uma vez que, as células que saírem da quiescência, mas forem bloqueadas em G_1 , provavelmente entram em apoptose. O complexo ciclina E/cdk2 também fosforila as proteínas p21 e p27 (inibidores da fosforilação da pRB) (Sheaff *et al.*, 1997), levando a degradação destas e, contribuindo para a progressão do ciclo celular (Sherr *et al.*, 1994). A pRB hiperfosforilada ativa alguns fatores de transcrição, induzindo a transcrição de diversos genes que codificam proteínas diretamente relacionadas à fase de síntese de DNA (fase S do ciclo), entre elas a ciclina A. A ciclina A, por sua vez, associa-se à quinase dependente de ciclina A, a cdk2 (Appleman *et al.*, 2002), promovendo a ativação do complexo CyA/cdk2. A ativação deste complexo induz a ativação de fatores de transcrição relacionados à genes que codificam proteínas essenciais à progressão através da fase S. Ao final do processo replicativo, onde todo o conteúdo genômico foi duplicado, outro complexo regulador, ciclina B/cdc2, é ativado e fosforila fatores de transcrição que codificam proteínas essenciais na divisão celular e, desta forma, a célula progride para as fases G_2/M do ciclo celular, podendo reiniciar um novo ciclo (Mao *et al.*, 1992).

Vários trabalhos têm relatado que a progressão através do ciclo celular sofre influência de diferentes agentes infecciosos, tais como bactérias (Shenker & Datar 1995; Shenker *et al.*, 2000; 2001; Lee *et al.*, 2004; Gerhard *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007), protozoários (Nagajyothi *et al.*, 2006) e vírus (Matsuda *et al.*, 2006), causando bloqueio da proliferação celular ou mesmo apoptose.

Neste contexto, alguns trabalhos demonstraram que após o estímulo antigênico, linfócitos T podem permanecer em G_0 e, mesmo na ausência de proliferação, mediar funções efetoras contra a infecção. Em 1995, foi descrito que extratos da bactéria *Fusobacterium nucleatum*

incapacitam os linfócitos de progredirem através do ciclo celular por bloqueio da fase G_1 , contudo não inibem a expressão de marcadores de ativação e a secreção de IL-2. O bloqueio da resposta proliferativa, observado em G_1 , foi associado a deficiência da expressão da ciclina D, um marcador atuante do meio para o final desta fase (Shenker & Datar 1995). Este estado foi denominado mais tarde de fase G_0 Ativada. (Lea *et al.*, 2003).

Proteínas imunossupressoras, que prejudicam a proliferação linfocitária humana em resposta a antígenos da bactéria *Treponema denticola*, foram caracterizadas por interromperem a progressão de G_1 para a fase S. Porém, estas proteínas não inibem a expressão dos marcadores de ativação, como as moléculas de superfície CD69 e CD25 (Lee *et al.*, 2004).

Desta forma, a modulação da reatividade celular, observada em células mononucleares de pacientes infectados com *S. mansoni* ou *N. americanus*, pode ser reflexo da inibição de alguma proteína envolvida na progressão das fases do ciclo celular de linfócitos.

Portanto, o entendimento do efeito da infecção por estes helmintos sobre o processo de ciclo celular é de importância fundamental para a compreensão da interação parasito/hospedeiro em pacientes mono- e co-infectados, assim como para os processos de regulação da resposta imune e desenvolvimento de patologia nestas infecções.

2. Justificativa & Objetivos

2.1 - Justificativa e objetivo geral

A formação do granuloma em torno de ovos do *S. mansoni* é o evento central no desenvolvimento da patologia associada à infecção esquistossomótica aguda e crônica, embora já tenha sido evidenciada a participação de antígenos derivados de outros estádios deste parasito, tanto no desenvolvimento da patologia quanto na resistência à esquistossomose (Ellner *et al.*, 1981; Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Jacobs *et al.*, 1997).

Em animais experimentalmente infectados, durante o progresso da infecção da fase aguda para a crônica, foi demonstrado que há uma diminuição no tamanho dos granulomas recém-formados em torno dos ovos, bem como, modificações em seus componentes celulares (Andrade & Warren, 1964). Este fenômeno foi denominado por modulação do granuloma (Domingo & Warren, 1968; Boros *et al.*, 1975), e a diminuição no tamanho parece ser benéfica para o hospedeiro e tem sido considerada fundamental para o equilíbrio hospedeiro-parasito.

Alterações do tamanho e do aspecto do granuloma também foram descritas durante a evolução da fase aguda para a crônica na esquistossomose mansoni humana (Neves & Raso, 1965). Diversos estudos a respeito da modulação ou imunorregulação da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes, em resposta ao antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA) já foram relatados (Nash *et al.*, 1982; Gazzinelli *et al.*, 1985; 1987; Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1993; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a; 2002; Joseph *et al.*, 2004; Talaat *et al.*, 2007). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na modulação do granuloma, bem como na diminuição da resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico ao SEA, não foram ainda completamente elucidados. Dentro deste contexto, um dos nossos objetivos foi avaliar a influência do antígeno SEA na progressão do ciclo celular de linfócitos T do sangue periférico de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

Devido as frequentes co-infecções helmínticas observadas em áreas endêmicas (Buck *et al.*, 1978; Keusch & Migasena 1982; Kvalsvig, 1988; Chamone *et al.*, 1990; Ashford *et al.*, 1992; Chungue *et al.*, 1995; Petney e Andrews, 1998; Booth *et al.*, 1998; Needham *et al.*, 1998; Brooker *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2002; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998; 2002; Tchuem Tchuente *et al.*, 2003; Raso *et al.*, 2004, 2006; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007), avaliamos, também, a influência da co-infecção pelo *N. americanus* na resposta imunológica de linfócitos T do sangue periférico de indivíduos infectados por *S. mansoni* ao antígeno SEA.

Objetivo geral

Avaliar o efeito da influência do antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA) na ativação de linfócitos T, bem como na progressão do ciclo celular destas células do sangue periférico de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni* e/ou *N. americanus*.

2.2 - Objetivos específicos

I - Avaliar o perfil hematológico, de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*, através do hemograma.

II - Avaliar a produção de citocinas no plasma e no sobrenadante de culturas celulares na presença de SEA, de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

IV - Determinar a expressão de marcadores de superfície e de moléculas de ativação de subpopulações de linfócitos, na presença de SEA, de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

III - Investigar a influência do SEA na progressão do ciclo celular de linfócitos T, por meio da análise das fases G₀/G₁, S, G₂/ M do ciclo celular e do percentual de células apoptóticas, de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

V - Analisar a expressão da ciclina D₁, D₂, D₃, marcadores da progressão da fase G₁ para S do ciclo celular, na presença de SEA, em linfócitos T de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

VI - Investigar se a presença de *N. americanus* influencia nos mecanismos celulares envolvidos na resposta ao SEA, de indivíduos infectados por *S. mansoni*, nos parâmetros analisados anteriormente.

3. Materiais & Métodos

3.1 - Caracterização da população

Este estudo foi possível devido a participação voluntária de moradores do município de Pedra Alta, um vilarejo do município Ponto dos Volantes, localizado a 618 km de Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais. Pedra Alta encontra-se na região do Vale do Jequitinhonha, uma área endêmica para a esquistossomose, caracterizada por montanhas, clima tropical, temperatura média de 24°C e com longos períodos chuvosos o que dificulta o acesso à região (IBGE, 2007). As principais atividades econômicas da região são as criações de gado e a agricultura, sendo as plantações de mandioca, milho, feijão e arroz as mais comuns. É importante salientar que todas as atividades exercidas pelos moradores requerem de uma maneira ou outra contato contínuo com água. A área é de extrema pobreza e com condições precárias de saneamento básico, higiene, educação e saúde. A maioria dos moradores obtém água para alimentação, higiene, entre outras atividades, em nascentes de rios ou córregos.

Os critérios utilizados para a inclusão dos indivíduos no estudo foram:

1. Crianças maiores de 6 anos de idade;
2. Indivíduos residentes na área-alvo durante os últimos 24 meses;
3. Indivíduos que relatam não terem recebido nenhum tratamento com drogas anti-helmínticas nos últimos 24 meses;
4. Indivíduos que consentiram participar do estudo;

Os critérios de exclusão foram:

1. Crianças que freqüentam escolas fora da área-alvo;
2. Indivíduos que trabalham em período integral fora da área-alvo;
3. Indivíduos que participaram em outros programas de controle e que receberam tratamento com drogas anti-helmínticas nos últimos 24 meses;
4. Mulheres com teste de gravidez positivo;
5. Indivíduos que apresentam exames de sangue com hemoglobina menor que 8 g/dL.

Os indivíduos adultos identificados como portadores de helmintoses, com exceção de esquistossomose, foram tratados com uma única dose de 400 mg de albendazol. Os indivíduos que, após o tratamento, permaneceram positivos para ovos de qualquer dos helmintos detectáveis através do método Kato-Kats (Katz *et al.*, 1972), foram novamente tratados com 3 doses de 400 mg por comprimido de albendazol em 3 dias consecutivos, sendo uma dose diária. No caso de infecção por *S. mansoni*, os indivíduos foram tratados com praziquantel. O praziquantel foi administrado em adultos via oral em dose única de 50 a 60 mg/kg. Em

crianças utilizou-se a dose recomendada de 70 mg/kg, dividida em duas vezes. O mesmo critério para avaliação após o tratamento foi utilizado para a esquistossomose.

Para os indivíduos da comunidade, portadores de outras doenças, foram oferecidos assistência médica e tratamento, quando necessário, independente da enfermidade estar relacionada aos objetos do estudo, ou da participação do indivíduo neste programa. Todo trabalho de levantamento parasitológico e supervisão do tratamento foi realizado pela equipe da Prof^a. Andréa Gazzinelli, da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais.

Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto René Rachou – FIOCRUZ (CEPSH/CpqRR: 012/2003) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: 598/2004), de acordo com documento em anexo.

3.1.1 - Definição da população em estudo

Duzentos e trinta e sete moradores de Pedra Alta participaram do levantamento parasitológico. Destes 32 indivíduos foram selecionados, por amostragem aleatória simples, para os ensaios realizados neste trabalho. Baseado nos exames parasitológicos os indivíduos selecionados, residentes em área endêmica para esquistossomose, foram separados em dois grupos de acordo com a presença de ovos dos helmintos *S. mansoni* e/ou *N. americanus* nas fezes (Tabela 1):

1) Indivíduos que não apresentaram ovos para *N. americanus* e *S. mansoni* nos exames parasitológicos foram incluídos no grupo denominado de indivíduos com fezes ovos-negativa (**NEG**). Esta classificação foi realizada somente após a realização de 3 exames parasitológicos repetidamente negativos, sendo cada exame constituído por triplicatas. Além disto, todos os indivíduos apresentaram atividades de contato com águas infestadas por cercárias na região endêmica, e não tiveram história prévia de tratamento.

2) Pacientes portadores da infecção crônica intestinal por *S. mansoni* (**XTO**). Classificados neste grupo por apresentarem ovos para *S. mansoni* nos exames parasitológicos. Este grupo de indivíduos foi dividido em dois subgrupos:

2.1) Pacientes portadores da mono- infecção por *S. mansoni* (**MONO**): exames parasitológicos ovos positivos para *S. mansoni* e ovos negativos para *N. americanus* e outros helmintos.

2.2) Pacientes portadores da co- infecção por *S. mansoni* e *N. americanus* (**CO**): exames parasitológicos ovos positivos para *S. mansoni* e *N. americanus*.

Foi incluído no estudo, um terceiro grupo (Tabela 1), composto de indivíduos doadores de sangue, residentes em área não endêmica para esquistossomose (**DS**). A amostra deste grupo de indivíduos foi obtida no Banco de Sangue Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho após obtenção de consentimento livre e esclarecido. De acordo com exame sorológico, todos foram negativos para HIV (Anti-HIV – Dade Behring – Enzygnost ½ plus e Anti-HIV – Abbott/Murex – 1.2.0), HTLV (Anti-HTLV 1+2 – Abbott/Murex), HCV (Anti-HCV version 4.0 – Abbott/Murex), Hepatite B (Anti-HBC total – Abbott/Murex e HBsAg – Dade Behring – Enzygnost 5.0), Doença de Chagas (Chagas elisa – Bioschile e Chagas hemaglutinação – Wiener) e VDRL (Wiener). A ausência de infecção para helmintos foi baseada em relatório pessoal de cada indivíduo e pelo fato de não residirem em área endêmica ou de risco de infecção.

Na primeira parte dos resultados, a fim de compreendermos a progressão através do ciclo celular em resposta ao SEA, comparamos os dados dos indivíduos **DS**, pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni* (**XTO**) e indivíduos não infectados (**NEG**). Na segunda parte, a fim de verificarmos se a progressão através do ciclo celular, em resposta ao SEA, é alterada pela presença da infecção *N. americanus*, comparamos os dados dos grupos de pacientes mono-infectado (**MONO**) e co-infectados (**CO**).

O número de indivíduos e/ou pacientes incluídos neste estudo estão representados na Tabela 1. Entretanto, nos diferentes ensaios, o número variou devido à dificuldade em obter células mononucleares suficientes para todos os ensaios experimentais. Desta forma, o número de indivíduos e/ou pacientes utilizado em cada ensaio foi discriminado nas legendas de figuras e tabelas.

Tabela 1: Caracterização da população em estudo.

GRUPO CLÍNICO	SIGLA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS			MEDIANA DA IDADE (Variação)
		Homens	Mulheres	Total	
Indivíduos com fezes ovos-negativa, residentes em área	NEG (◻)	06	04	10	39,9 (26-56)
Pacientes portadores da infecção crônica por <i>S. mansoni</i>	XTO (◊)	12	10	22	33,5 (20-48)
Mono-infectados	MONO (▽)	06	04	10	32,7 (21-45)
Co-infectados	CO (△)	06	06	12	34,0 (20-48)
Indivíduos doadores de sangue, não residentes em área	DS (○)	11	08	19	34,5 (22-56)

3.2 - Exame parasitológico de fezes

A presença de ovos nas fezes dos indivíduos foi inicialmente determinada por método qualitativo, através da técnica de sedimentação por centrifugação, utilizando éter etílico ou éter sulfúrico e formol (Pessoa e Martins, 1986). Foram examinadas três lâminas e no caso de resultados negativo para ovos de helmintos, uma quarta lâmina foi avaliada. Verificada a presença de infecção, por *N. americanus* e/ou *S. mansoni*, o número de ovos foi quantificado através de exames de três lâminas por amostra de fezes de acordo com método Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972). Foram coletadas três amostras fecais de cada indivíduo. Os valores da contagem de ovos foram designados como ovos por grama de fezes (epg).

3.3 – Preparo do antígeno solúvel de ovos do *S. mansoni*

O antígeno solúvel de ovos (SEA) de *S. mansoni* foi preparado segundo o método descrito por Gazzinelli e colaboradores (1983). Os ovos foram coletados de camundongos albinos suíços infectados com cercárias da cepa LE de *S. mansoni*. Foram triturados, separadamente, em homogeneizador com pistão de teflon em salina 1.7%. O homogenato resultante foi centrifugado a 50.000 x g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra salina fisiológica durante 48 horas a 4°C e esterilizado utilizando-se filtro de 0.22 µm.

Finalmente, a dosagem de proteínas do antígeno SEA foi determinada segundo o método descrito por Lowry e colaboradores (1951).

3.4 - Hemograma

Os hemogramas foram realizados no *Laboratório Paula Castro - Medicina Laboratorial*. A contagem diferencial de leucócitos e a dosagem de hemoglobina foram investigadas em contador hematológico eletrônico de células. Para isso, foram utilizadas amostras de sangue periférico, coletado a vácuo em tubos de cinco mL contendo o anticoagulante EDTA (Vacutainer, BD, USA).

A diferencial de leucócitos também foi realizada através da contagem celular em esfregaço sanguíneo através de microscopia óptica utilizando objetiva de imersão. Foi utilizado o método Panótico rápido para coloração das células e realizada a contagem de cem leucócitos para determinar os valores relativos das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos).

3.5 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Vinte mL de sangue total foram coletados em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica (Vacutainer, BD, USA). O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma solução de histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, Inc., USA), na proporção de 2:1, em tubos de

poliestireno com capacidade para 50mL (BD, New Jersey, USA). Os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada (Beckman Instruments Inc., modelo J-6B, Irvine, USA). Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares (PBMC) entre a interface do histopaque e do plasma.

O plasma foi retirado cuidadosamente, armazenado em -70°C (Ultra Low Freezer – Partlow 1160) e, posteriormente, utilizado para a dosagem das citocinas. As PBMC foram coletadas e transferidas para tubos cônicos, de polipropileno, de 50 mL (Falcon, BD, USA) onde foram lavadas 3 vezes por centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 4°C em meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) (Gibco, New York, USA). Finalmente, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 (Gibco, New York, USA), contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, USA), e ajustadas para a concentração desejada de acordo com o ensaio a ser realizado. Toda a manipulação, exceto a contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar (BBL-Biological Cabinet, model 60474, Cockeysville, MD ou Veco, modelo VLFS 12M).

3.6 - Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado segundo procedimento descrito por Gazzinelli e colaboradores (1983), com algumas modificações descritas em seguida. PBMC foram isoladas de sangue periférico sobre gradiente de densidade com histopaque 1077 (item 3.5). As células foram, então, ressuspensas em meio de cultura de células estéril (CMBlast) contendo 5% de soro humano normal AB Rh⁺ (SHuN) (Sigma, St Louis, USA), inativado a 56°C durante 30 minutos, 1,6% de L-glutamina (Sigma, St Louis, USA) e 0,03% de um coquetel de antibiótico e antimicótico (Sigam, St Louis, USA) diluídos em RPMI 1640. O cultivo celular foi realizado em placas de poliestireno, de fundo chato, de 48 poços (BD, New Jersey, USA) por 3 e 5 dias.

Em relação aos poços das placas com cultura de 3 dias, foram adicionados:

- 600 µL de CMBlast;
- 100 µL do anticorpo anti-CD3 (0,1 µg/mL) e anti-CD28 (0,2 µg/mL) ou RPMI;
- 100 µL de suspensão contendo $6,0 \times 10^5$ células/mL.

E, em relação aos poços das placas com cultura de 5 dias, foram adicionados:

- 600 µL de CMBlast;
- 100 µL da preparação antigênica SEA (25µg/mL) ou RPMI;
- 100 µL de suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL.

As culturas foram mantidas em incubadora contendo 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C, durante 3 dias (anti-CD3 e anti-CD28) e 5 dias (SEA). Quatro horas antes do término do período de incubação, foram adicionados a cada poço 72 µL de solução de BrdU (5-Bromo-2-deoxiUridina) a 0,33 mg/mL, obtendo-se uma concentração final de 33 µg/mL e, as placas foram novamente incubadas. O BrdU é um nucleosídeo pirimidino que atravessa a membrana celular dos linfócitos por difusão facilitada através da ação de permeases, durante o período de incubação. No interior do linfócito, o BrdU é fosforilado por uma enzima pertencente à via de recuperação dos nucleotídeos da célula, a timidina quinase. Na forma de nucleotídeo, o monofosfato de BrdU incorpora-se ao DNA apenas no momento da replicação, competindo com a timidina monofosfatada produzida pela via de novo (Riechard, 1988 apud Reome *et al.*, 2000).

3.7 - Determinação das fases do ciclo celular e proliferação celular

Após o término do período de incubação (3 e 5 dias), as placas foram centrifugadas e as células foram transferidas para tubos de poliestireno com o auxílio de pipeta plástica, tipo Pasteur (Samco Transfer Pipettes, San Fernando, USA). Em seguida, as células foram lavadas com 3,0 mL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 (tampão de lavagem contendo 0,5% de albumina bovina (BSA) e 0,1% Azida sódica). Sempre que for citado o processo de lavagem, este se refere a uma centrifugação de 400 x g a 18°C por 10 minutos, seguida de descarte do sobrenadante, secagem do tubo e homogeneização em vórtex.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 60 µL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 e a esta suspensão celular foi adicionado 3 µL de anti-CD3 PE (Tabela 2). As células foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente (T.A.) e ao abrigo da luz, e posteriormente, foram adicionados a cada tubo, 2,0 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution, BD, USA), procedendo-se a incubação por 10 minutos à T.A, ao abrigo da luz, a fim de garantir a fixação das células.

Ao término do período de incubação, foram adicionados 1,0 mL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 a fim de auxiliar no processo de lavagem. Em seguida, as células foram incubadas com 3,0 mL de PBS-P 0,015 M, pH 7,2, um tampão de permeabilização contendo 0,5% de BSA, 0,1% Azida e 0,5% de Saponina, por 10 minutos a T.A., ao abrigo da luz.

As células foram, novamente, lavadas com o PBS-P e tratadas com 10 µg de DNase I (BD Biosciences-Pharmlingen, USA) diluída em 100 µL de solução PBS Ca/Mg (PBS 0,015M, pH 7,2 acrescido de 1 mM CaCl₂ e 6 mM MgCl₂) por 1 hora a 37°C e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com 1,0 mL de PBS-P e marcadas com 5 µL de anti BrdU-FITC (BD Pharmlingen, USA) ou anticorpo controle isotópico (IgG1-FITC), por 1 hora de incubação a T.A., ao abrigo da luz. Neste contexto, anticorpos monoclonais específicos contra o BrdU são conjugados a fluorocromos para atuarem como sondas moleculares que permitem a detecção das células que incorporaram BrdU durante a replicação do DNA, sendo a intensidade de fluorescência observada diretamente relacionada à quantidade incorporada (Gratzner, 1982).

A células foram submetidas novamente ao processo de lavagem com 2,0 mL de PBS-P 0,015M, pH 7,2 e incubadas por 10 minutos a T.A., ao abrigo da luz com 5,0 µL de 7-AAD (7-amino-actinomicina-D) (BD Pharmlingen, USA). Enquanto o BrdU é um medidor da síntese de DNA, o 7-AAD é um marcador do conteúdo total de DNA na célula (Rabinovitch *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 2000). Por último, foram adicionados 300 µL de solução fixadora Max Facs Fix - MFF (paraformaldeído a 1%, 10 g/L de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) a cada tubo e a leitura dos dados foi realizada no citômetro de fluxo (FacsCan[®], BD, USA).

3.7.1 - Aquisição e análise dos dados da avaliação das fases do ciclo celular e proliferação celular

A avaliação da progressão do ciclo celular, e conseqüentemente, proliferação celular, foi realizada em citômetro de fluxo FACScan[®], BD, USA. Para as análises dos resultados, foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest. Foram coletados 30.000 eventos para a determinação das fases do ciclo celular, após estimulação *in vitro*. A identificação das populações celulares de interesse e, também, a determinação do valor percentual das fases do ciclo celular foram realizadas através de um computador acoplado ao citômetro.

A Figura 1 representa a análise realizada para a determinação das fases do ciclo celular, após estimulação por 3 dias (anti-CD3 e anti-CD28), *in vitro*. As análises após os 5 dias de cultura também foram realizadas conforme a Figura 1. No gráfico de distribuição pontual avaliou-se o tamanho celular *versus* a granulosidade, onde foram selecionadas as populações de interesse: linfócitos e blastos (L + B) em “gate” (R1) (Figura 1A). Após a seleção da população de interesse, a mesma foi avaliada por análise da intensidade de fluorescência por meio de gráficos FL1 (anti-BrdU FITC) *versus* FL2 (anti-CD3 PE) (Figura 1B). A Figura 1C representa o gráfico de intensidade FL1 (anti-BrdU FITC) *versus* FL3 (7-AAD) e ilustra a seleção das populações celulares em diferentes fases do ciclo celular: linfócitos e blastos em G₀/G₁, na fase S, em G₂/M e as células sub G₀/G₁ (A).

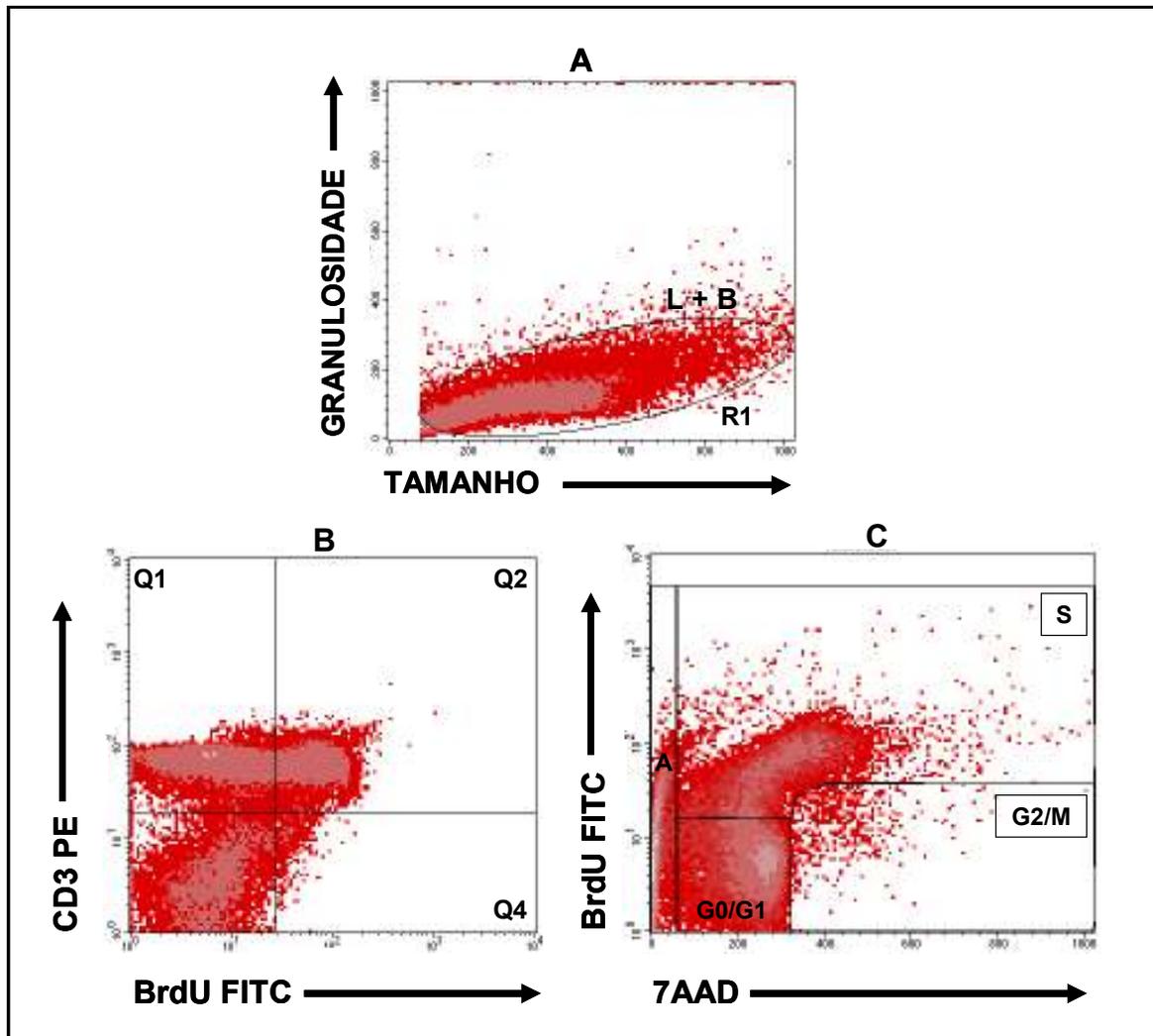


Figura 1: Representação esquemática da análise da progressão do ciclo celular de PBMC do sangue periférico, após 3 dias de cultura na presença de anti-CD3/anti-CD28 por citometria de fluxo.

(A) representa o perfil celular das populações de linfócitos e blastos (**L + B**), selecionadas no “gate” **R1** em gráfico de tamanho *versus* granulidade.

(B) representa o perfil da população de linfócitos e blastos T CD3⁺ que não incorporaram BrdU (**Q1**), linfócitos e blastos T CD3⁺ que incorporaram BrdU (**Q2**) e, outros linfócitos e blastos, com exceção de células T CD3⁺, que incorporaram BrdU (**Q4**), em gráfico de FL1 (anti-BrdU-FITC) *versus* FL2 (anti-CD3-PE).

(C) representa as diferentes fases do ciclo celular em que os linfócitos e blastos T CD3⁺ se encontram: **G₀/G₁**, **S**, **G₂/M** e em **A** (células sub G₀/G₁) em gráfico de fluorescência FL1 (anti BrdU-FITC) *versus* FL3 (7-AAD).

3.8 – Imunofenotipagem celular - Bulk Blast

Para imunofenotipagem celular as PBMC foram ressuspensas em meio de cultura de células (CMBlast) contendo 5% de SHuN, inativado a 56°C durante 30 minutos, 1,6% de L-glutamina e 0,03% de coquetel de antibiótico antimicótico diluídos em RPMI 1640.

O cultivo celular foi realizado em placas de poliestireno, de fundo chato, de 48 poços (BD, New Jersey, USA), sendo que cada poço recebeu:

- 600 µL de CMBlast;
- 100 µL da preparação antigênica SEA (25µg/mL) ou RPMI.
- 100 µL de suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL

As culturas foram mantidas em incubadoras contendo 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C, durante 5 dias.

Após o término do período de incubação, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C. As PBMC foram transferidas para tubos de poliestireno com o auxílio de pipeta plástica tipo Pasteur. Em seguida, as células foram lavadas com 3,0 mL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2. Mais uma vez, o processo de lavagem, este se refere a uma centrifugação de 400 x g a 18°C por 10 minutos, seguida de descarte do sobrenadante, secagem do tubo e homogeneização em vórtex.

Após lavagem, as células foram ressuspensas em 160 µL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 e 20 µL da suspensão celular foram transferidos para cada poço de uma placa de poliestireno com fundo em U, com 96 poços (BD, New Jersey, USA), contendo os anticorpos utilizados no protocolo do estudo (Tabelas 2 e 3).

As células foram incubadas com os anticorpos (Tabela 3) por 30 minutos, à T.A., ao abrigo da luz e, após o término do período de incubação, foram adicionados a cada poço, 120 µL de solução de lise comercial, procedendo-se a incubação por 10 minutos à T.A, ao abrigo da luz. Após este período, um novo processo de lavagem foi realizado. Posteriormente, a cada poço foram adicionados 200 µL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 e a placa homogeneizada.

Por último, foi realizado mais um processo de lavagem e às células foram adicionados 200 µL de solução fixadora Max Facs Fix - MFF. A suspensão celular foi transferida para tubos de 500 µL (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) e a leitura realizada no citômetro de fluxo (FacsCan[®], BD, USA).

Tabela 2: Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem celular.

<i>Marcador</i>	<i>Clone</i>	<i>Concentração</i>	<i>Atividade</i>
CD3-PE ^(BD)	SK7	0,5µg	Identificação de linfócitos T
CD4-FITC ^(BD)	RPA-T4	0,5µg	Identificação de linfócitos T auxiliares.
CD4-TC (©)	S3.5	0,5µg	Identificação de linfócitos T auxiliares.
CD8-FITC ^(BD)	RPA-T8	0,5µg	Identificação de linfócitos T citotóxicos ou supressores.
CD8-PercP ^(BD)	SK1	0,5µg	Identificação de linfócitos T citotóxicos ou supressores.
CD69-PE ^(BD)	FN50	0,5µg	Molécula importante na ativação inicial de linfócitos.
CD25-PE ^(BD)	M-A251	0,5µg	Receptor de cadeia α de IL-2 em linfócitos; molécula importante na ativação intermediária de linfócitos.
HLA-DR-PE ^(BD)	Tü36	0,5µg	Molécula importante na ativação tardia de linfócitos.
CD28-PE ^(BD)	L293	0,5µg	Molécula importante na co-estimulação de células T e na produção dependente de anticorpos dependentes de células T.

^(BD) Anticorpos marca Becton Dickinson; (©) Anticorpo marca Caltag.

Tabela 3: Relação dos anticorpos utilizados, em cada poço da placa de poliestireno, em fundo em U, para análise da imunofenotipagem celular.

Marcações	FITC (isotiocianato de fluoresceína)	PE (ficoeritrina)	PercP (clorofila piridinina)	TC (Tricolor)
Poço 01	IgG1	IgG1	IgG1	-
Poço 02	CD4	CD3	CD8	-
Poço 05	CD8	CD25	-	CD4
Poço 06	CD8	CD69	-	CD4
Poço 07	CD8	CD28	-	CD4
Poço 08	CD8	HLA-DR	-	CD4

3.8.1 - Aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem celular – Bulk Blast

A imunofenotipagem celular foi avaliada e analisada em citômetro de fluxo FACScan[®], BD, USA. Para a aquisição e análises dos dados, foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest. Foram coletados 30.000 eventos durante a leitura de cada amostra. A identificação das populações celulares de interesse e, também, a determinação do valor percentual de populações e subpopulações foram realizadas através de um computador acoplado ao citômetro.

A Figura 2 mostra, de forma esquemática, a análise realizada para a avaliação dos fenótipos de superfície, após estimulação *in vitro*. No gráfico de distribuição pontual, avaliaram-se os parâmetros de tamanho celular *versus* a granulosidade, onde foram selecionadas as populações de interesse: linfócitos e blastos (L + B) em “gate” (R1) (Figura 2A). Após a seleção da população de interesse, a mesma foi avaliada por análise da intensidade de fluorescência por meio de gráficos FL2 *versus* FL3 (Figura 2B).

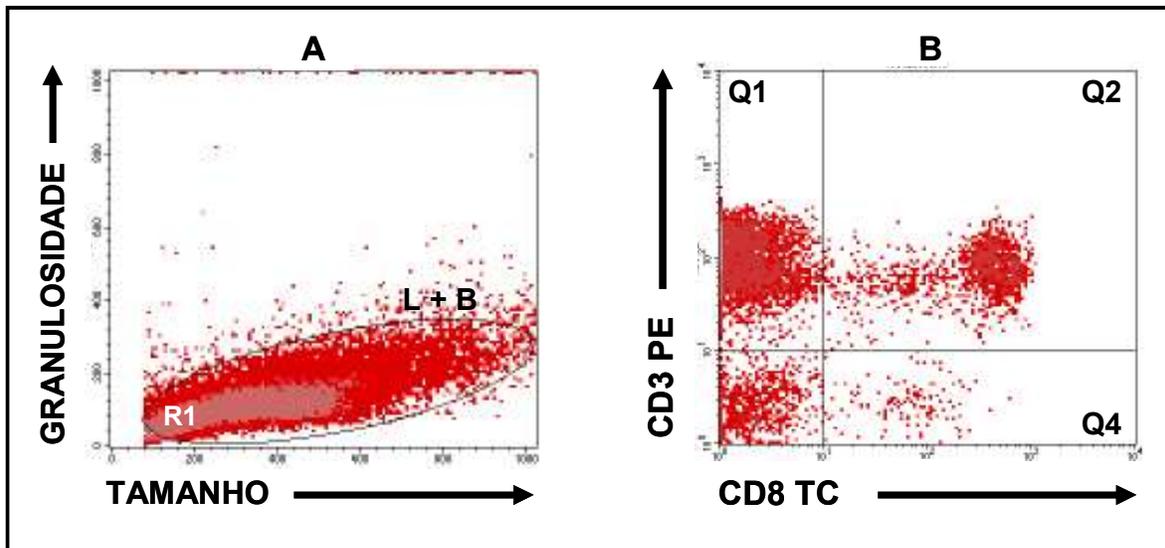


Figura 2: Representação esquemática da análise de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, de PBMC do sangue periférico, estimulados por 5 dias na presença de SEA.

(A) representa o perfil celular das populações de linfócitos e blastos (L + B), selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho *versus* granulosidade, após cultivo celular.

(B) representa o perfil da população de linfócitos T CD3⁺ e de linfócitos T CD8⁺, sendo identificada a população duplo positiva (Q2) em gráfico de fluorescência FL3 (anti-CD8 TC) *versus* fluorescência FL2 (anti-CD3 PE).

3.9 - Obtenção dos sobrenadantes de cultura para identificação das citocinas

O cultivo celular para coleta de sobrenadante seguiu a mesma metodologia para o ensaio de imunofenotipagem celular (item 3.8). Após o término do período de incubação, os sobrenadantes de cultura foram coletados e transferidos para tubos de poliestireno utilizando-se uma pipeta plástica, tipo Pasteur. Os sobrenadantes foram imediatamente estocados a -70°C para posterior utilização em ensaios de dosagem de citocinas, por citometria de fluxo.

3.10 - Caracterização das citocinas presentes no plasma e sobrenadantes de culturas de PBMC

Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ nos plasmas e nos sobrenadantes das culturas de PBMC na presença e ausência de SEA.

Os níveis de citocinas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) (BD, Pharmingen, USA) que emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas e recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, que são detectadas no canal FL3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de seis citocinas no mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada do protocolo original proposto por pelo sistema Cytometric Bead Array, com algumas modificações descritas a seguir.

Alíquotas de 25 μL de plasma ou sobrenadante de cultura foram diluídas 1:5 com diluente G (solução diluente tamponada). Alíquotas de 25 μL dos padrões de citocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente G (“Top Standard” – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 μL de diluente G apenas (controle negativo). Após a preparação das amostras e dos padrões, estas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL. A cada tubo foi adicionado 15 μL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit, BD, Pharmingen, USA) e incubados por 90 minutos, à T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μL da

solução F (Tampão fosfato salínico), centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente descartado.

As esferas foram, então, re-incubadas na presença de 18 µL do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados PE (reagente B) por 90 minutos a T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas com 500 µL da solução F, centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram ressuspendidas em 250 µL do reagente F e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FacsCan[®], BD, USA).

3.10.1 - Aquisição e análise dos dados de avaliação dos níveis de citocinas

A aquisição dos dados obtidos foi realizada no citômetro de fluxo FACScan[®], BD, USA. Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foi obtido com base em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (Figura 3A). Inicialmente, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de distribuição pontual FL3 x FL2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina presente na amostra (Figuras 3B e 3C).

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa das citocinas uma curva padrão foi construída, baseada nos dados dos padrões de citocinas em concentrações de 20 pg/mL – 5.000 pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4º parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão.

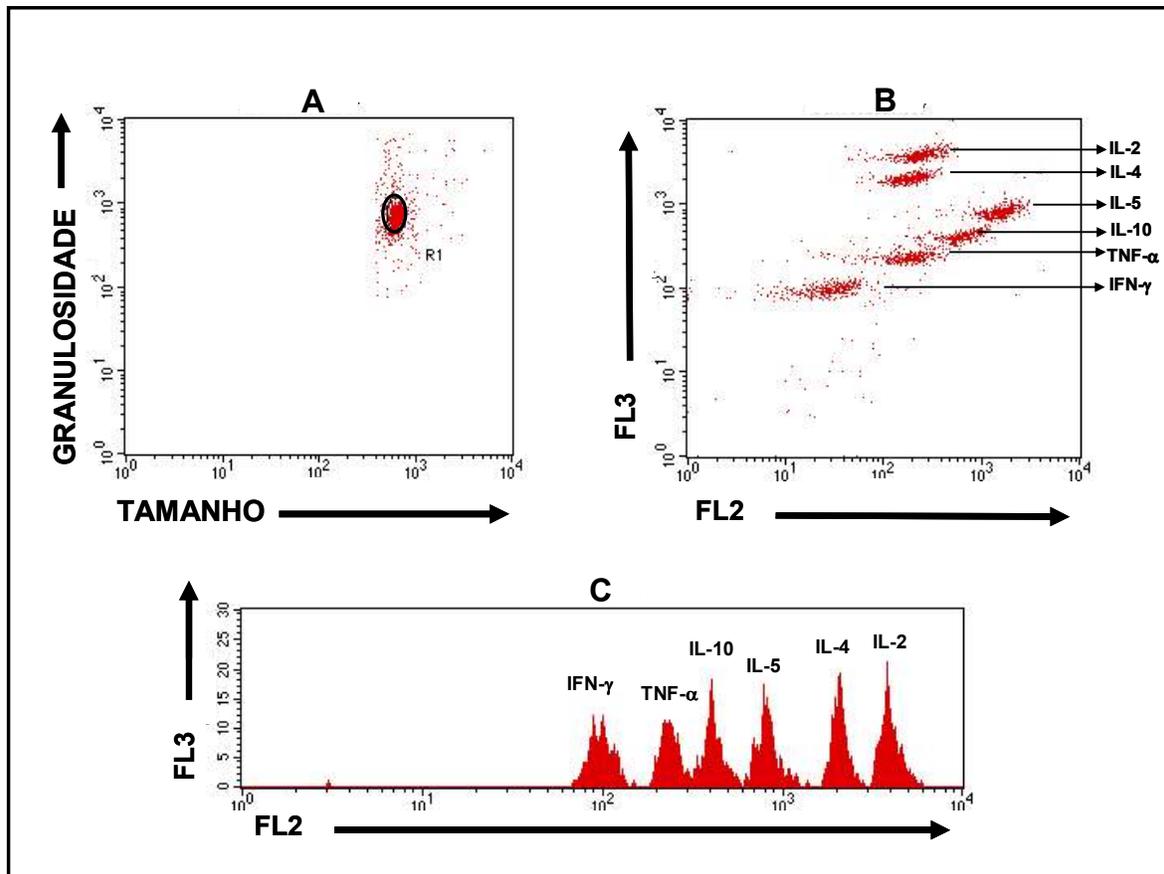


Figura 3: Representação esquemática da análise de citocinas, do soro, através do ensaio com microesferas por citometria de fluxo.

(A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho *versus* granulossidade.

(B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de distribuição pontual FL2 *versus* FL3.

(C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL2) em gráficos de distribuição pontual FL2 *versus* FL3, proporcional à concentração de cada citocina presente nos padrões, plasmas e sobrenadantes testados.

3.11 – Avaliação da expressão das Ciclinas D₁, D₂ e D₃ (Ciclina D_{1,2,3})

Para a investigação da expressão da ciclina D_{1,2,3}, o cultivo de PBMC também seguiu a metodologia empregada para o ensaio imunofenotipagem celular (item 3.8).

Após o término do período de incubação, as placas foram centrifugadas e as PBMC foram transferidas para tubos de poliestireno com o auxílio de pipeta plástica tipo Pasteur. Em seguida, as células foram lavadas com 3,0 mL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2, seguida por centrifugação de 400 x g a 18°C por 10 minutos, descarte do sobrenadante, secagem do tubo e homogeneização em vórtex.

Posteriormente, as células foram ressuspendidas para um volume final de 60 µL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2. A este tubo, foi adicionado 5 µL do anticorpo anti-CD3 PercP (BD Pharmingen, USA) e as células foram incubadas por 30 minutos, à T.A., ao abrigo da luz.

A fixação das células foi realizada com 2,0 mL de solução de lise comercial por 10 minutos à T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação foram adicionados 1,0 mL de PBS-Wash 0,015 M, pH 7,2 a fim de auxiliar no processo de lavagem. Em seguida, as células foram incubadas com 3,0 mL de PBS-P 0,015 M, pH 7,2, por 30 minutos a T.A., ao abrigo da luz.

Posteriormente, as células foram lavadas com 1,0 mL de PBS-P e marcadas com 3 µL de anti ciclina D_{1,2,3}-FITC (BD Pharmingen, USA) por 1 hora de incubação a T.A., ao abrigo da luz.

A células foram submetidas novamente ao processo de lavagem com 2,0 mL de PBS-P 0,015M, pH 7,2 e adicionados 300 µL de solução fixadora Max Facs Fix - MFF a cada tubo e a leitura foi realizada no citômetro de fluxo (FacsCan[®], BD, USA).

3.11.1 – Aquisição e análise dos dados de avaliação da expressão da Ciclina D_{1,2,3}

A expressão da ciclina D_{1,2,3} nos linfócitos T CD3⁺ foi avaliada em citômetro de fluxo FACScan[®], BD, USA. Para a aquisição e análises dos dados, foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest. Foram coletados 100.000 eventos durante a leitura de cada amostra. A identificação da população CD3⁺CyD_{1,2,3}⁺ foi realizada através de um computador acoplado ao citômetro.

A Figura 4 mostra a análise realizada para a avaliação da população $CD3^+CyD_{1,2,3}^+$, após estimulação *in vitro*. No gráfico de distribuição pontual, avaliaram-se os parâmetros de tamanho celular *versus* a granulosidade, onde foram selecionadas as populações de interesse: linfócitos e blastos (L + B) em “gate” (R1) (Figura 4A). Após a seleção da população de interesse, a mesma foi avaliada por análise da intensidade de fluorescência por meio de gráficos FL1 (anti-Ciclina $D_{1,2,3}$) *versus* FL2 (anti-CD3 PercP) (Figura 4B).

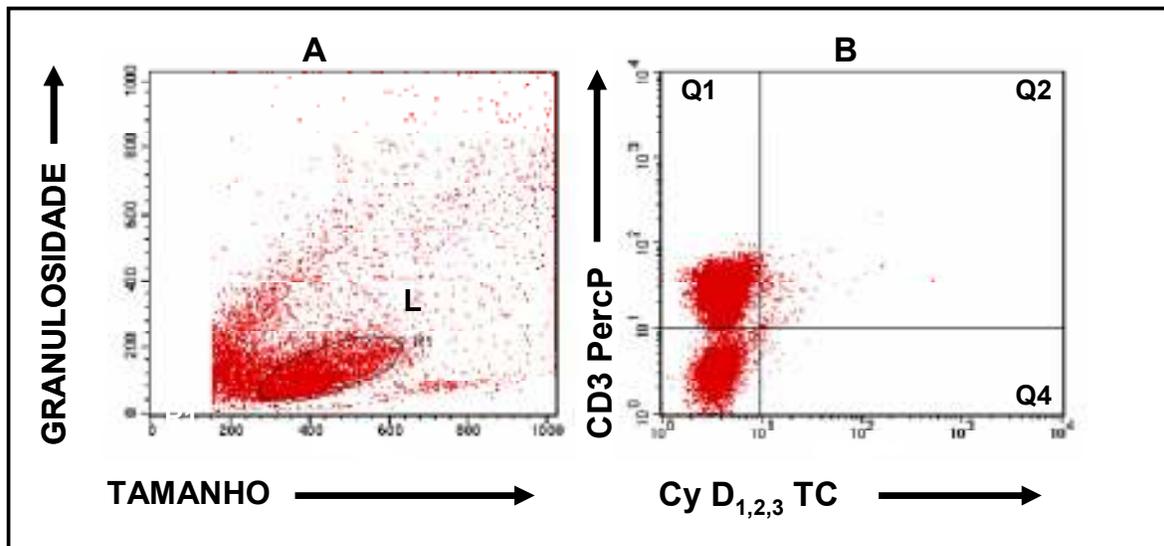


Figura 4: Representação esquemática da análise da população $CD3^+CyD_{1,2,3}^+$, por citometria de fluxo, de leucócitos do sangue periférico estimulados por 5 dias na presença de SEA.

(A) representa o perfil celular das populações de linfócitos (L), selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho *versus* granulosidade, após cultivo celular.

(B) representa o perfil da população de linfócitos T $CD3^+$ e células $CyD_{1,2,3}^+$, sendo identificada a população duplo positiva (Q2) em gráfico de fluorescência FL3 (anti-CD3 PercP) *versus* fluorescência FL1 (anti- $CyD_{1,2,3}$ FITC).

3.12 - Análise Estatística

A análise estatística deste trabalho foi realizada sob a supervisão e orientação da Bioestatística Anna Carolina Lustosa Lima do setor de Assessoria em Bioestatística do IRR. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Minitab 13.01 (P.A.,USA), GraphPad Prism 3.0.3 (San Diego, CA, USA) e SPSS 12.0 (Chicago, USA).

Os resultados dos ensaios que apresentavam distribuição normal foram analisados utilizando os testes: análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey quando as comparações envolviam 3 grupos. O teste T de student não pareado e pareado foram empregados quando comparadas somente 2 variáveis. As correlações entre os ensaios foram realizadas através da Correlação de Pearson.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados através do teste não paramétrico Krukall-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Os teste Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados quando comparados somente 2 variáveis. As correlações entre os ensaios foram realizadas através da Correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $\alpha < 0,05$.

4. Resultados

4.1 - Comparação do perfil hematológico do sangue periférico de indivíduos DS, XTO e NEG

O perfil hematológico, dos grupos de indivíduos doadores de sangue (DS), pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni* (XTO) e indivíduos negativos residentes em área endêmica para esquistossomose (NEG), foi caracterizado por meio da realização do hemograma.

A Tabela 4 mostra que as médias dos valores leucocitários nos grupos XTO e NEG foram semelhantes e maiores do que a média do grupo DS. Entretanto, a análise estatística revelou que esta diferença foi significativa somente quando comparados os grupos XTO e DS. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quando avaliado a média de linfócitos absolutos. Na contagem diferencial de leucócitos podemos observar que indivíduos residentes em áreas endêmicas (XTO e NEG) apresentaram valores médios de monócitos e neutrófilos aumentados em relação aos indivíduos do grupo DS. O valor médio de eosinófilos foi maior no grupo XTO em relação aos grupos DS e NEG, contudo a análise estatística revelou uma diferença significativa apenas entre XTO e NEG. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com relação à média de plaquetas, eritrócitos e dosagem de hemoglobina, apesar da média do percentual de hematócrito ter sido menor nos grupos XTO e NEG em relação ao DS.

Tabela 4: Caracterização do perfil hematológico da população estudada.

	DS	XTO	NEG
Global leucocitária ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	5.70 ± 0.9	6.84 ± 1.3^a	6.94 ± 1.8
Linfócito absoluto ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	2.50 ± 0.5	2.46 ± 0.5	2.52 ± 0.6
Monócito absoluto ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	82.60 ± 31.6	259.50 ± 127.5^a	211.80 ± 120.3^a
Neutrófilo absoluto ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	2.49 ± 0.4	3.37 ± 1.1^a	3.68 ± 1.2^a
Eosinófilo absoluto ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	489.40 ± 248.2	723.80 ± 617.2	243.10 ± 129.3^b
Plaquetas ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	240.6 ± 40.11	243.5 ± 85.59	243.6 ± 69.31
Eritrócitos ($1 \times 10^3 \text{ mm}^3$)	$5.135.333 \pm 595.241$	$4.756.364 \pm 449.333$	$4.771.000 \pm 387.942$
Hemoglobina (g/dL)	14.41 ± 1.3	13.97 ± 1.2	13.90 ± 1.3
Hematócrito (%)	46.87 ± 3.7	42.28 ± 4.0^a	42.18 ± 4.6^a

Os valores estão expressos em média \pm SD dos grupos de indivíduos DS (n=10), XTO (n=22) e NEG (5). A letra **a** representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS; a letra **b** representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo XTO.

4.2 - Caracterização do perfil imunológico por dosagem de citocinas de indivíduos DS, XTO e NEG

A produção *in vivo* das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ no plasma e *in vitro* nos sobrenadantes de culturas de PBMC na presença ou não do antígeno SEA, foi avaliada por meio do sistema Cytometric Bead Array (CBA) conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados apresentados abaixo estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.2.1 - Produção de citocinas no plasma

O nível da citocina TNF- α detectado no plasma de indivíduos dos grupos XTO e NEG mostrou-se significativamente mais elevado em relação aos níveis desta citocina no plasma dos indivíduos do grupo DS. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis de TNF- α no plasma dos grupos XTO e NEG (Figura 5B).

Semelhante aos resultados de TNF- α , a avaliação dos níveis de IFN- γ no plasma mostrou que indivíduos dos XTO e NEG apresentavam níveis mais elevados desta citocina do que indivíduos DS (Figura 5C). Entretanto, somente o grupo XTO apresentou níveis significativamente mais elevados em relação ao grupo DS (Figura 5C). Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos com relação ao nível da citocina IL-2 (Figura 5A).

A comparação entre os níveis plasmáticos médios das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, presentes nos plasmas dos indivíduos dos grupos DS, XTO e NEG, encontra-se na figura 5D, E e F respectivamente. Não observamos diferenças significativas entre os grupos quando avaliamos os níveis de IL-4 e IL-10. Por outro lado, os plasmas de indivíduos dos grupos XTO e NEG apresentaram níveis mais elevados de IL-5 do que aqueles do grupo DS. Porém, a análise estatística revelou que esta diferença foi significativa, mais uma vez, somente entre os grupos XTO e DS.

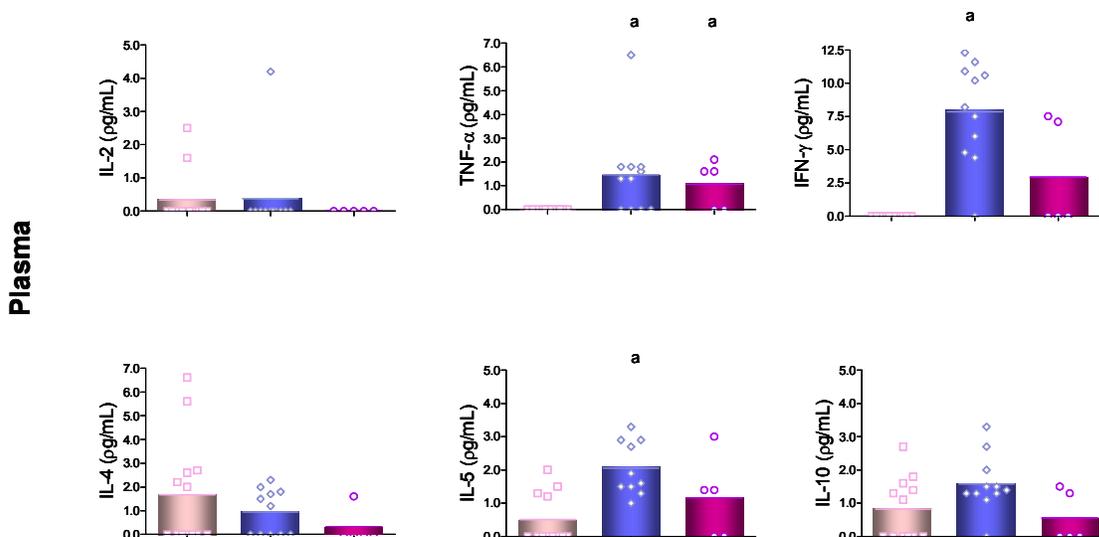


Figura 5: Análise de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ do plasma de indivíduos DS, XTO e NEG.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), por citometria de fluxo, a partir do plasma dos grupos de indivíduos DS: n= 13 (□), XTO: n= 11 (◇) e NEG: n= 5 (○). Todas as barras representam as médias dos valores. O teste estatístico utilizado em D foi ANOVA seguido por pós teste Tukey's; e o teste estatístico utilizado em A, B, C, E e F foi Kruskal-Wallis, seguido por pós teste de Dunn's. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2 - Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC dos indivíduos DS, XTO e NEG

4.2.2.1 - Comparação, da produção de citocinas, entre as culturas com e sem estímulo antigênico

A comparação entre a produção de citocinas nas culturas de PBMC não estimuladas e na presença de SEA dos grupos de indivíduos DS, XTO e NEG estão representadas nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

Pela Figura 6 mostramos que, curiosamente, PBMC dos indivíduos do grupo DS tem secreção média de citocinas maior após a exposição ao antígeno. Todas as diferenças foram estatisticamente significativas, exceto para IL-4.

No grupo de pacientes XTO, observamos uma variação grande de resposta ao estímulo antigênico. Houve um aumento estaticamente significativo na produção de IL-5 e IL-10 por PBMC após a estimulação com o SEA (Figura 7).

PBMC dos indivíduos NEG, em cultura, não mostraram diferença significativa na produção de nenhuma citocina após a estimulação com antígeno (Figura 8).

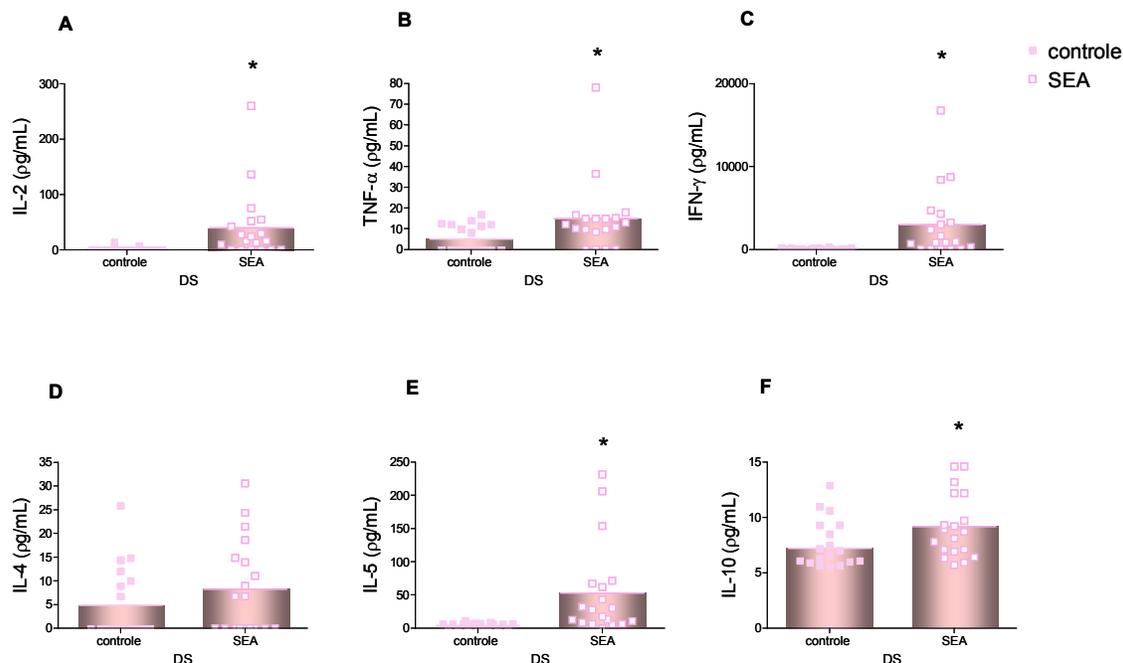


Figura 6: Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos DS.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) em sobrenadantes de cultura de PBMC de indivíduos do grupo DS. Todas as barras representam as médias dos valores. O teste estatístico T pareado foi utilizado em C, E e F; e o teste estatístico Wilcoxon em A, B e D. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O * representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a cultura não estimulada (■) e estimulada com SEA (□). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

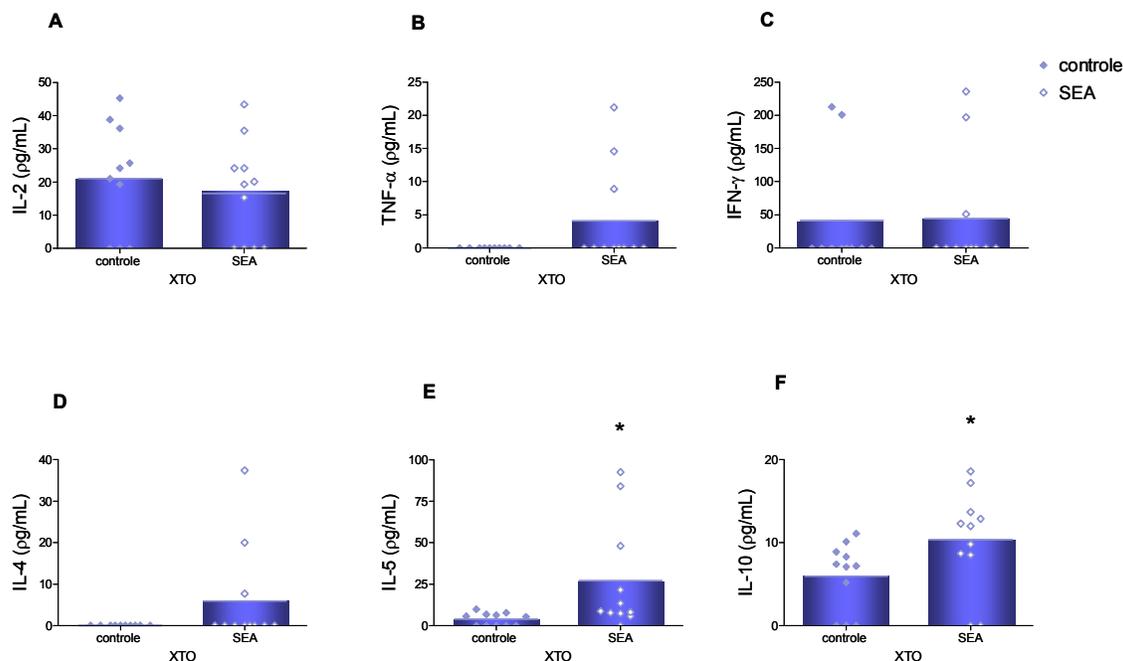


Figura 7: Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos XTO.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes do grupo XTO. Todas as barras representam as médias dos valores. O teste estatístico T pareado foi utilizado em A, E e F; e o teste estatístico Wilcoxon em B, C e D. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O * representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a cultura não estimulada (\blacklozenge) e estimulada com SEA (\blacklozenge). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

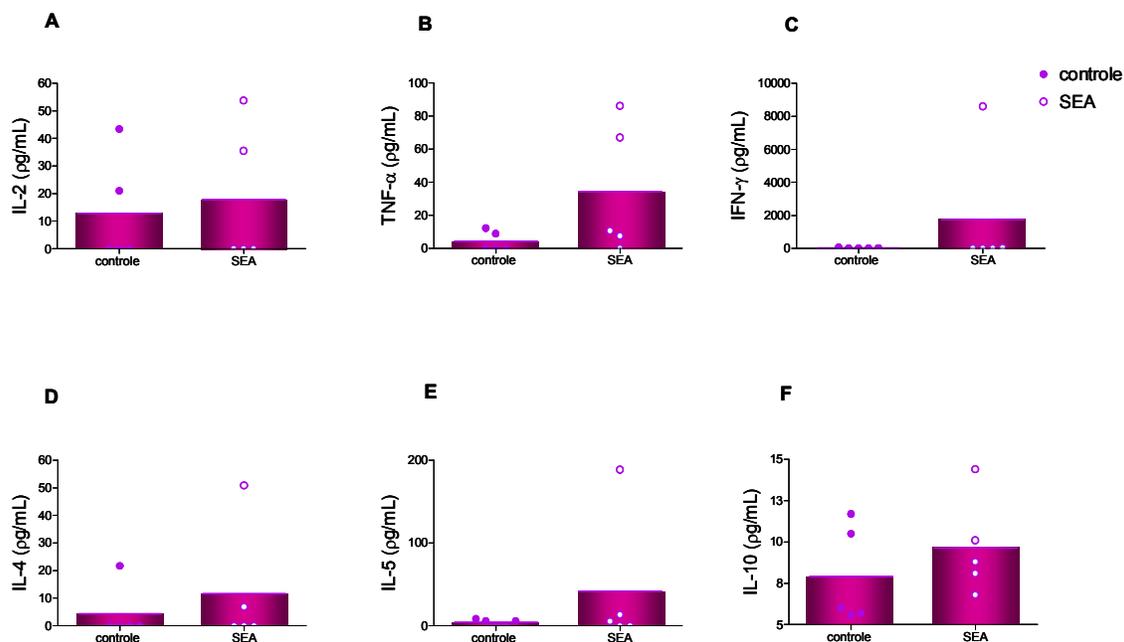


Figura 8: Análise da influência do SEA na produção das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 pelas PBMC de indivíduos NEG.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) em sobrenadantes de cultura de PBMC de indivíduos do grupo NEG. Todas as barras representam as médias dos valores. O teste estatístico T pareado foi utilizado em A – F. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais na cultura não estimulada (●) e estimulada com SEA (○). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2.2 – Comparação, da produção de citocinas no sobrenadante, entre os grupos de indivíduos DS, XTO e NEG

O gráfico da figura 9 mostra a produção *in vitro* de citocinas por PBMC dos indivíduos DS, XTO e NEG após cultura sem estímulo antigênico. Pode-se observar, por meio deste gráfico, que os grupos apresentaram em média um perfil de produção de citocinas diferente daquele observado no plasma.

A produção de IL-2, por PBMC do grupo de pacientes XTO, foi significativamente mais elevada quando comparado ao grupo DS (Figura 9A). Por outro lado, PBMC de pacientes do grupo XTO produziram níveis significativamente menores de IFN- γ quando comparados com grupo DS (Figura 9C). Apesar dos grupos apresentarem um perfil diferente em relação à produção das citocinas TNF- α e IL-4 (Figuras 9B e 9D), as análises não detectaram diferenças significativas para estas e as outras citocinas avaliadas.

Quando comparados os níveis de citocinas detectados no sobrenadante de culturas de PBMC sem estímulo antigênico e no plasma dos grupos investigados, observamos que, apesar das culturas de PBMC apresentarem níveis mais elevados do que aqueles observados no plasma, somente a produção de IL-2 nos sobrenadantes de cultura dos grupos XTO ($p= 0,005$) e NEG ($p< 0,001$) foi significativamente aumentada.

A figura 10 mostra a influência do antígeno SEA no perfil de produção *in vitro* de citocinas, entre os grupos. As PBMC dos indivíduos do grupo NEG secretaram níveis significativamente mais elevados de TNF- α quando comparados com os níveis do grupo XTO (Figura 10B). Como nas culturas não estimuladas, PBMC de pacientes do grupo XTO produziram níveis significativamente menores de IFN- γ quando comparados com os do grupo DS (Figura 10C). Não observamos nenhuma diferença significativa nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 secretadas por PBMC após estímulo em nenhum dos grupos investigados.

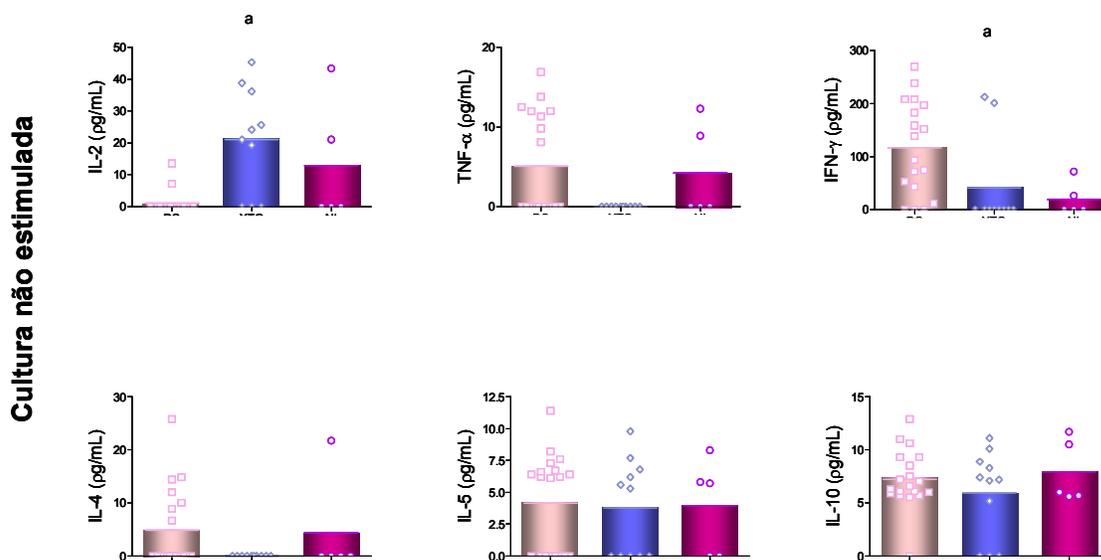


Figura 9: Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de cultura não estimulada de indivíduos DS, XTO e NEG.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), a partir do sobrenadante de PBMC de indivíduos dos grupos DS: n= 19 (□), XTO: n= 11 (◇) e NEG: n= 5 (○). Todas as barras representam as médias dos valores detectados. O teste estatístico utilizado em A, D, E e F foi o ANOVA seguido por pós teste Tukey's; e o teste estatístico utilizado em B e C foi Kruskal-Wallis, seguido por pós teste de Dunn's. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS. Os resultados estão expressos em pg/mL.

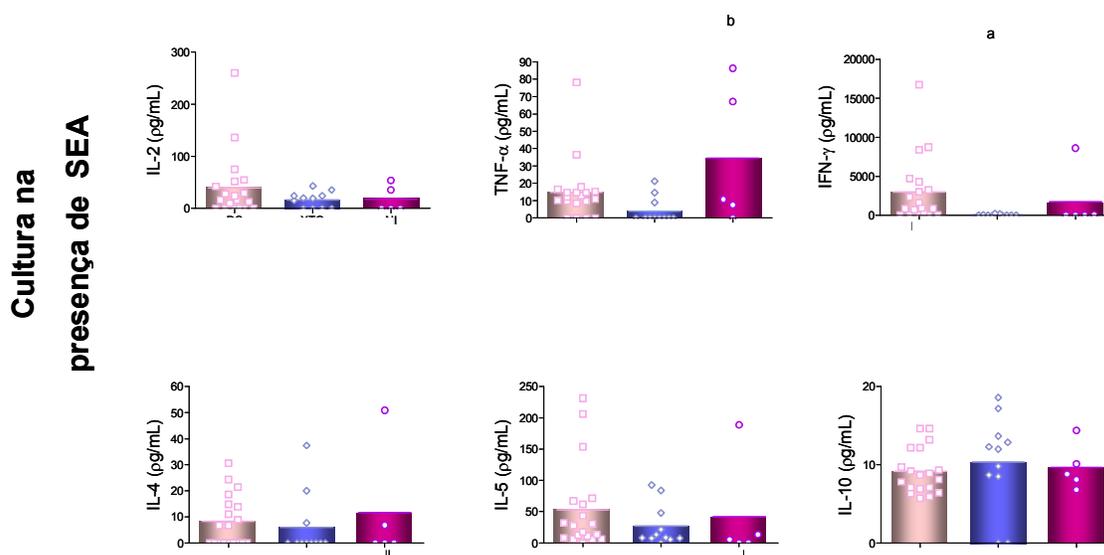


Figura 10: Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de cultura estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), a partir do sobrenadante de PBMC de indivíduos dos grupos DS: n= 19 (□), XTO: n= 11 (◇) e NEG: n= 5 (○). Todas as barras representam as médias dos valores detectados. O teste estatístico utilizado em A, B, D, E e F foi o ANOVA seguido por pós teste Tukey's; e o teste estatístico utilizado em C foi Kruskal-Wallis, seguido por pós teste de Dunn's. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS; a letra **b** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo XTO. Os resultados estão expressos em pg/mL.

4.3 - Comparação do fenótipo celular induzido por SEA entre os grupos DS, XTO e NEG

A entrada no ciclo celular e, conseqüentemente, a proliferação em resposta ao antígeno, inicia-se com a ativação de linfócitos T. Esta ativação depende da integração de sinais de ativação e co-estimulação por meio de moléculas receptoras, que na superfície de células quiescentes (G_0) normalmente não são expressas ou são pouco expressas (Fraser *et al.*, 1993; Gudmundsdottir *et al.*, 1999).

Nós examinamos a expressão de marcadores de superfície celular presentes no sangue periférico dos grupos de indivíduos DS, XTO e NEG após cultura não estimulada e estimulada, *in vitro*, com SEA, com a finalidade de detectar possíveis deficiências de sub-populações celulares.

A análise estatística mostrou que não houve diferença na frequência de linfócitos T $CD3^+$ entre os grupos pesquisados, tanto na cultura não estimulada quanto na estimulada com SEA (Figuras 11A e D). Por outro lado, quando analisamos a frequência das sub-populações de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e citotóxicas e/ou supressoras ($CD8^+$), observamos que na cultura não estimulada, as PBMC dos indivíduos NEG apresentaram uma menor frequência de linfócitos T $CD4^+$ e uma maior frequência de $CD8^+$ em comparação às PBMC do grupo DS (Figuras 11B e C).

Na cultura estimulada por SEA, PBMC dos grupos XTO e NEG apresentavam uma frequência significativamente menor de linfócitos T $CD4^+$ quando comparadas as do grupo DS (Figura 11E). Observamos, também, uma maior frequência de linfócitos T $CD8^+$ nestes 2 grupos, entretanto as diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 11F).

A análise estatística demonstrou que a razão das células $CD4^+/CD8^+$ nos grupos residentes em área endêmica (XTO e NEG) foi muito semelhante tanto em cultura não estimulada (Figura 12A) quanto em cultura estimulada com SEA (Figura 12B). Além disso, verificou-se que indivíduos do grupo NEG apresentaram uma razão significativamente menor em comparação ao grupo DS em ambas as culturas (Figuras 12A e B).

Analisamos, também, em sub-populações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ das PBMC de indivíduos DS, XTO e NEG, o efeito do antígeno de *S. mansoni* sobre a frequência de marcadores de ativação ($CD69^+$, $HLA-DR^+$ e $CD25^+$ e $CD28^-$) através da razão das células da cultura estimulada com SEA pela não estimulada. (Figura 13).

As PBMC dos indivíduos do grupo NEG exibiram um aumento da média da razão de $CD4^+CD69^+$ quando comparado aos grupos DS e XTO. Resultados similares foram observados

para HLA-DR⁺ em células CD4⁺ e CD8⁺. A análise do marcador de ativação CD25⁺ em linfócitos revelou um aumento significativo somente em linfócitos CD8⁺ de indivíduos do grupo NEG em relação aos demais grupos. Por outro lado, observamos que as PBMC de indivíduos NEG apresentaram uma maior frequência de CD4⁺CD28⁻, em comparação aos grupos DS e XTO. Estes resultados sugerem que maior percentagem de células dos indivíduos NEG são ativadas em resposta ao SEA, devido a estímulo via CD69, HLA-DR e CD28 em células CD4⁺ e CD25 e HLA-DR em CD8⁺ (Figura 13).

Recentemente, alguns autores sugeriram o envolvimento de células T reguladoras na modulação da resposta imune na esquistossomose crônica (McKee & Pearce, 2004; Hesse *et al.*, 2004; Baumgart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). A fim de caracterizarmos a presença dessas células T reguladoras, analisamos em linfócitos a frequência dos marcadores CD4⁺CD25^{HIGH} em cultura não estimulada (Figura 14A) e após estímulo com SEA por cinco dias (Figura 14B). Em seguida, avaliamos a influência do SEA através da razão da cultura estimulada com SEA pela cultura não estimulada (Figura 14C). Identificamos uma frequência significativamente menor de células CD4⁺CD25^{HIGH} na cultura não estimulada dos grupos de indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG) em comparação ao DS (Figura 14A). Na presença de SEA, observamos um aumento da frequência destas células em todos os grupos em relação à cultura controle, porém não observamos diferença estatística entre as culturas em nenhum dos grupos (Figura 14B). Neste contexto, quando analisamos a razão da cultura estimulada pela não estimulada observamos que o estímulo antigênico (SEA) induziu um aumento da frequência de células T reguladoras apenas no grupo de pacientes XTO quando comparado ao DS (Figura 14C).

Investigamos a relação entre a secreção de citocinas e a expressão de marcadores de superfície e detectamos que a secreção de IL-10 está diretamente correlacionada à frequência das células CD4⁺CD25^{HIGH} em cultura estimulada com SEA ($r= 0,7079$; $p= 0,0148^*$) apenas no grupo XTO. O mesmo não foi encontrado em cultura não estimulada ($r= 0,1195$; $p= 0,7265$).

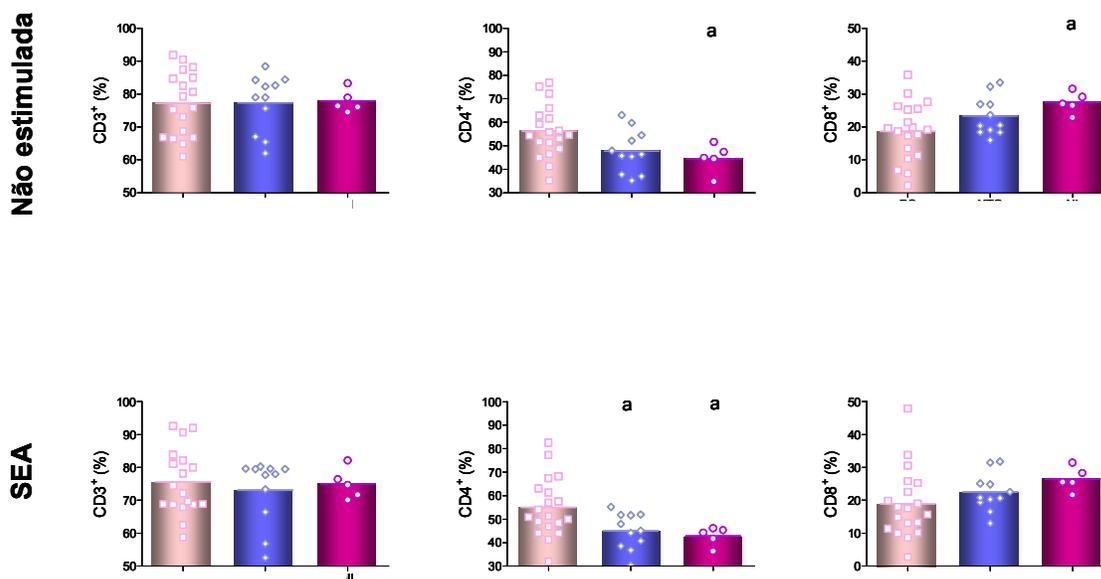


Figura 11: Frequência de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.

A frequência de células CD3⁺ (A e D), CD4⁺ (B e E) e CD8⁺ (C e F) foram analisadas por citometria de fluxo, a partir de PBMC de indivíduos DS: n= 19 (□), XTO: n= 11 (◇) e NEG: n= 5 (○), após 5 dias de cultura não estimulada (A, B e C) ou na presença de SEA (D, E e F). As barras equivalem às médias dos valores representados. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O teste estatístico utilizado em A, D, E e F foi o ANOVA seguido por pós teste Tukey's; e o teste estatístico utilizado em B e C foi Kruskal-Wallis, seguido por pós teste de Dunn's. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação ao grupo DS; a letra **b** representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação ao grupo XTO.

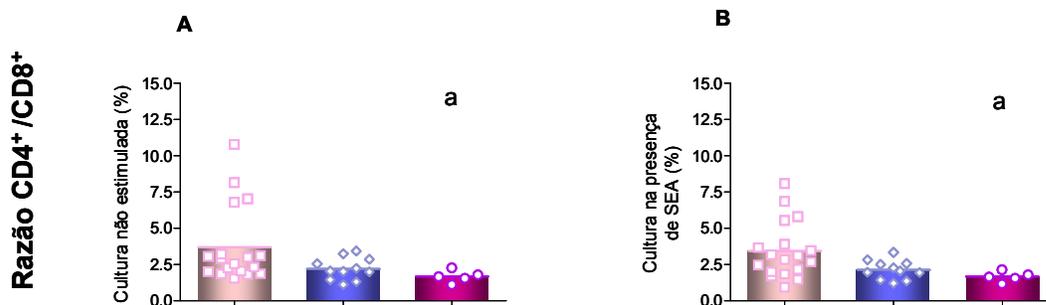


Figura 12: Razão entre células CD4⁺/CD8⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.

A razão de células CD4⁺/CD8⁺ de PBMC de indivíduos DS: n= 19 (□), XTO: n= 11 (◇) e NEG: n= 5 (○) foi avaliada após 5 dias de cultura não estimulada (**A**) ou na presença de SEA (**B**). As barras equivalem às médias dos valores representados. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O teste estatístico utilizado em **A** e **B** foi o ANOVA seguido por pós teste Tukey's. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS.

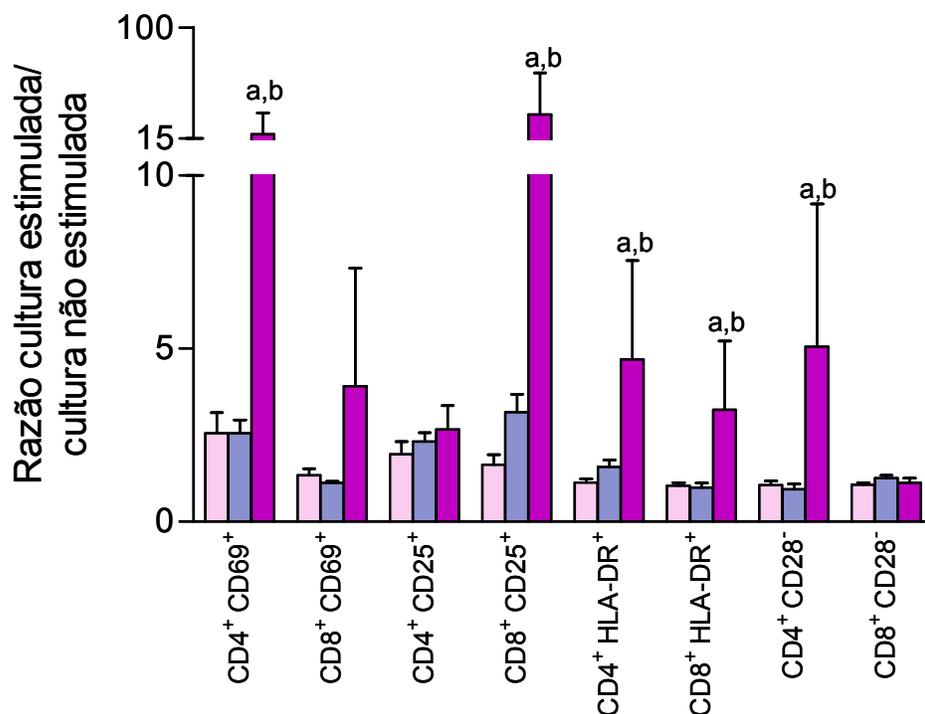


Figura 13: Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de marcadores de ativação (CD69⁺, HLA-DR⁺ e CD25⁺ e CD28⁻) em sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos DS, XTO e NEG.

A razão, das células ativadas, foi analisada por divisão dos valores encontrados após a cultura estimulada pelos valores encontrados após cultura não estimulada, a partir de PBMC de indivíduos DS (n= 19), XTO (n= 11) e NEG (n=5). As barras equivalem às médias dos valores. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS; a letra **b** representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo XTO.

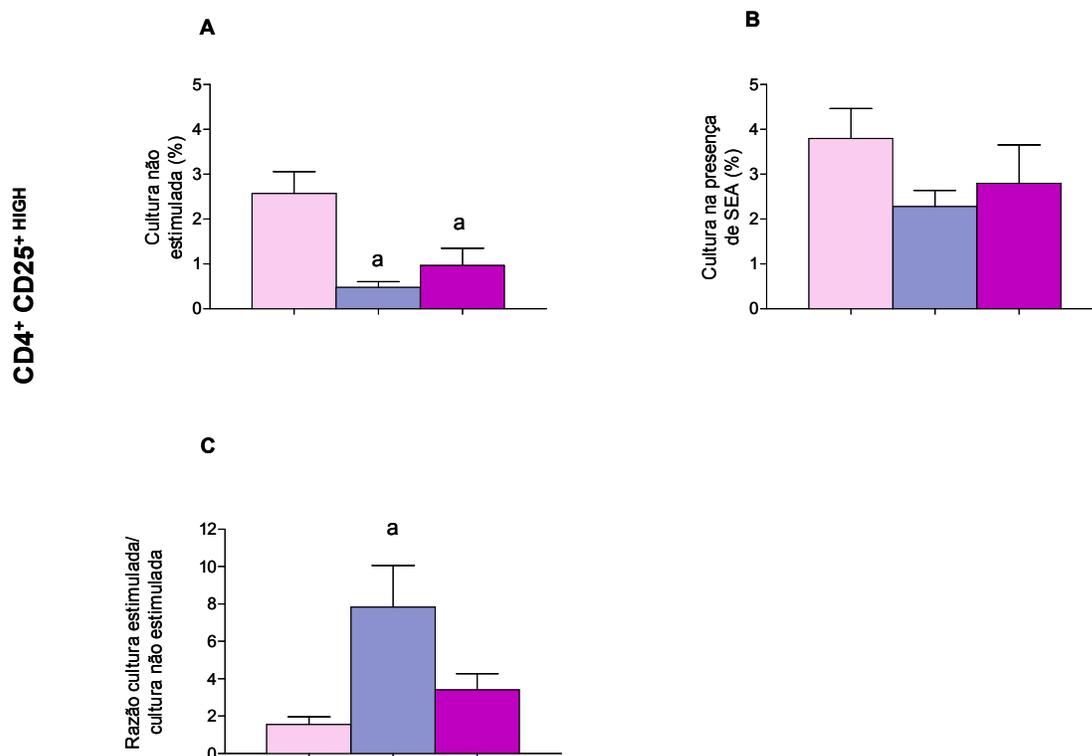


Figura 14: Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺HIGH de indivíduos DS, XTO e NEG.

A razão da frequência das células CD4⁺CD25⁺HIGH (C) foi analisada por divisão dos valores encontrados após a cultura estimulada (%) (B) pelos valores encontrados após cultura não estimulada (%) (A), a partir de PBMC de indivíduos DS (n= 19), XTO (n= 11) e NEG (n=5). As barras equivalem às médias dos valores. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação ao grupo DS.

4.4 - Caracterização da progressão do ciclo celular e resposta de proliferação de PBMC de indivíduos DS, XTO e NEG

A progressão do ciclo celular e a proliferação das PBMC dos indivíduos DS, XTO e NEG em culturas não estimuladas e na presença de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ou de SEA foram avaliadas por meio de citometria de fluxo, medindo-se a incorporação de BrdU e 7-Amino-Actinomycin D.

4.4.1 - Comparação do ciclo celular entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/anti-CD28 ou SEA

As tabelas 5, 6 e 7 mostram respectivamente os percentuais de distribuição de linfócitos T CD3⁺ nas fases do ciclo celular dos grupos de indivíduos DS, XTO e NEG.

A comparação entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/anti-CD28 no grupo de indivíduos DS mostrou que as células CD3⁺ progrediram através das fases do ciclo celular após o estímulo inespecífico (Tabela 5-A). Houve uma redução estatisticamente significativa na frequência de células nas fases G₀/G₁, concomitantemente com aumento significativo das células em fase S e G₂/M. Estes resultados mostram que os linfócitos T de indivíduos doadores de sangue (DS) apresentam atividade celular esperada a um estímulo inespecífico, sendo capazes de proliferar. Isso é claramente evidenciado pelo aumento de aproximadamente 3,6 vezes na frequência destas células na fase S. Por outro lado, após o estímulo com SEA, observamos frequências semelhantes de células CD3⁺ em fase repouso/síntese de RNA e proteínas (fase G₀/G₁) e na fase de replicação de DNA (fase S) quando comparado ao da cultura não estimulada. Porém, na presença do antígeno, houve um aumento estatisticamente significativo na frequência de células em fase G₂/M. (Tabela 5-B).

A análise da tabela 6-A mostra que células T dos pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni* (XTO) também apresentaram atividade normal de proliferação celular em resposta ao estímulo com anti-CD3/CD28. Observamos uma redução da frequência de células T em fase G₀/G₁ e um aumento em fase S em relação às células da cultura não estimulada, ambas as alterações foram estatisticamente significativas. Em contraste ao grupo DS, observamos redução significativa na frequência de células CD3⁺ em fase G₂/M quando comparado à cultura não

estimulada. (Tabela 6-A). O estímulo com SEA não induziu alterações significativas na progressão do ciclo em células CD3⁺ quando comparadas as das culturas não estimuladas (Tabela 6-B). Estes resultados sugerem que os antígenos solúveis de ovos *S. mansoni* não foram capazes de estimular a saída de células da fase G₀/G₁ e entrada em fase S (duplicação do DNA) em comparação à cultura não estimulada (Tabela 6-B).

Como nos resultados anteriores, o estímulo com anticorpos anti-CD3/CD28 alterou significativamente a frequência de células T nas fases G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular de indivíduos do grupo NEG (Tabela 7-A). Entretanto, assim como no grupo XTO, observamos uma redução, estatisticamente significativa, na frequência de células em G₂/M na cultura estimulada com anti-CD3/CD28 quando comparada à cultura não estimulada. Observamos uma redução da frequência de células da fase G₀/G₁, seguido de um aumento nas fases S e G₂/M do ciclo celular de células T de indivíduos do grupo NEG após estímulo com SEA. Porém, a análise estatística da comparação das culturas não estimulada e na presença de SEA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 7-B).

A análise estatística da frequência de células CD3⁺ apoptóticas não revelou diferenças entre as culturas, não estimulada e na presença de anti-CD3/anti-CD28, com exceção do aumento significativo no grupo de indivíduos DS na presença do estímulo inespecífico. Além disso, a presença de SEA também não influenciou o percentual de células apoptóticas em nenhum dos grupos investigados (Tabelas 5-7).

Tabela 5: Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de indivíduos DS.

	<i>Grupo DS</i>	G_0/G_1	Fase S	G_2/M	Apoptóticas
A	Cultura não estimulada - 3 dias	90,54 ± 4,8	5,03 ± 3,9	3,38 ± 1,4	0,93 ± 0,5
	Anti-CD3/anti-CD28	68,13 ± 9,5 *	18,07 ± 5,1*	12,38 ± 6,1*	1,28 ± 0,7*
B	Cultura não estimulada - 5 dias	90,28 ± 3,5	6,17 ± 3,0	1,65 ± 0,6	1,88 ± 1,1
	Cultura na presença de SEA	88,69 ± 3,6	6,48 ± 2,7	2,48 ± 1,0*	2,33 ± 1,3

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de indivíduos DS (n=10), após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O * representa $p < 0,001$.

Tabela 6: Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de pacientes XTO.

	<i>Grupo XTO</i>	G_0/G_1	Fase S	G_2/M	Apoptóticas
A	Cultura não estimulada - 3 dias	77,52 ± 11,7	10,20 ± 7,1	6,55 ± 1,9	5,47 ± 5,2
	Anti-CD3/anti-CD28	62,29 ± 9,5 *	29,24 ± 8,6 *	3,42 ± 2,4 *	5,15 ± 3,1
B	Cultura não estimulada - 5 dias	78,92 ± 7,8	11,00 ± 6,5	4,91 ± 2,4	4,92 ± 2,6
	Cultura na presença de SEA	78,27 ± 7,3	12,30 ± 5,1	4,06 ± 1,3	4,38 ± 2,9

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de pacientes XTO (n=11), após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O * representa $p < 0,001$.

Tabela 7: Distribuição das fases do ciclo celular de células T do grupo de indivíduos NEG.

	<i>Grupo NEG</i>	G_0/G_1	Fase S	G_2/M	Apoptóticas
A	Cultura não estimulada - 3 dias	77,20 ± 16,4	13,35 ± 12,6	5,31 ± 0,9	4,05 ± 4,4
	Anti-CD3/anti-CD28	53,77 ± 14,4 *	37,10 ± 10,3 *	2,45 ± 2,5 *	6,62 ± 5,0
B	Cultura não estimulada - 5 dias	78,42 ± 5,0	13,12 ± 5,3	5,49 ± 1,1	2,96 ± 2,0
	Cultura na presença de SEA	71,50 ± 5,3	19,56 ± 4,9	8,12 ± 6,4	3,10 ± 2,3

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo indivíduos NEG (n=5), após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O * representa $p < 0,001$.

4.4.2 - Comparação do ciclo celular entre os grupos DS, XTO e NEG

Os resultados anteriores foram reorganizados na tabela 8 e mostram as diferenças significativas da frequência média das células T CD3⁺ distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular entre os grupos DS, XTO e NEG.

A comparação entre a frequência, de células em fase G₀/G₁ na cultura não estimulada dos diferentes grupos, mostrou que indivíduos procedentes de áreas endêmicas, independente da presença de infecção pelo *S. mansoni* apresentaram um percentual menor destas células nas culturas de 3 e 5 dias de incubação (Tabelas 8-A e 8C). Estes dados sugerem que células de pacientes infectados (XTO) ou pelo menos em contato com o agente infeccioso (NEG), já estejam em processo de divisão celular mesmo sem estímulo. Desta forma, estas células apresentariam maior capacidade de entrarem em fase S quando comparadas com as do grupo DS (não residentes em área endêmica para esquistossomose).

O estímulo com anti-CD3/CD28 induziu a entrada no ciclo celular e proliferação nos três grupos investigados. Observamos um aumento estatisticamente significativo na frequência de células CD3⁺ em fase S nos grupos XTO e NEG em comparação ao DS (Tabela 8-B). Entretanto, curiosamente, notamos que células T CD3⁺ de pacientes dos grupos XTO e NEG apresentavam um percentual significativamente menor em fase G₂/M quando comparado ao grupo DS (Tabela 8-B). Estes dados sugerem que as células T de indivíduos residentes em área endêmica independente da presença de infecção pelo *S. mansoni*, apresentam um bloqueio na fase S do ciclo celular sugerindo que a infecção crônica e os mecanismos de regulação celular estejam efetivamente controlando este processo.

Tabela 8-D mostra a comparação entre os grupos na presença de SEA. Observamos que indivíduos dos grupos XTO e NEG apresentaram uma redução estatisticamente significativa da frequência de células T CD3⁺ em fase G₀/G₁ e um aumento na frequência de células em fase S quando comparado aos indivíduos do grupo DS. Quando comparamos a fase G₂/M, somente indivíduos do grupo NEG apresentaram aumento estatisticamente significativo na frequência de células nesta fase em relação ao grupo DS. Constatou-se também um aumento estatisticamente significativo no percentual de células T em fase S e G₂/M no grupo de indivíduos NEG em relação ao grupo de pacientes XTO. Estes resultados sugerem que a presença do antígeno SEA exerce um efeito regulador na resposta imune através do bloqueio da indução de um número menor de células CD3⁺ de pacientes do grupo XTO a progredir através do ciclo celular. Isto fica

evidente quando comparamos os resultados obtidos com células de indivíduos do grupo NEG submetidas ao mesmo estímulo.

De modo geral, um maior percentual, de células CD3⁺ apoptóticas, foi detectado em culturas não estimuladas de PBMC de indivíduos XTO e NEG quando comparado às culturas do grupo DS (Tabela 8). Curiosamente, aos cinco dias de cultura não estimulada, mais células apoptóticas foram observadas no grupo de pacientes XTO em comparação ao NEG (Tabela 8-C). O estímulo inespecífico induziu maior morte celular em células CD3⁺ de indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG) do que em células dos indivíduos DS (Tabela 8-B). Contudo, o estímulo antigênico na induziu diferença na frequência de células apoptóticas em relação aos três grupos avaliados (Tabela 8-D).

Através de análises de correlações, identificamos uma correlação inversamente significativa no grupo de pacientes XTO, entre a frequência células T CD3⁺ apoptóticas e a frequência de células em G₀/G₁ ($r = -0,6332$; $p = 0,0365^*$) em cultura na presença de SEA.

Tabela 8: Distribuição das fases do ciclo celular de células T dos grupos DS, XTO e NEG.

		<i>Distribuição das fases do ciclo celular (%)</i>			
		DS	XTO	NEG	
A	Cultura não estimulada 3 dias	Fases G ₀ /G ₁	90,54 ± 4,8	77,52 ± 11,7 ^a	77,20 ± 16,4
		Fase S	5,03 ± 3,9	10,20 ± 7,1	13,35 ± 12,6
		Fases G ₂ /M	3,38 ± 1,4	6,55 ± 1,9 ^a	5,31 ± 0,9
		Céls. apoptóticas	0,93 ± 0,5	5,47 ± 5,2 ^a	4,05 ± 4,4
B	Cultura na presença de anti-CD3/anti-CD28	Fases G ₀ /G ₁	68,13 ± 9,5	62,29 ± 9,5	53,77 ± 14,4
		Fase S	18,07 ± 5,1	29,24 ± 8,6 ^a	37,10 ± 10,3 ^a
		Fases G ₂ /M	12,38 ± 6,1	3,42 ± 2,4 ^a	2,45 ± 2,5 ^a
		Céls. apoptóticas	1,28 ± 0,7	5,15 ± 3,1 ^a	6,62 ± 5,0 ^a
C	Cultura não estimulada 5 dias	Fases G ₀ /G ₁	90,28 ± 3,5	78,92 ± 7,8 ^a	78,42 ± 5,0 ^a
		Fase S	6,17 ± 3,0	11,00 ± 6,5	13,12 ± 5,3
		Fases G ₂ /M	1,65 ± 0,6	4,91 ± 2,4 ^a	5,49 ± 1,1 ^a
		Céls. apoptóticas	1,88 ± 1,1	4,92 ± 2,6	2,96 ± 2,0 ^b
D	Cultura na presença de SEA	Fases G ₀ /G ₁	88,69 ± 3,6	78,27 ± 7,3 ^a	71,50 ± 5,3 ^a
		Fase S	6,48 ± 2,7	12,30 ± 5,1 ^a	19,56 ± 4,9 ^{a,b}
		Fases G ₂ /M	2,48 ± 1,0	4,06 ± 1,3	8,12 ± 6,4 ^{a,b}
		Céls. apoptóticas	2,33 ± 1,3	4,38 ± 2,9	3,10 ± 2,3

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de indivíduos DS (n=10), XTO (n=11) e NEG (5) após cultura de 3 e 5 dias de cultura. A letra **a** representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação ao grupo DS; a letra **b** representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação ao grupo XTO.

4.5 - Comparação da expressão de Ciclina D_{1,2,3} em linfócitos T dos grupos DS, XTO e NEG

Com o objetivo de se obter informações mais precisas sobre o ciclo celular de linfócitos T CD3⁺ durante a infecção com o *S. mansoni*, nós analisamos o efeito do estímulo, *in vitro*, por SEA sobre a expressão de um elemento chave que regula a progressão do ciclo celular, a ciclina D_{1,2,3}, que é um marcador de progressão da fase G₁ para a fase S.

Inicialmente, avaliamos o período de incubação das PBMC mais adequado para detecção da expressão de ciclina D_{1,2,3}, utilizando-se de PBMC de indivíduos dos grupos residentes em área endêmica (Figura 15). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos nos três tempos avaliados, tanto em cultura não estimulada (Figura 15A), quanto em cultura na presença de SEA (Figura 15B). Contudo, a análise da cultura não estimulada mostrou que em todos os tempos houve uma menor expressão de ciclina D_{1,2,3} por células T CD3⁺ no grupo NEG (Figura 15A). E por outro lado, na presença de SEA, este perfil não se manteve quando avaliado nos tempos de 24 e 96 horas (Figura 15B).

Baseado nos resultados descritos acima (Figura 15) e no fenótipo celular, o qual revelou que as células de indivíduos NEG são mais ativadas em resposta ao SEA, avaliamos a expressão de ciclina D_{1,2,3} em linfócitos CD3⁺ em PBMC após estimulação *in vitro* por 96 horas.

Os resultados mostram que, em cultura não estimulada, PBMC dos indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG) apresentaram maior percentual de células CD3⁺ expressando Ciclina D_{1,2,3}⁺ do que PBMC do grupo DS (Figura 16A). Porém, na presença do estímulo antigênico, observamos um aumento significativo somente no grupo NI em comparação aos outros dois grupos (Figura 16B).

Quando comparamos as culturas, não estimulada e na presença de SEA, observamos que a presença de SEA induziu uma redução significativa de células CD3⁺ expressando ciclina D_{1,2,3}⁺ (*p= 0,034) apenas na cultura de PBMC de pacientes XTO (Figura 16).

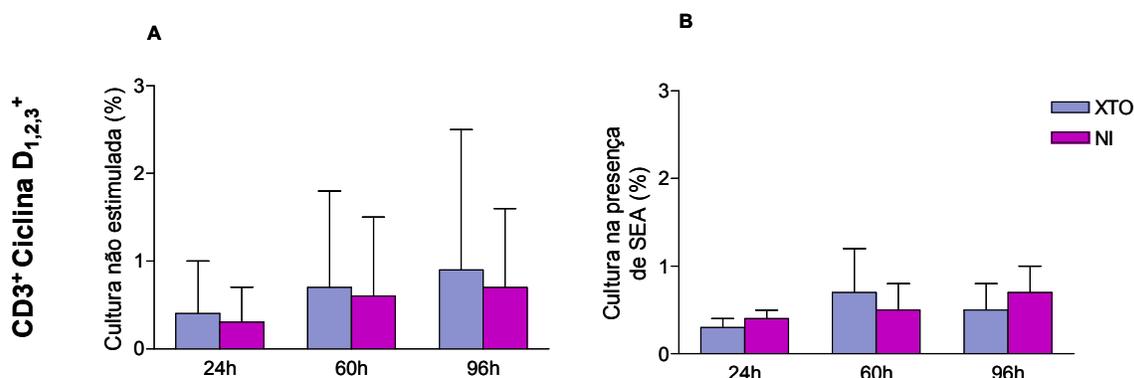


Figura 15: Cinética da frequência de células $CD3^+$ Ciclina $D_{1,2,3}^+$ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos XTO e NEG.

A cinética da frequência de células $CD3^+$ Ciclina $D_{1,2,3}^+$ foi analisada por citometria de fluxo, a partir de PBMC de indivíduos XTO: $n=11$ e NEG: $n=5$, após 5 dias de cultura não estimulada (A) ou na presença de SEA (B). As barras equivalem às médias dos valores representados. O teste estatístico utilizado em A e B para os ensaio de 24, 60 e 96 horas foi o teste T; e o teste estatístico utilizado entre o valor da cultura não estimulada e cultura na presença de SEA foi o teste T pareado. Nenhuma diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi encontrada.

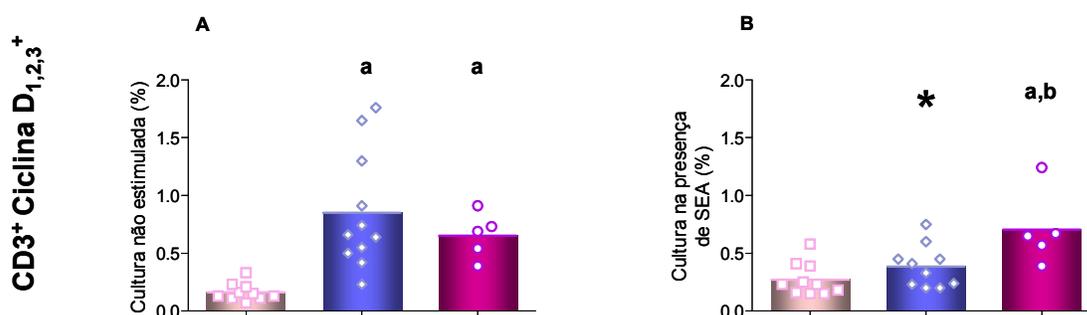


Figura 16: Análise da frequência de células $CD3^+$ Ciclina $D_{1,2,3}^+$ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de indivíduos DS, XTO e NEG.

A frequência de células $CD3^+$ Ciclina $D_{1,2,3}^+$ foi analisada por citometria de fluxo, a partir de PBMC de indivíduos DS: $n=10$ (□), XTO: $n=11$ (◇) e NEG: $n=5$ (○), após 5 dias de cultura não estimulada (A) ou na presença de SEA (B). As barras equivalem às médias dos valores representados. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O teste estatístico utilizado em A e B foi o ANOVA seguido por pós teste Tukey's. O * representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,034$) entre a cultura não estimulada e na presença de SEA no grupo XTO. A letra **a** representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo DS; a A letra **b** representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo XTO.

Estudo da influência do *N. americanus* em pacientes co-infectados com *S. mansoni*

Vários estudos mostraram que em áreas endêmicas para a esquistossomose há, freqüentemente, várias espécies de helmintos na mesma região, resultando em co-infecções helmínticas freqüentes (Chamone *et al.*, 1990; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998 e 2002; Petney e Andrews, 1998; Booth *et al.*, 1998; Needham *et al.*, 1998; Brooker *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2002; Tchuem Tchuente *et al.*, 2003; Raso *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007). Os helmintos mais comumente encontrados co-infectando pacientes portadores de esquistossomose, no Brasil, são os ancilostomídeos (Chamone *et al.*, 1990; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007). Neste contexto, procuramos investigar se a interação entre *N. americanus* e *S. mansoni* em pacientes co-infectados (CO) poderia influenciar nos mecanismos celulares envolvidos na resposta ao SEA.

4.6 - Comparação do perfil hematológico do sangue periférico de pacientes MONO e CO

A Tabela 9 mostra que em nenhum dos parâmetros hematológicos houve diferença significativa quando comparados os grupos de pacientes MONO e CO.

Tabela 9: Caracterização do perfil hematológico dos pacientes MONO e CO.

	MONO	CO
Global leucocitária (mm ³)	6.75 ± 0.9	6.92 ± 1.5
Linfócito absoluto (mm ³)	2.49 ± 0.5	2.43 ± 0.5
Monócito absoluto (mm ³)	241.10 ± 118.1	274.80 ± 137.7
Neutrófilo absoluto (mm ³)	3.40 ± 1.0	3.35 ± 1.2
Eosinófilo absoluto (mm ³)	598.50 ± 376.50	828.20 ± 765.0
Plaquetas (mm ³)	259.0 ± 104.8	230.0 ± 67.81
Eritrócitos (mm ³)	4.612.000 ± 473.798	4.876.667 ± 408.708
Hemoglobina (g/dL)	13.83 ± 1.4	14.09 ± 1.0
Hematócrito (%)	41.71 ± 4.8	42.75 ± 3.4

Os valores estão expressos em média ± SD dos grupos de pacientes MONO (n=10) e CO (n=12). Nenhuma diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) foi encontrada.

4.7 - Caracterização do perfil imunológico por dosagem de citocinas de pacientes MONO e pacientes CO

A comparação entre a produção de citocinas no plasma e no sobrenadante de culturas de PBMC não estimuladas e na presença de SEA dos grupos de pacientes MONO e CO estão representadas nas Figura 17.

Pode-se observar que o plasma dos grupos de pacientes MONO e CO apresentaram um perfil de citocinas semelhantes. A análise estatística mostrou que não houve nenhuma diferença significativa entre os dois grupos.

Por outro lado, nossos resultados mostram que os dois grupos apresentaram um perfil bem diferenciado de secreção de citocinas após cultura não estimulada (Figura 17B). Observamos uma maior secreção de IL-2 pelas PBMC de pacientes CO quando comparadas com pacientes MONO (Figura 17B). Apesar de termos observado uma maior secreção de citocinas IL-5, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de PBMC não estimuladas de pacientes CO, nenhuma diferença, estatisticamente, significativa foi observada entre os 2 grupos (Figura 17B).

Após a presença de SEA, novamente, não observamos nenhuma diferença significativa no perfil de citocinas entre os dois grupos (Figura 17C). Entretanto, observamos que no grupo CO, o estímulo com SEA induziu uma redução significativa da produção de IL-2 quando comparada à produção na cultura não estimulada de PBMC (* $p=0,053$) (Figura 17).

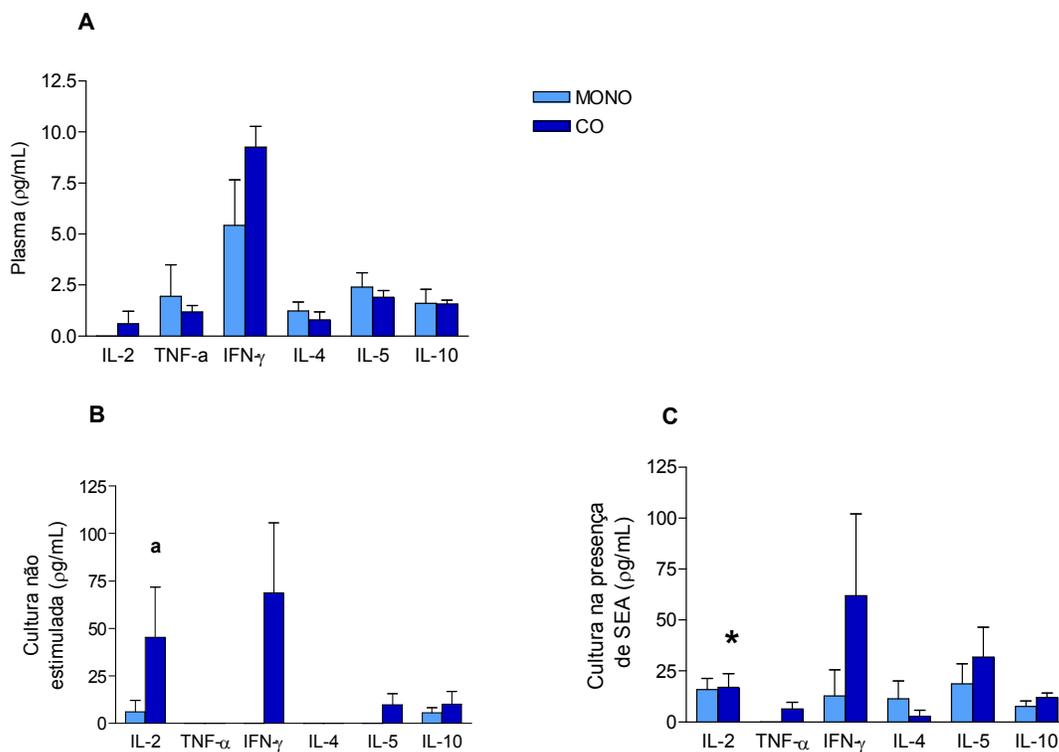


Figura 17: Análise da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ no plasma e no sobrenadante de cultura não estimulada e estimulada por SEA de pacientes MONO e CO.

Os níveis das citocinas (A) IL-2, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-4, (E) IL-5 e (F) IL-10 foram quantificados por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA). Foram avaliados plasma e sobrenadante de culturas de PBMC dos pacientes MONO (n= 4) e CO (n= 7). Todas as barras representam as médias dos valores. O teste estatístico utilizado em todos os gráficos foi o teste T. A letra **a** representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos MONO e CO. O teste estatístico utilizado entre a cultura não estimulada e estimulada foi o teste T pareado. O * representa a diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,034$) entre a cultura não estimulada e na presença de SEA no grupo CO. Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.8 - Comparação do fenótipo celular induzido por SEA entre os grupos MONO e CO

Investigamos a expressão de marcadores de superfície celular presentes no sangue periférico dos pacientes MONO e CO após cultura não estimulada e estimulada, *in vitro*, com SEA. Avaliamos, inicialmente, a frequência de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ entre as culturas não estimulada e em resposta ao SEA (Figura 18).

A análise dos resultados mostrou que não houve diferença na frequência de linfócitos T CD3⁺, bem como nas sub-populações CD4⁺ e CD8⁺ após cinco dias da cultura não estimulada (Figura 18 A-C). A presença do estímulo antigênico também não influenciou nas frequências celulares (Figura 18 D-F). A análise, da razão entre as células CD4⁺/CD8⁺, após 5 dias de cultura não estimulada (Figura 19A) e na presença de SEA (Figura 19B), também não demonstrou diferenças entre os grupos de pacientes. Pelo contrário, as razões encontradas foram muito semelhantes (Figura 19).

Além disso, a investigação dos marcadores de ativação (CD69⁺, HLA-DR⁺ e CD25⁺ e CD28⁻) nas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nas PBMC dos pacientes revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos de pacientes MONO e CO (Figura 20).

Conforme descrito anteriormente, o estímulo antigênico (SEA) induziu um aumento da frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) no grupo de pacientes XTO (Figura 14C). Vimos, também, que esta sub-população celular estava diretamente correlacionada à secreção de IL-10 neste grupo de pacientes ($r= 0,7079$; $p= 0,0148$ – tópico 4.3). Todavia, quando subdividimos o grupo em mono- e co-infectados, não encontramos diferença significativa nesta sub-população celular entre as culturas de PBMC de pacientes MONO e CO (Figura 21). Apesar disso, identificamos uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH} e a secreção de IL-10 na cultura de PBMC de pacientes do grupo CO (Tabela 10).

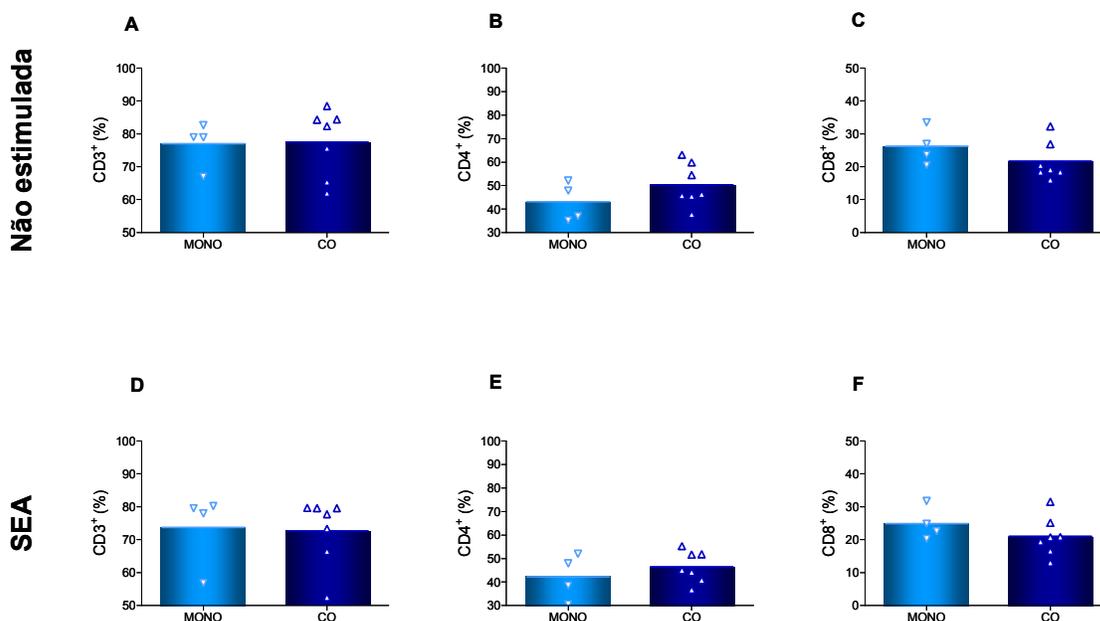


Figura 18: Frequência de células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.

A frequência de células $CD3^+$ (A e D), $CD4^+$ (B e E) e $CD8^+$ (C e F) foram analisadas por citometria de fluxo, a partir de PBMC de pacientes MONO: n= 4 (∇) e CO: n= 7 (Δ), após 5 dias de cultura não estimulada (A, B e C) ou na presença de SEA (D, E e F). As barras equivalem às médias dos valores representados. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O teste estatístico utilizado em A, B, C, E e F foi o teste T; e o teste estatístico utilizado em D foi teste Mann-Whitney. Nenhuma diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi encontrada.

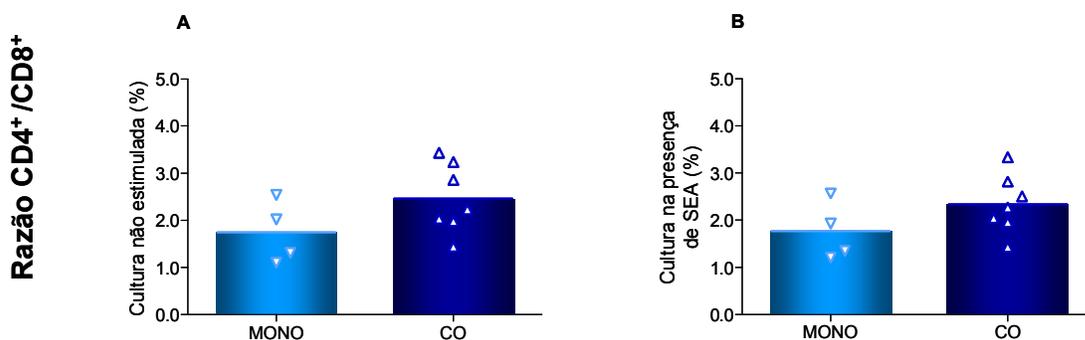


Figura 19: Razão entre células $CD4^+/CD8^+$ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.

A razão entre células $CD4^+/CD8^+$ de PBMC de pacientes MONO: $n=4$ (∇) e CO: $n=7$ (Δ) foi avaliada após 5 dias de cultura não estimulada (A) ou na presença de SEA (B). As barras equivalem às médias dos valores representados. O teste estatístico utilizado em todos os gráficos foi o teste T. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. Nenhuma diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi encontrada.

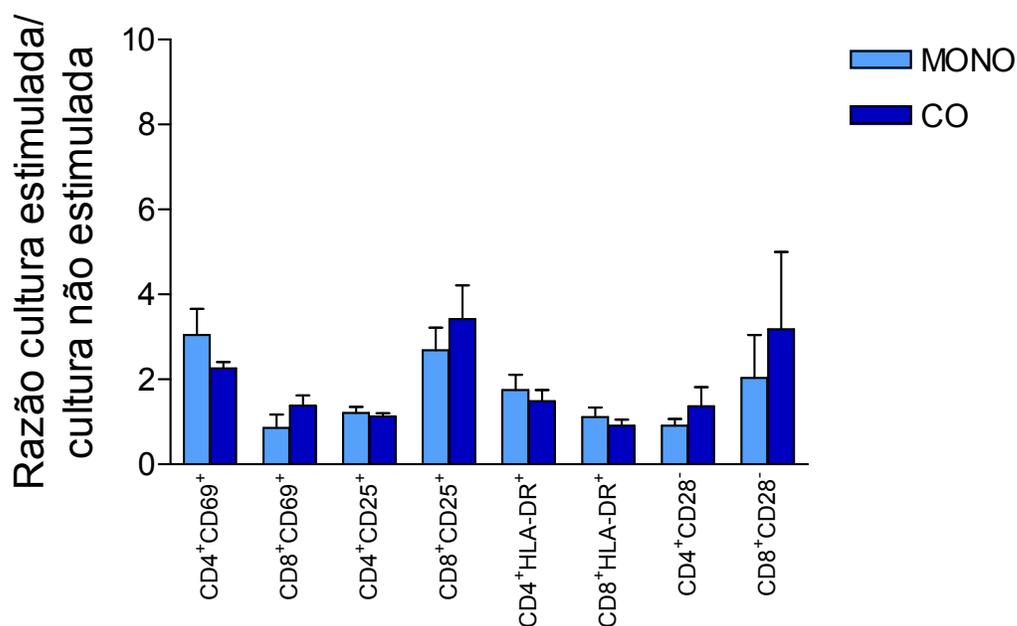


Figura 20: Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de marcadores de ativação ($CD69^+$, $HLA-DR^+$ e $CD25^+$ e $CD28^-$) em sub-populações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ de pacientes MONO e CO.

A razão, das células ativadas, foi analisada por divisão dos valores encontrados após a cultura estimulada pelos valores encontrados após cultura não estimulada, a partir de PBMC de pacientes MONO: $n=4$ e CO: $n=7$. As barras equivalem às médias dos valores. O teste estatístico utilizado em todos os gráficos foi o teste T. Nenhuma diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi encontrada.

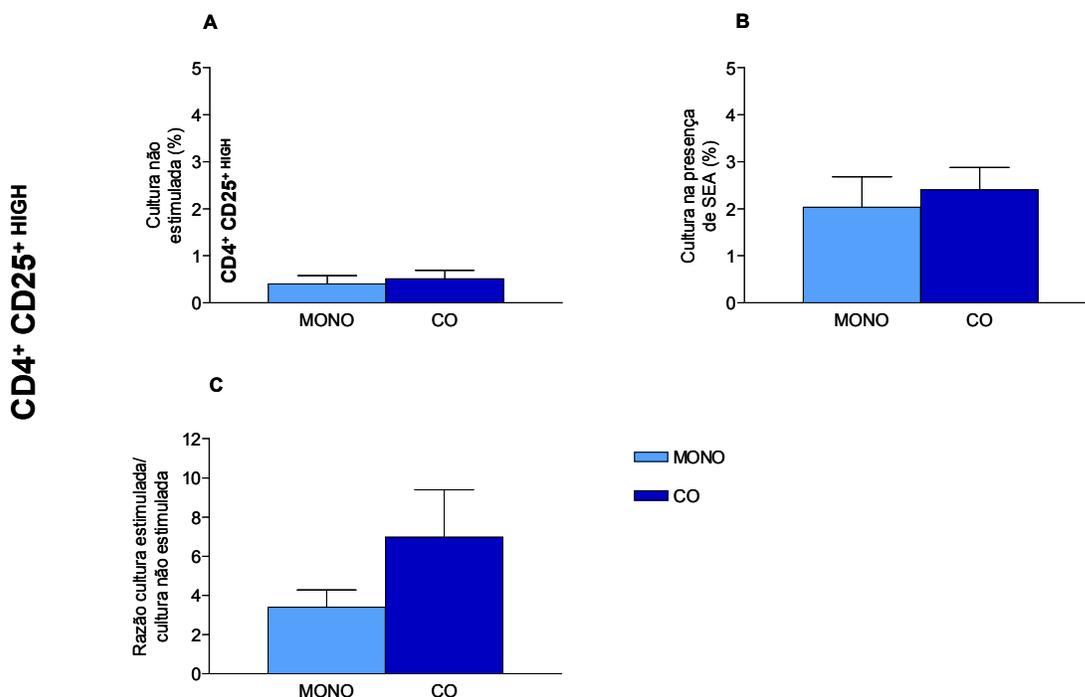


Figura 21: Efeito da presença do SEA em culturas de PBMC sobre a frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺HIGH de pacientes MONO e CO.

A razão da frequência das células CD4⁺CD25⁺HIGH, foi analisada por divisão dos valores encontrados após a cultura estimulada (%) (B) pelos valores encontrados após cultura não estimulada (%) (A), de PBMC de pacientes MONO: n= 4 e CO: n= 7. As barras equivalem às médias dos valores. O teste estatístico utilizado em todos os gráficos foi o teste T. Nenhuma diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) foi encontrada.

Tabela 10: Correlação entre IL-10 do sobrenadante e a frequência de células CD4⁺CD25⁺HIGH dos pacientes MONO e CO.

Correlação – CD4 ⁺ CD25 ⁺ HIGH e IL-10		
Estímulo	MONO	CO
Cultura não estimulada 5 dias	r= 0,8767 p= 0,1233 ns	r= -0,3888 p= 0,3887 ns
Cultura na presença de SEA 5 dias	r= 0,5330 p= 0,4670 ns	r= 0,7924 p=0,0336 *

4.9 - Caracterização da progressão do ciclo celular e resposta de proliferação de PBMC pacientes MONO e CO

A progressão do ciclo celular e a proliferação das PBMC dos pacientes MONO e CO em culturas não estimulada e na presença de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ou de SEA, foram avaliadas por incorporação de BrdU e 7-Amino-Actinomycin D, por meio de citometria de fluxo.

4.9.1 - Comparação do ciclo celular entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/anti-CD28 ou SEA

O percentual de distribuição de linfócitos T CD3⁺ nas fases do ciclo celular dos grupos de pacientes MONO e CO após cultura não estimulada e na presença de SEA estão apresentados nas tabelas 11 e 12 respectivamente.

A comparação da frequência dos linfócitos T CD3⁺ em diferentes fases do ciclo celular mostrou diferença estatisticamente significativa, entre as fases G₀/G₁, S e G₂/M quando comparadas às culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/CD28 do grupo MONO (Tabela 11-A). A comparação entre as culturas não estimulada e estimulada com anti-CD3/CD28 do grupo CO também revelou a capacidade das células CD3⁺ de progredirem através do ciclo celular após o estímulo anti-CD3/CD28. Todavia, encontramos uma redução na frequência de células em G₂/M, mas essa não foi estatisticamente significativa (Tabela 12-A).

A presença do SEA em cultura não induziu alterações significativas na progressão do ciclo das células CD3⁺ quando comparada à cultura não estimulada tanto em pacientes MONO (Tabela 11-B) quanto em pacientes CO (Tabela 12-B). Logo, pacientes MONO e CO apresentaram células T incapazes de proliferarem em resposta ao estímulo específico.

Além disso, nossos resultados mostraram que SEA, assim como anti-CD3/CD28 não induziram o aumento da frequência de células CD3⁺ apoptóticas nos dois grupos de pacientes infectados (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Distribuição das fases do ciclo celular de células T de pacientes MONO.

	<i>Grupo MONO</i>	G_0/G_1	Fase S	G_2/M	Apoptóticas
A	Cultura não estimulada - 3 dias	73,26 ± 6,3	11,67 ± 4,3	8,02 ± 0,8	6,94 ± 3,0
	Anti-CD3/anti-CD28	54,90 ± 2,4 *	35,30 ± 2,8 *	2,38 ± 0,7 *	7,52 ± 1,5
B	Cultura não estimulada - 5 dias	78,89 ± 1,5	10,19 ± 3,6	5,01 ± 0,9	6,32 ± 1,5
	Cultura na presença de SEA	77,26 ± 4,4	13,22 ± 3,7	3,81 ± 0,6	5,67 ± 2,1

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de pacientes MONO (n=4), após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O * representa $p < 0,001$.

Tabela 12: Distribuição das fases do ciclo celular de células T de pacientes CO.

	<i>Grupo CO</i>	G_0/G_1	Fase S	G_2/M	Apoptóticas
A	Cultura não estimulada - 3 dias	80,35 ± 4,6	9,22 ± 2,7	5,57 ± 0,7	4,48 ± 2,0
	Anti-CD3/anti-CD28	66,51 ± 3,3 *	25,77 ± 3,1 *	4,01 ± 1,0	3,79 ± 0,9
B	Cultura não estimulada - 5 dias	78,94 ± 0,8	11,45 ± 2,5	4,86 ± 1,1	4,13 ± 0,8
	Cultura na presença de SEA	78,84 ± 2,7	11,68 ± 1,4	4,20 ± 0,5	3,65 ± 0,8

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de pacientes CO (n=7), após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O * representa $p < 0,001$.

4.9.2 - Comparação do ciclo celular entre os grupos de pacientes MONO e CO

Os resultados anteriores foram reorganizados na tabela 13 e mostram as diferenças significativas da frequência média das células T distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular entre os grupos MONO e CO.

A comparação, entre a frequência de células T, nas diferentes fases do ciclo celular, nas culturas de 3 e 5 dias não estimuladas, mostrou-se muito semelhante. Entretanto, observamos uma menor frequência de células T CD3⁺ em fase G₂/M na cultura de 3 dias do grupo CO (Tabela 13-A). Esta diferença, no entanto, não se manteve significativa após 5 dias de cultivo sem estímulo (Tabela 13-C).

Apesar de ser encontrado um maior número de células T CD3⁺ em G₀/G₁ após estímulo com anti-CD3/CD28 no grupo CO (Tabela 132-B), observa-se que de modo geral, o estímulo inespecífico não induziu diferenças na progressão do ciclo celular entre os grupos MONO e CO.

Assim, comparando a resposta ao SEA de pacientes mono-infectados com *S. mansoni* ou co-infectados com *S. mansoni* e *N. americanus*, concluímos que não houve diferença na progressão através do ciclo celular, nem mesmo na frequência de células apoptóticas (Tabela 13-D).

Tabela 13: Distribuição das fases do ciclo celular de células T dos grupos MONO e CO

		<i>Distribuição das fases do ciclo celular (%)</i>		
		MONO	CO	
A	Cultura não estimulada 3 dias	Fases G ₀ /G ₁	73,26 ± 6,3	80,35 ± 4,6
		Fase S	11,67 ± 4,3	9,22 ± 2,7
		Fases G ₂ /M	8,02 ± 0,8	5,57 ± 0,7 *
		Células apoptóticas	6,94 ± 3,0	4,48 ± 2,0
B	Cultura na presença de Anti-CD3/anti-CD28	Fases G ₀ /G ₁	54,90 ± 2,4	66,51 ± 3,3 *
		Fase S	35,30 ± 2,8	25,77 ± 3,1
		Fases G ₂ /M	2,38 ± 0,7	4,01 ± 1,0
		Células apoptóticas	7,52 ± 1,5	3,79 ± 0,9
C	Cultura não estimulada 5 dias	Fases G ₀ /G ₁	78,89 ± 1,5	78,94 ± 0,8
		Fase S	10,19 ± 3,6	11,45 ± 2,5
		Fases G ₂ /M	5,01 ± 0,9	4,86 ± 1,1
		Células apoptóticas	6,32 ± 1,5	4,13 ± 0,83
D	Cultura na presença de SEA 5 dias	Fases G ₀ /G ₁	77,26 ± 4,4	78,84 ± 2,7
		Fase S	13,22 ± 3,77	11,68 ± 1,4
		Fases G ₂ /M	3,81 ± 0,6	4,20 ± 0,5
		Células apoptóticas	5,67 ± 2,1	3,65 ± 0,8

Os valores estão expressos em média ± SD do grupo de pacientes MONO (n=4) e CO (7) após cultura de 3 e 5 dias de cultura. O símbolo * representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,05) entre os grupos.

4.10 - Comparação da expressão de Ciclina D_{1,2,3} em linfócitos T pacientes MONO e CO

No item 4.5, demonstramos que a expressão de ciclina D_{1,2,3} em células CD3⁺ foi modulada na presença de SEA no grupo de pacientes XTO (Figura 16). Nesta etapa, avaliamos se a presença de mais de uma infecção helmíntica pode interferir na expressão da ciclina D_{1,2,3} em células CD3⁺. Para isto, comparamos a expressão desta ciclina em culturas de PBMC de pacientes MONO e CO não estimuladas e estimuladas com SEA (Figura 22).

Tanto após cultura não estimulada (Figura 22A) quanto estimulada (Figura 22B) não foram detectadas diferenças entre os grupos de pacientes. No entanto, SEA induziu uma redução, estatisticamente significativa (*p<0,044) na expressão da ciclina D_{1,2,3} em células CD3⁺ no grupo de pacientes MONO (Figura 22).

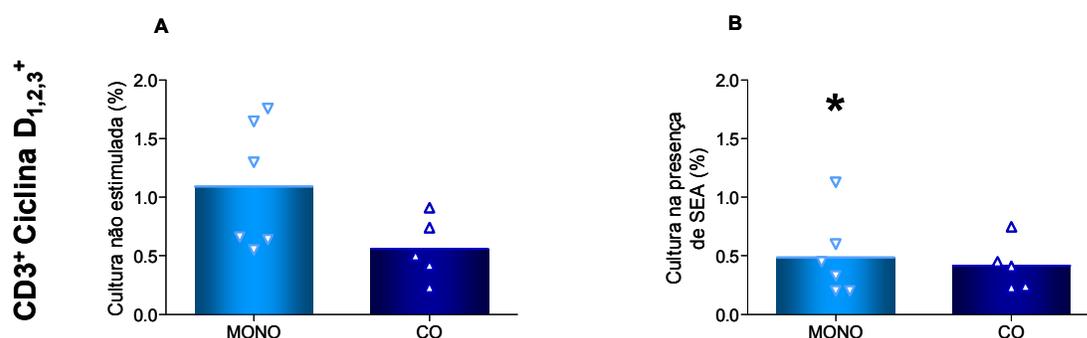


Figura 22: Análise da frequência de CD3⁺ Ciclina D_{1,2,3}⁺ após 5 dias de cultura não estimulada e estimulada com SEA de pacientes MONO e CO.

A frequência de células CD3⁺ Ciclina D_{1,2,3}⁺ foi analisada por citometria de fluxo, a partir de PBMC de pacientes MONO n= 6 (▼) e CO: n= 5 (▲), após 5 dias de cultura não estimulada (A) ou na presença de SEA (B). As barras equivalem às médias dos valores representados. Os símbolos representam a dispersão dos resultados individuais. O teste estatístico utilizado em A e B foi o teste T. O * representa a diferença, estatisticamente significativa (p< 0,044) entre a cultura não estimulada e estimulada com SEA no grupo de pacientes MONO.

Resumo dos Resultados: DS, XTO e NEG

	DS (□)	XTO (◇)	NEG (○)
Hemograma			
	↓ global	↑ global	
	↓ ↓ monócito	↑ monócito	↑ monócito
	↓ ↓ neutrófilo	↑ neutrófilo	↑ neutrófilo
		↑ eosinófilo	↓ eosinófilo
	↑ ↑ hematócrito	↓ hematócrito	↓ hematócrito
Plasma - Citocinas			
	↓ ↓ TNF- α	↑ TNF- α	↑ TNF- α
	↓ IFN- γ	↑ IFN- γ	
	↓ IL-5	↑ IL-5	
Cultura não estimulada			
Ciclo celular	Progride	Progride mais que DS	Progride mais que DS
Citocinas	↓ IL-2	↑ IL-2	
	↑ IFN- γ	↓ IFN- γ	
Ciclina D _{1,2,3}	↓ ↓ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	↑ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	↑ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺
Cultura estimulada com SEA			
Ciclo celular	Bloqueio qdo comparado ao XTO e NI	Bloqueio qdo comparado ao NI	Progride quando comparado ao XTO e DS
Citocinas		↓ TNF- α	↑ TNF- α
	↑ IFN- γ	↓ IFN- γ	
Ciclina D _{1,2,3}	↓ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	↓ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	↑ ↑ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺
Marcadores de ativação	↓ CD4 ⁺ CD69 ⁺ , ↓ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓ CD4 ⁺ CD28 ⁺ ↓ CD8 ⁺ CD25 ⁺ ↓ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	↓ CD4 ⁺ CD69 ⁺ , ↓ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓ CD4 ⁺ CD28 ⁺ ↓ CD8 ⁺ CD25 ⁺ ↓ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	↑ ↑ CD4 ⁺ CD69 ⁺ , ↑ ↑ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ↑ ↑ CD4 ⁺ CD28 ⁺ ↑ ↑ CD8 ⁺ CD25 ⁺ ↑ ↑ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺
Comparação - Controle x SEA			
	↑ IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ	↑ IL-5 e IL-10 ↓ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	Nenhuma diferença
Correlação: CD4⁺CD25⁺ e IL-10			
	nenhuma	positiva	nenhuma

Resumo dos Resultados: MONO e CO

	<i>MONO</i> (▼)	<i>CO</i> (▲)
Cultura não estimulada		
Ciclo celular	Progride	Progride
Citocinas	↓ IL-2	↑ IL-2
Cultura estimulada com SEA		
Ciclo celular	Não progride	Não progride
Comparação - Controle x SEA		
	↓ CD3 ⁺ CyD _{1,2,3} ⁺	↓ IL-2
Correlação: CD4⁺CD25⁺ e IL-10		
	nenhuma	positiva

5. Discussão

A esquistossomose mansoni é uma infecção que acomete milhões de pessoas em todo mundo e que ocasiona um grande impacto sócio-econômico, sendo assim se constitui um grande problema de saúde pública.

De acordo com as fases da infecção foi observado que os granulomas hepáticos apresentavam características diferentes sendo que na fase aguda, o volume do granuloma pode chegar a dezenas de vezes o volume do ovo (Andrade & Warren, 1964; Warren *et al.*, 1967) enquanto que na fase crônica, ocorre uma acentuada diminuição no tamanho dos mesmos. Esse efeito imunomodulatório tem sido bem documentado em vários estudos com humanos (Colley *et al.*, 1979; Gazzinelli *et al.*, 1985; Pearce *et al.*, 1991; Flores Villanueva *et al.*, 1994a; Chensue *et al.*, 1994; Flores Villanueva *et al.*, 1996). Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar a habilidade dos helmintos em modular a resposta imune, assim protegendo eles próprios da eliminação e, em adição, minimizando a patologia no hospedeiro. Estudos recentes identificaram algumas moléculas derivadas do ovo de *Schistosoma* que são capazes de induzir uma resposta do tipo Th₂ e uma resposta reguladora, via produção de citocinas, modulação de células dendríticas ou mesmo via células T reguladoras. Entretanto, em esquistossomose mansoni, não existem trabalhos avaliando a influência do efeito imunomodulatório na progressão do ciclo celular.

Diante deste fato, esse trabalho investiga a influência dos antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (SEA) na progressão do ciclo celular em linfócitos de pacientes portadores da esquistossomose.

Além disto, em áreas endêmicas, é encontrada uma alta frequência de pacientes co-infectados pelo *S. mansoni* e outros helmintos, principalmente o *N. americanus* (Chamone *et al.*, 1990; Brito *et al.*, 2006; Fleming *et al.*, 2006; Brooker *et al.*, 2007). Logo, também, investigamos se a presença da co-infecção pelo *N. americanus* influencia a resposta imunológica ao SEA.

5.1 - Avaliação do perfil hematológico do sangue periférico

A esplenomegalia e as possíveis hemorragias digestivas na esquistossomose grave são fatores responsáveis pela freqüente anemia nesta infecção (Sturrock *et al.*, 1996). A presença de infecção por outros helmintos, como os ancilostomídeos, tem sido significativamente associada à anemia (Schad *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1997; Stoltzfus *et al.*, 1997 a; b). Neste estudo, quantificamos os valores de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito e de hemoglobina (g/dL). Todos os resultados encontrados, nos três grupos investigados (Tabela 4), estão dentro dos valores de referência em hematologia (Miller *et al.*, 1990). Portanto, nenhum dos indivíduos infectados (XTO) e não infectados (DS e NEG) encontrava-se com perfil hematológico alterado e/ou anêmico. Alguns estudos mostraram que a presença de uma ou duas infecções, além da esquistossomose, não leva ao desenvolvimento de anemia, nem a redução da concentração de hemoglobina (Brito *et al.*, 2006; Muhangi *et al.*, 2007). Por outro lado, outros trabalhos associaram a presença de ancilostomídeos, em pacientes portadores de co-infecção a estas características (Brooker *et al.*, 2000; 2007). Nossos resultados mostraram que não houve diferença em nenhum dos parâmetros hematológicos quando comparados os grupos MONO e CO (Tabela 9), sugerindo que a presença da co-infecção pelo *N. americanus* não promoveu a anemia e a hipoproteïnemia, sintomas muito comuns em pacientes infectados apenas por ancilostomídeos (Schad *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1997; Stoltzfus *et al.*, 1997 a; b). A discrepância entre estes resultados pode estar relacionada à carga parasitária de *N. americanus*, visto que, nossos pacientes CO apresentavam a carga parasitária baixa, assim como observado por Brito e colaboradores (2006).

A comparação do perfil hematológico demonstrou que os indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG), apresentavam valores superiores de leucócitos em relação aos indivíduos doadores de sangue. Sobretudo, este perfil se deve, em particular, às populações de monócitos e neutrófilos (Tabela 4). Quanto aos monócitos, sabe-se que este tipo celular pode induzir a ativação e a proliferação de linfócitos T, com uma conseqüente diferenciação destes em células Tipo1, Tipo2 ou T reguladoras (Kapsenberg, 2003). No entanto, para que estas células promovam esta ativação, elas devem ser maturadas (Mellman & Steinman, 2001) ou por sinais intrínsecos ao organismo (Gallucci & Matzinger, 2001) ou mesmo por sinais derivados de patógenos (Akira & Takeda, 2004). Foi demonstrado que, na presença de antígenos de *A. lumbricoides*, menos células dendríticas tornam-se maduras, em comparação ao cultivo controle,

revelando um decréscimo da expressão da molécula co-estimuladora CD83 na superfície destas células (van Riet *et al.*, 2007). Com relação à infecção pelo *S. mansoni*, é sabido que o SEA pode ser rapidamente internalizado com MHC II nos compartimentos lisossomais dos monócitos, entretanto estas células apresentam menos moléculas co-estimuladoras na superfície (van Liempt *et al.*, 2007) e, portanto, apresentam deficiência na interação com os linfócitos (Kapsenberg, 2003).

Acreditamos que o aumento da população de monócitos, no sangue periférico de indivíduos XTO e NEG, pode funcionar como mecanismo de compensação devido à deficiência na maturação destas células frente ao antígeno de ovos de *S. mansoni* (van Liempt *et al.*, 2007). Como em uma área endêmica, os indivíduos estão em contato contínuo com antígenos de *S. mansoni*, seus monócitos devem manter atividade constante de apresentação de antígenos, refletindo no aumento da população circulante no sangue periférico (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2002).

De acordo com a literatura, sabe-se que células apresentadoras de antígeno podem ser atraídas para focos inflamatórios, por meio da ação quimioestática de neutrófilos (Kasama *et al.*, 1993; Scapini *et al.*, 2001). Em esquistossomose, a formação do granuloma envolve o recrutamento de monócitos para o sítio inflamatório, seguido por interações coordenadas entre linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e fibroblastos (Oloris *et al.*, 2007). Hirata e Fukuma (2003) demonstraram que a formação dos granulomas, na infecção por *S. japonicum*, ocorrem tanto por processos dependentes de células T quanto dependente de neutrófilos. Nossas análises revelaram que, um número maior de neutrófilos também foi detectado no sangue periférico de indivíduos XTO e NEG (Tabela 4), sugerindo que este tipo celular possa estar envolvido no aumento da população de monócitos, uma vez que os neutrófilos induzem a maturação das células apresentadoras através de interações de receptores de superfície, além da secreção de TNF- α (van Gisbergen *et al.*, 2005). Logo, nossos dados sugerem que independente da infecção crônica, há o provável envolvimento, simultaneamente, dos neutrófilos e monócitos de indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG).

Ainda a respeito da análise hematológica, o número absoluto de eosinófilos foi significativamente maior no grupo de pacientes portadores de esquistossomose do que no grupo de indivíduos NEG (Tabela 4). Estes resultados assemelham-se muito a trabalhos descritos anteriormente em pacientes portadores de infecção por *S. mansoni* (Kalinkovich *et al.*, 1998;

Borkow *et al.*, 2000; Lima, 2005; Silveira-Lemos *et al.*, 2006), e de fato, a eosinofilia é uma característica comum nas infecções helmínticas (Klion & Nutman, 2004).

Na esquistossomose, os eosinófilos representam aproximadamente 40-50% da composição do infiltrado inflamatório que compõe o granuloma na fase aguda, e de acordo com Lenzi e colaboradores (1987), é a principal célula inflamatória envolvida na migração dos ovos de *S. mansoni* pelo endotélio intestinal. Ganley-Leal e colaboradores e Reimert e colaboradores demonstraram que o número de eosinófilos observado no sangue periférico de indivíduos infectados foi positivamente correlacionado à concentração da citocina IL-5 detectada no plasma destes indivíduos (Ganley-Leal *et al.*, 2006; Reimert *et al.*, 2006), confirmando outros trabalhos que descreveram que a principal função da IL-5 é induzir o crescimento, diferenciação e ativação dos eosinófilos (Yamaguchi *et al.*, 1988; Sanderson, 1988; Coffman *et al.*, 1989). Assim como nestes estudos, nossos resultados revelaram um aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-5 no sangue periférico de pacientes XTO (Figura 5), sugerindo que a elevação desta citocina pode ser responsável pelo aumento do número de eosinófilos circulantes (Tabela 4), embora não encontramos correlação entre os níveis de IL-5 e eosinófilos.

Kalinkovich e colaboradores (1998) observaram que pacientes co-infectados por *S. mansoni* e *N. americanus* apresentam um maior número de eosinófilos do que os pacientes mono-infectados por *S. mansoni*. No entanto, a nossa investigação, a respeito da influência da infecção por *N. americanus* em pacientes infectados pelo *S. mansoni*, mostrou que não existe diferença entre os grupos MONO e CO em relação ao número de eosinófilos, assim como as demais sub-populações avaliadas (Tabela 9).

5.2 - Avaliação das citocinas no plasma

Trabalhos anteriores, em modelo experimental, demonstraram que o início da postura de ovos induz uma resposta celular do tipo Tipo2, e a transferência de ovos do *S. mansoni* para animais vacinados promove uma alteração da resposta do tipo Tipo1 para Tipo2 (Vella *et al.*, 1992). Pearce e colaboradores (1991) e Grzych e colaboradores (1991) demonstraram, ainda, que, na esquistossomose murina, a inibição da produção de IFN- γ coincide com o início da ovoposição e da secreção de IL-4 e IL-5.

A produção de citocinas durante a infecção esquistossomótica tem sido amplamente estudada por diversos autores com resultados variados. Em esquistossomose mansônica humana,

altos níveis de IL-4 foram detectados no soro de pacientes portadores da forma clínica intestinal quando comparados aos níveis encontrados no plasma de indivíduos não infectados (Zwingenberger *et al.*, 1991). Além disso, estes autores demonstraram uma correlação inversa entre os níveis de IL-4 e de IFN- γ , sugerindo que, em humanos, a infecção crônica por *S. mansoni*, também promove um perfil de citocinas Tipo2. El-Kady e colaboradores (2005) demonstraram que, além do predomínio de IL-4, altos níveis de IL-10 são detectados no plasma de pacientes portadores da forma clínica intestinal. Entretanto, recentemente, Makhoulf e colaboradores detectaram níveis normais de IL-5 e elevadas concentrações de IFN- γ no plasma de pacientes portadores da forma clínica intestinal, sugerindo um perfil de resposta Tipo1 (Makhoulf *et al.*, 2006). Apesar de estes resultados serem muitas vezes contraditórios, recentemente parece haver um consenso que, embora haja um predomínio de resposta Tipo2, podemos detectar a presença de citocinas do tipo 1 e o que o balanço destas citocinas influencia o curso da infecção (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003). Em nosso trabalho, os pacientes XTO apresentam níveis elevados de TNF- α , IFN- γ e de IL-5 no plasma (Figura 5), sugerindo um perfil misto Tipo1-Tipo2.

Em áreas endêmicas para helmintos, existem inúmeros relatos de diferentes infecções, com as causadas por vírus (Borkow *et al.*, 2001; Wolday *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004; El-Kady *et al.*, 2005), bactérias (Bentwich, 2000; Borkow *et al.*, 2001; Elias *et al.*, 2005) ou protozoários (Nacher, 2004; Spiegel *et al.*, 2003). É sabido que a resposta imune dirigida contra estes agentes infecciosos é predominantemente do tipo Tipo1 (Malhotra *et al.*, 2005; Maeno *et al.*, 2006; Ordway *et al.*, 2007) e que co-infecções com helmintos, pode alterar esse perfil para um microambiente misto de citocinas ou do tipo 2 (Santos *et al.*, 2004; El-Kady *et al.*, 2005). Nós não investigamos a presença de infecções viróticas ou bacterianas nos indivíduos residentes em área endêmica. Portanto, também não podemos excluir que este perfil misto, observado no plasma do paciente XTO, seja devido a presença de algumas destas infecções.

A quantificação das citocinas no plasma dos grupos categorizados em pacientes MONO e CO (Figura 17A) não mostrou diferença, sugerindo que a presença da co-infecção por *N. americanus* não influencia o perfil de produção em citocinas em pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni*.

Os indivíduos NEG foram caracterizados por apresentarem exames parasitológicos repetidamente negativos. Esses resultados sugerem que este grupo pode ser putativamente resistente à esquistossomose. Entretanto, mais análises são necessárias para classificarmos como

normais endêmicos (Viana *et al.*, 1994). Estes indivíduos apresentaram apenas a citocina TNF- α em maior concentração no plasma, quando comparado ao grupo de indivíduos doadores de sangue (Figura 5). Embora vários trabalhos tenham associado o TNF- α à forma clínica hepatoesplênica (Zwingenberger *et al.*, 1990; Mwatha *et al.*, 1998; Henri *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2007) e à formação do granuloma na esquistossomose (Amiri *et al.*, 1992; Cheever *et al.*, 1999), outros sugerem sua participação nos mecanismos de proteção. Esta citocina tem sido relatada como essencial na imunidade celular em modelos experimentais, vacinados com cercárias irradiadas (Coulson, 1997). Artis e colaboradores (1999) sugeriram que o TNF- α tem um papel crítico na regulação de citocinas Tipo2 que induzem os mecanismos de proteção no estágio inicial da infecção com *T. muris* (Artis *et al.*, 1999). Em esquistossomose mansônica, a produção inicial de TNF- α foi descrita como uma importante estimuladora da produção de óxido nítrico e aumento da produção de IL-10 em resposta a uma fração do antígeno solúvel de vermes adultos de *S. mansoni*, sugerindo um efeito protetor (Oliveira *et al.*, 1998; 1999). Além disso, alguns autores mostraram que o balanço entre TNF- α /IL-10 pode ser essencial na modulação do granuloma (Silva-Teixeira *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Zouain *et al.*, 2001; 2002). Em outros dados anteriormente publicados, foi revelado que linfócitos T CD4⁺ de indivíduos normais endêmicos produzem tanto TNF- α , quanto IFN- γ , após estímulo com Sm14, uma proteína recombinante do *S. mansoni* (Brito *et al.*, 2000). Neste sentido, os altos níveis apenas de TNF- α , no plasma de indivíduos NEG, sugerem que esta citocina seja um dos mecanismos envolvidos no combate à infecção, eliminando os vermes adultos e impedindo que o ciclo de vida se complete.

5.3 - Avaliação das citocinas no sobrenadante de culturas de PBMC

A análise comparativa entre a produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas controle e na presença do SEA revelou um aumento na produção das citocinas IL-5 e IL-10 nas culturas de células dos pacientes XTO após o estímulo com SEA (Figura 7). De acordo com nossos resultados, trabalhos anteriores demonstraram que a IL-10 estaria relacionada à modulação da resposta ao SEA (King *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a). Estes autores observaram que o bloqueio da IL-10, presente no sobrenadante das culturas de células de pacientes cronicamente infectados, na presença de SEA, induzia o aumento da reatividade celular a este antígeno. Por outro lado, a adição de IL-10 recombinante, diminuía significativamente a capacidade proliferativa destas células (Malaquias *et al.*, 1997; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a). Em outro estudo, foi comprovada a participação da IL-10 na supressão do granuloma, *in vitro* (Falcão *et al.*, 1998). De fato, vários trabalhos relataram a elevação dos níveis de IL-10 em sobrenadantes de culturas de células de indivíduos portadores da infecção crônica, na presença de SEA (Montenegro *et al.*, 1999; Almeida & Goes, 2000; Silveira *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2004; Hesse *et al.*, 2004). Assim como em nosso trabalho, a elevada secreção, tanto de IL-5 quanto a de IL-10, foi relacionada à reatividade celular, aos antígenos de *S. mansoni*, de pacientes portadores de infecção crônica (Araújo *et al.*, 1996).

Não observamos diferença nas citocinas IL-5 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas controle e estimulada com SEA de pacientes mono- e co-infectados (Figuras 17B-C). No entanto, a produção de IL-2 foi suprimida na presença do antígeno nas culturas de células do grupo CO (Figura 17C * $p < 0,034$). Bentwich e colaboradores demonstraram que PBMC de indivíduos co-infectados produzem reduzidos níveis de IL-2 em resposta a estímulos inespecíficos, mas não dosaram após estímulo por antígenos de *S. mansoni* (Bentwich *et al.*, 1996). De acordo com estes dados, é possível que a presença do *N. americanus* influencie a produção de IL-2 em resposta aos antígenos de ovos de *S. mansoni* e, esta redução pode contribuir para a manutenção da infecção. Vários estudos sugeriram que os ancilostomídeos apresentam algum mecanismo de escape por induzir supressão da resposta imune (Humphries *et al.*, 1997; Loukas & Prociv, 2001; Bethony *et al.*, 2002a; Brooker *et al.*, 2004), revelando picos de prevalência e de intensidade de infecção maiores em indivíduos de meia idade ou mais idosos (Bethony *et al.*, 2002 a; b). Neste contexto, é possível que o decréscimo da secreção de IL-2 em resposta ao SEA, funcione como um destes mecanismos de escape.

Diversos trabalhos mostraram o envolvimento de IFN- γ com a resistência a infecção pelo *S. mansoni* em indivíduos normais endêmicos (Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Viana *et al.*, 1994; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a; Silveira *et al.*, 2004). Não encontramos diferença significativa em relação ao IFN- γ e demais citocinas quando comparamos as culturas controle e estimulada por SEA de indivíduos NEG (Figura 8). Contudo, observamos um aumento dos níveis de TNF- α no sobrenadante de culturas de PBMC de indivíduos NEG quando comparados aos outros grupos (Figura 10B). Este resultado será discutido posteriormente.

Paradoxalmente, observamos que PBMC de indivíduos doadores de sangue, na presença do SEA, apresentaram um aumento significativo da produção de todas as citocinas avaliadas, com exceção da IL-4 (Figura 6). Este resultado sugere que os indivíduos DS, provavelmente, sofreram uma sensibilização prévia a este antígeno ou a outros antígenos com epítomos semelhantes. Contudo, apesar do aumento da secreção das citocinas pelas PBMC dos indivíduos DS, estas não apresentaram um aumento da expressão dos marcadores de ativação (Figura 13) e, também, não progrediram pelo ciclo celular (Tabela 8-D) em resposta ao antígeno. Considerando que, no Brasil, existe uma alta prevalência de helmintoses e que vários trabalhos já demonstraram a presença de reatividade cruzada entre os helmintos (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2002; 2004; Massara *et al.*, 2004; 2006; Fleming *et al.*, 2006), não é difícil imaginar que estes indivíduos tenham entrado em contato com algum destes helmintos. De fato, alguns trabalhos demonstraram que indivíduos não infectados podem apresentar reatividade cruzada, com aumento de secreção de citocinas, contra antígenos de *A. caninum*, *S. mansoni* (Geiger *et al.*, 2002) e *A. lumbricoides* (Geiger *et al.*, 2004). Logo, acreditamos que o aumento da produção das citocinas em resposta ao SEA (Figura 6), pode ser consequência de infecções anteriores por outros helmintos.

5.4 - Avaliação do fenótipo celular em culturas de PBMC

Na literatura, existe uma escassez de dados a respeito da caracterização fenotípica de linfócitos de pacientes portadores de infecção crônica por *S. mansoni*. Martins-Filho e colaboradores (1997) observaram que indivíduos infectados apresentam uma menor porcentagem de células T CD3⁺ do que os não infectados. Estes autores demonstraram, ainda, que menos linfócitos T CD4⁺ estão presentes no sangue periférico dos indivíduos infectados (Martins-Filho *et al.*, 1997). Em outros trabalhos, além do baixo percentual de células T CD3⁺ e T CD4⁺, observou-se aumento de células T CD8⁺ (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000).

Nossos resultados diferem destes achados, uma vez que a frequência de células CD3⁺ foi muito semelhante entre os grupos XTO, DS e NEG, tanto nas culturas não estimuladas (Figura 11A), quanto após o estímulo com SEA (Figura 11D). Entretanto, com relação às sub-populações celulares T CD4⁺ e T CD8⁺, constatamos que os indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG) apresentam uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e maior frequência de linfócitos T CD8⁺ do que os indivíduos DS (Figura 11), corroborando dados da literatura (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Sabe-se que este perfil implica em uma redução da razão CD4⁺/CD8⁺, assim como foi descrito por alguns trabalhos (Colley *et al.*, 1983; Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Em nosso estudo, encontramos uma redução da razão de células CD4⁺/CD8⁺ nos sobrenadantes das culturas controle (Figura 12A) e estimuladas com SEA (Figura 12B) dos indivíduos XTO e NEG em comparação ao grupo DS. Entretanto, esta redução foi significativa apenas entre os grupos NEG e DS. Estes dados sugerem que o contato com os parasitos, em uma região endêmica, pode induzir uma modulação das células T CD4⁺, no entanto, ocorre uma compensação pelas células T CD8⁺, não afetando na frequência de linfócitos totais.

De acordo com alguns trabalhos, a redução de linfócitos T CD4⁺, observada nos indivíduos infectados, é uma consequência do decréscimo de células *naive* e um aumento das células de memória (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Paralelamente a estes eventos, há o aumento da expressão de marcadores de ativação na superfície dos linfócitos T CD4⁺. Estes autores sugerem que, a infecção crônica por helmintos, deva induzir um “estado” de ativação constante e, conseqüentemente, uma modulação da resposta celular (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Este “estado” de ativação já havia sido relatado em pacientes portadores de infecção crônica pelo *S. mansoni*, onde estes pacientes apresentavam mais células

CD3⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺ quando comparados a indivíduos não infectados (Martins-Filho *et al.*, 1997; 1999).

Neste sentido, nós investigamos a ativação celular nos indivíduos DS, XTO e NEG. Os resultados foram obtidos pela razão das culturas estimuladas com SEA pelas culturas sem estímulo (Figura 13). Foram avaliadas as moléculas CD69, CD25 e HLA-DR, aparentemente responsáveis pela ativação celular inicial, intermediária e tardia, respectivamente (Caruso *et al.*, 1997). Analisamos, também, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, negativos para a molécula CD28, caracterizando-os como células ativadas, uma vez que este receptor é internalizado após a ligação com CD80 e CD86 das células apresentadoras de antígeno (Garcia *et al.*, 1999; Arosa, 2002).

A análise dos nossos resultados revelou uma frequência maior de células CD4⁺CD69⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD28⁻, além de CD8⁺CD25⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺ nas culturas de PBMC de indivíduos NEG em comparação às culturas dos DS e pacientes XTO (Figura 13). Estes dados revelam que somente as células dos indivíduos NEG apresentaram-se em “estado” ativado na presença do SEA e ainda que, os linfócitos T dos pacientes XTO se comportam de maneira semelhante aos linfócitos de indivíduos DS (Figura 13). Este perfil nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos NEG pode ser resultado de uma constante estimulação pelos antígenos do *S. mansoni*, presentes na área endêmica. Porém, as células dos pacientes XTO também são estimuladas continuamente, mas não se tornaram ativadas, demonstrando que mecanismos diferentes são empregados na resposta ao SEA nas células de indivíduos XTO e NEG.

Nossos resultados divergem dos descritos na literatura (Martins-Filho *et al.*, 1997; Kalinkovich *et al.*, 1998; Martins-Filho *et al.*, 1999; Borkow *et al.*, 2000), mas apesar das razões para estas divergências não serem claras, é possível levantarmos algumas hipóteses. Primeiro, em nosso trabalho, os pacientes XTO são portadores de uma (*S. mansoni*) ou duas infecções (*S. mansoni* e *N. americanus*) helmínticas. No entanto, nos demais trabalhos, os indivíduos avaliados apresentam-se co-infectados por mais helmintos (Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000) ou mesmo, não foram investigados com relação à presença de co-infecção (Martins-Filho *et al.*, 1997; 1999). Segundo, existem diferenças nos tempos de avaliação da expressão dos marcadores de ativação.

Além disso, existe mais uma grande diferença entre nosso trabalho e os demais. As células dos indivíduos NEG, que se apresentaram ativadas na presença do SEA (Figura 13), proliferaram em resposta ao antígeno (Tabela 8-D), contrariando a hipótese dos autores que

sugerem que um “estado” de ativação constante promove a supressão da capacidade proliferativa e induz a anergia celular (Borkow *et al.*, 2000).

O papel da molécula CD28 expressa na superfície, está relacionado ao segundo sinal envolvido na proliferação celular, funcionando como uma molécula co-estimuladora (Acuto & Michel, 2003). Em infecções crônicas helmínticas, tem sido relatada uma redução da frequência de células CD8⁺CD28⁺ em indivíduos infectados (Bentwich, 1996; Kalinkovich *et al.*, 1998; Borkow *et al.*, 2000). Curiosamente, quando analisamos a frequência de células T CD8, positivas para CD28, não encontramos diferenças entre os grupos DS, XTO e NEG.

Ao comparamos as culturas de PBMC de pacientes MONO e CO em resposta ao SEA, nossos resultados mostraram que a presença da infecção pelo *N. americanus* não induziu diferenças na frequência de linfócitos T CD3⁺ e suas sub-populações T CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 18). Kalinkovich e colaboradores (1998) também não observaram diferenças nas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ CD8⁺. Entretanto, estes autores demonstraram que pacientes co-infectados apresentam um maior percentual de células CD3⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺HLA-DR⁺ do que os pacientes mono-infectados, diferentemente, do que nossos dados revelaram (Figura 20).

Na esquistossomose murina, foi demonstrado que a células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH} tem um papel importante como produtora de IL-10 (McKee & Pearce, 2004; Hesse *et al.*, 2004). E ainda, que estas células Treg contribuem para polarização da resposta para Tipo2 por meio da supressão da resposta do tipo 1 (Baumgart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). Este tipo celular é caracterizado por células CD4⁺CD25^{HIGH} que apresentam expressão diferencial de CTLA-4, GITR e CD103 (Takahashi *et al.*, 2000; McHugh *et al.*, 2002; Birebent *et al.*, 2004; Dieckmann *et al.*, 2001; 2005), além de expressarem o fator de transcrição Foxp3 (Hori *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2005).

Em nosso trabalho, investigamos a influência do SEA na frequência das células CD4⁺CD25^{HIGH}. Esta análise foi realizada através da razão das culturas estimuladas com SEA pelas culturas sem estímulo. Os resultados mostraram que o SEA induziu um aumento da frequência das células CD4⁺CD25^{HIGH} em cultura de PBMC de pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni* (XTO) (Figura 14C). Encontramos, ainda, uma correlação positiva entre esta sub-população celular e a secreção de IL-10 neste grupo de pacientes ($r = 0,7079$; $p = 0,0148^*$). Como descrito anteriormente, há evidências de que a IL-10 esteja relacionada à modulação da resposta imune durante a esquistossomose, já que ela foi associada ao controle da morbidade (Araújo *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 1999; Joseph *et al.*,

2004; Silveira *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2007). Nossos resultados reforçam a hipótese do envolvimento das células CD4⁺CD25^{HIGH} observado na modulação da infecção experimental pelo *S. mansoni*. E ainda sugerem que estas células desempenhariam um papel importante como produtoras de IL-10, também na esquistossomose humana crônica, uma vez que elas se encontram elevadas nas culturas de pacientes XTO.

Quando analisamos a contribuição da infecção pelo *N. americanus* na frequência de células CD4⁺CD25^{HIGH} em resposta ao SEA, observamos que não há diferença significativa quando comparamos os grupos MONO e CO (Figura 21C). Contudo, identificamos uma correlação positiva entre esta sub-população celular e a secreção de IL-10 nas culturas de células de pacientes portadores de co-infecção (Tabela 10). Estes dados sugerem que a presença da infecção por *N. americanus* pode influenciar na secreção de IL-10 pelas células T reguladoras, embora quando comparamos a secreção desta citocina entre estes grupos MONO e CO, não encontramos diferenças significativas.

5.5 - Avaliação da progressão do ciclo celular e proliferação de células T de indivíduos DS, XTO e NEG

A incorporação por timidina marcada com trítio (H³-Td) foi a primeira determinação mais acurada da proliferação celular. Supôs que as células, durante a duplicação/replicação do conteúdo genômico (fase S, de síntese de DNA) incorporariam H³-Td. Entretanto, as células que são bloqueadas no início da fase S, não incorporam a timidina, uma vez que esta só é inserida durante a abertura das duas fitas de DNA, durante o processo de replicação. Logo, esta metodologia apresenta uma grande desvantagem, que é a avaliação apenas do conteúdo de DNA duplicado.

Para determinar a cinética do ciclo celular, é necessária uma quantificação rigorosa das fases do ciclo, bem como da taxa de DNA duplicado. Com o aparecimento da citometria de fluxo, a quantificação destas duas variáveis, tornou-se mais precisa.

O BrdU (5-Bromo-2-deoxiUridina) passou a ser amplamente empregado, permitindo a combinação de anticorpos específicos contra diferentes moléculas de superfície e/ou intracitoplasmáticas. O marcador 7-AAD (7- amino-actinomicina-D), em combinação com o

BrdU, permite avaliar as fases do ciclo celular, uma vez que o 7-AAD marca o conteúdo total de DNA.

Desta forma, por meio de citometria de fluxo é possível avaliar concomitantemente as sub-populações celulares nas diferentes fases do ciclo (G_0/G_1 , S e G_2/M), assim como seus produtos metabólicos (Shenker & Datar 1995; Gothot *et al.*, 1997; Mehta & Maino 1997; Schmid *et al.*, 2000; Reome *et al.*, 2000; Hay *et al.*, 2001; Rosato *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Gerhard *et al.*, 2005; Sieg *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007).

Neste estudo, utilizamos o BrdU e o 7-AAD para avaliar a cinética do ciclo celular e a proliferação celular de linfócitos T $CD3^+$ em resposta ao antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni*.

Em resposta ao estímulo inespecífico, anti-CD3/CD28, nossos resultados mostraram que as células T $CD3^+$, dos grupos DS, XTO e NEG, progrediram através das fases do ciclo celular (Tabelas 5-7), confirmando a capacidade proliferativa destas células nos três grupos investigados. Estes dados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostram que estímulos inespecíficos induzem a saída dos linfócitos T das fases G_0/G_1 e a entrada em fase de duplicação de DNA (fase S) na presença de anti-CD3/CD28 (Schmid *et al.*, 2000; Shenker *et al.*, 2001; Lea *et al.*, 2003), de SEB (superantígeno enterotoxina estafilocócica B) (Perrin *et al.*, 1999) e de PHA-P (phitohemaglutinina-P) (Shenker & Datar 1995; Shenker *et al.*, 2000; 2001; Lee *et al.*, 2004).

Quando comparamos a progressão do ciclo celular dos linfócitos T $CD3^+$ entre os grupos em resposta a este estímulo inespecífico, observamos, um aumento na frequência de células na fase S nos grupos XTO e NEG em relação aos indivíduos DS (Tabela 8-B). E, curiosamente, notamos que estes mesmos grupos de pacientes (XTO e NEG) apresentavam um percentual significativamente menor de células T nas fases G_2/M , quando comparado ao grupo DS (Tabela 8-B). Estes dados sugerem que, após o estímulo por anti-CD3/CD28, as células dos indivíduos XTO e NEG foram bloqueadas na fase S, impedindo a progressão do ciclo celular desta fase para G_2/M . Porém o mecanismo que impediu esta progressão não está esclarecido.

Alguns trabalhos relatam bloqueios do ciclo celular de linfócitos de indivíduos portadores de infecções bacterianas, em resposta a estímulos inespecíficos, no entanto nenhum deles demonstrou o bloqueio da progressão da fase S para G_2/M (Shenker *et al.*, 2000; 2001). Apesar de não investigarmos os mecanismos envolvidos neste bloqueio em resposta ao anti-CD3/CD28, podemos sugerir que ele possa estar relacionado ao aumento da expressão de ciclina A (responsável pela progressão na fase S), assim como, a hiperativação do complexo ciclina

A/cdk2. Appleman e colaboradores (2002) demonstraram que há um aumento da expressão desta ciclina, em resposta ao estímulo com anticorpos monoclonais anti-CD3/CD28, no entanto, a hiperativação do complexo ciclina A/cdk2 está diretamente relacionada à morte celular por apoptose em células cardíacas saudáveis (Adachi *et al.*, 2001). Células T dos indivíduos residentes em área endêmica (XTO e NEG) já apresentavam uma alta capacidade de progredir pelo ciclo celular mesmo sem estímulo (Tabelas 8-A e C). Este resultado é reforçado pela maior frequência de células $CD3^+CyD_{1,2,3}^+$ observado em culturas não estimuladas destes indivíduos (Figura 16A). Isso nos leva a pensar que os linfócitos T destes indivíduos, também expressem níveis elevados de ciclina A e, além disso, podem apresentar uma maior ativação do complexo ciclina A/cdk2. Portanto, quando as PBMC dos indivíduos, XTO e NEG, foram estimuladas com anti-CD3/CD28, possivelmente, ocorreu uma super-expressão do complexo ciclina A/cdk2, levando à morte por apoptose. Nossa hipótese é corroborada pelo aumento significativo da frequência de células sub G_0/G_1 nestes grupos, quando comparada à frequência observada na cultura de indivíduos DS (Tabelas 8-B). Concluindo, nossos resultados sugerem que a presença de anti-CD3/CD28 induz a progressão do ciclo celular contínua das células T dos indivíduos DS, porém, promovem o bloqueio na fase S das células T dos indivíduos XTO e NEG e que, impedidas de progredirem da fase S para G_2/M , iniciam o processo de apoptose.

A observação que células T $CD3^+$ dos indivíduos de área endêmica estavam em processo de divisão celular mesmo em cultura controle (não estimulada), baseou-se no fato destes apresentarem uma menor frequência de células nas fases G_0/G_1 do que os indivíduos DS (Tabelas 8-A e C). Acreditamos que os linfócitos T dos grupos XTO e NEG apresentem uma maior capacidade de proliferarem devido ao freqüente estímulo por contato com os parasitos, seja através de águas infestadas por cercárias ou mesmo de larvas ou ovos dos parasitos. Reforçando esta observação, nossos resultados mostraram que as células dos indivíduos XTO e NEG secretaram mais IL-2 do que as células dos indivíduos DS nas culturas não estimuladas, embora, este aumento tenha sido significativo apenas entre XTO e DS (Figura 9A). Crabtree e colaboradores (1989) mostraram que respostas proliferativas maiores estão diretamente relacionadas ao aumento da expressão do gene que codifica IL-2, assim como ao aumento do receptor para IL-2. Logo, esta citocina tem sido descrita como um fator de crescimento ou como uma molécula sinalizadora de proliferação celular, devido a sua capacidade em inativar a proteína p27, responsável pela inibição da fosforilação da proteína retinoblastoma (Nourse *et al.*, 1994).

De fato, Kaestel e colaboradores (2005) descreveram que a supressão da proliferação de linfócitos está diretamente associada ao decréscimo da produção de IL-2.

Concomitante ao aumento de IL-2, uma redução dos níveis de IFN- γ foi observada no sobrenadante das culturas de células de indivíduos XTO e NEG quando comparadas às culturas dos indivíduos DS, entretanto, esta redução foi significativa apenas entre XTO e DS (Figura 9C). O IFN- γ foi relacionado à modulação da capacidade proliferativa de macrófagos, atuando diretamente no aumento da expressão da proteína p21, um inibidor da progressão da fase G₁ para S (Xaus *et al.*, 1999). Também já foi descrito que a adição de IFN- γ induz a modulação da expressão da ciclina D, assim como a redução da atividade dos complexos ciclina D-cdk4 e ciclina D-cdk6 em células de linfoma humano (Kumar & Atlad, 1992). Em conjunto, estes trabalhos sugerem que o aumento desta citocina está relacionado à inibição da proliferação celular.

Em resumo, as PBMC em culturas não estimuladas dos indivíduos XTO e NEG, secretaram mais IL-2 e menos IFN- γ quando comparadas às dos indivíduos DS (Figura 9) e, também, apresentaram uma maior frequência de células CD3⁺CyD_{1,2,3}⁺ (Figura 16A). Desta forma, estes resultados sugerem que a exposição frequente a antígenos do *S. mansoni* ou de outros parasitos em áreas endêmicas, pode promover um microambiente rico em IL-2 e escasso em IFN- γ , que contribuiria para a progressão pelo ciclo celular e, conseqüentemente proliferação de células T (Tabelas 8-A e C).

Com relação à reatividade celular aos antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (SEA), nossos dados mostraram uma redução significativa na frequência de células nas fases G₀/G₁ nos grupos XTO e NEG em comparação ao grupo DS (Tabela 8-D). No entanto, percentuais significativamente menores de células T, nas fases S e G₂/M, foram observadas no grupo de pacientes XTO quando comparado ao grupo NEG (Tabela 8-D), sugerindo uma modulação desta resposta, como descrita anteriormente por ensaios de incorporação de timidina tritiada (Nash *et al.*, 1982; Gazzinelli *et al.*, 1985; 1987; Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1993; Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998a; 2002; Joseph *et al.*, 2004; Talaat *et al.*, 2007). Alguns trabalhos mostraram que indivíduos normais endêmicos apresentam alta reatividade celular aos antígenos do *S. mansoni* (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1989; Viana *et al.*, 1994; Brito *et al.*, 2000). Paralelamente, nossas análises demonstraram uma frequência maior de células CD3⁺CiclinaD_{1,2,3}⁺ nas culturas estimuladas por SEA dos indivíduos NEG em comparação aos grupos DS e XTO (Figura 16B). De fato, na presença do antígeno, menos células CD3⁺CiclinaD_{1,2,3}⁺ foram identificadas nas

culturas de pacientes XTO em comparação a cultura não estimulada (Figura 16 * $p=0,034$). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a modulação, induzida pelo antígeno SEA nos pacientes XTO, pode ser um reflexo da redução da ciclina D nas células T (Figura 16), promovendo o bloqueio destas células nas fases G_0/G_1 do ciclo celular (Tabela 8-D), sendo que o mesmo, não ocorre nas células T dos indivíduos não infectados residentes em área endêmica.

Diferente dos indivíduos não infectados de área endêmica, os indivíduos DS apresentaram células T $CD3^+$ que não apresentaram marcadores de ativação e foram incapazes de progredir através do ciclo celular em resposta ao estímulo antigênico (Tabela 5), resultando em uma ausência de proliferação celular. Entretanto, nossos resultados sugerem que este fenômeno seja devido a mecanismos diferentes daqueles observados nas células dos pacientes XTO.

Estudos independentes mostraram que as citocinas $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ podem controlar a proliferação celular, por induzir respectivamente a expressão p21, inibidor da progressão de G_1 para S (Xaus *et al.*, 1999) e a expressão da ciclina D (Kumar & Atlad, 1992; Khanna 2005). Em resposta ao SEA, a menor secreção de $IFN-\gamma$ pelas células dos pacientes XTO foi mantida quando comparada aos indivíduos DS (Figura 10C). Além da baixa concentração de $IFN-\gamma$, nossos resultados mostraram também que, a produção de $TNF-\alpha$ foi inferior no grupo de pacientes XTO em relação aos indivíduos NEG (Figura 10B).

Considerando os reduzidos níveis de $IFN-\gamma$ nas culturas de XTO, era possível que as células T proliferassem mais, uma vez que a expressão do inibidor p21 não fosse estimulada (Xaus *et al.*, 1999). Entretanto, as células foram bloqueadas em G_0/G_1 , por meio da inibição da ciclina $D_{1,2,3}$, sugerindo que outros mecanismos estejam envolvidos na supressão da resposta ao SEA, entre eles a redução da secreção de $TNF-\alpha$ e uma provável participação da IL-10, secretada pelas células Treg.

Khanna e colaboradores (2005) correlacionaram o aumento da expressão de mRNA de $TNF-\alpha$ a uma maior expressão da ciclina D em linfócitos. Embora, não encontramos correlações significativas entre a dosagem de citocinas nos sobrenadantes de culturas e a frequência de células T que expressam ciclina $D_{1,2,3}$, nossos dados sugerem que a baixa expressão de ciclina D (Figura 16), pode ser consequência da redução de $TNF-\alpha$ (Figura 10 B). Estes dados são confirmados, uma vez que os linfócitos T de indivíduos NEG foram capazes de proliferar em resposta ao SEA (Tabela 8-D), onde altos níveis de esta citocina e uma maior frequência de células $CD3^+CiclinaD_{1,2,3}^+$ foram observados. Portanto, acreditamos que a redução de $TNF-\alpha$

deve ser um dos mecanismos imunomodulatórios encontrados nos pacientes portadores de infecção crônica pelo *S. mansoni*.

Denys e colaboradores (2002) mostraram que a secreção de TNF- α pode ser inibida pela citocina reguladora IL-10, por inibição da expressão do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela síntese de TNF- α . De fato, a IL-10 apresenta um efeito imunossupressor muito bem documentado em diferentes sistemas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Taga & Tosato, 1992; Mosmann, 1994). A ação da IL-10 na progressão do ciclo celular de linfócitos T CD4⁺ foi avaliada em resposta ao superantígeno enterotoxina estafilocócica B (SEB) (Perrin *et al.*, 1999). Os autores mostraram que a IL-10 bloqueia as células nas fases G₀/G₁ por inibição da expressão das ciclina D e, por prevenir a modulação da p27 (Perrin *et al.*, 1999). Apesar de não encontrarmos diferença na produção de IL-10 quando comparamos os grupos DS, XTO e NEG (Figura 10F), nós mostramos que houve uma maior secreção desta citocina, quando comparados os sobrenadantes de culturas de pacientes XTO na presença e na ausência do antígeno SEA (Figura 7F). Este evento sugere que a IL-10 possa estar relacionada ao bloqueio das células dos pacientes XTO nas fases G₀/G₁ do ciclo celular (Tabela 8-D). Em resumo, a redução da produção de TNF- α (Figura 10) e o decréscimo da frequência de células CD3⁺CyD_{1,2,3}⁺ (Figura 16B), após o estímulo antigênico, podem ser reflexo de uma provável participação da IL-10, como um dos mecanismos envolvidos na modulação da reatividade celular. Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer melhor este papel.

A análise comparativa entre cultura estimulada e controle também revelou o aumento de IL-5 no sobrenadante de PBMC de pacientes XTO (Figura 7E). Na literatura, ainda não existem indícios da ação da IL-5 na progressão do ciclo celular de linfócitos T. No entanto, esta citocina é capaz de induzir a entrada de células B na fase S do ciclo em resposta ao LPS (Wetzel, 1991). Nós investigamos a frequência de linfócitos B, dos indivíduos XTO e NEG, após cinco dias de cultivo com e sem estímulo por SEA. As análises mostraram um aumento significativo desta subpopulação nas culturas estimuladas por SEA no grupo de pacientes XTO (sem estímulo: 6,69% \pm 1,8; na presença de SEA: 8,71% \pm 2,0). Por outro lado, o estímulo antigênico não induziu aumento dos linfócitos B nas culturas de indivíduos NEG (sem estímulo: 9,28% \pm 2,2; na presença de SEA: 8,79% \pm 3,1). As células B já foram associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune Tipo2 contra o *S. mansoni* (Hernandez *et al.*, 1997), assim como à modulação do granuloma em camundongos (Ferru *et al.*, 1998). Logo, estes dados sugerem que o aumento da produção de IL-5, nos sobrenadantes de culturas celulares de pacientes XTO, possa estar

relacionado a uma maior proliferação de linfócitos B, já que os linfócitos T foram bloqueados em G_0/G_1 e impedidos de proliferarem.

Outro mecanismo que nossos resultados sugerem participar da imunorregulação nos pacientes XTO é a presença de células Treg, já que nós observamos uma maior contribuição das células $CD4^+CD25^{HIGH}$ (Figura 14C) nas culturas de pacientes XTO, assim como uma correlação positiva entre a frequência destas células e a secreção de IL-10 (Figura 7F) em resposta ao estímulo antigênico. Alguns trabalhos mostraram que a supressão da capacidade proliferativa em esquistossomose (Flores-Villanueva *et al.*, 1994b) e em outras helmintíases (Osborne & Devaney, 1999; Allen & Loke, 2001) pode ser devido à ação da IL-10 secretada por células dendríticas, entretanto, nós não investigamos a participação destas células. No presente trabalho, nós hipotetizamos que as células T $CD3^+$ de pacientes XTO possivelmente foram bloqueadas nas fases G_0/G_1 do ciclo celular, caracterizando a modulação da resposta ao SEA, devido à participação de células Treg que secretam IL-10.

Alguns trabalhos demonstraram que as células Treg estão diretamente envolvidas com a anergia celular, devido a inibição da produção de IL-2 e da expressão das ciclinas D e E, marcadoras da progressão para a fase de replicação do DNA (Boussiotis *et al.*, 1997; Duthoit *et al.*, 2005). Em esquistossomose, a modulação da capacidade proliferativa de células de pacientes portadores de infecção crônica em resposta ao SEA, foi relacionada tanto à anergia (Stadecker, 1994) quanto à morte celular por apoptose (Carneiro-Santos *et al.*, 2000; Rutitzky *et al.*, 2003). Na anergia e na quiescência, as células permanecem na fase G_0 , entretanto são estados bastante distintos. Na quiescência as células podem tornar-se ativadas em resposta a estímulos (Yusuf & Fruman, 2003) e, se impedidas de progredirem através do ciclo, morrem por apoptose. Já as células anérgicas, por não serem ativadas e não *entrarem* no ciclo celular, também não sofrem apoptose (Sun *et al.*, 2003).

Como neste estudo, nós mostramos que os linfócitos T dos pacientes portadores de infecção crônica (XTO) não se tornam ativados (Figura 13), este é um indício da anergia destas células em resposta ao SEA. Os resultados da Tabela 6 também mostram, claramente, que o estímulo antigênico não induz o aumento de células T sub G_0/G_1 na cultura de células mononucleares dos pacientes XTO. Em adição, nossas análises demonstraram uma correlação inversa ($r = -0,6332$; $p = 0,0365^*$) entre a frequência de células T $CD3^+$ apoptóticas e a de células em G_0/G_1 nestas culturas, demonstrando que quanto mais células T permanecem em anergia, menos entram em apoptose.

Diversos autores mostraram que a morte celular por apoptose está diretamente relacionada à secreção da citocina IFN- γ (Sangfelt *et al.*, 1997; Otsuki *et al.*, 1998; Chawla-Sarkar *et al.*, 2003; Rutitzky *et al.*, 2003), cuja ação principal envolve o bloqueio da progressão das fases G₀/G₁ para a fase S, por modulação da ciclina D (Tienfenbrun *et al.*, 1996; Subramaniam *et al.*, 1998). Como citado anteriormente, nossas análises mostraram que no sobrenadante de cultura de pacientes XTO, houve uma redução da produção de IFN- γ quando comparado ao grupo DS (Figura 10C). Logo, nossos dados sugerem que a modulação da reatividade celular, nos pacientes XTO, não deve ser acompanhada pela apoptose das células T. Estes resultados reforçam nossa hipótese de que os linfócitos T destes pacientes permanecem em anergia em resposta ao SEA, apesar de serem capazes de proliferar em na presença de outros estímulos, como o anti-CD3/CD28 (Tabela 6-A).

As avaliações da progressão do ciclo celular e da proliferação de células T mostraram que não há diferenças significativas quando comparadas culturas controle e estimulada por SEA nos grupos MONO (Tabela 11-B) e CO (Tabela 12-B). No entanto, o estímulo antigênico induziu uma redução, estatisticamente significativa da frequência de células CD3⁺ciclina D_{1,2,3}⁺ no grupo de pacientes MONO (Figura 22). Estes resultados confirmam o bloqueio observado em G₀/G₁ das células dos pacientes XTO e sugerem que a infecção por *N. americanus* parece não influenciar na progressão das células T CD3⁺ do ciclo celular (Tabela 13-D), mas parece envolver outros mecanismos, não relacionados à expressão de ciclina D.

Conclusões

Em resumo, nossos resultados sugerem que as células T CD3⁺ de pacientes portadores de infecção por *S. mansoni* (**XTO**) são incapazes de proliferar em resposta ao SEA, por um bloqueio nas fases G₀/G₁ do ciclo celular, sendo que este, possivelmente ocorre devido à modulação da expressão de ciclina D_{1,2,3}. Acreditamos que o microambiente que promove a modulação desta ciclina e o conseqüente bloqueio em G₀/G₁, pode ser dependente das células Treg, que produzem IL-10 em resposta ao SEA. Os linfócitos T, não expressaram marcadores de ativação e, impedidos de progredirem pelo ciclo, mantem-se em anergia, caracterizando a imunossupressão observada em culturas celulares destes pacientes. Porém, outros mecanismos devem ser investigados, entre eles, o processamento de antígenos e apresentação, vias de transdução de sinal e as próprias células Treg, com uma melhor caracterização dos marcadores CTLA-4, Foxp3 e GITR.

Tanto as células de pacientes mono-infectados, quanto às células de co-infectados não foram ativadas na presença do SEA e, permaneceram em anergia. Embora, nas células dos pacientes **MONO**, esta anergia possa ser uma conseqüência da modulação da expressão de ciclina D_{1,2,3}, nas células de pacientes **CO**, não encontramos resposta para a anergia relacionada à expressão desta ciclina. Por outro lado, os resultados mostraram que o perfil anérgico nestes pacientes, parece estar relacionado à redução de IL-2 e a um provável envolvimento das Treg, por meio da secreção de IL-10.

Estes resultados sugerem que a infecção por *N. americanus* parece não influenciar na modulação da resposta ao SEA. Entretanto, deve envolver outros mecanismos que não afetam a expressão de ciclina D nos pacientes co-infectados. Desta forma, são necessários novos experimentos para esclarecer o mecanismo que induz a supressão da ciclina D_{1,2,3} nas células T nos pacientes **MONO** e os envolvidos no ciclo celular das células dos pacientes **CO**.

A reatividade celular, observada nas culturas de indivíduos **NEG** pode ser devido a um aumento dos marcadores de ativação, bem como a um microambiente rico em TNF- α , que contribui para a eliminação dos vermes adultos, através da indução da produção de óxido nítrico (Oliveira *et al.*, 1998; 1999) e, também promove a progressão pelo ciclo das células T, por aumento da expressão de ciclina D_{1,2,3}. Entretanto, é importante ressaltar que outros componentes também podem participar dos mecanismos de resistência à infecção.

6. Referências Bibliográficas

Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 939- 951.

Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, Ono Y, Nozato T, Abe S, Ikeda MA, Marumo F, Hiroe M. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res* 2001; 88: 408-14.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499–511.

Allen JE, Loke P. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol.* 2001; 23: 345-352.

Almeida CA, Goes AM. Human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Schistosoma mansoni* antigens: association between protein tyrosine kinases, mitogen-activated protein kinases and cytokine production. *Parasitol Int.* 2000; 48: 255-264.

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadick M, Rector E, Ritter D, McKerrow JH. Tumour-necrosis factor- α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 1992; 356: 604–607.

Andrade ZA, Warren KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1964; 58: 53-57.

Appleman LJ, van Puijenbroek A, Kirstin M. Shu KM, Nadler LM, Boussiotis VA. CD28 Costimulation Mediates Down-Regulation of p27 $kip1$ and Cell Cycle Progression by Activation of the PI3K/PKB Signaling Pathway in Primary Human T Cells. *The Journal of Immunology* 2002, 168: 2729–2736.

Araújo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 1399-1403.

Arosa FA. CD8⁺CD28⁻ T cells: certainties of a prevalent human T cell subset. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 1–13

Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, Grecis RK. Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J Exp Med*. 1999; 190: 953-962.

Ashford RW, Craig PS, Oppenheimer SJ. Polyparasitism on the Kenya coast. 1. Prevalence, and association between parasitic infections. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992; 86: 671-679.

Bahia-Oliveira LMG, Gazzinelli G, Eloi-Santos SM, Cunha-Melo JR, Alves-Oliveira LF, Silveira AMS, Viana IRC, Carmo J, Souza A, Corrêa-Oliveira R. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Tran R Soc Med Hyg*. 1992; 86: 57-61.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PM, Sampaio IB. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978; 20: 121-132.

Barral-Netto M, Hofstetter M, Gustavo dos Santos J, Cheever AW, Ottesen EA. *Schistosoma mekongi* infection in man: cellular immune responses and modulating mechanisms. *Clin Exp Immunol*. 1982; 47: 65-73.

Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally Occurring CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells Are an Essential, IL-10-Independent Part of the Immunoregulatory Network in *Schistosoma mansoni* Egg-Induced Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2006; 176: 5374–5387.

Beasley M, Brooke, S, Ndinaromtan M, Madjiouroum EM, Baboguel M, Djenguinabe E, Bundy DA. First nationwide survey of the health of schoolchildren in Chad. *Trop. Med. Int. Health*. 2002; 7: 625–630.

Bentwich Z, Weisman Z, Moroz C, Bar-Yehuda S, Kalinkovich A. Immune dysregulation in Ethiopian immigrants in Israel: relevance to helminth infections? *Clin Exp Immunol.* 1996; 103: 239-243.

Bentwich Z. Good worms or bad worms: do worm infections affect the epidemiological patterns of other diseases. *Parasitol Today* 2000; 16: 312-312.

Bethony J, Silveira AMS, Alves-Oliveira LF, Thankur A, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R, Lo Verde PT. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic area in Brazil. *J Infect Dis.* 1999; 173: 1665-1673.

Bethony J, Chen JZ, Lis SX, Xing FY, Foster V, Hawdon JM, Hotez PJ. Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, People's Republic of China. *Clin Infect Dis.* 2002a; 35: 1336-1344.

Bethony J, Williams JT, Blangero J, Kloos H, Gazzinelli A, Soares-Filho B, Coelho L, Alves-Fraga L, Williams-Blangero S, Lo Verde PT, Côrrea-Oliveira R. Additive host genetic factors influence fecal egg excretion rates during *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2002b; 67: 336-343.

Bethony J, Williams JT, Brooker S, Gazzinelli A, Gazzinelli MF, Lo Verde PT, Corrêa-Oliveira R, Kloos H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. Part III: household aggregation of water-contact behaviour. *Trop Med Inter Health.* 2004; 9: 381-389.

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 2006; 367: 1521-1532.

Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, Beauplet A, Robillard N, Semana G. Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3485- 3496.

Bogliolo L. *Schistosomiasis mansoni*. Patologia. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1959; 9: 359-424.

Boia MN, Carvalho-Costa FA, Sodre FC, Eyer-Silva WA, Lamas CC, Lyra MR, Pinto VL JR, Cantalice Filho JP, Oliveira AL, Carvalho LM, Gross JB, Sousa AL, Moraes TI, Bermudez-Aza EH, Martins EB, Coura JR. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48: 189-195.

Booth M, Bundy DA, Albonico M, Chwaya HM, Alawi KS, Savioli L. Associations among multiple geohelminth species infections in schoolchildren from Pemba Island. *Parasitology*. 1998; 116: 85-93.

Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, Kazibwe F, Kemijumbi J, Kariuki C, Kimani G, Ouma JH, Kabatereine NB, Vennervald BJ, Dunne DW. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol*. 2004; 172: 1295–1303.

Borkow G, Leng Q, Weisman Z, Stein M, Galai N, Kalinkovich A, Bentwich Z.. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1053-1060.

Borkow G, Weisman Z, Leng Q, Stein M, Kalinkovich A, Wolday D and Bentwich Z. Helminths, human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 568-571.

Boros DL, Pelley RP, Warren KS. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *J Immunol*. 1975; 114: 1437-1441.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 1997; 278: 124-128.

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. CD4+ T Cells of Schistosomiasis Naturally Resistant Individuals Living in an Endemic Area Produce Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α in Response to The Recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein. *Scand. J. Immunol.* 2000; 51: 595-601.

Brito LL, Barreto ML, Silva Rde C, Assis AM, Reis MG, Parraga IM, Blanton RE. Moderate- and low-intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75: 939-944.

Brooker S, Miguel E, Moulin S, Luoba A, Bundy D, Kremer M. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among schoolchildren in Busia District, Kenya. *East African Medical Journal.* 2000; 77: 157-161.

Brooker S, Bethony J, Hotez PJ. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol.* 2004; 58: 197-288.

Brooker S, Jardim-Botelho A, Quinnell RJ, Geiger SM, Caldas IR, Fleming F, Hotez PJ, Correa-Oliveira R, Rodrigues LC, Bethony JM. Age-related changes in hookworm infection, anaemia and iron deficiency in an area of high *Necator americanus* hookworm transmission in south-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101: 146-154.

Buck AA, Anderson RI, MacRae AA. Epidemiology of poly-parasitism. II. Types of combinations, relative frequency and associations of multiple infections. *Tropenmed Parasitol.* 1978; 29: 137-144.

Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH,. Immunity after treatment of human schistosomiasis

mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 393-408.

Carneiro-Santos P, Martins-Filho O, Alves-Oliveira LF, Silveira AM, Coura-Filho P, Viana IR, Wilson RA, Corrêa-Oliveira R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human Schistosomiasis mansoni, *Parasite Immunol.* 2000; 22: 267-277.

Caruso A, Licenziati S, Canaris AD, de Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A and Turano A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997; 27: 71-76.

Cebrián M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med.* 1988; 168: 1621-1637.

Cervi L, MacDonald AS, Kane C, Dzierszynski F, Pearce EJ. Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J Immunol.* 2004; 172: 2016-2020.

Chamone M, Marques CA, Atuncar GS, Pereira AL, Pereira LH. Are there interactions between schistosomes and intestinal nematodes? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84: 557-558.

Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections – Fifty years on. *Parasitology Today* 1997; 109: 373-387.

Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003; 8: 237-249.

Cheever AW, Poindexte, RW, Wynn TA. Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with or without recombinant tumor-necrosis factor- α treatment. *Infect. Immun.* 1999; 67: 2201–2208.

Chellappan SP, Hielbert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E₂F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991; 65: 1053-1061.

Chensue SW, Warmington KS, Ruth J, Lincoln PM and SL K. Crossregulatory role of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and IL-10 in schistosome egg granuloma formation: in vivo regulation of Th activity and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 1994; 98: 395-400.

Chunge RN, Karumba N, Ouma JH, Thiongo FW, Sturrock RF, Butterworth AE. Polyparasitism in two rural communities with endemic *Schistosoma mansoni* infection in Machakos District, Kenya. *J Trop Med Hyg.* 1995; 98: 440-444.

Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245: 308–310.

Colley DG, Hieny SE, Bartholomew RK, Cook JA. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. III. Regulatory effect of patient sera on human lymphocyte blastogenic responses to schistosome antigen preparations. *Am J Trop Med Hyg.* 1977; 26: 917-925.

Colley DG, Todd CW, Lewis FA, Goodgame RW. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. VI. In vitro nonspecific suppression of phytohemagglutinin responsiveness induced by exposure to certain schistosomal preparations. *J Immunol.* 1979 Apr; 4: 1447-1453.

Colley DG, Katz N, Rocha RS, Abrantes W, da Silva AL, Gazzinelli G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. IX. T-lymphocyte subset analysis by monoclonal antibodies in hepatosplenic disease. *Scand J Immunol.* 1983; 17: 297-302.

Comin F, Speziali E, Martins-Filho OA, Caldas IR, Moura V, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R, Faria AM. Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 274-284.

Coulson PS. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Adv Parasitol* 1997; 39: 271-336.

Cota GF, Pinto-Silva RA, Antunes CM, Lambertucci JR. Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74: 103-107.

Corrêa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos Carvalho O, Gazzinelli G. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38: 348-355.

Corrêa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, Carvalho OS, Gazzinelli G, Sher A. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83: 798-804.

Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA, Gazzinelli G. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998a; 31: 171-177.

Corrêa-Oliveira R, Dusse LMS, Viana IRC, Colley DG, Carvalho OS, Gazzinelli G. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1998b; 38: 348-355.

Corrêa-Oliveira R, Golgher DB, Oliveira GC, Carvalho OS, Massara CL, Caldas IR, Colley DG, Gazzinelli G. Infection with *Schistosoma mansoni* correlates with altered immune responses to *Ascaris lumbricoides* and hookworm. *Acta Tropica*. 2002; 83: 123-132.

Cottrell BJ, Sturrock RF, Vanhoegaerden M. An immunosuppressive factor in the serum of baboons (*Papio anubis*) infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunology*. 1980; 39: 589-598.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004, 99: 13-19.

Cox FE. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*. 2001; 122 Suppl:S23-38.

Crabtree JE, Heatley RV, Juby LD, Howdle PD, Losowsky MS. Serum interleukin-2-receptor in coeliac disease: response to treatment and gluten challenge. *Clin Exp Immunol*. 1989; 77: 345-348.

Curry AJ, Else KJ, Jones F, Bancroft A, Grecnis RK and Dunne DW. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. *J Exp Med*. 1995; 181: 769-774.

Dalton PR, Pole D. Water-contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. *Bull World Health Organ*. 1978; 56: 417-426.

de Farias LM, Resendes AP, Sabroza PC, Souza-Santos R. Preliminary analysis of the Information System in the Brazilian Schistosomiasis Control Program, 1999-2003. *Cad Saúde Publica*. 2007; 23: 235-239.

Denys A, Udalova IA, Smith C, Williams LM, Ciesielski CJ, Campbell J, Andrews C, Kwaitkowski D, Foxwell BMJ. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J. Immunol*. 2002; 168: 4837-4845.

de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 2003; 19: 547-551.

Dessein AJ, Couissinier P, Demeure C, Rihet P, Kohlstaedt S, Carneiro-Carvalho D, Ouattara M, Goudot-Crozel V, Dessein H, Bourgois A. Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol Invest*. 1992; 21: 423-453.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T and Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303-1310.

Dieckmann D, Plöttner H, Dotterweich S, Schuler G. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells suppress antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells but induce a suppressive phenotype only in CD4⁺ T cells. *Immunology* 2005; 115: 305-314.

Domingo EO, Warren KS. Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Pathol*. 1968; 52: 369-379.

Doughty BL, Goes AM, Parra JC, Rocha R, Cone JC, Colley DG, Gazzinelli G. Anti-idiotypic T-cells in human schistosomiasis, *Immunol. Invest*. 1989; 18: 373-388.

Duthoit CT, Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. Uncoupling of IL-2 Signaling from Cell Cycle Progression in Naive CD4⁺ T Cells by Regulatory CD4⁺CD25⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 155–163.

Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow DE. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev*. 1994; 8: 1772-1786.

Elias D, Akuffo H, Thors C, Pawlowski A and Britton S. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 398-404.

El-Kady IM, Lotfy M, Badra G, El-Masry S and Waked I. Interleukin (IL)-4, IL- 10, IL-18 and IFN- γ cytokines pattern in patients with combined hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* infections. Scand J Immunol. 2005; 61: 87-91.

Ellner JJ, Olds GR, Osman GS, El Kholy A, Mahmoud AA. Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. J Immunol. 1981; 126: 309-312.

Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Corrêa-Oliveira R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. Parasite Immunol. 1998; 20: 447- 454.

Faulkner H, Turner J, Behnke J, Kamgno J, Rowlinson MC, Bradley JE, Boussinesq M. Associations between filarial and gastrointestinal nematodes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005; 99: 301-312.

Ferru I, Roye O, Delacre M, Auriault C, Wolowczuk I. Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni*: demonstration of the participation of B cells in granuloma modulation. Scand. J. Immunol. 1998; 48: 233–240.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. Annu Rev Immunol. 1997; 15: 505-533.

Fleming FM, Brooker S, Geiger SM, Caldas IR, Corrêa-Oliveira R, Hotez P, Bethony JM. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. Trop Med Int Health. 2006; 11: 56-64.

Flores-Villanueva PO, Reiser H, Stadecker MJ. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7–2 costimulatory molecules by macrophages. J Immunol. 1994a; 153: 5190–5199.

Flores-Villanueva PO, Harris TS, Ricklan DE, Stadecker MJ. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes *in vitro* and down-regulate schistosomal granulomatous disease *in vivo*. *J Immunol*. 1994b; 152: 1847–1855.

Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB, Stadecker MJ. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol*. 1996; 156: 3315-3320.

Fraser JD, Straus D, Weiss A. Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol Today*. 1993; 14: 357-362.

Fujiwara RT, Loukas A, Mendez S, Williamson AL, Bueno LL, Wang Y, Samuel A, Zhan B, Bottazzi ME, Hotez PJ, Bethony JM. Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine*. 2006; 24: 501-509.

FUNASA: <http://www.funasa.gov.br/>. Acesso em 20 de Julho 2007. Epidemiologia e controle da esquistossomose, Brasil. 1999.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13: 114-119.

Gandhi NS, Chen JZ, Koshnood K, Xing FY, Chong C, Shuhua X, Hawdon JM, Hotez PJ. Epidemiology of *Necator americanus* hookworms infections in treatment in the south Indian fishing community of Vairavankuppam. *Parasitology* 2001; 96: 565-577.

Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, Cetre-Sossah CB, Andove J, Hightower AW, Karanja DMS, Colley DG, Secor WE. Correlation between Eosinophils and Protection against Reinfection with *Schistosoma mansoni* and the Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coinfection in Humans. *Infection and Immunity* 2006; 74: 2169–2176.

Garcia S, DiSanto J, Stockinger B. Following the development of a CD4 T cell response *in vivo*: from activation to memory formation, *Immunity* 11 1999; 163–171.

Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni: production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* 1983; 130: 2891-2895.

Gazzinelli G, Lambertucci JR, Katz N, Rocha RS, Lima MS, Colley DG. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment, *J. Immunol.* 1985; 135: 2121-2127

Gazzinelli G, Montesano MA, Corrêa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987; 82: 95-100.

Gazzinelli A, Bethony J, Alves-Oliveira LF, Lo Verde PT, Corrêa-Oliveira R, Kloos H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil Part I: Water contact. *Trop Med Int Health* 2001; 6: 126-135.

Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Corrêa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Paras Immunol* 2002; 24: 499-509.

Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Corrêa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 334-340.

Geiger SM, Caldas IR, MC Glone BE, Campi-Azevedo AC, Oliveira LM, Brooker S, Diemert D, Corrêa-Oliveira R, Bethony JM. Human hookworm infection Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunology* 2007; 29: 347-358.

Gerhard M, Schmees C, Voland P, Endres N, Sander M, Reindl W, Rad R, Oelsner M, Decker T, Mempel M, Hengst L, Prinz C. A secreted low-molecular weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 1327-1339.

Girod N, Brown A, Pritchard DI & Billett EE. Successful vaccination of BALB/c mice against human hookworm (*Necator americanus*): the immunological phenotype of the protective response. *Int J Parasitol* 2003; 33: 71–80.

Goes AM, Rocha RS, Gazzinelli G, Doughty BL. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*, Parasite. *Immunol.* 1989; 11: 695-711.

Goodgame RW, Colley DG, Draper CC, Lewis FA, McLaren ML, Pelley RP. Humoral immune responses in human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27: 1174-1180.

Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Srour E. Functional Heterogeneity of human CD34⁺ cells isolated in subcompartments of the G₀/G₁ phase of the cell cycle. *Blood* 1997; 90: 4384-4393.

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol.* 1991; 146: 1322-1327.

Gryseels B. Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience? *Parasitol Today.* 1994; 10: 380-384.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet* 2006; 368: 1106–18.

Gyorkos TW, Casapia M, Gotuzzo E, Dendukuri N, Soto JC, MacLean JD, Larocque R. Improving maternal and newborn health in hookworm-endemic areas by adding a single-dose anthelmintic to prenatal care: randomized controlled trial of iron supplementation plus mebendazole versus supplementation plus placebo during pregnancy. *Global Forum for*

Health Research, Forum 8, Mexico City, 2004;

Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1994; 1994: 1759-1771?.

Hay C, Micko C, Prescott MF, Liao G, Robinson K, De Leon H. Differential cell cycle progression patterns of infiltrating leukocytes and resident cells after balloon injury of the rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1948-1954.

Hawdon JM, Hotez PJ. Hookworm: developmental biology of the infections process. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 618-623.

Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, Dessein H, Montero F, Elwali NE, Saeed OK, Magzoub M, Dessein AJ. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol* 2002; 169:929–936.

Hernandez HJ, Wang Y, Stadecker MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *J Immunol.* 1997; 158: 4832-4837.

Hesse M, Cheeve, AW, Jankovic D, Wynn TA. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the TH1-inducing adjuvant, IL-12, in a TH2 model of granulomatous disease. *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 945–955.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 2001; 167: 6533–6544.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* 2004; 172: 3157–3166.

Hirata M, Fukuma T. Cytokine regulation in experimentally-induced *Schistosoma japonicum* egg granulomas formation. *Parasitol Int.* 2003; 52: 341-349.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.

Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM., Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm infection. *N.Engl. J. Med.* 2004; 351: 799–807.

Howard SC, Donnelly CA, Kabatereine NB, Ratard RC, Brooker S. Spatial and intensity-dependent variations in associations between multiple species helminth infections. *Acta Tropica* 2002; 83: 141-149.

Humphries DL, Stephenson LS, Pearce EJ, The PH, Dan HT, Khanh LT. The use of human feces for fertilizer is associated with increased intensity of hookworm infection in Vietnamese women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:518-20.

IBGE: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>. Acesso em 12 de Julho 2007. Sobre resultados da amostra do censo demográfico 2004.

Jacobs W, Bogers J, Deelder A, Wery M, Van Marck E. Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation in vivo. Stereological analysis and immunophenotyping of extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and chemokines. *Am J Pathol.* 1997; 150: 2033-2045.

Jones A, Jonsson AB, Aro H. *Neisseria gonorrhoeae* infection causes a G1 arrest in human epithelial cells. *FASEB J.* 2007; 21: 345-355.

Joseph S, Jones FM, Kimani G, Mwatha JK, Kamau T, Kazibwe F, Kemijumbi J, Kabatereine NB, Booth M, Kariuki HC, Ouma JH, Vennervald BJ, Dunne DW. Cytokine production in whole blood cultures from a fishing community in an area of high endemicity for *Schistosoma mansoni* in Uganda: the defferential effect of parasite worm and egg antigens. *Infec Immunity* 2004; 72: 728-734.

Judd W, Poodry CA, Strominger JL. Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from nondividing cells. *J Exp Med* 1980; 152: 1430-1435.

Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Kemijumbi J, Butterworth AE, Dunne DW, Fulford AJ. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitology* 1999; 118: 101–105.

Kaestel CG, Lovato P, Odum N, Nissen MH, Röpke C. The immune privilege of the eye: human retinal pigment epithelial cells selectively modulate T-cell activation in vitro. *Curr Eye Res.* 2005; 30: 375-83.

Kalinkovich A, Weisman Z, Greenberg Z, Nahmias J, Eitan S, Stein M, Bentwich Z. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin Exp Immunol.* 1998; 114: 414-421.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003; 173: 7454-7461.

Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil- derived macrophage inflammatory protein-1-a. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 63–72.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1972; 14: 397-400.

Keiser J, N'goran EK, Singer BH, Lengeler C, Tanner M, Utzinger J. Association between *Schistosoma mansoni* and hookworm infections among schoolchildren in Côte d'Ivoire. *Acta Trop* 2002a; 84: 31-41.

Keiser J, N'goran EK, Traore M, Lohourignon LI, Singer BH, Lengeler C, Tanner M, Utzinger J. Polyparasitism with *Schistosoma mansoni*, geohelminths and intestinal protozoa in rural Côte d'Ivoire. *Acta J Parasitol* 2002b; 88: 461-466.

Keusch GT, Migasena P. Biological implications of polyparasitism. *Rev Infect Dis*. 1982; 4: 880-882.

Khanna AK. Reciprocal role of cyclins and cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 on lymphocyte proliferation, allo-immune activation and inflammation. *BMC Immunology* 2005; 6: 22-31.

King CL, Medhat A, Malhotra I, Nafeh M, Helmy A, Khaudary J, Ibrahim S, El-Sherbiny M, Zaky S, Stupi RJ, Brustoski K, Shehata M, Shata MT. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J Immunol*. 1996; 156: 471547-21.

Klion AD, Nutman TB. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 30-37.

Kumar A, Atlad I. Interferon- α induces the expression of retinoblastoma gene product in human burkitt lymphoma Daudi cells: Role in growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6599-6603.

Lapa MS, Ferreira EV, Jardim C, Martins Bdo C, Arakaki JS, Souza R. Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52: 139-143.

Lawrence CE, Paterson JC, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW, Garside P. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2672-2684.

Lea NC, Orr SJ, Stoeber K, Williams GH, Lam EW-F, Ibrahim MAA, Mufti GJ, Thomas NSB. Commitment point during $G_0 \rightarrow G_1$ that controls entry into the cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2351-2361.

Lee W, Pankoski L, Zekavat A, Shenker BJ. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G_1 arrest in activated human lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 144-149.

Lenzi HL, Lenzi JA, Sobra, AC. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20: 433-435.

Lima, HD (2005). Influência da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* sobre o perfil de marcadores imunológicos da resposta celular e humoral na forma clínica intestinal da esquistossomose. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou pp 29, FIOCRUZ- Minas Gerais, Belo Horizonte.

Lowry DA, Roseburg AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Loukas A, Prociv P. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 689-703.

Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* 2000; 105 (4) E51.

MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ. Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun.* 2002; 70: 427-433.

Maeno Y, Nakazawa S, Dao le D, Van Tuan N, Giang ND, Van Hanh T, Taniguchi K. Osteopontin is involved in Th1-mediated immunity against *Plasmodium falciparum* infection in a holoendemic malaria region in Vietnam. *Acta Trop.* 2006; 98: 305-310.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 733-744.

Makhlouf LM, Serwah Ael-H, Abd El-Hamid Ael D, Hussein EM, Saad RM. INF-gamma, IL-5 and IgE profiles in chronic schistosomiasis mansoni Egyptian patients with or without hepatitis C infection. *J Egypt Soc Parasitol.* 2006; 36: 177-196.

Malaquias LC, Falcão PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, Pizziolo V, Souza CP, Colley DG, Corrêa-Oliveira R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol* 1997; 46:393-398.

Mao X, Green JM, Safer B, Lindsten T, Frederickson RM, Miyamoto S, Sonenberg N, Thompson CB. Regulation of translation initiation factor gene expression during human T cell activation. *J Biol Chemistry* 1992; 267: 20444-20450.

Martins-Filho OA, Dutra WO, Freeman GL, Silveira AM, Rabello A, Colley DG, Prata A, Gazzinelli G, Côrrea-Oliveira R, Carvalho-Parra J. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. *Scand J Immunol.* 1997; 46: 304-311.

Martins-Filho OA, Cunha-Melo JR, Lambertucci JR, Silveira AM, Colley DG, Gazzinelli G, Côrrea-Oliveira R. Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. *Dig Dis Sci.* 1999; 44: 570-577.

Martins MJ, Pinto-Silva RA, Serufo JC, Rayes AAM, Damasceno MPS, Martins MLV, Santos APS, Drummond SC, Bezerra MAS, Lambertucc, JR. Morbidity of schistosomiasis in

an endemic area of the Northeast state of Minas Gerais in Brazil: a clinical and sonographic study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998; 93: 243–244.

Massara CL, Peixoto SV, Barros Hda S, Enk MJ, Carvalho Odos S, Schall V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 127-34.

Massara CL, Peixoto SV, Enk MJ, Barros HS, Carvalho OS, Sakurai E, Schall V. Evaluation of an improved approach using residences of schistosomiasis-positive school children to identify carriers in an area of low endemicity. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74: 495–499.

Matsuda N, Tanaka H, Yamazaki S, Suzuki J, Tanaka K, Yamada T, Masuda M. HIV-1 Vpr induces G₂ cell cycle arrest in fission yeast associated with Rad24/14-3-3-dependent, Chk1/Cds1-independent Wee1 upregulation. Microbes Infect. 2006; 8: 2736-2744.

Matthys B, Tschannen AB, Tian-Bi NT, Comoe H, Diabate S, Traore M, Vounatsou P, Raso G, Gosoni L, Tanner M, Cisse G, N'Goran EK, Utzinger J. Risk factors for *Schistosoma mansoni* and hookworm in urban farming communities in western Cote d'Ivoire. Trop Med Int Health. 2007; 12: 709-723.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Immunity. 2002; 16: 311-323.

McKee AS, Pearce EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th₂ polarization during helminth infection by suppressing Th₁ response development. J. Immunol. 2004; 173: 1224-1231.

Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell. 2001; 106: 255-258.

Miller DR, Baehner RL, Miller LP (eds): Blood Diseases of Infancy and Childhood, 6th ED. St. Louis: CV Mosby 1990: 26-51.

Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Goncalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis.* 1999; 179: 1502-1514.

Montesano MA, Lima MS, Corrêa-Oliveira R, Gazzinelli G and Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni: XVI. Idiotypic differences in antibody preparations from patients with different clinical forms of infection. *J Immunol* 1989; 142: 2501-2506.

Montesano MA, Freeman GL Jr, Secor WE and Colley DG. Immunoregulatory idiotypes stimulate T helper 1 cytokine responses in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Immunol* 1997; 158: 3800-3804.

Mosmann T. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56: 1-5.

Muhangi L, Woodburn P, Omara M, Omoding N, Kizito D, Mpairwe H, Nabulime J, Ameke C, Morison LA, Elliott AM. Associations between mild-to-moderate anaemia in pregnancy and helminth, malaria and HIV infection in Entebbe, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101: 899-907

Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJC, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and INF- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1998; 160: 1992-1999.

Nacher M. Interactions between worm infections and malaria. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 26: 85-92.

Nagajyothi F, Desruisseaux M, Bouzahzah B, Weiss LM, Andrade Ddos S, Factor SM, Scherer PE, Albanese C, Lisanti MP, Tanowitz HB. Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis. *Cell Cycle*. 2006; 5:107-112.

Nash TE, Cheever AW, Ottesen EA, Cook JA. Schistosome infections in humans: perspectives and recent findings, *Ann. Intern. Med.* 1982; 97: 740-754.

Needham C, Kim HT, Hoa NV, Cong LD, Michael E, Drake L, Hall A, Bundy DA. Epidemiology of soil-transmitted nematode infections in Ha Province, Vietnam. *Trop Med Int Health* 1998; 3: 904-912.

Neves J, Raso P. Anatomico-clinical study of a case of schistosomiasis mansoni, toxemic form, evolving into a hepatosplenic form within 130 days (hepatic fibrosis, Symmers type). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1965; 7: 256-266.

Nielsen J, Holm TL, Claesson MH. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* 2004; 112: 642-650.

Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; 372: 570-573

Noureldin MS, el-Shinnawy H, d Abou Elenin A. Serum pretreatment with *Schistosoma mansoni* antigens for serological diagnosis of fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol* 2000; 30: 157-168.

Oliveira DM, Carmo SA, Silva-Teixeira DN, Goes AM. Immunization with PIII, a fraction of *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigenic preparation, affects nitric oxide production by murine spleen cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 175-180.

Oliveira DM, Gustavson S, Silva-Teixeira DN, Goes AM. Nitric oxide and IL-10 production induced by PIII-a fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm antigenic preparation

associated with downregulation of in vitro granuloma formation. Hum Immunol 1999; 60: 305- 311.

Oliveira LM (2006). Functional and phenotypic aspects of CD4⁺ T lymphocytes from patients with cronic intestinal clinical form of the schistosomiasis in the absence or presence of geohelminthes coinfections. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou pp 65, FIOCRUZ- Minas Gerais, Belo Horizonte.

Oloris SC, Mesnil M, Reis VN, Sakai M, Matsuzaki P, Fonseca Ede S, da Silva TC, Avanzo JL, Senhorini IL, Guerra JL, Costa-Pinto FA, Maiorka PC, Dagli ML. Hepatic granulomas induced by *Schistosoma mansoni* in mice deficient for connexin 43 present lower cell proliferation and higher collagen content. Life Sci. 2007; 80: 1228-1235.

Onyemelukwe GC, Musa BO. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. Afr J Med Med Sci. 2001; 30: 255-259.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Troudt J, Shanley C, Basaraba RJ, Orme IM. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. J Immunol. 2007; 179: 522-531.

Osborne J, Devaney E. Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. Infect Immun. 1999; 67: 1599-1605.

Otsuki T, Yamada O, Sakaguchi H. Human myeloma cell apoptosis induced by interferon- α 2. Br J Haematol 1998; 103: 518–529.

Ottesen EA, Hiatt RA, Cheever AW, Sotomayor ZR, Neva FA. The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. Clin Exp Immunol. 1978, 33: 37-47.

Ottesen EA, Poindexter RW. Modulation of the host response in human schistosomiasis. II. Humoral factors which inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29: 592-597.

Ouma JH, Fulford AJ, Kariuki HC, Kimani G, Sturrock RF, Muchemi G, Butterworth AE, Dunne DW. The development of schistosomiasis mansoni in an immunologically naive immigrant population in Masongaleni, Kenya. *Parasitology* 1998; 117: 123–32.

Pancre V, Delacre M, Herno J, Auriault C. Schistosomal egg antigen-responsive CD8 T-cell population in *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice, *Immunology* 1999; 98: 525-534.

Parra JC, Gazzinelli G, Goes AM, Moyes RB, Rocha R, Colley DG, Doughty BL. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies, *J. Immunol.* 1991; 147: 3949-3954.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-608.

Pawlowski ZS, Schad GA, Stott GJ. Hookworm infection and anaemia. Approaches to prevention and control. World Health Organization. Geneva, 1991.

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med.* 1991; 173: 159-166.

Perrin GQ, Johnson HM, Subramaniam PS. Mechanism of Interleukin-10 Inhibition of T-Helper Cell Activation by Superantigen at the Level of the Cell Cycle. *Blood* 1999; 93: 208-216.

Petney TN, Andrews RH. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 377-393.

Pritchard DI, Quinnell RJ, McKean PG, Walsh EA, Legget KV, Slater AFG, Raiko A, Dale DDS, Keymer AE. Antigenic cross-reactivity between *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* in a community in Papua New Guinea infected predominantly with hookworm. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 511-514.

Rabinovitch PS, Torres RM, Engel D. Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol* 1986; 136: 2769-2774.

Raso G, Luginbuhl A, Adjoua CA, Tian-Bi NT, Silue KD, Matthys B, Vounatsou P, Wang Y, Dumas ME, Holmes E, Singer BH, Tanner M, N'goran EK, Utzinger J. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Cote d'Ivoire. *Int J Epidemiol* 2004; 33: 1092-1102.

Raso G, Vounatsou P, Singer BH, N'Goran EK, Tanner M, Utzinger J. An integrated approach for risk profiling and spatial prediction of *Schistosoma mansoni*-hookworm coinfection *PNAS* 2006; 103: 6934-6939.

Reimert CM, Fitzsimmons CM, Joseph S, Mwatha JK, Jones FM, Kimani G, Hoffmann KF, Booth M, Kabatereine NB, Dunne DW, Vennervald BJ. Eosinophil Activity in *Schistosoma mansoni* Infections *In Vivo* and *In Vitro* in Relation to Plasma Cytokine Profile Pre- and Posttreatment with Praziquantel. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006; 13: 584-593.

Reome JB, Johnston DS, Helmich BK, Morgan TM, Dutton-Swain N and Dutton RW. The effects of prolonged administration of 5-bromodeoxyuridine on cells of the immune system. *J Immunol* 2000; 165: 4226-4230.

Rezende SA, Silva-Teixeira DN, Drummond SC, Goes AM. IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs induced by immune complexes. *Scand J Immunol* 1997; 46: 96-102.

Riechard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 349-353.

Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJC, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock RF. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun* 1993; 61: 4984-4993.

Rocklin RE, Brown AP, Warren KS, Pelley RP, Houba V, Siongok TK, Ouma J, Sturrock RF, Butterworth AE. Factors that modify the cellular-immune response in patients infected by *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*. 1980; 125: 1916-1923.

Rosato MT, Jabbour AJ, Ponce RA, Kavanagh TJ, Takaro TK, Hill JP, Poot M, Rabinovitch PS and Faustman EM. Simultaneous analysis of surface marker expression and cell cycle progression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 2001; 256: 35-46.

Rutitzky LI, Mirkin GA, Stadecker MJ. Apoptosis by neglect of CD4⁺ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*. 2003; 171: 1859-1867.

SABIN VACCINE INSTITUTE. http://www.sabin.org/hookworm_intro.htm. Acesso em 5 de Maio 2005. Sobre ancilostomíase na América Latina em 2004.

Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 2003; 33: 880–888.

Sanderson CJ. Interleukin-5: an eosinophil growth and activation factor. *Dev. Biol. Stand.* 1988; 69: 23–29.

Sangfelt O, Erickson S, Castro J, Heiden T, Einhorn S, Grander D. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 343–352.

Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Jesus AR and Carvalho EM. Clinical and immunological consequences of human T cell leukemia virus type-I and *Schistosoma mansoni* co-infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 121-126.

Savioli L, Stansfield S, Bundy DA, Mitchell A, Bhatia R, Engels D, Montresor A, Neira M, Shein AM. Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections: forging control efforts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 96: 577–579. Erratum in: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003, 97:90.

Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, Cassatella MA. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3a (MIP- 3a)/CCL20 and MIP-3b/CCL19. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 1981–1988.

Schad GA, Murrel KD, Fayer R, El Naggar HMS, Page MR, Parrish PK, Stewart TB. Paratenesis in *Ancylostoma duodenale* suggests possible meat-borne human infection. *Trans Royal Trop Med and Hyg* 1984; 78: 203-204.

Schmid I, Cole SW, Corin YD, Zack JA, Giorgi JV. Detection of cell cycle subcompartments by flow cytometric stimulation of DNA-RNA content in combination with dual color immunofluorescence. *Cytometry* 2000; 39: 108-116.

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-cdk2 is a regulator of p27kip1. *Genes Dev.* 1997; 11: 1464-1478.

Sherr CJ, Kato J, Quelle DE, Matusuoka M, Roussel MF: D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59: 11-17.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677.

Shenker BJ, Datar S. *Fusobacterium nucleatum* inhibits human T-cell activation by arresting cells in the Mid-G₁ phase of the cell cycle. *Infect Immun* 1995; 63: 4830-4836.

Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G₂ arrest of the cell cycle in human T-cells. *J. Immunol* 2000; 165: 2612-2619.

Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G₂ arrest of the cell cycle. *J Immunol* 2001; 167: 435-441.

Sieg SF, Rodriguez B, Asaad R, Jiang W, Bazdar DA, Lederman MM. Peripheral S-Phase T Cells in HIV Disease Have a Central Memory Phenotype and Rarely Have Evidence of Recent T Cell Receptor Engagement. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192: 62–70.

Silva-Teixeira DN, Contigli C, Goes AM. Cytokine profile associated to effector functions of human T cell clones specific for *Schistosoma mansoni* antigens. *Hum Immunol* 1998; 59: 219-224.

Silveira AMS, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Bethony J, Gazzinelli A, Carvalho-Queiroz C, Alvarez MCB, Lima-Silva FC, Prata A, Lo Verde PT, Corrêa-Oliveira R. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon- γ and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 514-519.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira LF, Corrêa-Oliveira R. High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 1: 345-351.

Spiegel A, Tall A, Raphenon G, Trape JF, Druilhe P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97: 198-189.

Stadecker M.J. The shrinking schistosomal egg granuloma: how accessory cells control T cell-mediated pathology. *Exp Parasitol,* 1994; 2: 198-201.

Stephenson LS, Latham MC, Kurz KM, Brigham H. Treatment with a single dose of albendazole improves growth of Kenyan schoolchildren with hookworm, *Trichiuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 78-87.

Stoltzfus RJ, Chwaya HM, Tielsch KJ, Albonico M, Savioli L. Epidemiology of iron deficiency anemia in Zanzibari schoolchildren: the importance of hookworms. *Am J Clin Nutr* 1997a; 65: 153-159.

Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML, Albonico M. Hookworm control as a strategy to prevent iron deficiency. *Nutr. Rev* 1997b; 55: 223-232.

Subramaniam PS, Cruz PE, Hobeika AC, Johnson HM. Type I interferon induction of the Cdk-inhibitor p21 WAF1 is accompanied by order G₁ arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene* 1998; 16: 1885–1890.

Sun J, Stalls MA, Thompson KL and van Houten NF. Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. *Cell Immunol* 2003; 225: 33-41.

Sturrock RF, Kariuki HC, Thiongo FW, Gachare JW, Omondi BG, Ouma JH, Mbugua G, Butterworth AE. Schistosomiasis mansoni in Kenya: relationship between infection and anaemia in schoolchildren at the community level. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90: 48-54.

Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 148: 1143-1147.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-309.

Talaat RM, El-Bassiouny AI, Osman AM, Yossif M, Charmy R, Al-Sherbiny MM. Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S. mansoni*-infected Egyptian patients. *Parasitol Res* 2007; 101: 289–299.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Population. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 5839–5847.

Tchuem Tchuenté LA, Behnke JM, Gilbert FS, Southgate VR, Vercruysse J. Polyparasitism with *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted helminth infections among schoolchildren in Loum, Cameroon. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 975-986.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Andrade ZA, Cunha-Mello JR, Wilson RA, Corrêa-Oliveira R. The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human Schistosomiasis mansoni infection. *Scand J Immunol*. 2002; 56: 315-322.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LCC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Gazzinelli A, Alvarez MCB, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Cytokines, chemokine receptors, CD4⁺CD25^{HIGH+} T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *in press*

Tienfenbrun N, Melamed D, Levy N. Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to reversible G₀-like arrest. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3934–3944.

Timothy LM, Coulson PS, Behnke JM, Wilson RA. Cross-reactivity between *N. americanus* and *S. mansoni* in mice. *Int J Parasitol* 1992; 22: 1143-1149.

Todd CW, Goodgame RW, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. V. Suppression of schistosome antigen-specific lymphocyte blastogenesis by adherent/phagocytic cells. *J Immunol.* 1979; 122: 1440-1446.

van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* 2002; 277: 48122-48129.

van der Werf MJ, de Vlas SJ, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Associating community prevalence of *Schistosoma mansoni* infection with prevalence of signs and symptoms. *Acta Trop.* 2002; 82: 127-137.

van Gisbergen KP, Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 2005; 579: 6159-6168.

van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, van Kooyk Y, van Die I. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol.* 2007; 44: 2605-2615.

van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology.* 2007; 212: 475-490.

Vella AT, Hulsebosch MD, Pearce EJ. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44^{hi} T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44^{lo} cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *J Immunol.* 1992; 149: 1714-1722.

Viana IR, Sher A, Carvalho OS, Massara CL, Eloi-Santos SM, Pearce EJ, Colley DG, Gazzinelli G, Côrrea-Oliveira R. Interferon-gamma production by peripheral blood

mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994; 88: 466-470.

Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. J. Exp. Med. 1988; 167: 1737-1742.

Yusuf I, Fruman DA. Regulation of quiescence in Lymphocytes. TRENDS in Immunology 2003; 24: 380-386.

Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. PNAS 2005; 102: 4103-4108.

Warren KS, Domingo EO, Cowan RB. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol. 1967; 51: 735-756.

Webster M, Corrêa-Oliveira R, Gazzinelli G, Viana IR, Fraga LA, Silveira AM, Dunne DW. Factors affecting high and low human IgE responses to schistosome worm antigens in an area of Brazil endemic for *Schistosoma mansoni* and hookworm. Am J Trop Med Hyg. 1997; 57: 487-494.

Wetzel GD. Interleukin 5 (IL-5) can act in G₀/G₁ to induce S phase entry in B lymphocytes from normal and autoimmune strain mice and in transformed leukemic B cells. Cell Immunol. 1991; 137: 245-251.

WHO: Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil - Transmitted Helminthiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva. 2002.

Wilkins HA, Blumenthal UJ, Hagan P, Hayes RJ, Tulloch S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81: 29-35.

Wolday D, Mayaan S, Mariam ZG, Berhe N, Seboza T, Britton S, Galai N, Landay A and Bentwich Z. Treatment of intestinal worms is associated with decreased HIV plasma viral load. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31: 56-62.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 425–456.

Wright V, Bickle Q. Immune responses following experimental human hookworm infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005; 142: 398-403.

Xaus J, Cardã M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J, Celada A. Interferon- γ induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 1999; 11: 103–113.

Zouain CS, Gustavson S, Oliveira SC, Azevedo V, Alves JB, Goes AM. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. *Vaccine* 2001; 19: 1218-1224.

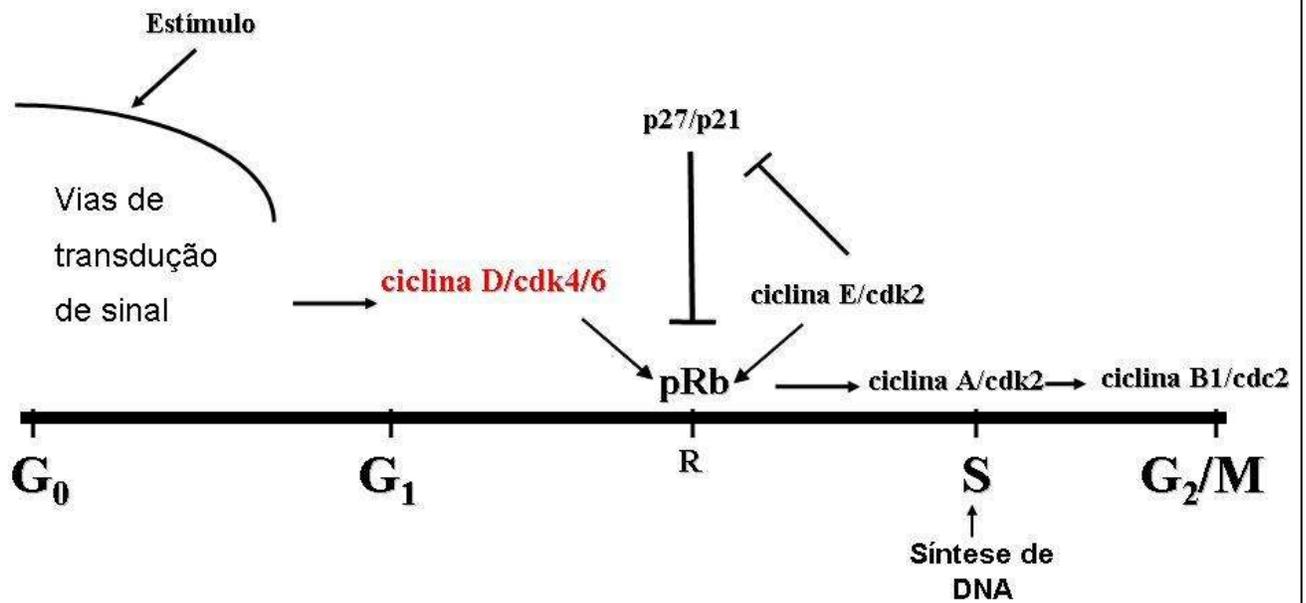
Zouain CS, Gustavson S, Silva-Teixeira DN, Contigli C, Rodrigues V Jr, Leite MF, Goes AM. Human Immune Response in Schistosomiasis: The Role of P24 in the Modulation of Cellular Reactivity to *Schistosoma mansoni* Antigens. 2002; 63(8):647-656.

Zwingenberger K, Irschick E, Vergetti Siqueira JG, Correia Dacal AR, Feldmeier H. Tumour necrosis factor in hepatosplenic schistosomiasis. *Scand J Immunol* 1990; 31: 205-211.

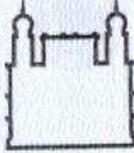
Zwingenberger K, Hohmann A, de Brito MC, Ritter M. Impaired balance of interleukin-4 and interferon-gamma production in infections with *Schistosoma mansoni* and intestinal nematodes. *Scand J Immunol*. 1991; 34: 243-251.

7. Anexos

Resumo esquemático do ciclo celular



Chellappan *et al.*, 1991; Mao *et al.*, 1992; Dynlacht *et al.*, 1994; Hatakeyama *et al.*, 1994; Sherr *et al.*, 1994; Sherr, 1996; Sheaff *et al.*, 1997; Appleman *et al.*, 2002)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

PARECER Nº 01/2004 – CEPESH- CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 012/2003

Projeto de Pesquisa: "Papel de antígenos derivados do *Schistosoma mansoni* na regulação da progressão do ciclo celular e proliferação *in vitro* de linfócitos"

Pesquisador Responsável: Giovanni Gazzinelli

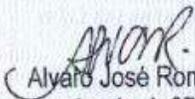
Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 19 de setembro de 2003

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, após consideradas as respostas as pendências anteriores, constatou-se que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Por se tratar de um projeto de cooperação internacional o mesmo estará sendo encaminhado ao CONEP para análise e aprovação final.

Belo Horizonte, 21 de janeiro de 2004.


Alyano José Romanha
Coordenador do CEPESH- CPqRR

Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ
Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel: (0055) (31) 3295-3566 (ramal 180) - Fax: (0055) (31) 3295-3115
e-mail: romanha@cpqrr.fiocruz.br



PARECER N.º 598/2004

Registro CONEP: 9738 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 012/2003

Processo n.º 25000.014849/2004-23

Projeto de Pesquisa: " *Papel de antígenos derivados do S. mansoni na regulação da progressão do ciclo celular e proliferação in vitro de linfócitos.*"

Pesquisador Responsável: Dr. Giovanni Gazzinelli

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Objetivo

Caracterizar os eventos moleculares que regulam a progressão do ciclo celular e proliferação de células T CD4⁺ de indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni* e *Necator americanus*, co-infectados ou não, antes e após tratamento quimioterápico.

Sumário

Este estudo será realizado na região nordeste de Minas Gerais, onde o *N. americanus* e o *S. mansoni* são co-endêmicos. Para definição da população-alvo serão realizados levantamento parasitológico e entrevistas para avaliar o risco de exposição a infecção. Para tanto, amostras de fezes e sangue serão coletadas. Os indivíduos (cinco de cada categoria de infecção) serão selecionados por amostragem aleatória. Todo material biológico (soro, plasma e células), assim como o banco de dados permanecerá no Centro de Pesquisas René Rachou.

Serão incluídos na análise somente indivíduos residentes na área endêmica selecionada, por um período mínimo de 12 meses consecutivos.

Serão excluídos indivíduos que relataram ter recebido tratamento com drogas anti-helmínticas nos últimos dois anos, bem como aqueles com infecções helmínticas que não sejam por *N. americanus* e o *S. mansoni*.

Comentários

As condições preestabelecidas para a realização dos objetivos encontram-se adequadas.

Os pesquisadores relatam que os riscos da pesquisa se limitam ao procedimento da coleta sanguínea (dor, hematoma etc), assim como aos possíveis efeitos adversos das drogas anti-helmínticas (albendazol e praziquantel).

Segundo os pesquisadores, os resultados desta pesquisa poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos imunes e fatores que influenciam a imuno-regulação na esquistossomose humana. Além disso, podem contribuir na compreensão de outras doenças infecciosas crônicas, onde também é observada essa modulação da resposta imune.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresenta-se de acordo com o preconizado na Resolução 196/96.

Com. Parecer CONEP nº 598/2004

Outros Centros (colaboração com outras instituições): The George Washington University (EUA).

Este projeto será financiado pelo *World Health Organization* - TDR (EUA)

Consta o currículo do Pesquisador Principal, que apresenta vasta experiência na área.

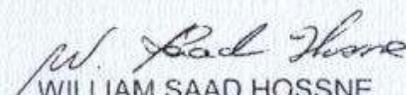
As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 06 de abril de 2004.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS