

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU/CPqRR



*Mestrado em Ciências da Saúde*

Aspectos funcionais e fenotípicos de  
linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma  
crônica intestinal da esquistossomose mansoni  
na ausência ou presença de co-infecções  
por geo-helminhos

**“Functional and phenotypic aspects of CD4<sup>+</sup> T  
lymphocytes from patients with chronic intestinal  
clinical form of the schistosomiasis in the absence  
or presence of geo-helminthes coinfections”**

por

*Luciana Maria de Oliveira*

Belo Horizonte

Março de 2006



**Ministério da Saúde**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Centro de Pesquisas René Rachou**

**Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Aspectos funcionais e fenotípicos de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose mansoni na ausência ou presença de co-infecções por geo-helmintos

“Functional and phenotypic aspects of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with chronic intestinal clinical form of the schistosomiasis in the absence or presence of geo-helminthes coinfections”

por

*Luciana Maria de Oliveira*

Dissertação apresentada  
como requisito parcial para  
obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ)

Co-orientador: Prof. Dr. Jeffrey Michael Bethony (GWU)

Março, 2006

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

O48a Oliveira, Luciana Maria de.  
2006

Aspectos funcionais e fenotípicos de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose mansoni na ausência ou presença de co-infecções por geo-helminhos – “Functional and phenotypic aspects of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with chronic intestinal clinical form of the schistosomiasis in the absence or presence of geo-helminth infections” / Luciana Maria de Oliveira. - Belo Horizonte, 2006.

xxv, 122 f.: il; 29,7 x 21,0 cm. 204 referências.

Bibliografia: 105 – 120

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. *Schistosoma mansoni*; 2. LT CD4<sup>HIGH</sup>; 3. Geo-helminhos; 4. Co-infecção.

I. Título. II. Corrêa-Oliveira, Rodrigo (Orientador). III. Bethony Jeffrey (Co-orientador).

CDD – 2. ed. – 616.963

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

**Centro de Pesquisas René Rachou**

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Aspectos funcionais e fenotípicos de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose mansoni na ausência ou presença de co-infecções por geo-helminthos

“Functional and phenotypic aspects of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with chronic intestinal clinical form schistosomiasis in the absence or presence of geo-helminthes coinfections”

apresentada por

*Luciana Maria de Oliveira*

**Banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Orientador/Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari (Membro Titular)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Symone Fulgêncio Lima (Membro Titular)

Prof<sup>a</sup>. Dra Silvana Maria Eloi Santos (Membro Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em 16 de março de 2006.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Ata da vigésima defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Luciana Maria de Oliveira, sob a orientação do Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira e co-orientada pelo Dr. Jeffrey Bethony**

Aos dezesseis dias do mês de março do ano de dois mil e seis, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da vigésima dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação da aluna Luciana Maria de Oliveira intitula-se "Aspectos funcionais e fenotípicos de Linfócitos T CD4+ de pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose mansoni na ausência ou presença de co-infecções por geo-helminthos". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - UFMG (membro titular), Dra. Symone Fulgêncio Lima - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular) e Dra. Silvana Maria Eloi Santos - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir a aluna e considerando que 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, dezesseis de março de dois mil e seis.

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Dra. Symone Fulgêncio Lima

*Dedico às duas pessoas que mais amo:  
meus pais Anilson e Alcina.  
Verdadeiros mestres que me proporcionaram  
o maior de todos os ensinamentos:  
amor próprio e respeito aos outros.  
Amo vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

“A grandeza de uma profissão é, talvez,  
antes de tudo, unir os homens:  
só há um luxo verdadeiro, o das relações humanas”.

***Antoine de Saint-Exupery***

*Aos meus orientadores que me ajudaram a trilhar os caminhos que levam ao amadurecimento profissional, um agradecimento muito especial:*

Ao *Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira*, pela grande contribuição para minha carreira científica e pela amizade, carinho e respeito dedicados a mim em todo este período de convivência. Meus agradecimentos pela oportunidade que me foi dada de ingressar no laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM), pela orientação no desenvolvimento deste projeto e, ainda, pela sua constante disponibilidade e boa vontade em me atender para discutirmos os aspectos técnico-científicos e as dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho. Sua amizade e dedicada atenção foram motivações para continuar a gratificante tarefa de aperfeiçoar meus conhecimentos.

Ao *Dr. Jeffrey Bethony*, pela confiança em minha capacidade profissional, pela oportunidade de participar em vários projetos sob sua coordenação, inclusive o projeto que deu origem a esta dissertação e também pela orientação e ajuda durante os experimentos. Agradeço também pela amizade e carinho dedicados a mim durante este período de convivência.

Ao *Dr. Olindo Assis*, uma pessoa iluminada e de sensibilidade extrema que, além de excelente profissional foi sempre o amigo que acreditou no meu potencial e me abriu muitas portas. Você sempre foi e continuará sendo o amigo de todas as horas. Agradeço também pela colaboração na padronização do uso da metodologia de análise da proliferação celular por citometria de fluxo e pela enorme contribuição nas discussões e na elaboração desta dissertação.

À *Dra. Andréa Teixeira*, exemplo de profissionalismo e humanidade, pela grande contribuição para meu aprendizado profissional e pessoal, pelo incentivo constante e, principalmente, por sua sincera amizade. Sempre lembrarei com carinho e gratidão os ensinamentos recebidos, a colaboração na padronização do uso da metodologia de análise da proliferação celular por citometria de fluxo e a enorme contribuição nas discussões e na elaboração desta dissertação.



*À minha família, que reúne as pessoas que mais amo e que estão sempre juntas para superar as dificuldades ou para comemorar as vitórias mútuas: Amo vocês!*

A meus pais *Anilson e Alcina*, pessoas a quem muito amo e que me deram, não apenas a vida, mas todas as bases necessárias para eu me tornar quem sou hoje. Obrigada pelo amor, respeito, carinho e incentivo que sempre me dedicaram.

A meus irmãos *Rogério, Cristina e Luís*, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a realizar meus sonhos. Pelo enorme amor, amizade e respeito que nos une, além dos laços fraternos.

À minha irmã *Valéria* um agradecimento especial! Obrigada por sua colaboração e incentivo na realização deste sonho em especial.

Às minhas cunhadas *Nilza e Senair*, a meus cunhados *Elinei e Carlos*, e, principalmente, a meus sobrinhos *William, Helen, Erika, Guilherme, Ana Luisa e Iago*. Agradeço por compreenderem a ausência e o distanciamento que este período nos impôs.

*Às pessoas especiais com as quais a vida me presenteou e com quem aprendi a valorizar o companheirismo, a lealdade e a amizade.*

Ao *Ricardo Marcelo*, companheiro de todas as horas... mesmo quando a distância nos separa! Obrigada por transformar cada instante em que estamos juntos em grandes momentos! E ainda, obrigada pelo companheirismo, pela amizade e por me incentivar sempre a realizar meus sonhos. *Amo você!*

Aos amigos do coração: *Cristina, Solange, Carol, Vladimir, Denise, Pollyana e Ricardo Fujiwara* (LICM), *Fernanda, Regina e Zilma* (Hemominas) e à *Paulinha* (Arrozinho) pela amizade sincera que sempre me dedicaram e pelo incentivo durante esta e muitas outras fases da minha vida. *“Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito”*.

*A todos os amigos do LICM, tanto aqueles que já terminaram seus trabalhos e partiram para novas conquistas, quanto aqueles que ainda estão presentes no laboratório, agradeço o agradável convívio.*

Agradecimento especial aos amigos *Ariane, Denise, Gustavo, Vanessa e Carol* pela colaboração na padronização do uso da metodologia de análise da proliferação celular por citometria de fluxo.

À *Clari Gandra*, pela eterna alegria e disposição em ajudar e, principalmente, pela amizade e carinho a mim dedicado.

À vice-chefe do LICM, *Dra. Iramaya*, pelo apoio, incentivo e agradável convívio. Agradeço também as discussões e sugestões que enriqueceram este trabalho

A todos os funcionários da área administrativa, em especial à gerente, *Eliane Léo e à Ana Beatriz* (Tiza) por todo o apoio recebido, pelo agradável convívio, pelo carinho e pela amizade.

A todos os *técnicos* do LICM que realizam um importante serviço de apoio aos trabalhos realizados. Agradecimento também à *Ana Pacheco, Sérgio e Rita* pelo apoio nos serviços gerais.

*A todos os funcionários e amigos do CPqRR, pelo agradável convívio durante estes anos.*

Gostaria de agradecer especialmente à *Ana Carolina*, pelos ensinamentos de bioestatística e pelo auxílio nas análises estatísticas. E também ao *Segemar*, pela dedicação e profissionalismo com que atende na biblioteca e, pela agilidade em obter materiais que auxiliaram na revisão bibliográfica.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial ao *Gustavo, Pollana, Fernanda e Graça*. Foi muito gratificante e enriquecedora a nossa convivência diária.

Ao *Dr. Roberto Sena e Dr. Álvaro Romanha*, ex-diretor e ao atual diretor do CPqRR, respectivamente. À coordenadora *Dra. Virgínia Schall* e a todos os *professores* do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR.

Aos *voluntários das comunidades de áreas endêmicas* sem os quais este trabalho não teria sido possível.

À *Dra. Andréia Gazzinelli* da Faculdade de Enfermagem da UFMG, *Dra. Lúcia Alves* e à técnica *Marlucy* da UNIVALE pelos dados parasitológicos e envio do material biológico. E ainda, ao amigo *Wesley* pela colaboração nas análises dos dados parasitológicos.

À *Dra. Teresa, Dra. Symone e Dra. Silvana*, membros da banca examinadora, pela grande contribuição para o aprimoramento desta dissertação e para minha formação acadêmica.

Às agências financiadoras deste trabalho: Centro de Pesquisas René Rachou - **CPqRR**, Fundação Oswaldo Cruz - **FIOCRUZ**, Universidade de George Washington - **GWU** e National Institutes of Health - **NIH**.

*Finalmente, a todos aqueles que me ajudaram a chegar neste momento e realizar este projeto, mas, por razão de espaço não puderam ser discriminados neste agradecimento.*

“Bem longe, lá na luz do sol, estão as minhas mais altas aspirações.  
Talvez eu não as alcance, mas posso olhar para cima e ver sua beleza,  
acreditar nelas e tentar seguir para onde elas apontam”.

**Luisa May Al Cott**

## RESUMO

Infecções helmínticas representam uma das mais prevalentes doenças parasitárias do mundo, sendo as co-infecções freqüentemente observadas em áreas endêmicas. Têm-se postulado que as infecções helmínticas podem aumentar a susceptibilidade a outras infecções ou agir de maneira sinérgica na ativação dos mecanismos imunes protetores. Neste contexto, a resposta imune celular específica e o perfil de expressão de citocinas, fatores importantes na ativação de mecanismos protetores já foram avaliados. Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores e mecanismos que levam à imunidade protetora ou que contribuem para a persistência dos parasitos em humanos co-infectados por *Schistosoma mansoni* e geo-helmintos. Neste estudo nós avaliamos a resposta imune celular de linfócitos T (LT) CD4<sup>+</sup> de pacientes com esquistossomose intestinal na ausência (XTO) ou presença (CO) de co-infecções por geo-helmintos. Células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas por antígenos brutos de ovos (SEA) ou de vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni*. Análises da incorporação de BrdU (fase S do ciclo celular) e do fenótipo celular (tais como CD4 e marcadores de ativação) foram realizadas por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram maior envolvimento de LT CD3<sup>+</sup> comparados aos linfócitos B (LB) CD19<sup>+</sup>. Após estimulação *in vitro* com SWAP, o percentual médio de LB CD19<sup>+</sup> dos pacientes do grupo XTO foi maior comparado com aquele observado em indivíduos não infectados. Entretanto, nenhuma diferença significativa na freqüência e reatividade das subpopulações de LT CD3<sup>+</sup> foi observada entre os grupos. Contudo, observamos uma subpopulação de LT expressando altos níveis da molécula CD4 (CD4<sup>HIGH</sup>) que apresentou diferentes perfis de reatividade após estimulação *in vitro*. Nas culturas estimuladas com SWAP foi observada uma maior freqüência de LT CD4<sup>HIGH</sup> reativos em pacientes do grupo XTO comparada àquela observada no grupo CO, mas semelhante ao grupo NI. Análises de marcadores de ativação/memória demonstraram maior percentual médio de LT CD4<sup>HIGH</sup> CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup> comparado à subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> convencionais. Estes dados estão de acordo com a literatura que descreve os LT CD4<sup>HIGH</sup> como células antígeno-específicas, recentemente ativadas que apresentam fenótipo de memória e que podem estar relacionadas à estimulação antigênica crônica.

**Palavras-chave:** *S. mansoni*, geo-helmintos, co-infecções, LT CD4<sup>HIGH</sup>.

## ABSTRACT

Helminthic infections are one of the most prevalent parasitic diseases in the world, and concomitant helminthic infections are frequently observed in endemic areas. It has been postulated that helminthic infections may lead to an increase of host susceptibility to other infections or act synergistically to activate immune effector mechanisms that may lead to clearance of the infections. In this context, the specific immune cellular response and cytokines expression profiles, factors known to be important in the activation of protective mechanisms were evaluated. However, it is not known what are the effect(s) of the immune response against one infection on the protective response to a second infection. It is also not known how these responses may contribute for the persistence of co-parasitic infections in chronic human *Schistosoma mansoni* infections. In this study, we evaluated the immune cellular responses of T CD4<sup>+</sup> lymphocytes of patients with intestinal schistosomiasis and patients with intestinal schistosomiasis plus geo-helminthic infections. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with soluble antigens extracts from adult parasites (SWAP) and of parasite eggs (SEA) of *S. mansoni*. Analysis of BrdU incorporation (phase S of the cellular cycle) and of cell phenotype (such as CD4 and activation markers) were performed by flow cytometry. Our results show higher involvement of T CD3<sup>+</sup> lymphocytes when compared to the B CD19<sup>+</sup> lymphocytes. After *in vitro* stimulation with SWAP, the mean percentage of B CD19<sup>+</sup> cells in patients of XTO group was higher when compared with that of non-infected individuals. However, no statistically significant differences between frequency and reactivity of T CD3<sup>+</sup> lymphocytes subpopulations were observed when we compared the groups of patients. Nevertheless, we observed a subpopulation of T cells expressing high levels of CD4 (CD4<sup>HIGH</sup>) with differential expression patterns of reactivity. In cultures stimulated with SWAP, we observed a higher frequency of T CD4<sup>HIGH</sup> reactive in mono-infected patients when compared to the co-infected individuals. Analysis of activation/memory markers show higher mean percentage of CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup> in T CD4<sup>HIGH</sup> cell subpopulation than T CD4<sup>+</sup> conventional. These data are in agreement with those previously reported that T CD4<sup>HIGH</sup> cells are a population highly and recently activated antigen-specific effector cells, that display a memory phenotype and could be involved in process of chronic antigen stimulation.

**Key-words:** *S. mansoni*, geo-helminthes, co-infections, LT CD4<sup>HIGH</sup>.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Prevalências das co-infecções por <i>S. mansoni</i> e geo-helmintos nas áreas endêmicas avaliadas neste estudo .....	51
Tabela 02	Características da população estudada .....	51
Tabela 03	Painel de anticorpos utilizados nos ensaios funcionais por citometria de fluxo .....	59
Tabela 04	Painel de anticorpos utilizados nos estudos de aspectos fenotípicos de PBMC .....	60
Tabela 05	Freqüência de LB CD19 <sup>+</sup> e LT CD3 <sup>+</sup> , após estimulação <i>in vitro</i> .....	68
Tabela 06	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> e LT CD8 <sup>+</sup> após estimulação <i>in vitro</i> ....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Características parasitológicas dos voluntários participantes do estudo.....	52
Figura 02	Associações entre intensidade de infecção por <i>S. mansoni</i> com idade e com intensidade de infecção por ancilostomídeos.....	52
Figura 03	Figura ilustrativa dos passos utilizados para a análise dos dados por citometria de fluxo.....	62
Figura 04	Reatividade de PBMC obtidas de indivíduos residentes em áreas endêmicas avaliada pelo método de detecção de <sup>3</sup> H-Td incorporada ao DNA celular após estimulação <i>in vitro</i> .....	65
Figura 05	Reatividade de PBMC obtidas de indivíduos residentes em áreas endêmicas avaliada pelo método de detecção de BrdU incorporado ao DNA celular após estimulação <i>in vitro</i> .....	65
Figura 06	Correlação entre a reatividade de PBMC avaliada pelos métodos de detecção de <sup>3</sup> H-Td ou BrdU incorporados ao DNA celular após estimulação <i>in vitro</i> .....	66
Figura 07	Reatividade de LT CD3 <sup>+</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	68
Figura 08	Reatividade de LB CD19 <sup>+</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	69
Figura 09	Reatividade de LT CD4 <sup>+</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	71
Figura 10	Reatividade de LT CD8 <sup>+</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	71
Figura 11	Razão entre LT auxiliares e LT citotóxicos/supressores (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ) após estimulação <i>in vitro</i> .....	72
Figura 12	Razão entre LT auxiliares reativos e LT citotóxicos/supressores reativos (CD4 <sup>+</sup> BrdU <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> BrdU <sup>+</sup> ) após estimulação <i>in vitro</i> .....	72
Figura 13	Histograma representativo da freqüência de linfócitos expressando alta densidade do marcador CD4 de superfície (LT CD4 <sup>HIGH</sup> ) após estimulação <i>in vitro</i> com SWAP.....	73
Figura 14	Histograma de freqüência demonstrando LT CD4 <sup>+</sup> reativos (CD4 <sup>+</sup> BrdU <sup>+</sup> ) com alta densidade do marcador CD4 e LT CD4 <sup>+</sup> não reativos (CD4 <sup>+</sup> BrdU <sup>-</sup> ) com densidade média de expressão após estimulação <i>in vitro</i> com SWAP.....	74
Figura 15	Freqüência de LT CD4 <sup>HIGH</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	75
Figura 16	Reatividade de LT CD4 <sup>HIGH</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	75
Figura 17	Influência dos antígenos SEA e SWAP na freqüência ou reatividade de LT CD4 <sup>HIGH</sup> .....	76



Figura 18	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> expressando os marcadores de ativação celular CD69, CD25 e HLA-DR após estimulação <i>in vitro</i> .....	78
Figura 19	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> expressando os marcadores de ativação celular CD62L e CD38 após estimulação <i>in vitro</i> .....	79
Figura 20	Densidade de expressão (MFI) do marcador de ativação celular CD62L em LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	80
Figura 21	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> expressando o marcador de co-estimulação CTLA-4 após estimulação <i>in vitro</i> .....	81
Figura 22	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> expressando alta densidade do marcador de superfície CD25 (CD25 <sup>HIGH</sup> ) após estimulação <i>in vitro</i> .....	82
Figura 23	Freqüência de LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> expressando os marcadores de células de memória CD44, CD45RA e CD45RO após estimulação <i>in vitro</i> .....	84
Figura 24	Densidade de expressão (MFI) dos marcadores de memória CD44, CD45RA e CD45RO em LT CD4 <sup>+</sup> convencionais e LT CD4 <sup>HIGH</sup> após estimulação <i>in vitro</i> .....	85
Figura 25	Razão CD45RA <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> e CD45RO <sup>+</sup> /CD45RO <sup>-</sup> em LT CD4 <sup>+</sup> convencionais LT CD4 <sup>HIGH</sup> e após estimulação <i>in vitro</i> .....	86
Figura 26	Associação negativa entre a intensidade de infecção por <i>S. mansoni</i> versus freqüência e reatividade de LT CD4 <sup>HIGH</sup> após estimulação <i>in vitro</i> por SEA.....	88
Figura 27	Associações da reatividade LB CD19 <sup>+</sup> induzida por SEA com a intensidade de infecção por <i>S. mansoni</i> e com outros parâmetros imunológicos.....	89

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AB:** antígenos A,B do sistema sangüíneo eritrocitário ABO

**aC:** antes de Cristo

**AKT:** atividade tirosina quinase

**APC:** célula apresentadora de antígenos

**ANOVA:** análise de variância

**Anc:** sigla usada neste trabalho para identificar ancilostoídeos

**Asc:** sigla usada neste trabalho para identificar *Ascaris lumbricoides*

**B7:** família de moléculas de superfície que se ligam a moléculas co-estimuladoras

**BCA:** ácido bicinrôninico

**BCA<sup>TM</sup>:** Kit para dosagem de proteínas que utiliza o ácido bicinrôninico

**BCG:** Bacilo atenuado do *Mycobacterium bovis* (Bacilo Calmette Guérin)

**bcl-2:** proteína codificada pelo gene bcl-2 que foi primeiramente demonstrado em linfoma de células B. Esta proteína se liga à membrana mitocondrial e previne a apoptose.

**BCR:** receptor de células B

**BD:** Becton Dickinson

**BrdU (BudR; Br-dU):** 5-Bromo-2-deoxiUridina

**BSA:** albumina bovina sérica

**cc:** cultura controle, isto é, cultura não estimulada

**CC:** quimiocinas que possuem duas cisteínas adjacentes próximas à região N-terminal

**CCR5:** receptor 5 das quimiocinas do grupo CC

**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:** molécula de superfície de linfócitos T

**CD3 $\zeta$ :** cadeia peptídica  $\zeta$  que, juntamente com as cadeias  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  formam o complexo CD3

**CD4:** molécula de superfície de linfócitos T com função auxiliadora

**CD8:** molécula de superfície de linfócitos T com funções citotóxicas e, ou supressoras

**CD19:** molécula de superfície de linfócitos B

**CD25:** cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, marcador de ativação celular intermediária e de células reguladoras

**CD28:** molécula de superfície co-estimuladora de linfócitos T

**CD38:** molécula de superfície, marcador de ativação celular inicial

**CD44:** molécula de superfície de células de memória

**CD45RA:** isoforma leve da molécula de superfície celular (CD45), marcador de células não primadas por antígenos

**CD45RO:** isoforma pesada da molécula de superfície celular (CD45), marcador de células de memória

**CD62L:** molécula de adesão celular (selectina) de células não primadas

**CD69:** molécula de superfície, marcador de ativação celular inicial

**CD71:** receptor de transferrina humana que é expresso sobre monócitos, linfoblastos em proliferação e na maioria das células de linhagens tumorais

**CD80:** molécula de superfície celular de APC membro da família B7

**CD86:** molécula de superfície celular de APC membro da família B7

**CD152:** molécula de superfície co-estimuladora de linfócitos T (CTLA-4)

**CdO:** Córrego do Onça, localidade rural do município de Governador Valadares que é endêmica para helmintoses

**CE:** cultura experimental que recebeu acréscimo de estímulos inespecíficos (PHA) ou específicos (SEA ou SWAP)

**Ci:** Currie, medida de atividade radioativa

**CMBlast:** meio de cultivo celular suplementado

**CMV:** Citomegalovírus

**CO:** sigla para identificar grupo de indivíduos apresentando a forma intestinal da infecção por *S. mansoni* e co-infecção com geo-helmintos

**CO<sub>2</sub>:** fórmula química da molécula de dióxido de carbono

cpm: contagens por minuto

**CPqRR:** Centro de Pesquisas René Rachou

**CTLA-4:** antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos

**CXC:** quimiocinas que possuem dois resíduos de cisteínas separados por outro aminoácido

**CXCL12:** quimiocina 12 do grupo CXC, também denominada SDF-1 $\alpha/\beta$

**CXCR4:** receptor 4 das quimiocinas do grupo CXC

**DALYs:** do inglês, "Disability Adjusted Life Years", ou seja, deficiências ajustadas por anos de vida

**DNA:** ácido deoxiribonucleotídeo

**DNase I:** deoxiribonuclease I

**ELISA:** ensaio imunoenzimático

**epg:** ovos por grama de fezes

**et al:** do latim, significa colaboradores

**Facs:** do inglês, “Fluorescence Activated Cell Sorter”

**FIGs.:** figuras

**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

**G0:** do inglês, “Gap 0”, fase ou estado no qual células viáveis permanecem sem comprometimento com a progressão no ciclo celular

**HCV:** vírus da hepatite C

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana

**HIVgp120:** proteína do vírus HIV

**<sup>3</sup>H-Td:** [metil-<sup>3</sup>H] timidina, ou seja, timidina marcada com trítio

**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

**IE:** índice de estimulação

**IgA:** imunoglobulina da classe A

**IgG1:** isotipo 1 da imunoglobulina da classe G

**IgG4:** isotipo 4 da imunoglobulina da classe G

**IgE:** imunoglobulina da classe E

**IgM:** imunoglobulina da classe M

**IFN:** interferon

**IL:** interleucina

**Kunits:** unidades multiplicadas por mil

**L:** litro

**L1 - L5:** 1º a 5º estágios de desenvolvimentos de larvas de helmintos

**LB:** linfócitos B

**Ick:** proteína tirosina quinase membro da família Src

**LT:** linfócitos T

**M:** molar

**MEM:** meio essencial mínimo, solução nutritiva para cultivo celular

**MFF:** Max Facs Fix, solução fixadora de células para ensaios de citometria

**mg:** miligrama,  $10^{-3}$  grama

**µg:** micrograma,  $10^{-6}$  grama

**MHC:** do inglês, Main Histocompatibility Complex, ou seja, Complexo de Histocompatibilidade Principal

**mL:** mililitro,  $10^{-3}$  litro

**µL:** micrograma,  $10^{-6}$  litro

**mmol:** milimolar,  $10^{-3}$  molar

**N:** normalidade

**NaN<sub>3</sub>:** fórmula química da molécula de azida sódica

**NE:** nordeste

**NI:** sigla para identificar indivíduos do grupo não infectados por quaisquer helmintos

**NOD:** camundongos diabéticos não obesos. Estes camundongos exibem susceptibilidade espontânea ao desenvolvimento de diabetes mellitus autoimune (tipo 1) dependente de insulina (IDDM)

**O<sub>2</sub>:** fórmula química da molécula de oxigênio

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**p56<sup>Ick</sup>:** proteína tirosina quinase membro da família Src

**pH:** potencial hidrogeniônico

**PPD:** derivado da proteína tuberculina purificada

**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-W:** solução tampão salínico fosfatado para lavagem de células

**PE:** ficoeritrina, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro laranja da luz visível

**PFA:** paraformaldeído

**PHA-P:** fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

**PKB:** proteína quinase B, participa da via de transdução de sinais

**POD:** peroxidase dismutase

**pop:** população

**PPO:** 2,5-difeniloxazole

**POPOP:** 1,4-bis 2-5-fenil-oxazolil-benzeno

**Q1 - Q4:** quadrantes 1 a 4

**Rh:** antígeno Rh<sub>0</sub>(D) do sistema sangüíneo eritrocitário Rh

**RPMI 1640:** solução nutritiva para cultivo celular e que não contém timidina na sua composição química

**r<sub>s</sub>:** coeficiente de correlação de Spearman

**S:** fase de síntese de DNA durante progressão pelo ciclo celular

**Sch:** sigla usada neste trabalho para identificar *Schistosoma mansoni*

**SDF-1 $\alpha/\beta$ :** do inglês: stromal cell-derived factor 1, ou seja, fator derivado de células do estroma. Também denominada quimiocina CXCL12.

**Shc:** proteína adaptadora da via de transdução de sinais

**Src:** família de proteínas com atividade tirosina quinase

**SE:** sudeste

**SEA:** solução antigênica de ovos de *S. mansoni*

**ShuN:** soro humano normal AB Rh+

**sp.:** espécie

**SSC:** sigla para parâmetro de complexidade ou granulosidade intracelular em ensaios de citometria de fluxo

**SWAP:** do inglês, “Solution Worm Adult Protein”, solução antigênica de vermes adultos de *S. mansoni*

**TA:** temperatura ambiente

**TC:** tricolor, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro vermelho da luz visível

**TCR:** receptor de células T

**Th:** linfócitos T auxiliares (do inglês, h = helper)

**Th0:** células T CD4<sup>+</sup> indiferenciadas que apresentam um padrão misto de secreção de citocinas do tipo 1 e do tipo 2

**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 alfa

**Tr:** células T reguladoras

**TT:** toxóide tetanus

**Tween 20:** polioxietilensorbitano monolaurato

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**VdG:** Virgem das Graças, localidade rural do Município de Ponto dos Volantes – MG que é endêmica para helmintoses

**VzV:** varicela-zoster vírus

**x g:** giros por minuto

**XTO:** sigla para identificar grupo de indivíduos apresentando a forma intestinal da infecção por *S. mansoni*

**XX:** número 20 em algarismo romano

**ZAP-70:** proteína tirosina quinase associada à cadeia CD3 $\zeta$

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa, letra a do alfabeto grego
$\beta$	Beta, letra b do alfabeto grego
$\delta$	Delta, letra d do alfabeto grego
$\gamma$	Gama, letra g do alfabeto grego
$\mu$	Micro, letra m do alfabeto grego
$\rho$	Rô, letra r do alfabeto grego
$\varepsilon$	Épsilon , letra e do alfabeto grego
$\zeta$	Zeta, letra z do alfabeto grego
®	Marca registrada
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
<	Menor
°C	Graus centígrados
%	Percentual



# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>26</b>
1.1 Importância e epidemiologia das helmintoses.....	26
1.2 Biologia dos helmintos.....	29
1.2.1 Biologia dos ancilostomídeos.....	29
1.2.2 Biologia do <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	30
1.2.3 Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	31
1.3 A resposta imune contra parasitos.....	33
1.3.1 Imunologia das helmintoses.....	37
1.3.2 Imunologia da esquistossomose.....	39
1.3.3 Imunologia no contexto das co-infecções helmínticas.....	42
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>46</b>
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos Específicos.....	46
<b>3. População estudada e Metodologia.....</b>	<b>47</b>
3.1 Seleção das áreas endêmicas.....	47
3.2 Critérios de inclusão dos participantes.....	48
3.3 Definição dos grupos avaliados.....	49
3.4 Caracterização da população estudada.....	49
3.5 Obtenção de sangue total.....	53
3.6 Produção dos antígenos brutos de <i>S. mansoni</i> .....	53
3.7 Obtenção de PBMC.....	54
3.8 Blastogênese para detecção de <sup>3</sup> H-Td incorporada ao DNA.....	55
3.9 Blastogênese para detecção de BrdU incorporado ao DNA.....	56
3.10 Detecção da proliferação celular por imunofluorescência.....	58
3.11 Ensaio de imunofenotipagem celular.....	59

3.12 Aquisição e análise dos dados.....	60
3.13 Análise estatística dos dados.....	62
<b>4. Resultados.....</b>	<b>64</b>
4.1 Reatividade <i>in vitro</i> de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de <sup>3</sup> H-Td ou BrdU incorporados ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular.....	64
4.2 Freqüência e reatividade <i>in vitro</i> de LT CD3 <sup>+</sup> e LB CD19 <sup>+</sup> .....	67
4.3 Freqüência e a reatividade <i>in vitro</i> das subpopulações majoritárias de LT CD4 <sup>+</sup> e de LT CD8 <sup>+</sup> .....	69
4.4 Freqüência e reatividade <i>in vitro</i> da subpopulação minoritária de LT CD4 <sup>HIGH</sup> .....	73
4.5 Aspectos fenotípicos da subpopulação de LT CD4 <sup>+</sup> convencional e da subpopulação de LT CD4 <sup>HIGH</sup> .....	77
4.5.1 Expressão dos marcadores de ativação celular na subpopulação de LT auxiliares.....	77
4.5.2 Freqüência <i>in vitro</i> de LT auxiliares CTLA-4 <sup>+</sup> .....	80
4.5.3 Freqüência <i>in vitro</i> de LT auxiliares CD25 <sup>HIGH</sup> .....	81
4.5.4 Expressão de marcadores de memória celular na subpopulação de LT auxiliares.....	82
4.6 Correlação entre os principais achados sobre os aspectos funcionais e fenotípicos <i>in vitro</i> das populações celulares e outros parâmetros biológicos relacionados às infecções helmínticas.....	87
<b>5. Discussão.....</b>	<b>90</b>
5.1 Reatividade <i>in vitro</i> de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de <sup>3</sup> H-Td ou BrdU incorporados ao DNA .....	90
5.2 Aspectos funcionais <i>in vitro</i> de PBMC.....	92
5.3 Aspectos funcionais e fenotípicos <i>in vitro</i> de LT CD3 <sup>+</sup> e LB CD19 <sup>+</sup> .....	94

5.4 Aspectos funcionais e fenotípicos <i>in vitro</i> das subpopulações majoritárias de LT CD4 <sup>+</sup> e LT CD8 <sup>+</sup> e minoritária de LT CD4 <sup>HIGH</sup> ....	96
5.5 Papel biológico da regulação positiva do marcador CD4.....	100
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>104</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO A</b> - Finalidades dos anticorpos utilizados nos ensaios para avaliação de aspectos funcionais e fenotípicos das populações celulares presentes em culturas de PBMC.....	121
<b>ANEXO B</b> - Cópia do parecer nº: 003/2000 do Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ, aprovando o projeto “Interação entre a genética do hospedeiro e a co-infecção helmíntica”.....	122

## 1. INTRODUÇÃO

*“O indivíduo que pesquisa está emitindo sinais.  
Podem ser captados à distância,  
às vezes não é captado pelo vizinho que está ao lado.  
Mas é isto que é a parte interessante da ciência.  
É haver um outro indivíduo, não importa de onde seja,  
que está interessado no mesmo tema.”*

**Zilton Andrade**

## 1.1 Importância e epidemiologia das helmintoses

Os helmintos formam um grupo diversificado de organismos filogeneticamente não relacionados, pertencentes a dois filos distintos: os vermes cilíndricos classificados no filo Nematelminthes e os vermes planos classificados no filo Plathelminthes. Em ambos os filos, vermes ancestrais de vida livre originaram organismos com hábitos parasitários que são agentes etiológicos de infecções crônicas em hospedeiros imunocompetentes (Maizels *et al.* 2004).

Em termos de saúde pública, os vermes platelmintos do gênero *Schistosoma* são os que causam as maiores prevalências mundiais. Já entre os helmintos nematódeos os vermes transmitidos pelo solo (geo-helmintos) se destacam. Dentre as principais espécies de geo-helmintos com importância médica, podemos citar: *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichura trichiura*, e os parasitos da família Ancylostomatidae - *Ancylostoma duodenale* (primitivamente distribuída na Ásia e região do Mediterrâneo) e *Necator americanus* (originalmente na África subsaariana) (Maizels *et al.* 2004).

Evidências obtidas de estudos paleo-parasitológicos sugerem que helmintos e hospedeiros humanos co-existem a milhares de anos. Neste sentido, foi descrito o encontro de ovos de *Schistosoma haematobium* em tecidos dessecados dos rins de uma múmia egípcia da dinastia XX (1250-1000 aC) (Ruffer 1910 *apud* Araújo & Ferreira 2000). Corroborando este achado, Deelder e colaboradores (1990 *apud* Kloos & David 2002) também relataram a identificação de antígenos de *S. haematobium* em um adolescente egípcio que viveu a aproximadamente 5.000 anos. Estudos em sítios arqueológicos da América do Sul também revelaram a existência de ovos de ancilostomídeos em coprólitos recuperados do intestino de múmias datadas de 7.230 +/- 80 anos (Araújo *et al.* 1981; Ferreira *et al.* 1987 *apud* Araújo & Ferreira 2000).

Apesar das evidências sugestivas de que as infecções helmínticas surgiram a mais de 7.000 anos, elas ainda representam um grande problema médico sanitário e causam endemias em várias regiões do mundo. Nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, a existência de ambientes naturais propícios (exemplo: temperatura, umidade, etc) e o grande número de pessoas vivendo em baixas condições socioeconômicas são fatores que favorecem as altas taxas de prevalência destas endemias.

Segundo dados epidemiológicos estimativos do ano de 2002 da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de dois bilhões de indivíduos estão infectados por

helmintos em todo o mundo. Além disso, 40% de toda a morbidade mundial, excluindo-se aquela relacionada à malária, foram relacionadas às infecções helmínticas. Estima-se também que 300 milhões de indivíduos apresentam elevadas cargas parasitárias que resultam em deficiências para o paciente e em prejuízos socioeconômicos para as nações onde as helmintoses são endêmicas (OMS 2002).

Analisando os dados epidemiológicos das infecções helmínticas isoladas e tomando-se como exemplo a infecção por *A. lumbricoides*, dados estimativos mundiais consideram a infecção acometendo 1,45 bilhões de indivíduos, dos quais 350 milhões apresentam algum tipo de morbidade associada. Além disso, 60 mil mortes por ano estão associadas a esta infecção (OMS 2002).

Quanto aos ancilostomídeos, estima-se que mais de um bilhão de indivíduos estejam infectados, sendo que 150 milhões apresentam algum tipo de morbidade associada (Crompton 2000; OMS 2002). Além disso, apenas no ano de 2002, 65 mil mortes em todo o mundo foram relacionadas às infecções por ancilostomídeos (OMS 2002).

Apenas no continente americano, 135 milhões de indivíduos encontram-se infectados por ancilostomídeos, correspondendo a 35% de prevalência (SABIN VACCINE INSTITUTE 2006). No Brasil, segundo estimativas nacionais para a infecção por ancilostomídeos, observa-se 10 a 40% de prevalência (da Silva 2003). Entretanto, em termos regionais, Fleming e colaboradores (2006) relataram uma prevalência de 68,2% em uma região rural do estado de Minas Gerais.

Considerando-se a infecção por *Schistosoma sp*, pode-se dizer que ela afeta mais de 200 milhões de indivíduos em todo o mundo, dos quais 20 milhões apresentam morbidade grave. Além disso, 15 mil mortes por ano são associadas às seqüelas da infecção por *S. haematobium* (exemplo: o câncer de bexiga e os distúrbios renais) e por *Schistosoma mansoni* (exemplo: a hipertensão porta e a fibrose periportal) (OMS 2002).

Em relação à história natural da infecção no continente americano, o surgimento da esquistossomose ocorreu com o tráfico de escravos africanos durante o período de colonização (Morgan *et al.* 2005). No Brasil, a combinação de fatores, tais como: a existência de grandes corpos d'água com hábitat propício para o desenvolvimento dos planorbídeos susceptíveis, o clima quente e úmido associados a condições sanitárias precárias e ao intenso fluxo migratório interno favoreceu o estabelecimento, expansão e manutenção desta helmintose (Coura & Amaral 2004).

Desde a década de 60, programas de controle da esquistossomose foram implantados no país e obtiveram sucesso no controle da morbidade da doença e/ou relativo sucesso em reduzir os índices de prevalência e os focos isolados. Entretanto, estes programas não interromperam a transmissão nem reduziram as taxas de prevalência a índices inferiores a 5%. Além disso, estes programas não conseguiram evitar a ocorrência de novos focos em áreas antes indenes (Coura & Amaral 2004).

Atualmente, a esquistossomose está presente em 18 estados federativos, sendo endêmica desde o estado do Maranhão (NE) até os estados do Espírito Santo e Minas Gerais (SE). Focos isolados da doença ocorrem nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Norte, Goiás e Tocantins (Coura & Amaral 2004). Estima-se um total de 25 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão, sendo que 2,5 milhões de indivíduos encontram-se infectados (OMS 2001).

Além dos dados de prevalência das infecções helmínticas, a partir de 1990 começaram a se calculadas novas estimativas quantitativas que consideram as taxas de incapacidade física (anemia, retardo no crescimento, etc) e mental (prejuízo no rendimento escolar, problemas cognitivos, etc) associadas a tais infecções. Estas estimativas consideram o número de anos vividos com as deficiências e foram denominadas DALYs (do inglês: Disability Adjusted Life Years, ou seja, Deficiências Ajustadas por Anos de Vida) (OMS 2002).

Segundo estas estimativas, a ancilostomose apresenta 22,1 milhões de DALYs associadas, principalmente a deficiências de ferro e desnutrição. As DALYs para a ascariose eram estimadas em 10,5 milhões e a esquistossomose apresentava DALYs de 4,5 milhões. Porém, esta estimativa para a esquistossomose é considerada subestimada, pois a infecção causa seqüelas muito graves e o tratamento dificulta o cálculo correto desta estimativa. (OMS 2002).

Corroborando a idéia de DALYs subestimada para a esquistossomose, recentemente King e colaboradores (2005) relataram estimativas de incapacidades com pesos 4 a 30 vezes maiores que o peso por incapacidades idade-específica atribuída à esquistossomose no Global Burden of Disease Project (Murray *et al.* 1996), que foi de 0,5%. Estas novas estimativas de incapacidades resultaram de meta-análises realizadas com base em uma revisão sistemática dos trabalhos da literatura (março de 1921 e julho de 2002) que descreviam incapacidades físicas e/ou mentais associadas a todas as formas clínicas da esquistossomose (King *et al.* 2005).

## 1.2 Biologia dos helmintos

Apesar das diferenças filogenéticas e biológicas (exemplo: diferentes ciclos evolutivos, diferentes habitats ocupados pelos vermes adultos no hospedeiro), as infecções causadas pelos geo-helmintos ou pelo *Schistosoma* podem evoluir apresentando desde formas assintomáticas (inaparentes) até formas com morbidade grave, chegando mesmo ao óbito em alguns casos.

Como já descrito na literatura, os ciclos de vida dos helmintos são caracterizados por rápidas mudanças estruturais e fisiológicas que garantem a estes parasitos adaptarem-se à vida em ambientes específicos e com grandes diferenças de osmolaridade, temperatura, tensão de O<sub>2</sub>, entre outras (El-Ansary & Al-Daihan S 2005). Além de garantir plasticidade e adaptabilidade aos parasitos, as rápidas mudanças morfológicas e fisiológicas são fatores importantes que ajudam no escape ao sistema imunológico dos hospedeiros (El-Ansary & Al-Daihan S 2005).

### 1.2.1 Biologia dos ancilostomídeos

As espécies de ancilostomídeos *A. duodenale* e *N. americanus* diferem em aspectos morfológicos, sendo que a primeira espécie possui dentes nas margens da boca (do latim, *Ancylos* = curvo e *Toma* = boca) e a outra espécie (do latim, *Necator* = assassino) possui lâminas cortantes no lugar de dentes (Rey 2001).

A patogenia da ancilostomose pode ser causada por ação traumática (migração das larvas), ação irritativa dos vermes (irritação intestinal) e ação espoliadora dos vermes (anemia e hipoproteinemia). A anemia ferropriva causada pela perda de sangue induzida pela ancilostomose é um grave problema de saúde pública, que pode gerar diversas conseqüências, principalmente em crianças, adolescentes do sexo feminino e mulheres grávidas (Crompton 2000).

O ciclo de vida dos ancilostomídeos é monoxênico, apresentando duas fases distintas. Na fase externa ou exógena, estágios larvais de vida livre desenvolvem-se no solo até a forma infectante. Na fase interna ou endógena, os parasitos sexualmente maduros vivem no intestino delgado (duodeno) do hospedeiro.

O ciclo evolutivo começa com larvas filarióides (L3) infectantes penetrando ativamente através da pele ou da mucosa dos hospedeiros e alcançando os



capilares sangüíneos ou linfáticos. Migrando pelo sistema circulatório, estas larvas alcançam os pulmões e se transformam em larvas de 4º estágio, que continuam a migração em direção à faringe e são deglutidas, chegando finalmente ao intestino delgado onde desenvolvem maturidade sexual.

Vermes adultos copulam no duodeno e liberam os ovos que são eliminados juntamente com as fezes dos hospedeiros. Nos solos com condições naturais favoráveis (temperatura, umidade e oxigenação) ocorre a formação de larvas rabditóides (L1) e, em seguida, a eclosão. As larvas L1 liberadas sofrem duas mudas até transformarem-se nas larvas infectantes, que penetram ativamente em novo hospedeiro, completando o ciclo.

É importante ressaltar que a infecção também pode ser passiva, pela ingestão das larvas infectantes. Neste caso, as larvas L3 alcançam diretamente o intestino delgado, atravessam a mucosa intestinal e infectam as células de Lieberkühn, onde se transformam em larvas de 4º estágio. As larvas L4 retornam, então, ao intestino delgado e desenvolvem-se até o estágio adulto (Crompton 2000).

### 1.2.2 Biologia do *Ascaris lumbricoides*

A espécie *A. lumbricoides* é a mais cosmopolita de todos os helmintos, sendo descrita em várias regiões do mundo e acometendo todas as faixas etárias. Apesar de cosmopolita, é mais comum nas regiões tropicais e subtropicais devido à presença de condições naturais favoráveis à sobrevivência dos ovos nos solos.

Como descrito para os ancilostomídeos, os parasitos sexualmente maduros vivem no intestino delgado do hospedeiro vertebrado, entretanto, o hábitat do *A. lumbricoides* é a região do jejuno e do íleo.

A patogenia associada à ascariose é variada devido às migrações sistêmicas das larvas, podendo ocorrer hemorragia da mucosa intestinal, hemorragia pulmonar e reação local eosinofílica em alvéolos (broncopneumonia) e obstruções intestinais (durante infecções massivas). Abscessos também podem se formar em diversos órgãos devido a localizações ectópicas destes helmintos (Heggors *et al.* 1995).

O ciclo evolutivo também é muito semelhante ao ciclo dos ancilostomídeos, apresentando poucas diferenças. A infecção é passiva e ocorre pela ingestão de ovos embrionados contendo a larva infectante de 3º estágio (L3) que eclodem no intestino delgado. As larvas L3 atravessam a parede do intestinal, entram no sistema

circulatório e migram até os pulmões, onde sofrem duas mudas. Em seguida, as larvas L5 migram até a faringe e, se deglutidas, retornam ao intestino delgado e maturam.

Os parasitos sexualmente maduros copulam e liberam ovos embrionados (contendo larvas de 1º estágio) que alcançam o solo junto com as fezes. Nos solos os embriões sofrem duas mudas até transformarem-se em larvas infectantes (Hegggers *et al.* 1995).

### 1.2.3 Biologia do *Schistosoma mansoni*

Diferentemente dos geo-helminthos, o hábitat dos vermes adultos do *S. mansoni* é endovenoso. O primeiro relato da doença ocorreu em 1852, na cidade do Cairo (Egito) quando Theodor Bilharz descreveu a presença destes vermes nas veias mesentéricas durante necrópsia (Bilharz 1852 apud Coura & Amaral RS 2004). Em 1907 o pesquisador Sambon descreveu a espécie *S. mansoni* (Sambon 1907 apud Coura & Amaral 2004), sendo que a presença desta espécie foi confirmada no Brasil através da descrição de casos registrados por Pirajá da Silva no ano de 1908 (Pirajá da Silva 1908 apud Coura & Amaral 2004).

O ciclo evolutivo deste parasito é heteroxênico, ou seja, os vermes necessitam de um hospedeiro intermediário (onde reproduzem de forma assexuada) e um hospedeiro definitivo (no qual reproduzem de forma sexuada) para completarem o ciclo de vida. Além disso, o ciclo envolve dois estágios larvais de vida livre que se desenvolvem em corpos d'água com iluminação, temperatura e oxigenação adequadas.

Descrito independentemente por Leiper no Egito (Leiper 1915) e por Lutz no Brasil (Lutz 1916 apud Coura & Amaral 2004), o ciclo começa com a penetração ativa das larvas infectantes (cercárias) através da pele ou mucosa dos hospedeiros definitivos. Após a penetração as cercárias sofrem transformações morfológicas e fisiológicas tornando-se esquistossômulos, migram pelo sistema circulatório através de vários órgãos (incluindo coração e pulmões). Os esquistossômulos que chegam ao sistema porta intra-hepático desenvolvem maturidade sexual.

Os vermes adultos acasalam-se e migram para o ramo inferior da veia mesentérica onde realizam a postura de ovos. Uma parte dos ovos liberada na

corrente sangüínea atravessa a parede vascular e intestinal e é liberada, juntamente com as fezes, para o meio ambiente. Os ovos que alcançam corpos d'água com condições naturais favoráveis eclodem, liberam larvas móveis e ativas (miracídios) que nadam ativamente e penetram em caramujos susceptíveis (planorbídeos do gênero *Biomphalaria*).

No caramujo os miracídios se reproduzem e transformam-se em esporocistos primários e secundários. Os esporocistos secundários se transformam em cercárias (larvas infectantes móveis e ativas) que deixam o caramujo e nadam até encontrar um hospedeiro definitivo susceptível (marsupiais e mamíferos, incluindo o homem), no qual penetram ativamente, completando o ciclo de vida.

Considerando que o casal de vermes adultos do *S. mansoni* vive nas veias mesentéricas onde realizam a postura, uma parte dos ovos pode ser transportada pela corrente sangüínea até o fígado ou o baço, onde fica retida nos tecidos. As secreções glandulares de miracídios presentes nos ovos férteis que ficam aprisionados têm ação tóxica e imunogênica com conseqüente reação inflamatória granulomatosa que pode originar lesões cumulativas nos tecidos afetados e complicações relacionadas à morbidade grave da doença (Wynn *et al.* 2004).

Considerando-se a história natural e a evolução clínica da esquistossomose, esta doença pode apresentar duas fases distintas: aguda e crônica. Em áreas consideradas hiperendêmicas (taxas de infecção > 90%), a fase aguda da doença é rara, sendo mais comum e apresentando maior gravidade nas áreas não endêmicas (Gelfand 1964).

A fase aguda pode ser dividida em pré-postural e pós-postural, sendo que a primeira fase inicia-se com a penetração das cercárias e pode durar de 10 a 30 dias. Nesta fase, a dermatite cercariana é o sintoma clássico, caracterizada por prurido intenso e erupções urticariformes (Torres 1976), mas pode ocorrer também febre, mal-estar, anorexia e intensa eosinofilia (Barbosa *et al.* 2001; Wynn *et al.* 2004). Além disso, estudos com infecções experimentais em macacos têm relatado a ocorrência de morte nesta fase. As mortes foram associadas à presença de toxinas circulantes provenientes de vermes mortos e de secreções glandulares produzidas por esquistossômulos (Fairley 1951).

A fase aguda pós-postural inicia-se a partir do 15º ou 20º dia após exposição, sendo que estudos imunológicos em modelos experimentais relatam que a reação de hipersensibilidade do tipo granulomatosa (granulomas) se inicia nesta fase (Grzych *et al.* 1991).

A fase crônica da esquistossomose é graduada de acordo com a gravidade da doença e pode ser classificada como forma intestinal, hepatointestinal e hepatosplênica, sendo que esta última pode ser subdividida em hepatosplênica compensada ou descompensada. A existência e a extensão de fibrose hepática ou intestinal, avaliadas através de exames de ultra-som, determinam o grau de morbidade da esquistossomose.

A morbidade grave é rara (5 a 10%) e se caracteriza por fibrose de Symmers e fibrose periportal (Cheever & Andrade 1967). O desenvolvimento de comprometimento intestinal, hepático e/ou esplênico se deve às obstruções dos ramos intra-hepáticos da veia porta, que podem levar ao surgimento de circulação colateral intra-hepática e esofagiana, hipertensão portal, hepatoesplenomegalia e ascite (Cheever & Andrade 1967).

A forma crônica intestinal é muito comum nas áreas endêmicas (90 a 95%) e pode ser assintomática ou apresentar sintomatologia restrita a desconforto abdominal e diarreia mucossanguinolenta. Esta forma clínica está associada a vários eventos imunossupressores que serão discutidos mais detalhadamente abaixo.

### **1.3 A resposta imune contra parasitos**

O sistema imune dos vertebrados é composto por um repertório de mecanismos de defesa induzíveis que permitem o reconhecimento de antígenos (resposta induzida) e o desenvolvimento de diferentes funções efetoras que efetivamente eliminam muitos dos parasitos (Janeway *et al.* 2001).

A indução de subpopulações de células T auxiliaadoras é essencial para a eficácia da resposta imune antígeno-específica, sendo que erros na indução da resposta de células T podem resultar em resposta imune ineficaz e, ou imunopatologias (Graham 2002).

As células do sistema imune humano podem permanecer viáveis por mais de 20 anos sem sofrer divisão celular (Buckton *et al.* 1967 apud Beverley & Maini 2000). Isto é, algumas células do sistema imune podem permanecer na fase G0 do ciclo celular, sendo que a exposição ao antígeno pode ativá-las e induzir a saída para a fase G1, permitindo a progressão do ciclo celular (Pardee 1989). Entretanto, a ativação celular

também pode induzir as células do sistema imune a sofrerem um processo de anergia ou apoptose, levando à supressão da resposta e tolerância (Sun *et al.* 2003).

Portanto, a proliferação celular é um evento precoce na resposta imune antígeno-específica, sendo a quantificação da taxa de proliferação celular uma ferramenta muito utilizada para avaliar a atividade funcional de células do sistema imune (Gazzinelli *et al.* 1983; Gazzinelli *et al.* 1985; Gaines *et al.* 1996; Bahia-Oliveira *et al.* 1992; Viana *et al.* 1994; Malaquias *et al.* 1997; Mehta & Maino 1997; Groux *et al.* 1998; Hellerstein 1999; Iezzi *et al.* 1999; Reome *et al.* 2000; Mduluzza *et al.* 2001; Rosato *et al.* 2001; Corrêa-Oliveira *et al.* 2002; Sun *et al.* 2003).

A progressão do ciclo celular depende da integração de sinais de ativação e co-estimulação (Gudmundsdottir *et al.* 1999). A ativação celular inicia-se com a exposição a estímulos mitogênicos ou antigênicos que pode ser mediada por receptores de células T (TCR) ou por receptores de células B (BCR). A co-estimulação é induzida pela ligação de moléculas, tais como o CD28 da superfície de linfócitos T com os ligantes específicos presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos - APC (exemplo: CD80 e CD86, membros da família B7) (Manzotti *et al.* 2002).

Assim, as células T que são ativadas na presença de sinais de co-estimulação proliferam e originam clones antígeno-específicos. Em seguida, através de mecanismos de diferenciação, os clones de linfócitos transformam-se em células efetores/memória que, finalmente, serão responsáveis pelos mecanismos efetores da resposta imune celular (Beverley & Maini 2000; Rosato *et al.* 2001).

A ativação e diferenciação celular são processos caracterizados por alterações na expressão de moléculas de superfície dos linfócitos, sendo estas expressões diferenciadas importante nos estudos sobre a resposta imune antígeno-específica. Neste sentido, células não primadas têm sido caracterizadas como sendo aquelas CD62L<sup>HIGH</sup> e CD45RA<sup>+</sup>, sendo que a perda gradual destas moléculas é uma indicação de ativação celular (Dutton *et al.* 1998). Além disso, a expressão das moléculas CD69, CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2) e HLA-DR (MHC-II) têm sido utilizadas como evidências de ativação celular inicial, intermediária e tardia, respectivamente (Caruso *et al.* 1997; Black *et al.* 2002).

Considerando-se a resposta imune celular e o papel de diferentes populações celulares no desenvolvimento da imunidade antígeno-específica, a subpopulação de LT auxiliares CD4<sup>+</sup> representa um papel destacado no desenvolvimento da patogênese de várias infecções. Neste sentido, estudos em modelo murino

utilizando a infecção pelo *S. mansoni* e outras infecções têm demonstrado que o processo de diferenciação pode gerar duas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> distintas em relação ao tipo de citocinas por elas produzidas.

Células auxiliares do tipo 1 (Th1) que são produtoras de citocinas, tais como IL-2 e IFN- $\gamma$ , estariam associadas à imunidade celular e hipersensibilidade do tipo tardia (Mosmann *et al.* 1986; Mosmann & Sad 1996). Células auxiliares do tipo 2 (Th2), produtoras de citocinas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 estariam envolvidas com a produção de anticorpos e com a indução de hipersensibilidade imediata (Mosmann *et al.* 1986; Fiorentino *et al.* 1991). Além destas subpopulações, existe um conjunto de células T não diferenciadas e produtoras de um padrão misto de citocinas que originam as duas subpopulações Th1 e Th2, denominadas Th0 (Mendoza 2006).

Apesar de ter sido descrita a presença de células Th1 e Th2 com funções bem definidas e opostas em modelo murino, uma divisão tão característica não é observada em estudos envolvendo humanos, nos quais se observa apenas uma tendência à polarização da resposta imune em direção a um tipo ou outro.

A ausência de divisão característica entre as respostas imunes Th1 e Th2 em estudos humanos pode ser devida a dificuldades, inerentes a tais estudos, de padronização de diversos fatores, tais como: presença de diversas fases evolutivas do parasito no hospedeiro, resposta imune diferenciada a cada estágio evolutivo, diferentes graus de exposição e formas clínicas, entre outros.

Além disso, esta ausência de polarização pode, ainda, demonstrar o caráter importante do balanço da resposta imune no desenvolvimento de susceptibilidade e resistência às infecções. A importância do balanço da resposta imune no desenvolvimento de patogênese já foi descrita anteriormente pelo nosso grupo (Corrêa-Oliveira *et al.* 1998) nas infecções por *S. mansoni* e também pelo grupo de (Mduluzza *et al.* 2001) na infecção por *S. haematobium*.

Ainda em relação à subpopulação de LT CD4<sup>+</sup>, evidências recentes têm sugerido que a regulação positiva do marcador CD4 é um evento precoce e universal no processo de ativação celular em resposta a peptídeos antigênicos e pode ser utilizada para identificar populações celulares reativas a antígenos específicos. Neste contexto, alguns trabalhos têm descrito uma população minoritária de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentando elevada densidade de expressão do marcador CD4, denominados LT CD4<sup>HIGH</sup> (Ridgway *et al.* 1998; Costa *et al.* 2000; Ebert & McColl SR 2001; McCabe *et al.* 2001; Novak *et al.* 2001; O'Connor & Devaney 2002).

O percentual destas células CD4<sup>HIGH</sup> na circulação (isto é, antes de estimulação *in vitro*) é muito reduzido, representando menos de 0,4% das células vivas (Ridgway *et al.* 1998). Porém, após 96 horas de estimulação *in vitro* o percentual das mesmas aumenta sensivelmente (10 a 20% das células vivas). As células CD4<sup>HIGH</sup> também têm sido descritas como reativas a antígenos convencionais (Ridgway *et al.* 1998; Novak *et al.* 1999 e 2001; McCabe *et al.* 2001; O'Connor & Devaney 2002) com possível participação no desenvolvimento de imunopatologias, tais como o diabetes em camundongos NOD (Lejon & Fathman 1999; Reijonen *et al.* 2002 e 2003) ou as reações hospedeiro versus transplante (Krieger *et al.* 2000).

Como visto acima, a ativação exacerbada de células T pode causar imunopatologias, sendo que falhas na ativação podem comprometer a imunidade contra patógenos. Portanto, a ativação é um processo altamente regulado, sendo controlada em vários pontos, não apenas pela interação dos receptores com os antígenos, mas também por sinais co-estimuladores adicionais e/ou por moléculas inibidoras que podem ser solúveis ou de superfície (Manzotti *et al.* 2002).

A interação entre a molécula CD28 de LT com as moléculas CD80 e CD86 das APC é um exemplo de sinal co-estimulador que induz a progressão do ciclo celular e a expressão de citocinas. Portanto, a interação destas moléculas é um ponto de regulação da ativação celular.

O antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, também denominado CD152) expresso na superfície de linfócitos T ativados compete com a molécula CD28 pelos sítios de ligação às moléculas CD80 e CD86, atuando, assim, como um regulador negativo da ativação celular (Manzotti *et al.* 2002; Steel & Nutman 2003; Zouain *et al.* 2004). Neste sentido, a expressão constitutiva de moléculas CTLA-4 em células T reguladoras (Tr) murinas e humanas foi descrita por diversos autores (Takahashi *et al.* 2000; Dieckmann *et al.* 2001; Birebent *et al.* 2004; Dieckmann *et al.* 2005), sendo que a ação reguladora desta proteína foi evidenciada em vários trabalhos da literatura (Manzotti *et al.* 2002; Birebent *et al.* 2004).

Evidências experimentais sugerem que a expressão de CTLA-4 interfere com eventos de transdução de sinais intracitoplasmáticos regulados por STAT5 por competir com este fator de transcrição, sendo que esta competição parece ser importante para a função da molécula CTLA-4 (Srahna *et al.* 2005).

A memória celular é outro mecanismo da resposta imune e pode ser definida como uma resposta alterada de um animal em seguida à re-exposição ao mesmo antígeno sendo, em geral, mais rápida e intensa (Dutton *et al.* 1998).

A diferenciação em células de memória é outro processo bastante complexo, também caracterizado pela expressão diferencial de moléculas de superfície celular. Assim, estudos fenotípicos utilizam a combinação de diferentes marcadores para caracterizar as células de memória, tais como a alta expressão das moléculas CD44 (CD44<sup>HIGH</sup>) e da isoforma de alto peso molecular CD45RO, combinada com a baixa expressão da molécula CD62L e dos marcadores de ativação CD25 e CD69 (Dutton *et al.* 1998).

Em suma, a resposta imune antígeno-específica é caracterizada por reconhecimento do antígeno, ativação, proliferação e diferenciação em células efetoras/memória que serão responsáveis pelos mecanismos imunes efetores (Janeway *et al.* 2001). Assim, a avaliação do perfil de expressão de marcadores de ativação/diferenciação e da taxa de proliferação celular é uma excelente ferramenta para o estudo da resposta imune antígeno-específica. Neste contexto, Rosato e colaboradores (2001), utilizaram análises simultâneas da progressão no ciclo celular e da expressão de marcadores de superfície em PBMC e células T humanas estimuladas com o antígeno toxóide tetânico (TT) e demonstraram haver estimulação seletiva de células T CD4<sup>+</sup>.

Além disso, evidências obtidas de análises simultâneas de fenótipos de ativação e proliferação celular demonstraram que estes eventos podem ser independentes. Estudos realizados com células de indivíduos saudáveis (Caruso A *et al.* 1997) e de pacientes portadores de artrite idiopática juvenil (Black *et al.* 2002) demonstraram que as aquisições dos marcadores de ativação CD69, CD25, CD71 e HLA-DR não se correlacionaram com proliferação celular. Do mesmo modo, Lee e colaboradores (2004) utilizaram extratos da bactéria oral *Treponema denticola* para estudar a resposta imune e demonstraram que estes extratos interferiram com a linfoproliferação por impedir as células de entrarem na fase S do ciclo celular. Contudo, estes extratos bacterianos não inibiram a expressão dos marcadores de ativação celular CD25 e CD69.

### 1.3.1 Imunologia das helmintoses

Os helmintos representam ótimos exemplos de patógenos multicelulares complexos que desenvolvem doenças crônicas e sobrevivem por vários anos (em média 5 a 10 anos) no hospedeiro humano imunocompetente, a despeito de uma



forte resposta imune induzida por eles. Neste sentido, avaliações da prevalência da infecção por ancilostomídeos e da indução de resistência a infecções e/ou reinfecções mostraram resultados controversos.

Estudos sobre as infecções por *A. lumbricoides* e ancilostomídeos na África do Sul, relataram que a prevalência da ascariose diminuiu com o aumento da idade, sugerindo resistência adquirida, sendo que a prevalência da ancilostomose permaneceu constante em todas as faixas etárias (Schutte *et al.* 1981). Todavia, um outro estudo relatou um aumento na prevalência da ancilostomose com a idade, até se atingir um platô, a partir do qual permanecia constante (Behnke 1987).

Contrastando com estes resultados, a equipe de Hawell-Elkins descreveu uma curva de prevalência para a ancilostomose que apresentava uma forma convexa, demonstrando uma diminuição em indivíduos idosos que é sugestiva de resistência adquirida com a idade (Hawell-Elkins *et al.* 1988).

Uma explicação para a variabilidade de resultados descritos na literatura é que estes estudos não levam em consideração os fatores genéticos e/ou as diferentes taxas de exposição dos participantes avaliados. Bethony e colaboradores (2002) relataram que estes são importantes aspectos que influenciam a prevalência e a intensidade das infecções helmínticas.

Quanto ao desenvolvimento de resposta imunológica contra a ancilostomose, foi relatado o desenvolvimento de resposta imune humoral significativa contra antígenos do parasito, entretanto, esta imunidade humoral não foi protetora (Behnke 1987). Outro experimento, utilizando ensaios de proliferação de PBMC, relatou o desenvolvimento de resposta celular contra antígenos derivados de larvas de *N. americanus* que também não era efetiva no combate a reinfecções (Taylor & Turton 1976).

Contudo, em relação à imunidade contra a infecção por *S. mansoni*, a existência de associação entre os níveis de anticorpos séricos e a imunidade passiva (de mãe para filho) foi sugerida em humanos (Montesano *et al.* 1999; Attallah *et al.* 2003) e também em animais experimentais (Knopf & Coghlan 1989). Além disso, estudos experimentais utilizando coelhos infectados com cercárias atenuadas demonstraram que a transferência passiva do soro destes coelhos para camundongos susceptíveis conferiu proteção contra o desafio com *S. mansoni* (Fallon *et al.* 1996).

Em relação ao perfil de resposta imune celular, a tendência à polarização da resposta em direção ao pólo Th2 e a indução de mecanismos imunomoduladores

são características comuns de muitos helmintos (Quinnell *et al.* 1995; Pritchard & Walsh 1995; Rumbley *et al.* 1999; Maizels *et al.* 2004). Além disso, tem sido demonstrada uma associação entre a resposta imune Th2 e uma carga reduzida de helmintos no intestino (Pritchard *et al.* 1997).

Considerando-se que a associação parasito-hospedeiro deve ter surgido ao acaso, com o decorrer de milhares de anos, uma série de adaptações pode ter ocorrido, tanto no parasito quanto no hospedeiro. Vários autores têm descrito a modulação da resposta imune do hospedeiro como uma estratégia evolutiva de muitos patógenos que induzem doenças crônicas (Damian 1997; Maizels & Yazdanbakhsh 2003).

Corroborando esta hipótese, evidências experimentais demonstram que as infecções helmínticas crônicas estão entre os principais co-fatores que produzem alterações acentuadas em populações periféricas de células T e nos padrões de ativação destas células (Bentwich *et al.* 1996). Neste sentido, já foi relatado que a presença de helmintoses induziu uma diminuição na razão entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos/supressores ( $CD4^+/CD8^+$ ) e na razão entre células T auxiliares não primadas ( $CD45RA^+$ ) e de memória ( $CD45RO^+$ ) (Kalinkovich *et al.* 1998). Além disso, um aumento na frequência da população de células T  $CD3^+$ , e de suas subpopulações, expressando HLA-DR foi relatada em experimentos com humanos portadores de diferentes formas da esquistossomose, sendo a modulação da ativação de LT  $CD4^+$  associada à forma crônica assintomática (Martins-Filho *et al.* 1999).

### 1.3.2 Imunologia da esquistossomose

Os eventos imunológicos descritos para a fase aguda pré-postural incluem hipersensibilidade mediada por IgE, resposta imune celular e humoral anti-esquistossômulos (IgM e/ou IgG), além de produção de anticorpos IgA direcionada contra antígenos de ovos e vermes adultos (Rabello 1995).

Na fase aguda da esquistossomose, a resposta celular de linfócitos T auxiliares é claramente Th1, dominada por alta produção das citocinas pró-inflamatórias  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-1, IL-6, e baixa produção das citocinas IL-4 e IL-5 (Araújo *et al.* 1996; Corrêa-Oliveira *et al.* 1998; de Jesus *et al.* 2002).

O papel do IFN- $\gamma$  na esquistossomose murina parece estar relacionado à morte de esquistossômulos, sendo que experimentos *in vitro* demonstraram o envolvimento de macrófagos na morte destas larvas (Esparza *et al.* 1988; James 1986; James & Glaven 1987). O mesmo foi observado para macrófagos humanos (James SL *et al.* 1990). Além disso, a administração de anticorpos anti-IFN- $\gamma$  em camundongos vacinados com cercárias atenuadas diminuiu parcialmente a proteção contra a infecção (Smythies *et al.* 1992).

Em estudos sobre a resposta imune celular, uma intensa resposta proliferativa de PBMC direcionada contra antígenos derivados de ovos (SEA) e uma fraca resposta direcionada contra antígenos de preparações de vermes adultos (SWAP) têm sido observadas (Colley *et al.* 1977; Ottensen *et al.* 1978; Nash *et al.* 1982; Gazzinelli *et al.* 1985).

Todavia, na fase crônica da esquistossomose a resposta imune celular e humoral contra SWAP tornam-se predominantes (Colley *et al.* 1977; Ottensen *et al.* 1978; Gazzinelli *et al.* 1987). Além disso, a resposta contra SWAP é dependente da parasitemia, apresentando-se reduzida em indivíduos com altas cargas parasitárias (Ellner *et al.* 1981; de Jesus *et al.* 1993). Corroborando este fato, em pacientes com a forma crônico-intestinal e com altas cargas parasitárias que apresentavam resposta de proliferação ausente ou reduzida, o tratamento quimioterápico restaurou a resposta linfoproliferativa de PBMC (Ottensen *et al.* 1978; Gazzinelli *et al.* 1985 e 1987).

Na fase crônica intestinal, a modulação da resposta imune contra o *Schistosoma* é bem relatada. Porém, os mecanismos de ação que levam à imunomodulação são pouco entendidos e bastante controversos. Trabalhos da literatura já descreveram a participação de diferentes populações celulares, tais como, linfócitos T supressores CD8<sup>+</sup> (Parra *et al.* 1991; Pearce & Pedras-Vasconcelos 1997) e células B (Cheever *et al.* 1985). Outros estudos demonstraram o envolvimento dos fatores solúveis do soro, tais como: os complexos imunes (Goes *et al.* 1991), a IL-10 (Flores-Villanueva *et al.* 1996; Malaquias *et al.* 1997; Rezende *et al.* 1997; Falcão *et al.* 1998) e os anticorpos idiotipos (Colley *et al.* 1987; Parra *et al.* 1988; Eloi-Santos *et al.* 1989; Montesano *et al.* 1989; Parra *et al.* 1991).

Quanto ao perfil de citocinas na fase crônica intestinal da esquistossomose, este se apresenta como Th2, sendo dominado por alta expressão das citocinas IL-4, IL-5 e, principalmente, da citocina reguladora IL-10 (Araújo *et al.* 1996; Malaquias *et al.* 1997; Corrêa-Oliveira *et al.* 1998; Falcão *et al.* 1998). Um estudo em modelo murino avaliou o perfil de citocinas, sendo relatado que, nas 6 primeiras semanas de

infecção a produção de IFN- $\gamma$  foi predominante. Após a 8<sup>a</sup> ou 12<sup>a</sup> semanas (coincidindo como início da produção de ovos pelos parasitos) os níveis desta citocina se reduziram e as citocinas do tipo Th2 passaram a predominar (Grzych *et al.* 1991). Outro estudo demonstrou que camundongos vacinados, após receberem injeções de ovos mudavam o padrão de resposta imune do tipo Th1 para o tipo Th2 (Pearce *et al.* 1991).

O papel de citocinas reguladoras, tal como a IL-10, no mecanismo de regulação da resposta imune contra diversas doenças tem sido foco de muitos estudos (Holaday *et al.* 1993; King & Nutman 1993; Sieling *et al.* 1993; Chensue *et al.* 1994; Malaquias *et al.* 1997; Montesano *et al.* 1997; Perrin *et al.* 1999). Neste contexto, a IL-10 já foi relacionada à modulação da resposta de linfócitos T em infecções humanas por filária (King & Nutman 1993), *Micobacterium leprae* (Sieling *et al.* 1993), *Leishmania sp* (Holaday *et al.* 1993) e *Schistosoma sp* (Araújo *et al.* 1996; Malaquias *et al.* 1997). Um possível mecanismo de ação da IL-10 para indução de imunomodulação, proposto por Perrin e colaboradores (1999), sugere que esta citocina altera as vias de transdução de sinais intracitoplasmáticos, com conseqüente bloqueio da ativação e proliferação celular.

Quanto à resposta imune humoral induzida na fase crônica intestinal da esquistossomose, são descritos altos títulos dos anticorpos IgE e IgG4. Estes anticorpos representam importante papel nos mecanismos de defesa contra a doença, apesar dos experimentos de van Dan e colaboradores (1996) não terem encontrado uma relação entre o aumento de resistência a reinfecções com a idade e os níveis de IgE específicos contra antígenos do parasito.

Corroborando a importância destes anticorpos, Hagan e colaboradores (1991) demonstraram significativa correlação entre a produção de anticorpos IgE específicos contra *Schistosoma* e a aquisição de imunidade à esquistossomose. Vários trabalhos também demonstraram um aumento na relação IgG4:IgE em pacientes com altas cargas parasitárias (Hagan *et al.* 1991; Rihet *et al.* 1992; Demeure *et al.* 1993). Além disso, um estudo avaliando a resposta imune humoral contra antígenos de *S. mansoni* demonstrou padrões de agregação familiar na resposta dos isotipos IgE e IgG4 específicos, reforçando o papel destes anticorpos na resistência/susceptibilidade à esquistossomose (Bethony *et al.* 1999).

Entretanto, o papel biológico destas imunoglobulinas na infecção por *S. mansoni* ou por outros helmintos ainda não está bem esclarecido. Porém, as evidências sugerem que IgG4 pode interferir na imunidade protetora adquirida por

bloquear a ativação específica da cascata do complemento competindo com IgG1 e, também, por bloquear a degranulação de mastócitos ao competir com a ligação de IgE aos antígenos do parasito (Butterworth *et al.* 1987). Esta hipótese é favorecida pelas características bioquímicas do isotipo IgG4 que não apresenta sítios de ligação para proteínas do sistema do complemento na sua porção Fc, além de apresentar a capacidade de se ligar a mastócitos sem, contudo, induzir o processo de degranulação (Burton & Woof 1992; Jefferis *et al.* 1995).

### 1.3.3 Imunologia no contexto das co-infecções helmínticas

A imunomodulação dirigida contra células T antígeno-específicas induzidas por infecções helmínticas crônicas podem influenciar a indução da resposta imune contra outros antígenos, já que esta modulação é regulada por citocinas não-específicas (Maizels *et al.* 2004). Vários estudos demonstraram que o microambiente produzido pelas citocinas Th2, comuns nas infecções helmínticas, influencia o desenvolvimento de resposta imune a vacinações com novos antígenos (Kullberg *et al.* 1992 e 1996; Borkow & Bentwich 2000; (Cooper *et al.* 2001).

Além disso, vários trabalhos têm relatado que muitos indivíduos cronicamente infectados com helmintos apresentam-se co-infectados por outros patógenos com altas prevalências nas áreas endêmicas para transmissão de helmintoses, tais como por vírus (Borkow *et al.* 2001; Wolday *et al.* 2002; El-Kady *et al.* 2005; Santos *et al.* 2004), bactérias (Borkow *et al.* 2001; Bentwich 2000; Elias *et al.* 2005), protozoários (Nacher 2004) ou outros helmintos (Geiger *et al.* 2002; Corrêa-Oliveira *et al.* 2002).

Não é surpreendente também que os estudos sobre a resposta imune nas co-infecções apresentem resultados diferentes daquele observado na mono-infecção, dependendo de quais patógenos estão envolvidos e as espécies de hospedeiros co-infectados (Borkow & Bentwich 2000; Corrêa-Oliveira *et al.* 2002; Geiger *et al.* 2002; El-Kady *et al.* 2005; Nacher 2004; Santos *et al.* 2004; Elias *et al.* 2005).

Neste contexto, El-Kady e colaboradores (2005) estudaram as co-infecções por *S. mansoni* e o vírus da hepatite C (HCV), relatando maior nível de IFN- $\gamma$  nos indivíduos mono-infectados por HCV, quando comparado aos indivíduos mono-infectados por *S. mansoni* ou co-infectados. Além disso, os níveis de IL-4 e IL-10 foram mais elevados nos indivíduos co-infectados, quando comparados aos portadores de mono-infecção por HCV.

Já em estudos de co-infecções por dois helmintos (*Schistosoma mansoni* e *Strongyloides stercoralis*) e pelo vírus HTLV-1, foi demonstrado que PBMC dos indivíduos co-infectados com *S. mansoni* e HTLV-1 apresentaram diminuição na produção de IL-5 e redução nos níveis de IgE específicos contra SWAP. Os indivíduos com infecções tripla apresentaram menos células produzindo IFN- $\gamma$  e mais células produzindo IL-10 que os indivíduos portadores de infecções únicas pelo HTLV-1 ou co-infecções apenas com os helmintos (Santos *et al.* 2004).

Em estudos experimentais sobre a resposta imune nas co-infecções por *S. mansoni* e *Mycobacterium bovis* (BCG) foram encontrados altos níveis de IL-4 e IL-5 quando PBMC de camundongos co-infectados foram estimulados *in vitro* com SEA. Ao mesmo tempo, foi observada uma diminuição na resposta de proliferação de esplenócitos contra o antígeno específico (PPD) derivado desta bactéria, assim como contra o antígeno inespecífico concavalina A (Elias *et al.* 2005). Este experimento demonstra que a supressão da resposta imune induzida por antígenos de ovos do *S. mansoni* age de forma inespecífica, influenciando a resposta imune contra outros antígenos não relacionados à esquistossomose.

Considerando-se que em áreas endêmicas para *S. mansoni* ocorre também alta prevalência para geo-helmintos, uma porcentagem significativa de co-infecções por estes helmintos tem sido relatada (Petney & Andrews 1998; Booth *et al.* 1998; Brooker *et al.* 2000; Howard *et al.* 2002; Tchuem Tchuente *et al.* 2003; Raso *et al.* 2004). Um estudo sobre epidemiologia e imunologia das infecções por nematódeos intestinais e *S. mansoni*, realizado em uma comunidade rural do estado de Minas Gerais, demonstrou que *N. americanus* era o parasito mais prevalente (68,2%), seguido por *A. lumbricoides* (48.8%) e *S. mansoni* (45.3%), sendo que 60.6% dos indivíduos infectados eram portadores de infecções múltiplas (Fleming *et al.* 2006).

Em estudos envolvendo infecções múltiplas tem sido relatada a existência de associação entre diferentes pares de helmintos. A existência de interações positivas (sinergismo) entre *N. americanus* e *S. mansoni* foi evidenciada em diversos estudos (Chamone *et al.* 1990; Corrêa-Oliveira *et al.* 2002; Keiser *et al.* 2002a e 2002b; Raso *et al.* 2004; Fleming *et al.* 2006), sendo que este sinergismo parece induzir um aumento na intensidade de infecção destes helmintos (Fleming *et al.* 2006).

Entretanto, as co-infecções por *A. lumbricoides* e *S. mansoni* apresentam interação negativa predominante, sendo evidenciada pelas menores prevalências desta associação de helmintos nas áreas endêmicas e por reduzida intensidade de infecção por *S. mansoni* nestas co-infecções (Fleming *et al.* 2006).

Apesar da elevada prevalência de co-infecções por helmintos e da existência de relações de sinergismo e antagonismo entre diferentes pares de helmintos, a maioria dos estudos sobre imunidade contra estas infecções tem sido realizada de forma isolada, sem considerar as possíveis interações entre a resposta imune nas infecções múltiplas.

Além disso, uma grande parte dos estudos que considera tais interações se restringe a avaliar a reatividade cruzada entre antígenos e anticorpos (Corrêa-Oliveira *et al.* 1988; Noureldin *et al.* 2000; Geiger *et al.* 2002; Abdel Megeed *et al.* 2005). Neste sentido, já foi demonstrado que anticorpos séricos de indivíduos infectados com *A. lumbricoides* e ancilostomídeos apresentam reatividade cruzada com antígenos de *S. mansoni* (Corrêa-Oliveira *et al.* 1988).

Um estudo envolvendo a resposta contra *Fasciola hepatica* e *Schistosoma sp.* também demonstrou a existência de reatividade cruzada entre anticorpos séricos contra antígenos destes parasitos (Noureldin *et al.* 2000). Além disso, anticorpos monoclonais anti-*Trichinella spiralis* acoplados a uma coluna de sefarose foram utilizados para isolar um antígeno presente no fluído de um cisto hidático, demonstrando a existência de reatividade cruzada entre *Echinococcus granulosus* e *T. spiralis* (Abdel Megeed *et al.* 2005).

Geiger e colaboradores (2002) avaliaram a resposta proliferativa *in vitro* de PBMC de indivíduos residentes em área endêmica para ancilostomídeos mas apresentando baixa prevalência para *S. mansoni*. A estimulação por antígenos derivados de vermes adultos de *Ancylostoma caninum* e por antígenos de *S. mansoni* (SEA e SWAP) resultou em altos níveis de resposta proliferativa, sendo que PBMC de indivíduos normais endêmicos apresentaram os maiores níveis de proliferação em resposta a esses antígenos. Além disso, PBMC de indivíduos normais endêmicos e de indivíduos infectados com *T. trichiura* apresentaram reatividade cruzada contra antígenos de *A. lumbricoides* e de *S. mansoni* (SEA e SWAP).

Raros trabalhos descrevem avaliações sobre as influências do microambiente criado pela presença de co-infecções por helmintos na indução da resposta imune contra os antígenos destes parasitos. Um estudo avaliou a influência da infecção por *S. mansoni* em camundongos susceptíveis a infecções pelo nematódeo *Trichuris muris*, um dos poucos helmintos que induzem uma resposta Th1. Os resultados deste trabalho demonstraram que durante a co-infecção com *T. muris* e *S. mansoni* foram induzidos altos níveis de anticorpos da classe IgE e de citocinas IL-4, IL-5, IL-

10, assim como baixos níveis de IFN- $\gamma$ . Este ambiente predominantemente Th2 foi protetor contra a infecção por *T. muris*, sendo estes vermes completamente eliminados pelo hospedeiro (Curry *et al.* 1995).

Um outro estudo sobre a imunidade induzida contra antígenos de *S. mansoni*, ancilostomídeos e *A. lumbricoides* demonstrou que o helminto *S. mansoni* tem efeito significativo sobre outras infecções helmínticas. Neste estudo foi relatada uma resposta imune predominante contra antígenos de *S. mansoni* (SEA e SWAP), independente da presença de outras helmintoses, em áreas onde este parasito era prevalente. Todavia, em áreas onde a maior prevalência era de ancilostomídeos ou *A. lumbricoides* e não existiam infecções por *S. mansoni*, tanto a resposta imune humoral como a celular foi direcionada contra os antígenos do parasito mais prevalente (Corrêa-Oliveira *et al.* 2002).

Em suma, diversos trabalhos relataram associações entre o perfil de resposta imune e a parasitemia durante infecções helmínticas e demonstraram a existência de reações cruzadas entre antígenos de diferentes espécies destes parasitos. Além disso, já foi sugerido que durante co-infecções a resposta imune induzida contra uma espécie de parasito pode influenciar a resposta contra outros patógenos. Contudo, algumas perguntas ainda não foram respondidas, dentre elas: quais são os fatores da resposta imune contra infecções por geo-helmintos que atuam sobre a resposta imune protetora específica para *S. mansoni*? Ou como a resposta imune a esses parasitos interagem entre si?

O estudo dos aspectos funcionais e fenotípicos de LT CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da esquistossomose crônica intestinal, considerando o contexto da infecção (ausência ou presença de co-infecções por geo-helmintos) é de extrema importância, pois pode contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune que contribuem para a persistência de co-infecções parasitárias em humanos cronicamente infectados por *S. mansoni*.

A possibilidade de demonstrar como a mono-infecção ou as co-infecções por *S. mansoni* e geo-helmintos influenciam a ativação, proliferação e diferenciação de LT CD4<sup>+</sup> e, por sua vez, interferem com a resposta imune celular, justificam o estudo realizado neste trabalho.

Nossa hipótese é que as co-infecções por *S. mansoni* e geo-helmintos podem potencializar a indução de mecanismos imunes supressor/regulador, alterando a ativação e proliferação de populações celulares específicas e, conseqüentemente a resposta imune celular contra antígenos derivados de *S. mansoni*.



## **2. OBJETIVOS**

*“Se alguém segue em frente, confiante, na direção de seus sonhos e desafios, para viver a vida que imaginou, encontrará um grande sucesso nas horas comuns do dia-a-dia”.*

***Autor desconhecido***

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos funcionais e fenotípicos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose mansoni na ausência ou presença de co-infecções por geo-helminhos.

## 2.2 Objetivos Específicos

- A) Comparar a reatividade *in vitro* de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de Timidina tritiada (<sup>3</sup>H-Td) ou Bromo-deoxi-Uridina (BrdU) incorporados ao DNA celular durante fase S do ciclo celular;
- B) Caracterizar a frequência e a reatividade *in vitro* de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e linfócitos T CD3<sup>+</sup>;
- C) Determinar a frequência e a reatividade *in vitro* das subpopulações majoritárias de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- D) Quantificar a frequência e reatividade *in vitro* da subpopulação minoritária de linfócitos T CD4<sup>HIGH</sup>;
- E) Estudar comparativamente os aspectos fenotípicos da subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> convencional e da subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup>;
  - a. Avaliar a expressão dos marcadores de ativação celular inicial (CD69, CD62L), de ativação intermediária (CD38 e CD25) e ativação tardia (HLA-DR);
  - b. Estudar a frequência *in vitro* de LT auxiliares CTLA-4<sup>+</sup>;
  - c. Quantificar a frequência *in vitro* de LT auxiliares CD25<sup>HIGH</sup>;
  - d. Analisar a frequência e a expressão *in vitro* dos marcadores de memória (CD44 e CD45RO/CD45RA);
- F) Pesquisar a existência de correlação entre os principais achados sobre os aspectos funcionais e fenotípicos *in vitro* das populações celulares e outros parâmetros biológicos relacionados às infecções helmínticas.

### **3. POPULAÇÃO ESTUDADA & METODOLOGIA**

*“O endeusamento das técnicas produz  
ou um formalismo árido,  
ou respostas estereotipadas.  
Seu desprezo, ao contrário,  
leva ao empirismo sempre  
ilusório em suas conclusões,  
ou a especulações abstratas e estéreis”.*

***Maria Cecília S. Minayo***

Neste estudo utilizamos antígenos brutos do *S. mansoni* (SEA e SWAP) para estimular *in vitro* PBMC isoladas de voluntários residentes em áreas endêmicas de Minas Gerais para avaliar a resposta imune específica, mediada por LT CD4<sup>+</sup>, no contexto da mono-infecção por *S. mansoni* e das co-infecções por este parasito e os geo-helminthos.

### 3.1 Seleção das áreas endêmicas

O Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR-FIOCRUZ), em convênio com a Faculdade de Enfermagem da UFMG e a Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE) realizaram levantamentos seccionais no 9 estado de Minas Gerais para identificar áreas endêmicas para *S. mansoni* e outras infecções helmínticas. Estes levantamentos envolveram toda a população de uma área selecionada onde foram determinadas a presença e a intensidade de infecção para as helmintoses.

Exames parasitológicos de fezes foram realizados utilizando-se o método Kato-Katz (Katz *et al.* 1972). Este método apresenta algumas limitações, tal como a dificuldade de visualização de larvas de alguns helmintos, tais como de *Taenia sp.* e *Strongyloides sp.* e/ou a presença de protozoários (Engels *et al.* 1996). Porém, este método permite a quantificação da infecção pelos helmintos identificados. Assim, considerando-se que a intensidade de infecção é um importante fator na determinação da patogenia das infecções helmínticas, foi feita a escolha por se utilizar um método parasitológico quantitativo.

Em dias consecutivos, foram coletadas três amostras de fezes de cada participante, sendo analisadas duas lâminas para cada amostra coletada, totalizando seis lâminas examinadas por voluntário. A média aritmética das contagens de ovos obtidas nas seis lâminas analisadas foi calculada e a intensidade de infecção expressa como número de ovos por gramas de fezes (epg).

Um total de 61 indivíduos foi recrutado de comunidades selecionadas que apresentaram moderada ( $\geq 10\%$  a  $< 50\%$ ) a alta ( $\geq 50\%$ ) prevalência de infecção por *S. mansoni*, de acordo com a classificação da OMS (OMS 2002).

### 3.2 Critérios de inclusão dos participantes

Os voluntários foram incluídos neste estudo segundo os seguintes critérios:

- a. o voluntário, ou responsável legal, concordou em participar do estudo e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após receber informações sobre o estudo, fornecidas em linguagem leiga e adaptada à cultura local, para permitir a plena compreensão dos participantes;
- b. todos os voluntários tinham residência fixa na área endêmica para transmissão de *S. mansoni* e geo-helmintos a pelo menos dois anos;
- c. não tinham relatos de tratamentos com anti-helmínticos nos últimos dois anos;
- d. todos os indivíduos infectados por *S. mansoni* que foram incluídos neste estudo, independente de serem mono- ou co-infectados, apresentavam apenas a forma clínica crônica intestinal da esquistossomose, pois, as outras formas clínicas da doença estão associadas a mudanças significativas da resposta imune (Gazzinelli *et al.* 1983b; Martins-Filho *et al.* 1999) e não eram objetos de estudos deste trabalho.

Independente de participação neste estudo, todos os indivíduos que participaram dos levantamentos seccionais receberam tratamento para todas as infecções helmínticas detectadas nos exames coprológicos, conforme tratamento padrão de 50mg/kg de peso para esquistossomose (praziquantel) e 400mg de albendazol (dose única) para as outras parasitoses. No caso de infecção por *S. stercoralis*, o tratamento consistiu de três doses consecutivas de 400mg do albendazol.

Este estudo, parte de um projeto maior intitulado “Interrelação entre a genética e a co-infecção helmíntica”, do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR-FIOCRUZ foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Ministério da Saúde (Protocolo # 002/2000 - ANEXO B).

### 3.3 Definição dos grupos avaliados

Os indivíduos incluídos neste estudo foram classificados, segundo os critérios abaixo, em três grupos (TAB. 2):

- a. **Não infectados (NI):** indivíduos saudáveis, sem nenhum sinal ou sintoma clínico e que não apresentaram ovos ou larvas de quaisquer helmintos em nenhuma das seis lâminas do exame de fezes;
- b. **Mono-infectados (XTO):** pacientes que possuíam um ou mais ovo(s) de *S. mansoni* identificados em pelo menos uma das seis lâminas do exame de fezes, sendo negativos para os demais helmintos. Além disso, os indivíduos incluídos neste grupo não apresentavam sintomas clínicos, exceto por ocasional desconforto intestinal.
- c. **Co-infectados (CO):** pacientes que possuíam um ou mais ovo(s) de *S. mansoni* e um ou mais ovo(s) de pelo menos um dos geo-helmintos (*N. americanus* ou *A. duodenale*, *A. lumbricoides*) identificados em pelo menos uma das seis lâminas do exame de fezes. Além disso, os indivíduos incluídos neste grupo não apresentavam sintomas clínicos, exceto por ocasional desconforto intestinal.

### 3.4 Caracterização da população estudada

Para realização deste estudo, foram selecionadas três localidades: Palha e Virgem das Graças, localidades rurais do município de Ponto dos Volantes - MG e Córrego do Onça, uma localidade rural do município de Governador Valadares - MG.

Ponto dos volantes é um município com uma população estimada de 10.529 habitantes. A pecuária é dominada por rebanhos bovinos, suínos e frangos. A lavoura de café e o extrativismo de madeiras são outras fontes de renda comuns (IBGE 2006).

Córrego do Onça é uma das 14 localidades que formam a comunidade de Córrego dos Melquíades em Governador Valadares. Cada localidade é cortada por, pelo menos, um córrego permanente que é a principal fonte de água das famílias residentes. Durante a estação seca, canais de irrigação são construídos para manter

as plantações de arroz que, juntamente com o feijão, o milho, a banana e o café representam a agricultura de subsistência da região. A venda de leite também constitui uma fonte de renda familiar (Silveira 2002).

Em relação à prevalência das infecções helmínticas analisadas isoladamente, as localidades selecionadas para este estudo apresentaram moderada a alta prevalência para *S. mansoni* (Palha + VdG: 49,1% e CdO: 57,1%), além de moderada intensidade de infecção por *S. mansoni* (Palha + VdG: 150 epg e CdO: 399 epg). Quanto à prevalência de ancilostomídeos e *A. lumbricoides*, ambas localidades apresentaram baixas taxas (Palha + VdG: 47,65% de ancilostomídeos e 19,1% de *A. lumbricoides* e CdO: 38,8% e 9,2%, respectivamente).

Na Tabela 1 foram resumidos os dados de prevalência das infecções analisadas neste estudo, considerando as estatísticas para as infecções simples, co-infecções duplas (*S. mansoni* e ancilostomídeos) ou co-infecções triplas (*S. mansoni*, ancilostomídeos e *A. lumbricoides*) para as duas localidades incluídas neste estudo.

Na Tabela 2 estão resumidos os dados de intensidade de infecção, idade e gênero (masculino e feminino) dos voluntários incluídos neste estudo que foram segregados em grupos de acordo com o contexto da infecção (NI, XTO e CO). Além disso, a intensidade de infecção por *S. mansoni* e geo-helmintos também foi representada em gráficos de dispersão individual (FIG. 1). Considerando as classes de infecção propostas pela OMS para *S. mansoni* e geo-helmintos (OMS 2002), podemos observar que os indivíduos avaliados neste estudo apresentaram baixa (1-99 epg) ou média (100-399 epg) intensidade de infecção por *S. mansoni*, exceto por um indivíduo que apresentou uma carga parasitária acima de 399 epg. Do mesmo modo, podemos observar que nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na intensidade de infecção por *S. mansoni* foi encontrada entre os grupos XTO e CO.

Em relação à infecção por geo-helmintos, todos os indivíduos pertencentes ao grupo CO estavam infectados com ancilostomídeos, sendo que apenas cinco destes estavam co-infectados com *A. lumbricoides* (co-infecções triplas). Quanto à carga parasitária, os indivíduos apresentaram apenas baixa intensidade de infecção por ancilostomídeos e *A. lumbricoides* (1-1.999 epg e 1-499 epg, respectivamente), exceto por um indivíduo que apresentou uma carga parasitária de *A. lumbricoides* acima de 500 epg.

Em relação à idade dos voluntários, podemos observar que a mediana de idade diferiu significativamente ( $p = 0,0276$ ) entre os grupos CO e NI, sendo muito

maior nos indivíduos não infectados (TAB. 2). Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a idade dos voluntários e a intensidade de infecção por *S. mansoni* (FIG. 2A).




Corroborando dados da literatura que sugerem a existência de sinergismo entre *S. mansoni* e ancilostomídeos (Fleming *et al.* 2006), análises de correlação demonstraram uma associação positiva entre a intensidade de infecção por *S. mansoni* e a intensidade de infecção por ancilostomídeos (FIG. 2B).

**Tabela 1** - Prevalências das co-infecções por *S. mansoni* e geo-helminthos nas áreas endêmicas avaliadas neste estudo.

	Palha + VdG	CdO
<b>Sch (%)</b>	16,80	36,30
<b>Sch+Anc (%)</b>	25,90	18,70
<b>Sch+Anc+Asc (%)</b>	06,40	02,20
<b>Sch Total (%)</b>	49,10	57,20

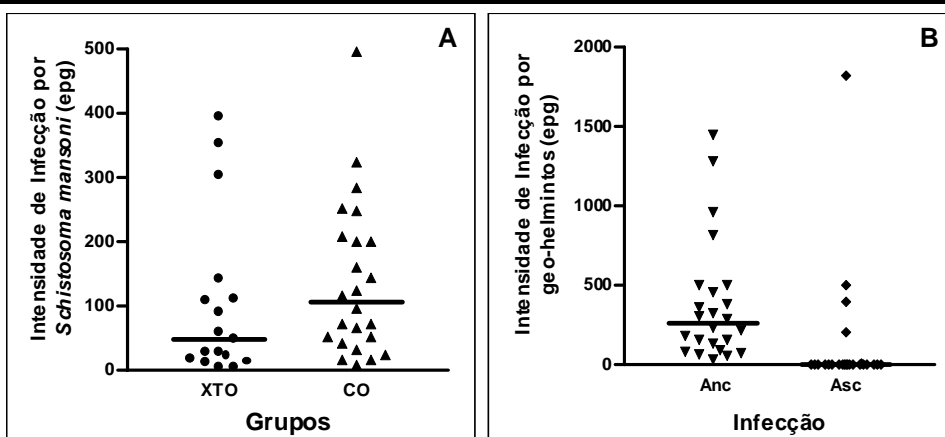
VdG = Virgem das Graças, CdO = Córrego do Onça, Sch = *Schistosoma mansoni*, Anc = Ancilostomídeos, Asc = *Ascaris lumbricoides*.

**Tabela 2** - Características da população estudada.

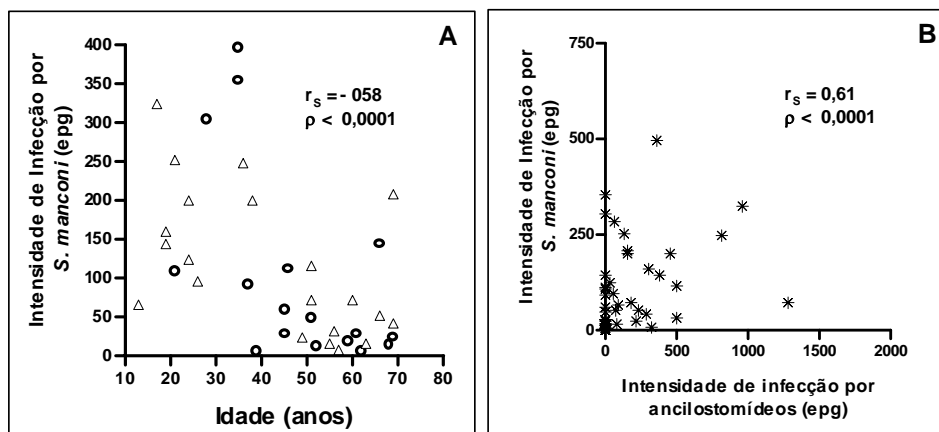
Grupos	n (M/F)	Mediana de idade (anos)	Mediana da intensidade de infecção (epg)		
			<i>S. mansoni</i>	Ancilostomídeos	<i>A. lumbricoides</i>
 NI	19 (05/14)	58.0 (07-90)	00	00	00
 XTO	18 (09/09)	45.5 (21-69)	54 (05-394)	00	00
 CO	24 (15/09)	37.0 (04-69)	106 (08-496)	260 (32-1448)	00 (00-1820)

Valores entre parênteses = variação máxima e mínima do intervalo. n = número de indivíduos, M = masculino, F = feminino, epg = ovos por grama de fezes.





**Figura 01** - Características parasitológicas dos voluntários participantes do estudo. (A) Intensidade de infecção por *S. mansoni* dos indivíduos dos grupos XTO e CO. (B) Intensidade de infecção por ancilostomídeos (Anc) e *A. lumbricoides* (Asc) dos indivíduos do grupo CO. Os símbolos representam dispersão individual e as barras representam as medianas de cada grupo.



**Figura 02** - Associações entre a infecção por *S. mansoni* com idade e co-infecção por ancilostomídeos. (A) Correlação negativa entre intensidade de infecção por *S. mansoni* e idade. Os símbolos  $\bullet$  representam os dados dos indivíduos do grupo XTO e os símbolos  $\Delta$  representam os dados de indivíduos do grupo CO. (B) Correlação positiva entre intensidade de infecção por *S. mansoni* e intensidade de infecção por ancilostomídeos. A força da associação entre as variáveis foi representada pelo valor  $\rho$ , sendo considerados estatisticamente significativos os valores  $\rho < 0,05$ .

### 3.5 Obtenção de sangue total

O sangue dos voluntários foi coletado pela manhã, por profissionais habilitados do CPqRR-FIOCRUZ, em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica (VACUTAINER - BD, EUA). O sangue coletado foi mantido à temperatura ambiente (TA) e enviado, dentro do prazo de 12 horas, para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR-FIOCRUZ localizado em Belo Horizonte.

O sangue de 29 voluntários foi utilizado nos ensaios de blastogênese para avaliação da proliferação pela metodologia de detecção de BrdU incorporado, sendo o sangue dos outros 32 voluntários utilizado nos ensaios de imunofenotipagem celular. Além disso, o sangue de todos os 61 voluntários foi utilizado nos ensaios de blastogênese para avaliação da proliferação pela metodologia de detecção da  $^3\text{H-Td}$  incorporada.

Todos os ensaios utilizando sangue foram realizados dentro do prazo máximo de 24 horas após a coleta.

### 3.6 Produção dos antígenos brutos de *S. mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* (cepa LE) é mantido no CPqRR-FIOCRUZ em camundongos albinos suíços e em caramujos do gênero *Biomphalaria*. Ovos e vermes adultos de *S. mansoni* foram coletados de camundongos infectados para a preparação dos antígenos SEA e SWAP. Foi utilizado o protocolo descrito por (Gazzinelli *et al.* 1983b) com algumas modificações, descritas a seguir.

Suspensões de vermes adultos e ovos em solução salina 1,7% foram obtidas e, em seguida, os vermes ou ovos foram triturados, separadamente, por sonicação em homogeneizador de tecido com pistão de teflon (WIRTIS, DT), até completo rompimento dos mesmos. Os extratos obtidos foram centrifugados a 50.000 x g, a 4°C, por 90 minutos, sendo os sobrenadantes de cada preparação coletados e submetidos à diálise por 48 horas a 4°C, em membrana de diálise (THOMAS SCIENTIFIC, EUA) imersa em uma solução contendo 0,03%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 01%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,9% NaCl (tampão salínico fosfatado - PBS 0,015M, pH 7,4) (reagentes SIGMA, EUA).

O conteúdo protéico de cada preparação antigênica obtida após processo de diálise foi determinado pelo método colorimétrico de detecção e quantificação de proteínas totais utilizando o kit BCA™ Protein Assay (PIERCE®, EUA). Finalmente, as preparações antigênicas foram esterilizadas em filtros de 0.22µm de poros (THOMAS SCIENTIFIC, EUA) e estocadas a -80°C, em alíquotas de 500µL, até o momento do uso.

### 3.7 Obtenção de PBMC

A obtenção de PBMC foi realizada segundo procedimento descrito por (Gazzinelli *et al.* 1983b), com algumas modificações descritas a seguir. Resumidamente, sangue total heparinizado e homogeneizado foi adicionado, delicadamente, sobre uma camada de solução histopaque 1077 (SIGMA, EUA), na proporção de 2:1, em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL (FALCON - BD, EUA). Esta preparação foi submetida à centrifugação 40 minutos, 400 x g, T.A., em centrífuga Beckman, modelo J-6B (BECKMAN INSTRUMENTS, Irvine, EUA).

Após centrifugação, as PBMC foram coletadas na interface entre o plasma e o histopaque, sendo então, transferidas para novos tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL e lavadas por três vezes em meio essencial mínimo - MEM (GIBCO, EUA). Em cada etapa de lavagem 10mL de MEM foram adicionados e a preparação celular foi submetida à centrifugação por 10 minutos, 400 x g, a 4°C, seguida pelo descarte do sobrenadante.

O concentrado de células obtido ao final do processo de lavagem foi ressuspenso com 1mL de meio de cultura celular RPMI 1640 (GIBCO, EUA). Uma alíquota de 10 µL desta suspensão celular foi retirada e diluída em 190µL de solução de Turck's (2% de ácido acético glacial + 1% cristal violeta), sendo esta preparação utilizada para contar as células em Câmara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC, Horsham, EUA).

Finalmente, o volume da suspensão celular foi ajustado para conter  $10^7$  células por mililitro, utilizando RPMI 1640 suplementado com 5% de SHuN inativado a 56°C por 30 minutos + 1,6% de L-glutamina + 3% de coquetel antimicótico e

antibiótico (meio completo para cultivo de células - CMBlast) (reagentes SIGMA, EUA).

A suspensão celular assim obtida foi utilizada para ensaios de blastogênese e de imunofenotipagem celular. Todas as etapas do procedimento, exceto a contagem das células, foram realizadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (VECO - modelo VLFS 12M, EUA).

### 3.8 Blastogênese para detecção de $^3\text{H-Td}$ incorporada ao DNA

O ensaio de proliferação celular (blastogênese) foi realizado segundo procedimento descrito por (Gazzinelli *et al.* 1983b), com algumas modificações descritas a seguir: PBMC foram obtidas e o cultivo celular foi realizado em placas de cultura de poliestireno, fundo chato e 96 poços (FALCON - BD, EUA). Alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  da suspensão de PBMC foram transferidas para nove poços de uma placa de cultura denominada “estímulo específico” e para seis poços de outra placa de cultura denominada “estímulo inespecífico”.

Aos primeiros três poços de ambas as placas foram adicionados 175 $\mu\text{L}$  de meio CMBlast, recebendo estes poços a denominação de cultura controle (cc). Na placa “estímulo inespecífico”, aos três outros poços foram adicionados 150 $\mu\text{L}$  do meio CMBlast + 25  $\mu\text{L}$  de fitohemaglutinina de *Phaseolo vulgaris* (PHA-P) (SIGMA, EUA) de forma a se obter uma concentração final de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Estes poços receberam a denominação de culturas experimentais com estímulo inespecífico (PHA).

Na placa “estímulo antigênico”, a três poços foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  do meio CMBlast + 25  $\mu\text{L}$  de SEA e aos outros três poços foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  do meio CMBlast + 25  $\mu\text{L}$  de SWAP, de forma a se obter uma concentração final de 25  $\mu\text{g/mL}$  em cada poço. Os três primeiros poços foram denominados de culturas experimentais com estímulo específico (SEA) e os outros três poços foram denominados de culturas experimentais com estímulo específico (SWAP).

As placas “estímulo inespecífico” foram previamente incubadas por 66 horas e as placas “estímulo específico” foram previamente incubadas por 90 horas, sendo a incubação realizada a 37°C em incubadora de atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  (FORMA SCIENTIFIC, Marietta, OH, EUA). Em seguida, a cada poço foram

adicionados 10 $\mu$ L de uma solução de timidina tritiada a 1 $\mu$ Ci (SIGMA, EUA) apresentando atividade específica de 20Ci/mmol e as placas foram incubadas por mais seis horas nas condições descritas acima.

Ao final do período de incubação as células foram lisadas e o DNA coletado em microfibras de vidro Whatman 934-AH (THOMAS SCIENTIFIC, EUA), com auxílio de um coletor automático de células M-24S (Cell Harvester Brandel, M-24S, EUA). A microfibras de vidro contendo o DNA, foi submetida à secagem e os confetes (correspondentes a cada poço) colocados em frascos para cintilação (SKATRON INSTRUMENTS, EUA) contendo 2,0 mL de coquetel de cintilação [333ml de Tolueno (Nuclear, Brasil) + 5g de PPO (WINLAB, UK) + 0,1g de POPOP (FISCHER, EUA)].

A radioatividade incorporada pelo DNA replicante foi determinada em cintilador líquido Beckman LS6000SC (BECKMAN INSTRUMENTS, Irvine, EUA). Cada amostra foi contada durante 2 minutos com os canais de trítio [ $^3\text{H}$ ] e carbono quatorze [ $^{14}\text{C}$ ] abertos. Os resultados foram expressos como contagens por minuto (cpm) e os dados analisados através do índice de estimulação (IE), que foi obtido pela divisão do valor, em cpm, da cultura experimental pelo valor da cultura controle, ou seja:

$$\text{IE} = \text{CE (cpm)} : \text{cc (cpm)}$$

Todas as etapas do procedimento, exceto a determinação da radioatividade por cintilação líquida, foram realizadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (VECO - modelo VLFS 12M, EUA).

### 3.9 Blastogênese para detecção de BrdU incorporado ao DNA

Este ensaio foi adaptado a partir dos trabalhos de (Dolbeare *et al.* 1983; Gaines *et al.* 1996; Mehta & Maino 1997). Resumidamente, as PBMC foram obtidas e o cultivo celular foi realizado em placas de cultura de poliestireno, fundo chato e 48 poços (FALCON - BD, EUA), contendo um volume final de cultura igual a 1000 $\mu$ L por poço. Alíquotas de 75  $\mu$ L da suspensão de PBMC foram transferidas para nove poços de uma placa de cultura denominada “estímulo específico” e para seis poços de outra placa de cultura denominada “estímulo inespecífico”.

Aos primeiros três poços de ambas as placas foram adicionados 925 $\mu$ L de meio CMBlast, recebendo estes poços a denominação de cultura controle (cc). Na placa estímulo inespecífico, aos três outros poços foram adicionados 900 $\mu$ L de meio

CMBlast + 25  $\mu$ L de PHA-P, obtendo-se uma concentração final de 2,5  $\mu$ g/mL. Estes poços receberam a denominação de culturas experimentais com estímulo inespecífico (PHA).

Na placa estímulo antigênico, aos outros três primeiros poços foram adicionados 900 $\mu$ L de meio CMBlast + 25 $\mu$ L de SEA e aos outros três poços foram adicionados 900 $\mu$ L de meio CMBlast + 25 $\mu$ L de SWAP, de forma a se obter uma concentração final de 25 $\mu$ g/mL em cada poço. Os três primeiros poços foram denominados de culturas experimentais com estímulo específico (SEA), sendo os outros poços denominados de culturas experimentais com estímulo específico (SWAP).

As placas “estímulo inespecífico” foram previamente incubadas por 48 horas e as placas “estímulo específico” foram previamente incubadas por 72 horas, sendo a incubação realizada a 37°C em incubadora de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a cada poço foram adicionados 90 $\mu$ L de uma solução de uma solução de BrdU (BD - Pharmingen, EUA) a 330 $\mu$ g/mL, obtendo-se uma concentração final de 30 $\mu$ g/mL, sendo as placas novamente incubadas por mais 24 horas nas condições descritas acima.

Após o período de incubação, as PBMC foram transferidas para tubos de cônicos de poliestireno com capacidade para 15mL (FALCON, BD, EUA) contendo PBS (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e 0,1% de NaN<sub>3</sub>) (reagentes SIGMA, EUA) e centrifugadas a 400 x g, 4°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante aspirado com o auxílio de uma bomba a vácuo.

Finalmente, o concentrado celular foi ressuspenso em 500 $\mu$ L de uma solução de PBS-W. A proliferação celular e o fenótipo de superfície das células presente nesta suspensão foram avaliados pela detecção de imunofluorescência por citometria de fluxo.

Todas as etapas do procedimento, exceto a etapa final após a incubação, foram realizadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (VECO - modelo VLFS 12M, EUA).

### 3.10 Detecção da proliferação celular por citometria de fluxo

Este ensaio foi adaptado a partir dos trabalhos de (Dolbeare *et al.* 1983; Gaines *et al.* 1996; Mehta & Maino 1997), sendo que as concentrações e o tempo de incubação dos reagentes BrdU e DNase foram determinados por curvas de concentração e cinética, respectivamente, previamente realizadas em experimentos de padronização.

Alíquotas de 50 $\mu$ L da suspensão de PBMC, obtida no ensaio de blastogênese descrito acima, foram transferidas para tubos de ensaio de poliestireno com capacidade para 5mL (FALCON, BD, EUA), contendo 50 $\mu$ L de anticorpos contra antígenos de superfície celular ou respectivos anticorpos isotípicos marcados com PE (TAB. 3). Os anticorpos foram previamente diluídos em PBS-W numa concentração final de 5 $\mu$ g/mL. A suspensão foi incubada por 30 minutos, T.A. e ao abrigo da luz.

Em seguida, as hemácias ainda contidas nas amostras foram lisadas e as PBMC fixadas com uma solução de lise comercial (Facs Lyse Solution - BD, EUA) por 10 minutos, T.A. e ao abrigo da luz. As amostras foram, então, centrifugadas a 400 x g por dez minutos, a 18°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram lavadas com PBS-W e permeabilizadas por dez minutos, T.A., com PBS-P (solução de PBS 0,015M, pH 7,2 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de NaN<sub>3</sub> e 0,5% de saponina) (reagentes SIGMA, EUA).

A suspensão celular foi centrifugada a 400 x g, por um período de 10 minutos a 18°C, sendo posteriormente lavada com PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C e ao abrigo da luz, com 50  $\mu$ L de uma solução contendo PBS-P + anticorpos anti-BrdU marcados com FITC (TAB. 3) a 5 $\mu$ g/mL + DNase I a 5 $\mu$ g/ml (atividade específica de 500Kunits/mL - SIGMA, EUA).

Após o processo de desnaturação do DNA e marcação com os anticorpos anti-BrdU, as células foram primeiramente lavadas com 150  $\mu$ L de PBS-P e, em seguida, com 200  $\mu$ L de PBS-W. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução fixadora contendo 1% PFA + 10g/L de cacodilato de sódio + 6,67g/L de NaCl (Max Facs Fix - pH: 7,2) (reagentes SIGMA, EUA) e a suspensão celular foi utilizada para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD, EUA), utilizando o programa específico CELLQuest<sup>TM</sup> (BD, EUA).

### 3.11 Ensaio de imunofenotipagem celular

Este ensaio foi realizado de acordo com as recomendações dos fabricantes de anticorpos, com algumas modificações descritas a seguir: alíquotas de 50 $\mu$ L da suspensão de PBMC, obtida no ensaio de blastogênese descrito acima, foram transferidas para tubos de ensaio de polipropileno com capacidade para 5mL.

A cada tubo foram adicionados 50 $\mu$ L de anticorpos contra antígenos de superfície celular ou dos respectivos anticorpos isotípicos marcados com diferentes fluorocromos (TAB. 4). Os anticorpos foram previamente diluídos em PBS-W numa concentração final de 5 $\mu$ g/mL.

As suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos, TA e ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias ainda presentes nas amostras foram lisadas e as PBMC fixadas utilizando solução de lise comercial por 10 minutos, T.A. e ao abrigo da luz.

As amostras foram, então, centrifugadas a 400 x g por dez minutos, a 18°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS-W e, finalmente, 200  $\mu$ L de MFF foram adicionados à amostra. A aquisição dos dados foi realizada no FACSCalibur, utilizando o programa específico CELLQuest™.

**Tabela 3.** Painel de anticorpos utilizados nos ensaios funcionais por citometria de fluxo.

Tubos	Anticorpos Monoclonais Conjugados com Fluorocromos	
	FITC	PE
01	$\alpha$ -BrdU [Clone: B44]*	$\alpha$ -CD4 [Clone: L200]*
02	$\alpha$ -BrdU [Clone: B44]*	$\alpha$ -CD3 [Clone: SK7]*
03	$\alpha$ -BrdU [Clone: B44]*	$\alpha$ -CD8 [Clone: 3B5]*
04	$\alpha$ -BrdU [Clone: B44]*	$\alpha$ -CD19 [Clone: HIB19]*
05	$\alpha$ -IgG	$\alpha$ -IgG

\* BD-Pharmingen, EUA



**Tabela 4.** Painel de anticorpos utilizados nos estudos de aspectos fenotípicos de PBMC.

Anticorpos Monoclonais Conjugados com Fluorocromos			
Tubos	FITC	PE	TC/Cy-Chrome
01	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD25 [Clone: M-A251]*	$\alpha$ -CTLA-4 [Clone: BNI3]*
02	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD25 [Clone: M-A251]*	$\alpha$ -HLA-DR [Clone: TÜ36]**
03	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD69 [Clone: FN50]*	$\alpha$ -CD25 [Clone: 3G10]**
04	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD38 [Clone: HB7]*	$\alpha$ -CD25 [Clone: 3G10]**
05	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD45RO [Clone: UCHL-1]**	$\alpha$ -CD25 [Clone: 3G10]**
06	$\alpha$ -CD4 [Clone: RPA-T4]*	$\alpha$ -CD45RA [Clone: MEM56]**	$\alpha$ -CD25 [Clone: 3G10]**
07	$\alpha$ -CD3 [Clone: SK7]*	$\alpha$ -CD62L [Clone: DREG-56]**	$\alpha$ -CD4 [Clone: S3.5]*
08	$\alpha$ -CD3 [Clone: SK7]*	$\alpha$ -CD44 [Clone: MEM85]**	$\alpha$ -CD4 [Clone: S3.5]*
09	$\alpha$ -IgG	$\alpha$ -IgG	$\alpha$ -IgG

\* BD-Pharmingen, EUA

\*\* Caltag, EUA

### 3.12 Aquisição e análise dos dados

A aquisição e a subsequente análise dos dados foram realizadas utilizando-se o programa específico CELLQuest<sup>TM</sup>, sendo os dados obtidos armazenados no modo lista do programa.

Para garantir que subpopulações minoritárias estivessem suficientemente representadas nas amostras, a fim de possibilitar segurança nas análises estatísticas dos parâmetros analisados, foram obtidos entre 10 a 30 mil eventos por amostra.

A Figura 3 ilustra a estratégia empregada para as análises por citometria de fluxo. Primeiramente, gráficos de distribuição pontual foram construídos pela combinação dos parâmetros de tamanho e complexidade celular (FSC x SSC) e a população de interesse, que se constituiu de linfócitos e linfoblastos, foi selecionada dentro da região R1 (FIG. 3A).

Em seguida, os eventos selecionados nesta região foram representados em gráficos de distribuição pontual construídos com combinações de diferentes fluorescências - FL, por exemplo, FL2/Anti-CD4 PE versus FL1/Anti-BrdU FITC (FIG.

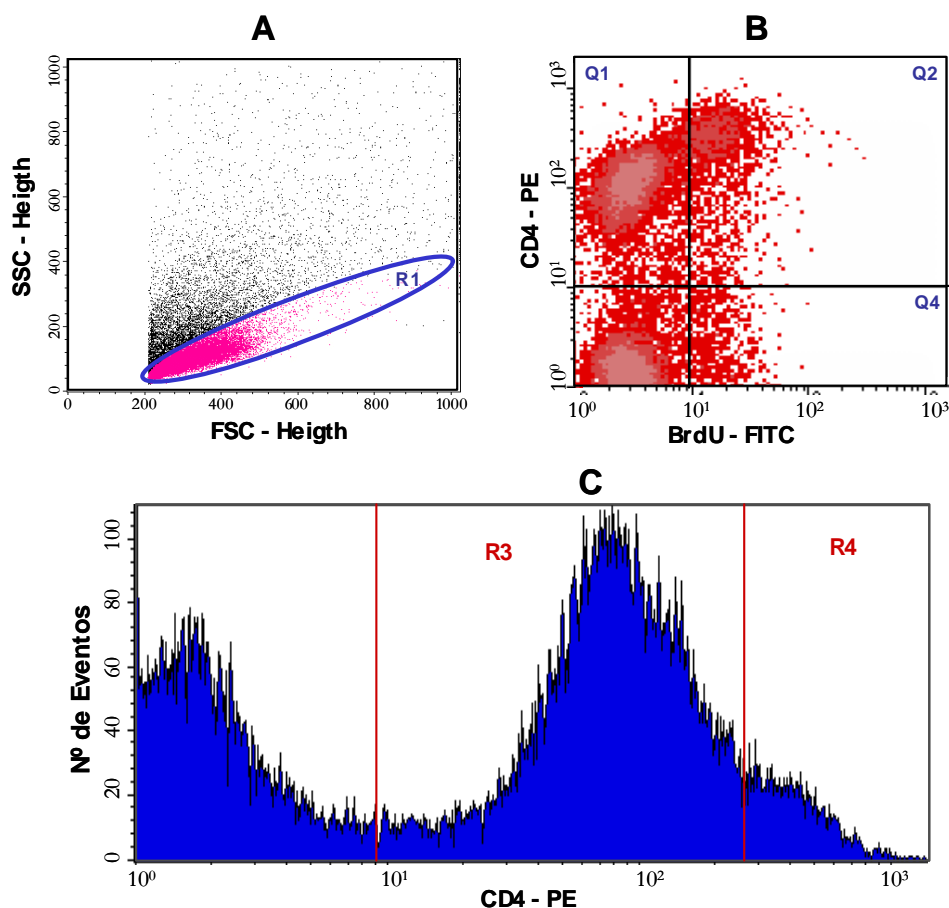
3B). Esses gráficos foram, então, divididos em quatro quadrantes (Q1 a Q4) e as freqüências dos eventos observados em cada quadrante foram determinadas pelo programa CELLQuest™.

Nas análises dos aspectos funcionais, a reatividade da população total de PBMC, ou seja, a freqüência de todas as células que incorporaram BrdU, foi calculada pela soma dos quadrantes Q2 e Q4. Em seguida, a reatividade das populações celulares específicas (LB CD19<sup>+</sup>, LT CD3<sup>+</sup>, LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>) foi determinada utilizando-se a seguinte abordagem: o percentual de linfócitos reativos nas populações específicas foi dividido pelo percentual total de PBMC reativos, sendo o valor final multiplicado por 100, ou seja,

$$\text{Reatividade Pop. Espec.} = \left\{ \frac{\% \text{ de linfócitos BrdU}^+ \text{ na pop. específica}}{\% \text{ de PBMC BrdU}^+} \right\} \times 100$$

Nas análises dos aspectos funcionais e fenotípicos da subpopulação majoritária de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e da subpopulação minoritária de LT CD4<sup>HIGH</sup>, utilizamos a seguinte estratégia metodológica: primeiramente, a densidade de expressão do marcador CD4 foi analisada em histogramas de freqüência construídos com os eventos contidos na região R1 (FIG. 3C). Em seguida, os linfócitos apresentando densidades baixas ou intermediárias do marcador CD4 foram denominados por LT CD4<sup>+</sup> convencionais e selecionados na região R3. Os linfócitos expressando alta densidade da molécula CD4 de superfície foram denominados LT CD4<sup>HIGH</sup> e selecionados dentro de R4 (FIG. 3D). A freqüência de cada subpopulação de linfócitos T auxiliar foi, então, determinada pelo programa CELLQuest™.

Finalmente, histogramas de freqüência foram construídos com os eventos contidos, simultaneamente, nas regiões R1/R3 ou R1/R4 e a freqüência de células que incorporaram BrdU<sup>+</sup> (células reativas), assim como de células expressando marcadores de ativação, de co-estimulação ou de memória, foi determinada para cada subpopulação de linfócitos T auxiliares.



**Figura 3** - Figura ilustrativa dos passos utilizados para a análise dos dados por citometria de fluxo. **(A)** Gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus complexidade celular (SSC) demonstrando a população de interesse (linfócitos e linfoblastos) contida na região R1; **(B)** Gráficos de distribuição pontual de FL1/anti-BrdU-FITC versus FL2/anti-CD4-PE demonstrando diferentes populações celulares contidas nos quadrantes Q1-Q4: LT CD4<sup>+</sup>BrdU<sup>-</sup> contidos em Q1, LT CD4<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> contidos em Q2 e CD4<sup>-</sup>BrdU<sup>+</sup> contidos em Q4; **(C)** Gráficos de distribuição pontual de FL1/anti-BrdU-FITC versus FL2/anti-CD4-PE demonstrando a população de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) selecionados na região R2 e; **(D)** Histograma de freqüência da intensidade de expressão da molécula de superfície CD4, demonstrando a população de LT CD4<sup>+</sup> convencionais na região R3 e a população de LT CD4<sup>HIGH</sup> na região R4.

### 3.13 Análise estatística dos dados

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando-se os programas GraphPad Prisma 3.03 (San Diego, CA, USA) e Minitab 13.01 (P.A., USA). O teste t de Student foi usado, quando aplicável, para detectar as diferenças entre as médias de dois grupos. Quando o teste t de Student não pode ser ajustado, foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Witney.

Para detectar as diferenças entre as médias de mais de dois grupos foi usado o teste paramétrico ANOVA e, uma vez determinada existência de diferenças entre as médias, foram realizados testes de comparações múltiplas de Tukey para determinar quais médias diferiram. Quando o teste ANOVA não pode ser ajustado, os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas de Dunn foram utilizados.

Finalmente, considerando-se que alguns dados analisados não apresentaram distribuição normal, a existência de associações entre as variáveis foi identificada utilizando-se o teste não paramétrico de correlação de Spearman ( $r_s$ ).

Todos os testes foram realizados ao nível de 95% de confiança ( $\alpha=0,05$ ). Todo o procedimento de análise estatística dos dados foi realizado sob a supervisão e orientação da consultora de Bioestatística do CPqRR - FIOCRUZ, Ana Carolina Lustosa Lima.

## 4. RESULTADOS

*“Tempo virá em que uma pesquisa diligente e contínua  
esclarecerá aspectos que agora permanecem escondidos (...)*

*Tempo virá em que nossos descendentes  
ficarão admirados de que não soubéssemos  
particularidades tão óbvias a eles...*

*Muitas descobertas estarão reservadas para os que virão,  
quando a lembrança de nós estará apagada (...)*

*A natureza não revela seus mistérios de uma só vez”.*

**Sêneca, Problemas Naturais**

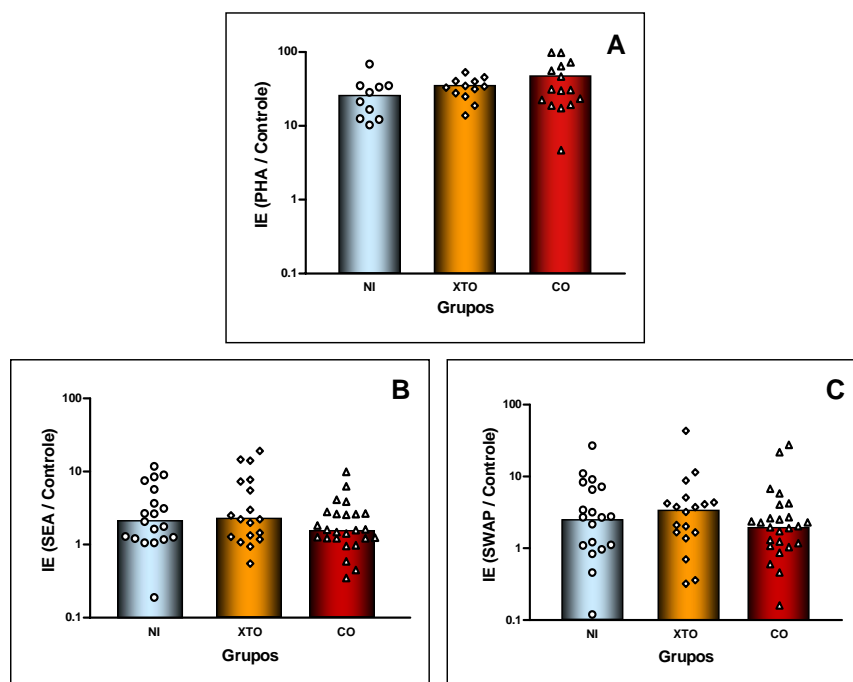
**Livro 7, Século I**

#### 4.1 Reatividade *in vitro* de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de $^3\text{H-Td}$ ou BrdU incorporados ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular

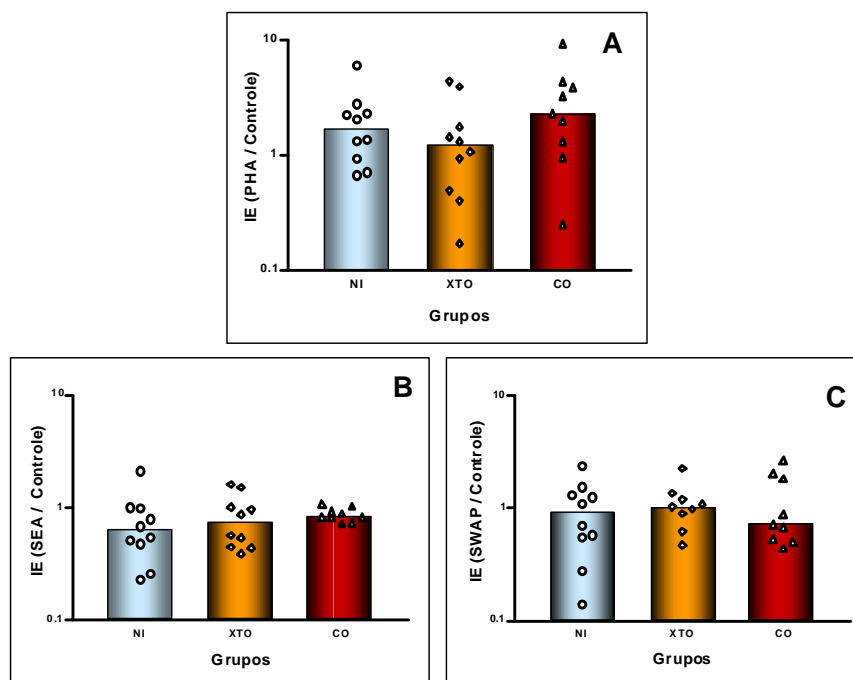
O aspecto funcional avaliado neste estudo foi a reatividade (proliferação) celular de PBMC isolados dos voluntários residentes nas áreas endêmicas foi determinada, após estimulação *in vitro* na presença de PHA-P, de SEA ou de SWAP. Vale ressaltar que a reatividade foi avaliada pelas metodologias de detecção de  $^3\text{H-Td}$  ou BrdU incorporados ao DNA celular, sendo que, independente da metodologia utilizada, os resultados de reatividade celular foram expressos como Índice de Estimulação (IE), ou seja, o quociente da divisão entre os valores (cpm ou % de células BrdU<sup>+</sup>) obtidos para a cultura estimulada e os valores obtidos para a cultura controle.

As Figuras 4 e 5 representam os resultados de reatividade celular, avaliados com o emprego das metodologias de incorporação de  $^3\text{H-Td}$  e incorporação de BrdU. Podemos observar que, independentemente da metodologia empregada, a estimulação *in vitro* não induziu diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de indivíduos avaliados (NI, XTO e CO).

Vale ressaltar, ainda, que em ambas metodologias, a reatividade celular induzida pela estimulação por SEA foi semelhante àquela induzida por SWAP. Além disso, apesar da metodologia de incorporação de BrdU ter apresentado valores de IE mais baixos do que os valores obtidos com a metodologia de incorporação da  $^3\text{H-Td}$ , em ambas a reatividade celular induzida por PHA-P foi significativamente maior que aquela induzida pelos antígenos SEA ou SWAP ( $p < 0,05$ ).

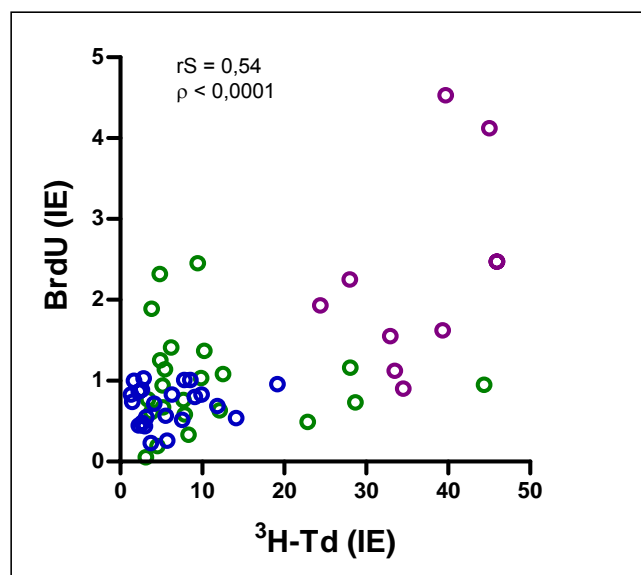


**Figura 4** - Reatividade de PBMC obtidas de indivíduos residentes em áreas endêmicas avaliada pelo método de incorporação de  $^3\text{H-Td}$  após estimulação *in vitro* por PHA-P (A), SEA (B) ou SWAP (C). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE) e representados em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam as medianas obtidas para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 5** - Reatividade de PBMC obtidas de indivíduos residentes em áreas endêmicas avaliada pelo método de incorporação de BrdU após estimulação *in vitro* por PHA-P (A), SEA (B) ou SWAP (C). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE) e representados em gráficos de dispersão de valores individuais. Barras coloridas representam as medianas obtidas para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.

Após verificarmos a correspondência entre os resultados de reatividade *in vitro* de PBMC obtidos com o emprego das metodologias de incorporação de  $^3\text{H-Td}$  e de incorporação de BrdU, nós aplicamos o teste estatístico não paramétrico de correlação de Spearman para verificar a existência de associações entre o desempenho destas metodologias. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre os desempenhos das duas metodologias empregadas (FIG. 5).



**Figura 6** - Correlação entre a reatividade de PBMC avaliada pelos métodos de detecção de  $^3\text{H-Td}$  ou BrdU incorporados ao DNA celular após estimulação *in vitro* na presença de PHA (●), SEA (●) ou SWAP (●). A associação entre as variáveis foi representada pelo coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) e a força desta associação representada pelo valor  $p$ , sendo considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .

A correlação positiva entre as duas metodologias empregadas validou as subseqüentes análises dos aspectos funcionais da resposta imune celular contra antígenos de *S. mansoni* realizadas com os dados de reatividade celular obtidos com o emprego da metodologia de incorporação de BrdU associada à imunofenotipagem celular. Esta estratégia metodológica nos permitiu avaliar, simultaneamente, os aspectos funcionais e imunofenotípicos da resposta de linfoproliferação após estimulação *in vitro*.



## 4.2 Frequência e reatividade *in vitro* de LB CD19<sup>+</sup> e LT CD3<sup>+</sup>

Os resultados descritos acima foram indicativos de que a reatividade *in vitro* de PBMC não é influenciada pelo contexto da infecção (NI, XTO ou CO) nem pela estimulação antigênica (SEA ou SWAP). Apesar disto, questionamos se a ausência de diferenças, necessariamente refletia um envolvimento das mesmas populações celulares. Para responder a esta questão, nossa próxima estratégia metodológica foi realizar análises funcionais e fenotípicas das diferentes populações de linfócitos presentes em PBMC estimulados pelos antígenos.

Assim, quantificamos a frequência das populações de LT CD3<sup>+</sup> e de LB CD19<sup>+</sup>, assim como das subpopulações majoritárias de LT auxiliares CD4<sup>+</sup> e de LT citotóxicos/supressores CD8<sup>+</sup> presentes nas culturas de PBMC após estimulação por SEA ou SWAP. Em seguida, avaliamos a reatividade celular destas populações, calculando o percentual de contribuição destas populações para a proliferação total de PBMC.

A Tabela 5 sumariza os resultados das análises de frequência das populações de LB CD19<sup>+</sup> e LT CD3<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA e SWAP. Comparando estas duas populações de linfócitos, podemos observar que os LT CD3<sup>+</sup> formaram a população celular majoritária (~60%) em relação aos LB CD19<sup>+</sup> (~10%) nas culturas de PBMC ( $p < 0,001$ ). Entretanto, quando comparamos a frequência de cada população entre os grupos de indivíduos avaliados (NI, XTO e CO) não observamos diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), sugerindo que o contexto da infecção não influencia a participação destas populações celulares na resposta imune contra antígenos de *S. mansoni*.

A importância dos LT CD3<sup>+</sup> nas culturas de PBMC foi corroborada pelas análises dos aspectos funcionais das diferentes populações celulares, sendo que estes linfócitos apresentaram maior reatividade *in vitro*, contribuindo com aproximadamente sessenta e cinco por cento da proliferação celular total, enquanto os LB CD19<sup>+</sup> contribuíram com apenas trinta por cento da proliferação celular total (FIGs. 7 e 8).

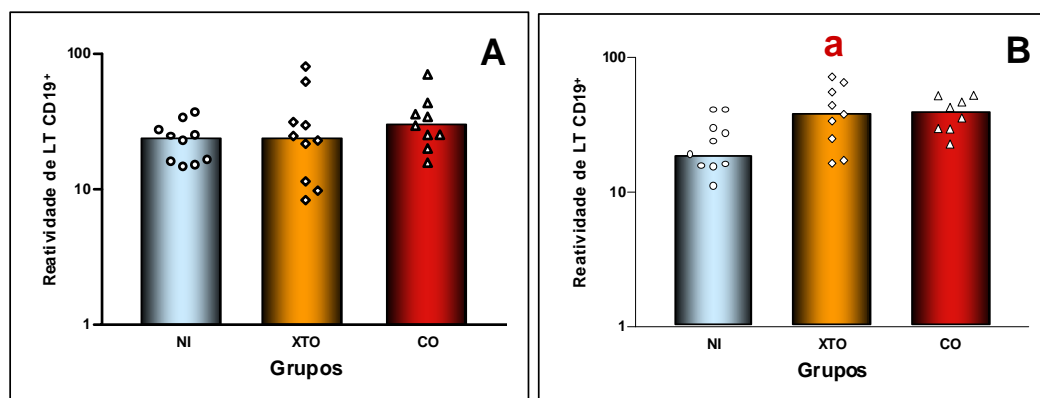
A reatividade dos LT CD3<sup>+</sup> foi semelhante entre os grupos de indivíduos avaliados ( $p > 0,05$ ) e independentes do estímulo antigênico utilizado (SEA e SWAP). Entretanto, em relação aos LB CD19<sup>+</sup> a estimulação com o antígeno SWAP induziu maior reatividade ( $p < 0,05$ ) no grupo de indivíduos mono-infectados por *S. mansoni* - XTO em relação ao grupo de indivíduos não infectados - NI (FIG. 7B). O

mesmo efeito não foi observado após estimulação de PBMC com o antígeno SEA ( $p = 0,2860$ ) (FIG. 7A). Estes resultados sugerem que os LB CD19<sup>+</sup> podem apresentar um importante papel na resposta imune induzida pela infecção por *S. mansoni*.

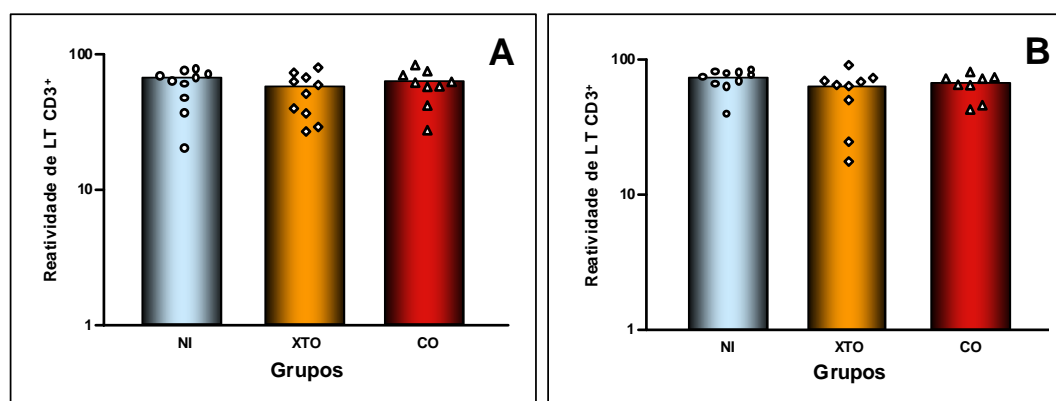
**Tabela 5** - Frequência de LB CD19<sup>+</sup> e LT CD3<sup>+</sup>, após estimulação *in vitro*.

	SEA		SWAP	
	LB CD19 <sup>+</sup>	LT CD3 <sup>+</sup>	LB CD19 <sup>+</sup>	LT CD3 <sup>+</sup>
NI	11,9 (04,2-23,4)	63,5 (33,7-79,1)	11,4 (04,7-22,0)	59,4 (41,5-82,6)
XTO	11,9 (04,1-19,6)	61,6 (44,6-80,1)	10,7 (05,8-20,7)	64,1 (42,1-82,1)
CO	12,4 (06,8-15,2)	61,4 (39,6-86,8)	11,7 (0,7-16,7)	57,0 (50,5-86,8)

Os resultados foram expressos como mediana da frequência de cada população de linfócitos. Os números representados entre parênteses indicam valores mínimos e máximos dos intervalos.



**Figura 7** - Reatividade de LB CD19<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). A reatividade foi calculada como o valor percentual da contribuição de LT CD19<sup>+</sup> para a proliferação celular total de PBMC e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam os valores medianos de os grupos de indivíduos: NI [■ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. A letra a representa diferença significativa entre a mediana observada para o grupo XTO em relação ao grupo NI. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 8** - Reatividade de LT CD3<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). A reatividade foi calculada como o valor percentual da contribuição de LT CD3<sup>+</sup> para a proliferação celular total de PBMC e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. Barras coloridas representam os valores medianos obtidos para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.

#### 4.3 Frequência e a reatividade *in vitro* das subpopulações majoritárias de LT CD4<sup>+</sup> e de LT CD8<sup>+</sup>

Em relação às frequências das subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>, os resultados sumarizados na Tabela 6 demonstraram maior envolvimento ( $\rho < 0,01$ ) da subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> quando comparado à subpopulação de LT CD8<sup>+</sup> apenas nos grupos XTO e CO, após estimulação por SEA. Já em relação à influência do contexto da infecção na participação destas subpopulações de linfócitos na resposta imune contra SEA ou SWAP, não observamos diferenças significativas ( $\rho > 0,05$ ) entre os grupos de indivíduos avaliados (NI, XTO ou CO).

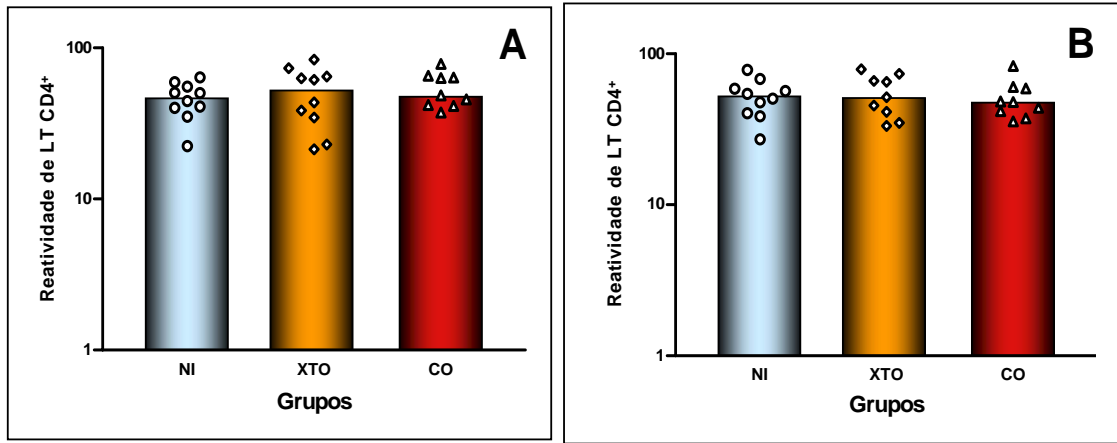
**Tabela 6** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro*.

	SEA		SWAP	
	LT CD4 <sup>+</sup>	LT CD8 <sup>+</sup>	LT CD4 <sup>+</sup>	LT CD8 <sup>+</sup>
<b>NI</b>	<b>40,3 (24,0-59,4)</b>	<b>27,1 (10,0-40,0)</b>	<b>38,2 (22,3-56,4)</b>	<b>34,1 (21,3-63,1)</b>
<b>XTO</b>	<b>48,3 (32,4-62,0)</b>	<b>27,3 (22,2-31,9)</b>	<b>47,2 (29,5-63,1)</b>	<b>36,3 (26,5-40,7)</b>
<b>CO</b>	<b>47,6 (37,1-71,6)</b>	<b>29,1 (21,2-40,4)</b>	<b>38,9 (30,5-64,3)</b>	<b>30,2 (23,5-44,4)</b>

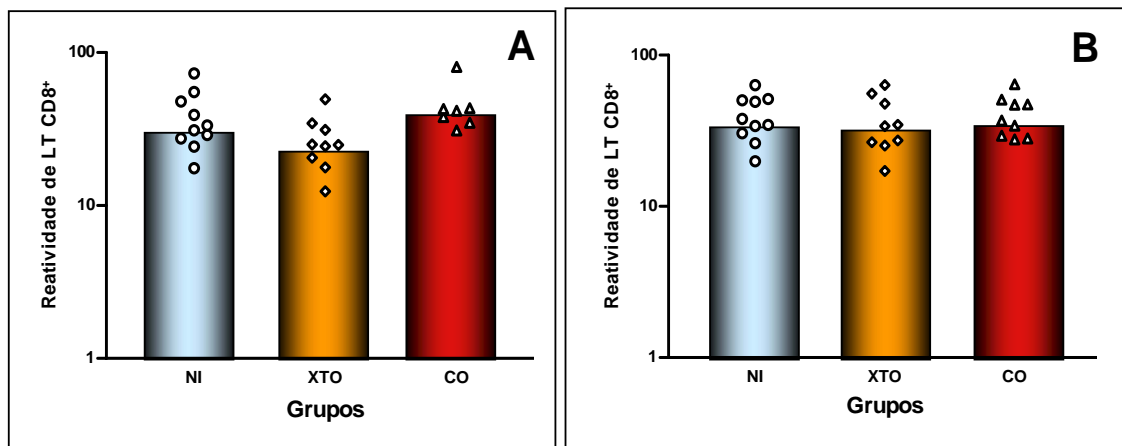
Os resultados foram expressos como mediana da frequência de cada população de linfócitos, sendo os valores mínimos e máximos do intervalo indicados entre parênteses.

Os resultados de reatividade *in vitro* das subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> foram resumidos nas Figuras 9 e 10. Podemos observar que a subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> foi mais reativa (~50%) quando comparada à subpopulação de LT CD8<sup>+</sup> (~ 30%), independente do estímulo antigênico (SEA ou SWAP) utilizado. Novamente, o contexto da infecção não induziu diferenças significativas ( $\rho > 0,05$ ) na reatividade dos LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>, já que os valores obtidos para os grupos de indivíduos NI, XTO e CO foram semelhantes.

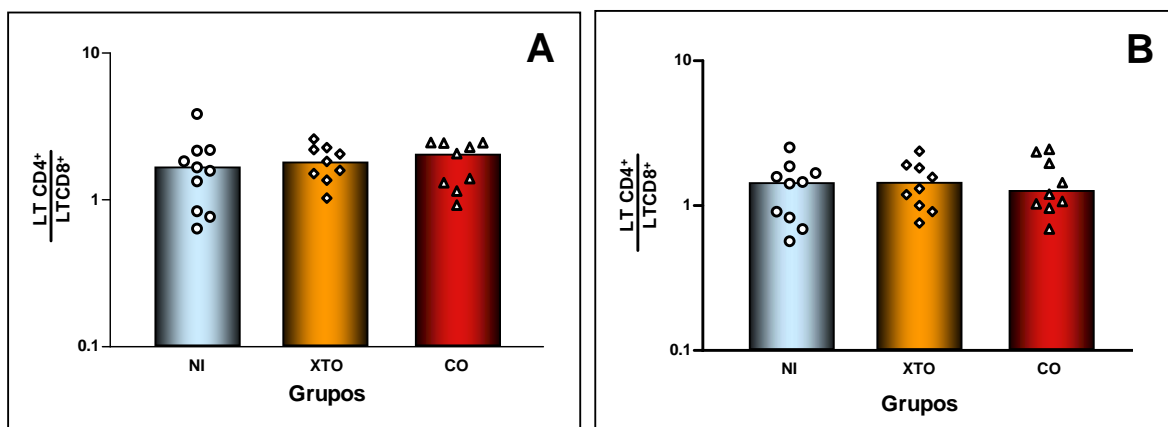
Para confirmar o maior envolvimento da subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> durante a resposta imune induzida pelos antígenos de *S. mansoni*, a razão entre a frequência e reatividade destas subpopulações de linfócitos (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) foi calculada considerando-se o contexto da infecção. Os resultados obtidos para esta razão foram sempre maiores que um, confirmando a maior participação da subpopulação de LT CD4<sup>+</sup>, tanto em termos de frequência como de reatividade *in vitro* (FIGs. 11 e 12). Além disso, podemos observar que o envolvimento das subpopulações de linfócitos não foi influenciado pelo contexto da infecção, já que não foram observadas diferenças significativas ( $\rho > 0,05$ ) entre as medianas obtidas para os grupos de indivíduos avaliados, independente do estímulo antigênico utilizado.



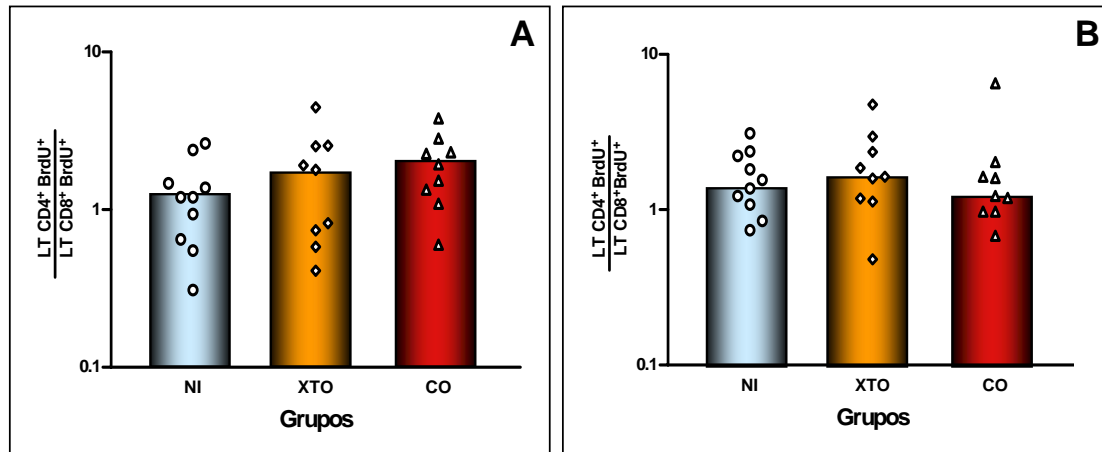
**Figura 9** - Reatividade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). A reatividade foi calculada como o valor percentual da contribuição de LT CD4<sup>+</sup> para a proliferação celular total de PBMC e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam os valores medianos obtidos para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 10** - Reatividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). A reatividade foi calculada como o valor percentual da contribuição de LT CD8<sup>+</sup> para a proliferação celular total de PBMC e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam os valores medianos obtidos para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 11** - Razão entre a frequência de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão de valores individuais, sendo os valores medianos de cada grupo de indivíduos representados por barras coloridas: NI [■ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.

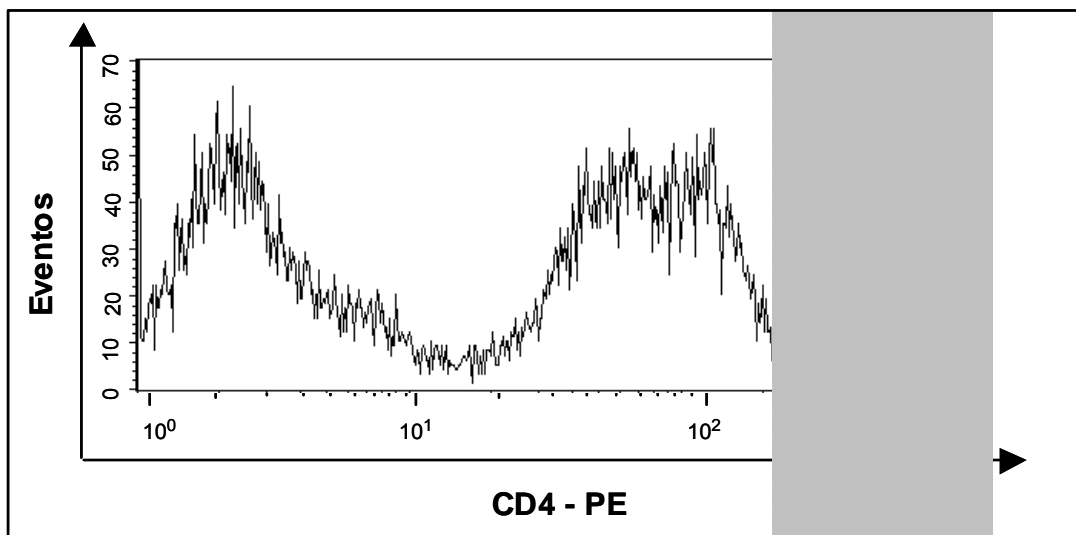


**Figura 12** - Razão entre a reatividade de LT CD4<sup>+</sup> e de LT CD8<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> / LT CD8<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup>) após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão de valores individuais, sendo os valores medianos de cada grupo de indivíduos representados por barras coloridas: NI [■ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.

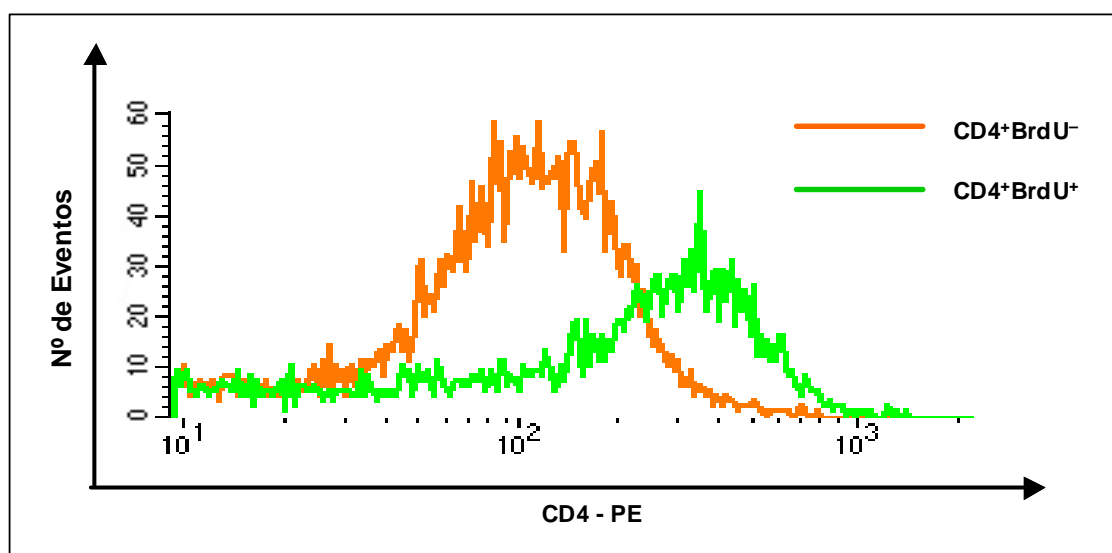
#### 4.4 Frequência e reatividade *in vitro* da subpopulação LT CD4<sup>HIGH</sup>

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas na frequência e reatividade da subpopulação majoritária de LT CD4<sup>+</sup> e, baseado em trabalhos da literatura que chamam a atenção para um subconjunto minoritário de células T CD4<sup>HIGH</sup> (Ridgway *et al.* 1998; Lejon & Fathman 1999; Novak *et al.* 1999), passamos a avaliar a presença e caracterizar a subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> dentro do contexto da infecção por *S. mansoni*.

A análise dos dados nos permitiu identificar esta subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> (FIG. 13) e demonstrar que estes linfócitos estavam contidos, principalmente, no subconjunto de LT CD4<sup>+</sup> reativos, ou seja, LT CD4<sup>+</sup> que incorporaram BrdU (FIG. 14).



**Figura 13** - Histograma representativo da frequência de linfócitos expressando alta densidade do marcador CD4 de superfície (LT CD4<sup>HIGH</sup>) após estimulação *in vitro* com SWAP. O gráfico foi construído com os dados provenientes de um indivíduo do grupo XTO.



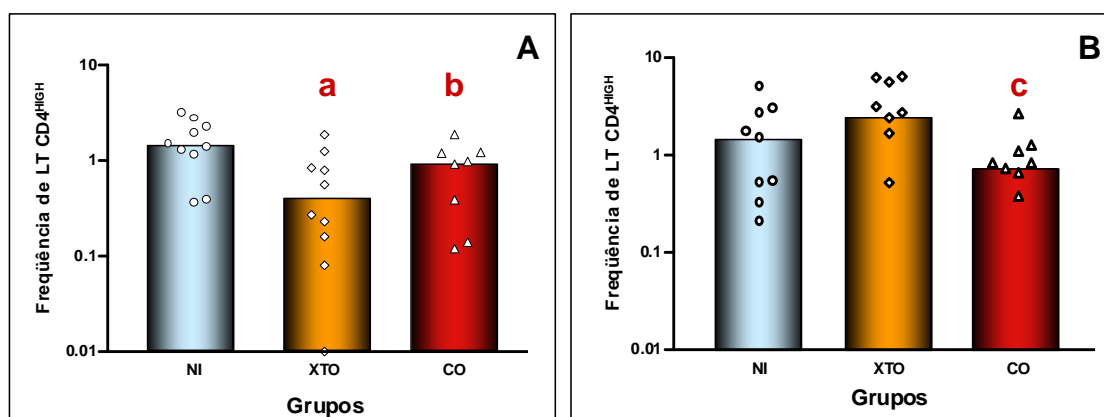
**Figura 14** - Histograma representativo da intensidade média de fluorescência (MFI) de LT CD4<sup>+</sup> reativos (CD4<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup>) e LT CD4<sup>+</sup> não reativos (CD4<sup>+</sup>BrdU<sup>-</sup>) após estimulação *in vitro* com SWAP. O gráfico foi construído com os dados provenientes de um indivíduo do grupo XTO.

Após identificarmos a subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup>, avaliamos se haveria diferença na frequência e expansão destes linfócitos considerando-se o contexto da infecção e a resposta imune celular antígeno-específica (NI, XTO ou CO). As análises dos resultados mostraram que o contexto da infecção influenciou a frequência e reatividade destas células, sendo que o tipo de estímulo antigênico (SEA ou SWAP) também induziu diferenças significativas (FIGs. 15, 16 e 17).

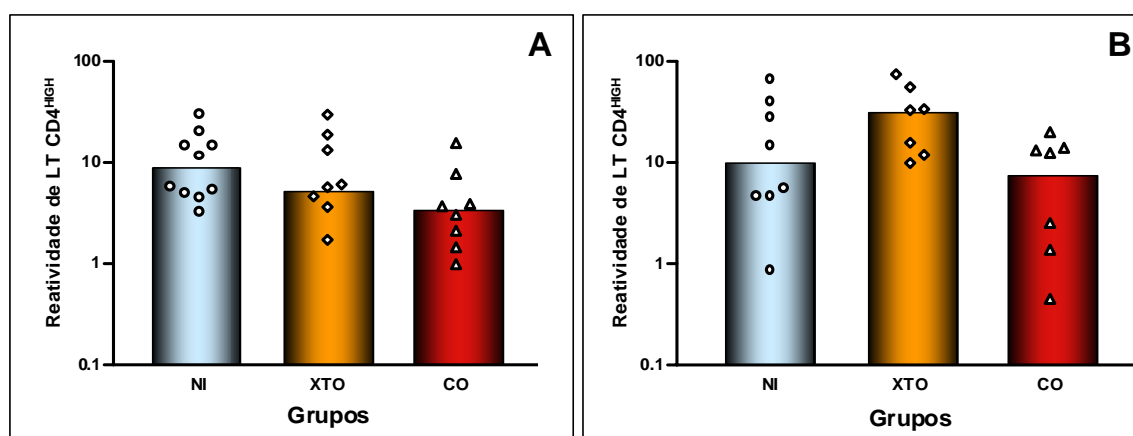
A Figura 15 resume os dados de frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> e mostra que a estimulação *in vitro* com SEA induziu uma menor frequência ( $p < 0,05$ ) destes linfócitos nos indivíduos dos grupos XTO e CO comparada àquela dos indivíduos do grupo NI. Já a estimulação por SWAP induziu menor frequência ( $p < 0,05$ ) de LT CD4<sup>HIGH</sup> apenas no grupo de indivíduos co-infectados quando comparada aos valores observados para os indivíduos do grupo XTO.

Após investigarmos a influência do contexto da infecção na frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup>, avaliamos a reatividade destes linfócitos no contexto da mono- ou co-infecções. Para esta análise, nossa estratégia foi calcular a contribuição da subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> para a proliferação total de LT CD4<sup>+</sup>. Os resultados desta análise não demonstraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre a reatividade dos LT CD4<sup>HIGH</sup> quando comparamos os grupos de indivíduos avaliados (FIG. 16).



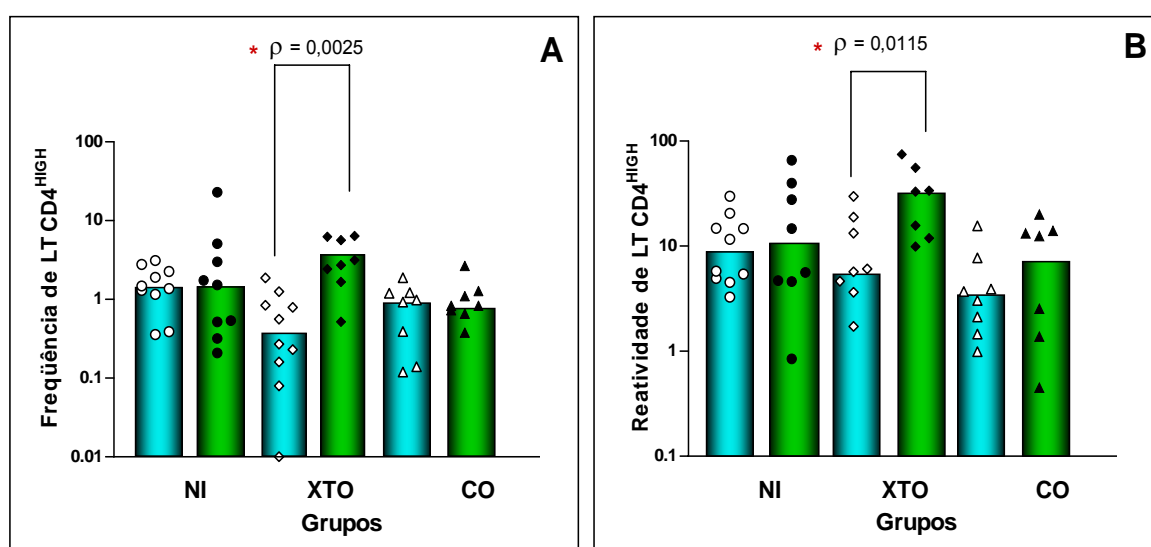


**Figura 15** - Frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A) ou SWAP (B). A frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> foi calculada como o valor percentual de LT CD4<sup>HIGH</sup> observados na subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam os valores medianos obtidos para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. As Letras **a** e **b** representam a existência de diferenças significativas ( $\rho < 0,05$ ) entre a frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> no grupo de indivíduos XTO e CO, respectivamente, em relação ao grupo NI. A letra **c** representa a existência de diferença significativa ( $\rho < 0,05$ ) entre a frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> no grupo de indivíduos CO comparado ao grupo XTO. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 16** - Reatividade de LT CD4<sup>HIGH</sup> após estimulação por SEA (A) ou SWAP (B). A reatividade foi calculada como o valor percentual da contribuição de LT CD4<sup>HIGH</sup> para a proliferação celular total de LT CD4<sup>+</sup> e foi representada em gráficos de dispersão de valores individuais. As barras coloridas representam os valores medianos obtidos para os grupos de indivíduos: NI [□ ○], XTO [■ ◇] e CO [■ △]. Gráficos em escala logarítmica.

Finalmente, investigamos a influência dos diferentes antígenos SEA e SWAP sobre a frequência e reatividade dos LT CD4<sup>HIGH</sup>, considerando o contexto da infecção. Nossos resultados mostram que o antígeno SWAP induziu maior frequência ( $p = 0,0057$ ) e reatividade dos LT CD4<sup>HIGH</sup> ( $p = 0,0156$ ) quando comparadas àquelas induzidas pelo antígeno SEA, apenas no grupo de indivíduos XTO (FIG. 17).



**Figura 17** - Influência dos antígenos SEA (■) e SWAP (■) na frequência (A) ou reatividade (B) de LT CD4<sup>HIGH</sup>. Os resultados foram representados em gráficos de dispersão de valores individuais, sendo os valores medianos da frequência e reatividade representados por barras coloridas. Gráficos em escala logarítmica. Os asteriscos representam as diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na frequência e reatividade induzidas pelos antígenos.

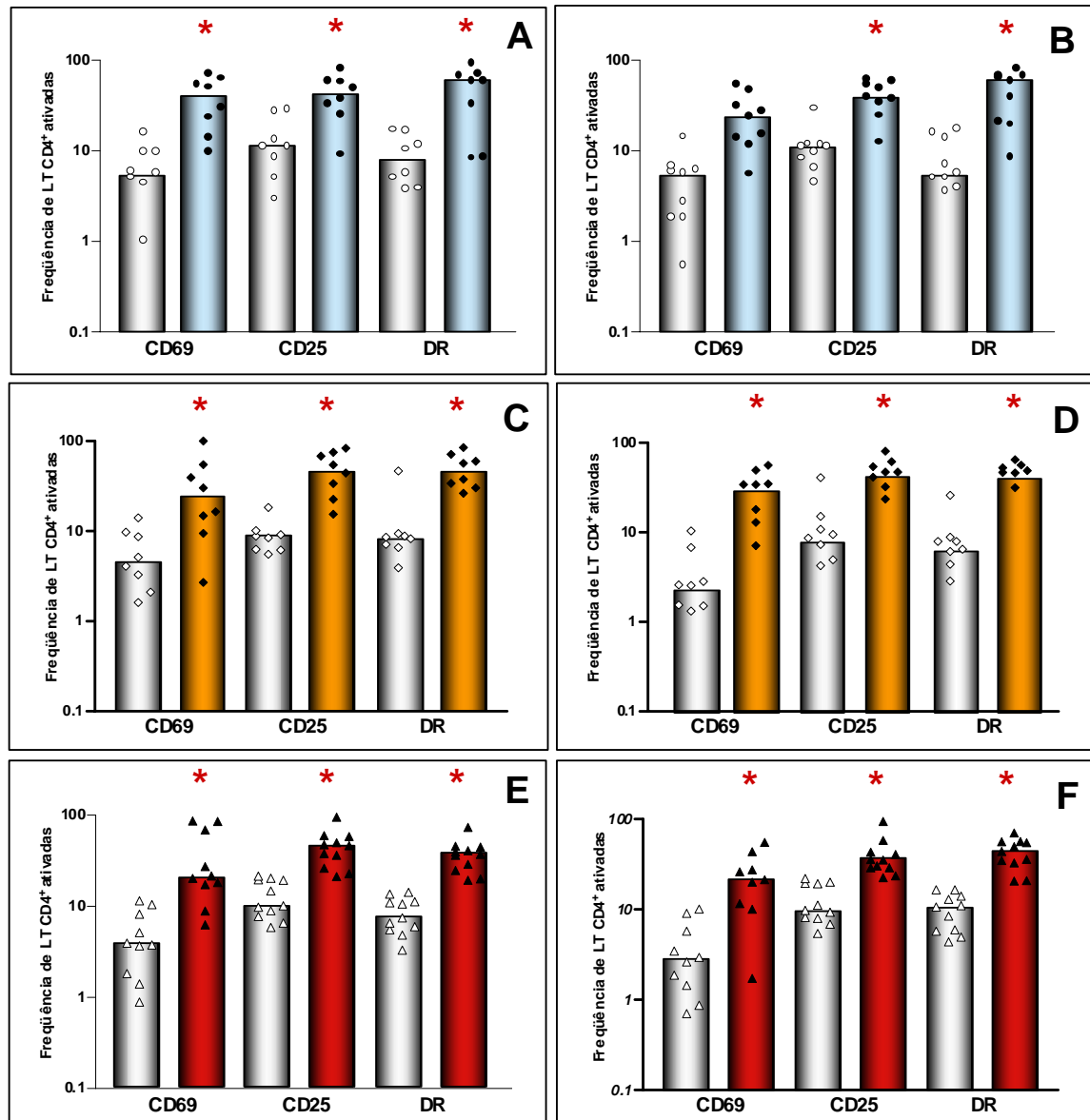
## 4.5 Aspectos fenotípicos das subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e de LT CD4<sup>HIGH</sup>

Após a identificação da existência de uma subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> em culturas de PBMC estimuladas *in vitro*, demonstramos que a frequência e reatividade destes LT CD4<sup>HIGH</sup> são dependentes do contexto da infecção e do estímulo antigênico. Em seguida, questionamos se a presença/ausência de co-infecções induziria diferenças na expressão de outros marcadores de superfície celular nesta subpopulação minoritária de LT CD4<sup>HIGH</sup> e, ainda, se estes linfócitos seriam diferentes dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> convencionais.

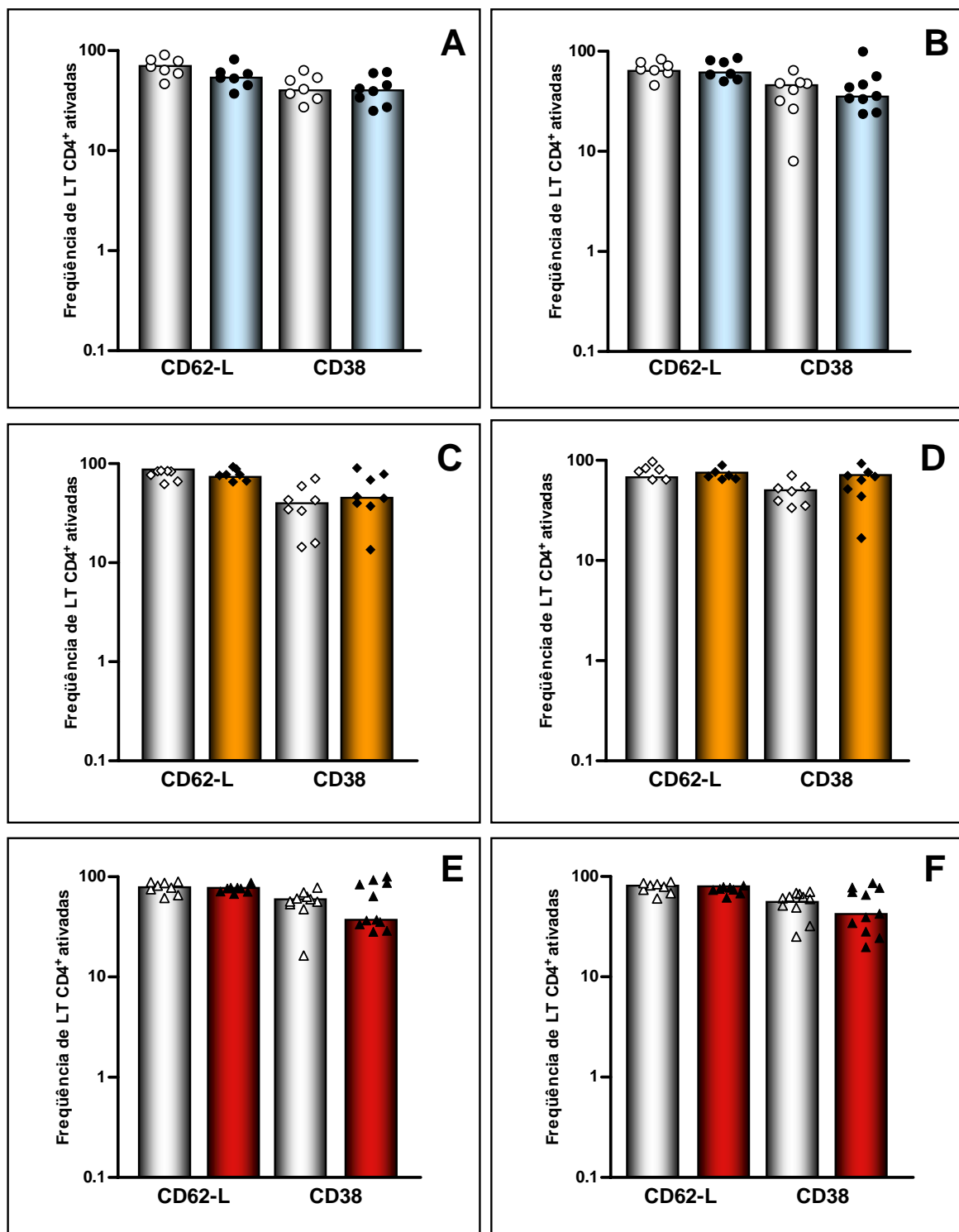
### 4.5.1 Expressão dos marcadores de ativação celular na subpopulação de LT auxiliares

Primeiramente, realizamos a análise do perfil de expressão dos marcadores de ativação inicial (CD69 e CD62L), ativação intermediária (CD25 e CD38) e ativação tardia (HLA-DR). Os resultados obtidos foram representados na Figura 18, onde podemos observar que os LT CD4<sup>HIGH</sup> apresentaram maiores níveis de expressão dos marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR comparados aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais ( $p < 0,01$ ). A maior expressão destes marcadores de ativação nos LT CD4<sup>HIGH</sup> foi independente dos estímulos antigênicos utilizados (SEA ou SWAP) ou do contexto da infecção (NI, XTO ou CO).

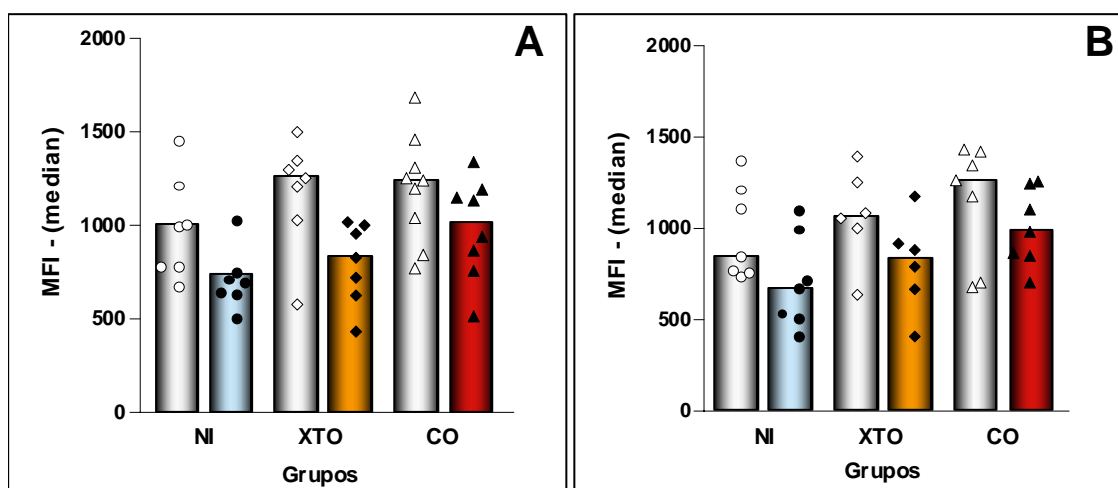
Entretanto, para os marcadores de ativação CD62L e CD38 a estimulação *in vitro* com SEA ou SWAP não induziu diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas frequências obtidas para as duas subpopulações avaliadas, independente do contexto da infecção (FIG. 19). Além disso, considerando que o marcador CD62L é uma selectina que está presente também em linfócitos não primados por antígenos, mas têm a expressão diminuída após eventos de ativação celular, avaliamos a densidade de expressão deste marcador nos LT CD4<sup>HIGH</sup> e LT CD4<sup>+</sup> convencionais. Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas na densidade de expressão deste marcador de ativação (FIG. 20).



**Figura 18** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e LT CD4<sup>HIGH</sup> expressando os marcadores de ativação celular CD69, CD25 e HLA-DR após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre a frequência de LT ativados CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> observados no subconjunto de LT CD4<sup>HIGH</sup> (●◆▲) em relação aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◇△). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: ■■ NI, ■■ XTO e ■■ CO. Gráficos em escala logarítmica.



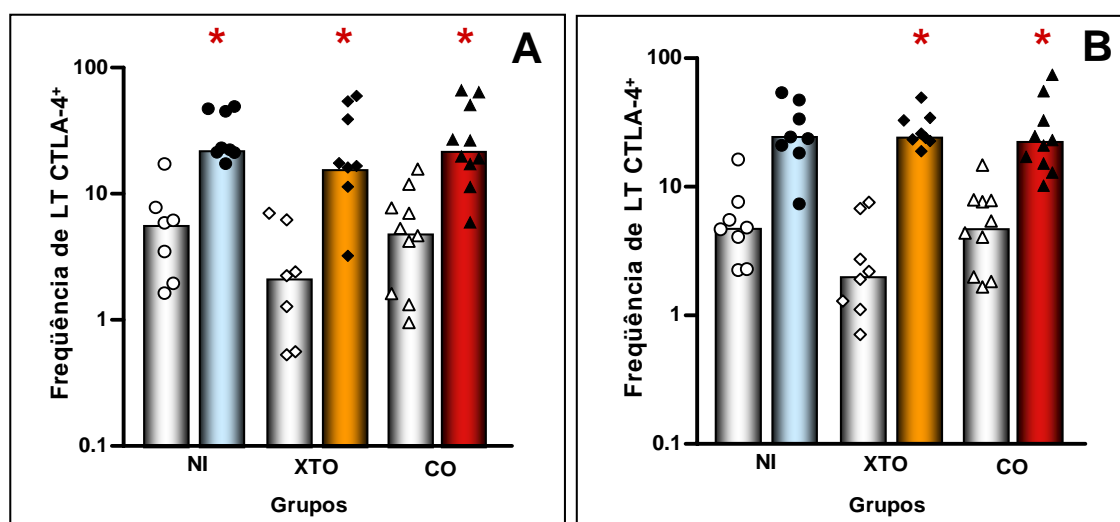
**Figura 19** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◇) e LT CD4<sup>HIGH</sup> (●◆) expressando os marcadores de ativação celular CD62L e CD38 após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: □□ NI, □■ XTO e ■■ CO. Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 20** - Densidade de expressão (MFI) do marcador de ativação celular CD62L em LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◊△) e LT CD4<sup>HIGH</sup> (●◆▲) após estimulação *in vitro* por SEA (**A**) ou SWAP (**B**). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: ■■ NI, ■■ XTO e ■■ CO. Gráficos em escala linear.

#### 4.5.2 Frequência *in vitro* de LT auxiliares CTLA-4<sup>+</sup>

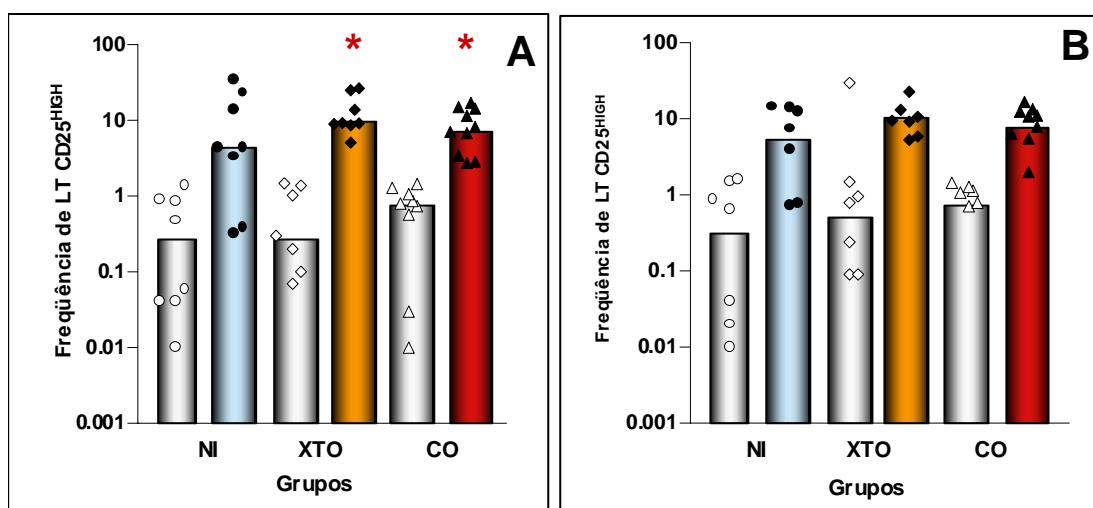
A análise da frequência de LT auxiliares expressando o marcador de co-estimulação celular CTLA-4 demonstrou que, independente do contexto da infecção (NI, XTO e CO) ou do estímulo antigênico, os LT CD4<sup>HIGH</sup> apresentaram maior expressão deste marcador ( $p > 0,01$ ) comparada àquelas observadas para os LT CD4<sup>+</sup> convencionais. Contudo, no grupo NI ocorreu uma exceção, pois, a estimulação por SWAP não induziu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no percentual de células expressando este marcador entre os LT CD4<sup>HIGH</sup> e os LT CD4<sup>+</sup> convencionais (FIG. 21).



**Figura 21** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e LT CD4<sup>HIGH</sup> expressando o marcador de co-estimulação CTLA-4 após estimulação *in vitro* por SEA (**A**) ou SWAP (**B**). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos:   NI,   XTO e   CO. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as frequências de LT CTLA-4<sup>+</sup> observados na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> (●●▲) em relação aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◇△). Gráficos em escala logarítmica.

#### 4.5.3 Frequência *in vitro* de LT auxiliares CD25<sup>HIGH</sup>

A análise da frequência de LT auxiliares expressando altos níveis do marcador de células reguladoras CD25 (CD25<sup>HIGH</sup>) demonstrou que estes linfócitos foram mais frequentes entre a subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> ( $p > 0,01$ ) comparados à subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> convencionais, apenas nos grupos XTO e CO após estimulação *in vitro* por SEA. Já a estimulação com SWAP não induziu diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os LT CD4<sup>HIGH</sup> e os LT CD4<sup>+</sup> (FIG. 22).



**Figura 22** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e LT CD4<sup>HIGH</sup> expressando alta densidade do marcador de superfície CD25 (CD25<sup>HIGH</sup>) após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: □□ NI, □■ XTO e □■ CO. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as frequências de linfócitos T CD25<sup>HIGH</sup> observados na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> (●●▲) em relação aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◊△). Gráficos em escala logarítmica.

#### 4.5.4 Expressão de marcadores de memória celular na subpopulação de LT auxiliares

A análise da frequência de LT auxiliares não primados e de memória foi realizada utilizando-se os marcadores CD44, CD45RA e CD45RO. A Figura 23 resume os resultados obtidos, na qual podemos observar que os LT auxiliares expressando o marcador CD45RO são mais frequentes entre os LT CD4<sup>HIGH</sup>, comparados aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais ( $p < 0,01$ ), independente do contexto da infecção (NI, XTO e CO) ou do estímulo antigênico (SEA ou SWAP).

No grupo de indivíduos NI observou-se uma maior frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> expressando o marcador CD44 comparados aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais ( $p > 0,01$ ), independente do estímulo antigênico. Quanto à expressão do marcador CD45RA, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre a frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> CD45RA<sup>+</sup> comparados aos LT CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>.

Considerando-se ainda o conhecimento atual sobre marcadores de células não primadas e células de memória, estudos recentes (Dutton *et al.* 1998) têm

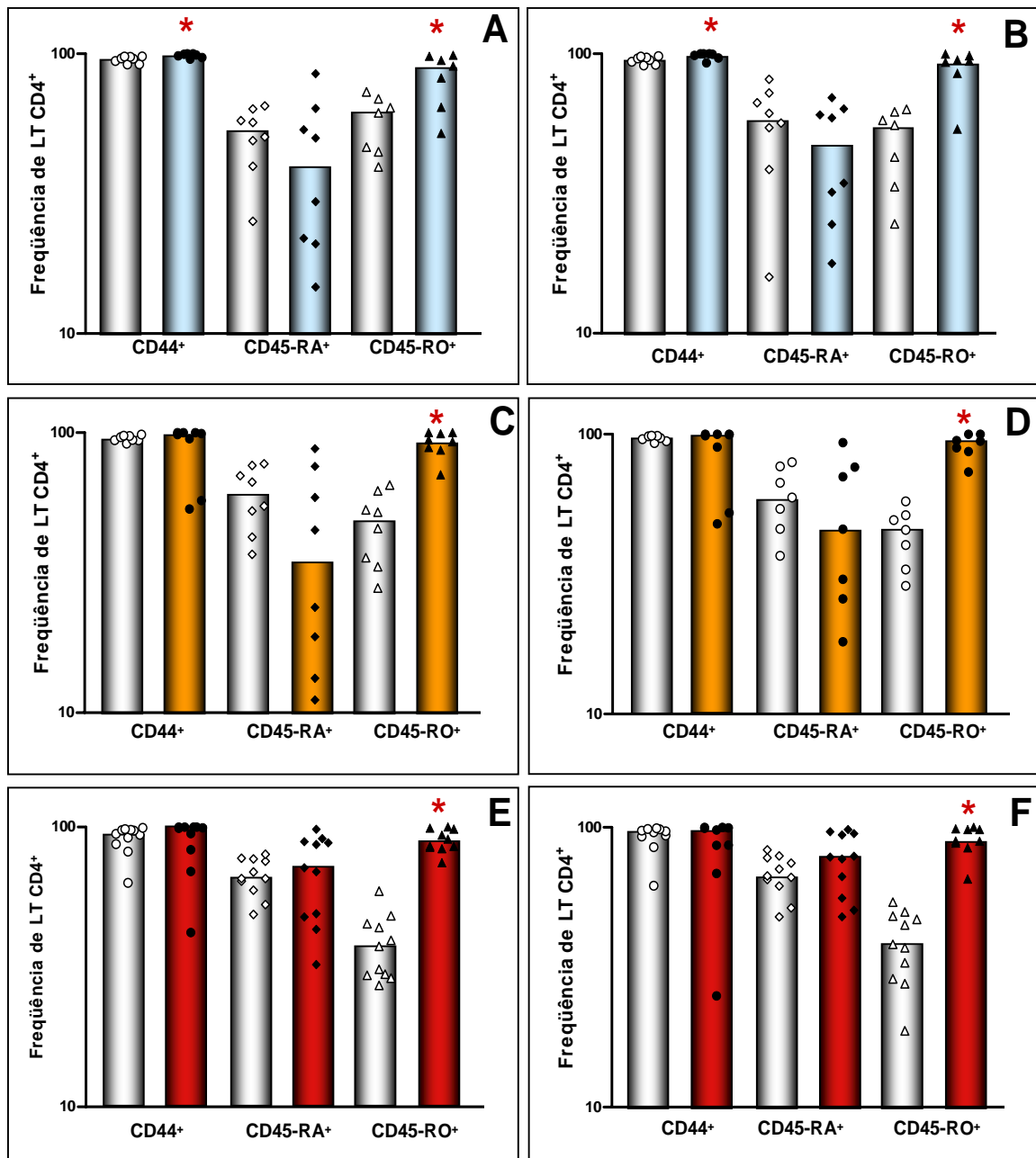


demonstrado que as moléculas CD44, CD45RA e CD45RO podem ser expressas por células não primadas por antígenos e por células de memória, sendo que a perda da molécula CD45RA e a aquisição das moléculas CD44 e CD45RO podem melhor caracterizar o evento de diferenciação em células de memória do que a simples análise da presença/ausência destes marcadores sobre a superfície celular.

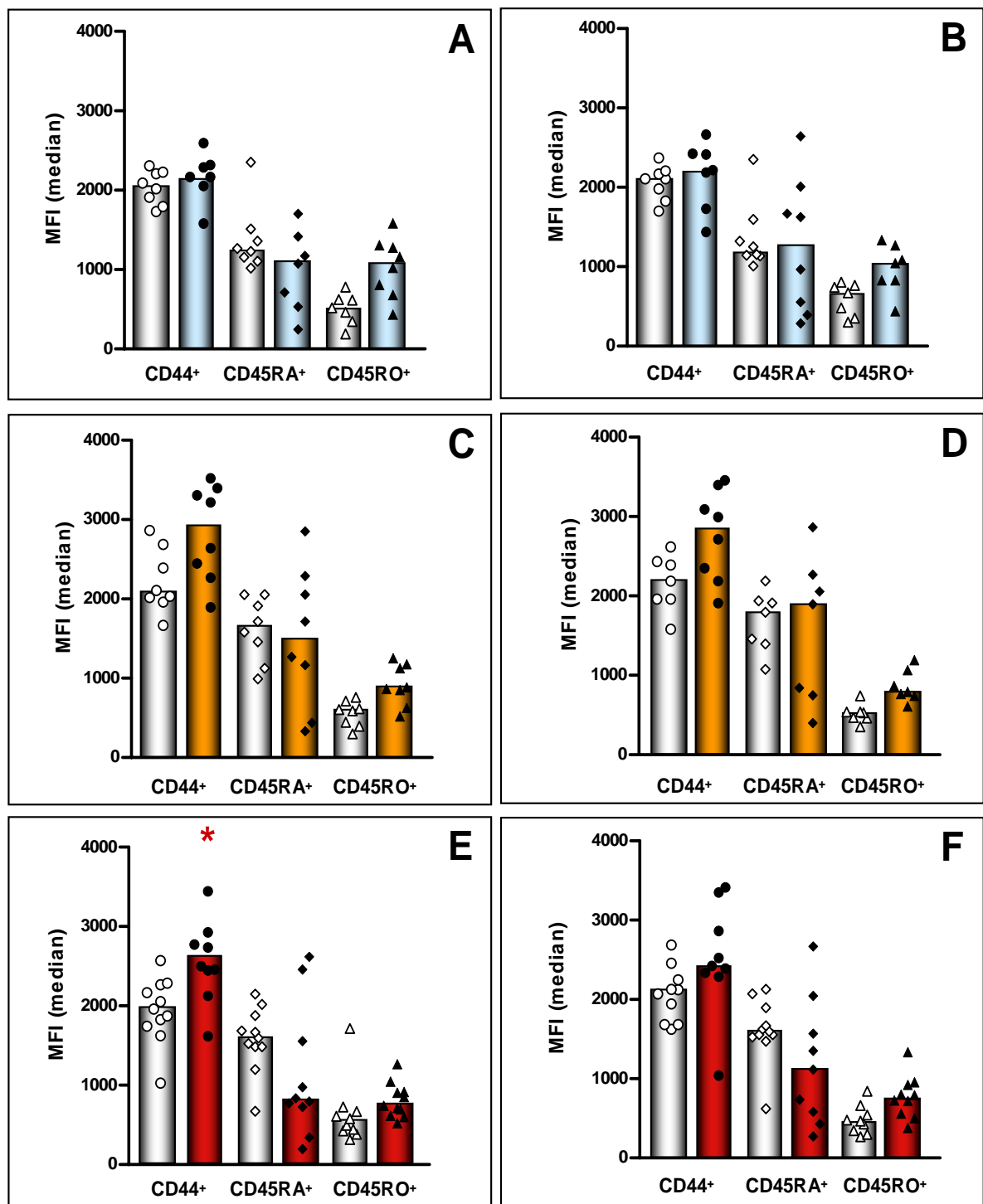
Assim, utilizamos a avaliação da densidade de expressão dos marcadores sobre a superfície celular como outra estratégia de análise. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 24, onde podemos observar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos níveis de expressão destes marcadores entre as duas subpopulações de LT auxiliares. Uma exceção foi observada apenas no grupo NI, após estimulação com SEA, que demonstrou maior nível de expressão do marcador CD44 nos LT CD4<sup>HIGH</sup>, quando comparados aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais ( $p < 0,05$ ).

Além disso, calculamos também a razão entre o percentual de LT auxiliares expressando ou não os marcadores CD45RA e CD45RO, ou seja, a razão (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) e (CD45RO<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>). Nessa abordagem, considerando-se que a perda da isoforma CD45RA é um evento precoce na diferenciação celular, uma razão menor que 1 foi considerada indicativa de uma subpopulação de células de memória. Já para a molécula CD45RO, considerando-se que a aquisição desta isoforma é um evento que caracteriza diferenciação celular em células de memória, uma razão maior que 1 foi considerada indicativa de uma subpopulação de células de memória. A Figura 25 resume os resultados obtidos com esta análise e mostra que, para a isoforma CD45RA a razão foi menor ou próxima a 1, independente do contexto da infecção ou dos estímulos antigênicos.

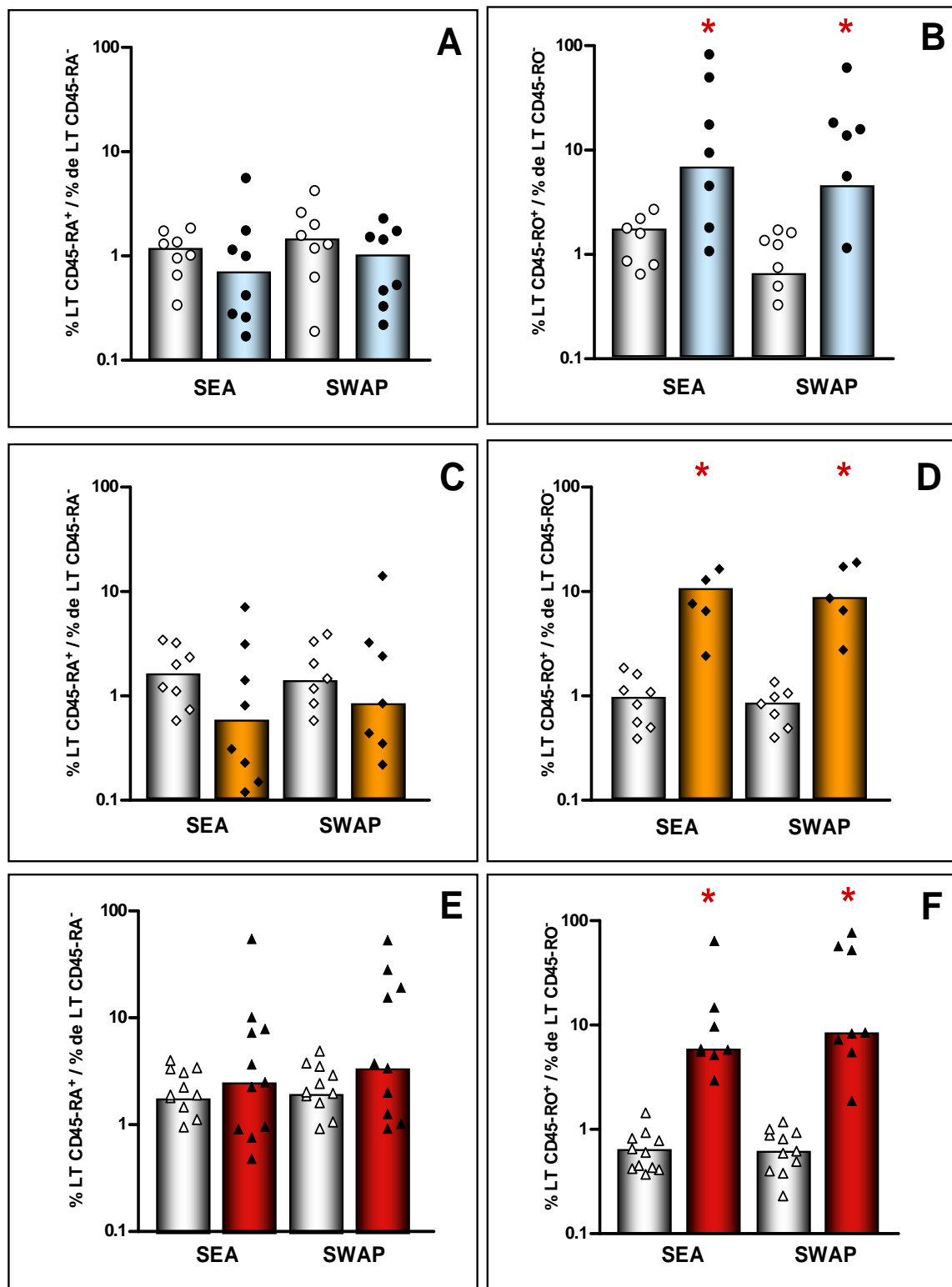
Ainda na Figura 25 podemos observar que a razão CD45-RO<sup>+</sup> / CD45-RO<sup>-</sup> foi maior que 1 na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> e menor ou igual a 1 na subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> convencionais, sendo estas diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) para todos os grupos de indivíduos, independente da estimulação antigênica. Uma exceção foi observada apenas no grupo de indivíduos NI, após estimulação com SEA, onde não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as razões obtidas para as subpopulações CD4<sup>HIGH</sup> e CD4<sup>+</sup> convencionais.



**Figura 23** - Frequência de LT CD4<sup>+</sup> convencionais e LT CD4<sup>HIGH</sup> expressando os marcadores de células de memória CD44, CD45RA e CD45RO após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: □□ NI, □□ XTO e □□ CO. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as frequências de linfócitos T CD44<sup>+</sup> e CD45-RO<sup>+</sup> observados na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> (●●▲) em relação aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◇△). Gráficos em escala logarítmica.



**Figura 24** - Densidade de expressão (MFI) dos marcadores de memória CD44, CD45RA e CD45RO em LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◇△) e LT CD4<sup>HIGH</sup> (●◆▲) após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos: □ NI, □ XTO e □ CO. Gráficos em escala linear.



**Figura 25** - Razão entre LT auxiliares CD45-RA<sup>+</sup> / LT CD45-RA<sup>-</sup> e LT CD45-RO<sup>+</sup> / LT CD45-RO<sup>-</sup> após estimulação *in vitro* por SEA (A, C, E) ou SWAP (B, D, F). Os resultados foram representados em gráficos de dispersão individual, sendo as barras coloridas representativas da mediana obtida para os grupos de indivíduos:  NI,  XTO e  CO. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre as razões CD45-RO<sup>+</sup> / CD45-RO<sup>-</sup> observadas no sub-conjunto de LT CD4<sup>HIGH</sup> (●♦♦) em relação aos LT CD4<sup>+</sup> convencionais (○◊△). Gráficos em escala logarítmica.

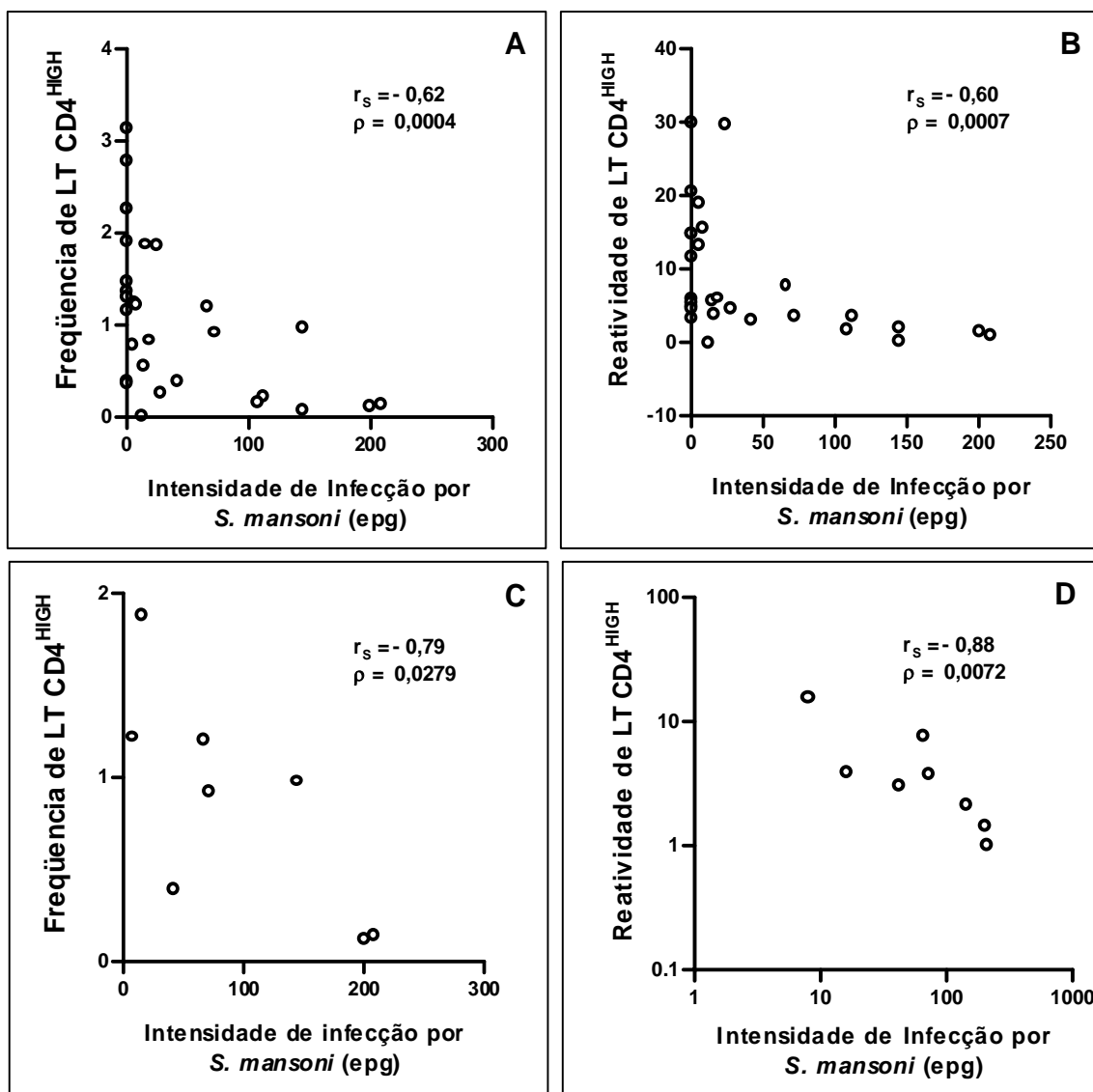
#### 4.6 Correlação entre os principais achados sobre os aspectos funcionais e fenotípicos *in vitro* das populações celulares e outros parâmetros biológicos relacionados às infecções helmínticas

Considerando-se que dados da literatura sugerem que a presença de co-infecções por geo-helmintos resulta em maior parasitemia por *S. mansoni* (Fleming *et al.* 2006) e, ainda, que nossos resultados demonstraram que a co-infecção por *S. mansoni* e geo-helmintos induziu uma menor frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> após estimulação *in vitro* por SEA e SWAP (FIG. 15), nossa próxima estratégia metodológica foi avaliar a existência de associações entre a intensidade de infecção e os aspectos funcionais ou fenotípicos da resposta imune induzida pelos antígenos de *S. mansoni* no contexto das co-infecções.

Para esta abordagem, o teste estatístico não paramétrico de Spearman foi aplicado para correlacionar os parâmetros imunológicos obtidos após estimulação *in vitro* com cada antígeno, considerando os dados da população total, independente do contexto da infecção e também com os dados separados por grupo de indivíduos (NI, XTO e CO). Os dados de intensidade de infecção por *S. mansoni*, ancilostomídeos e *A. lumbricoides* e de idade dos indivíduos também foram considerados nas análises de correlações.

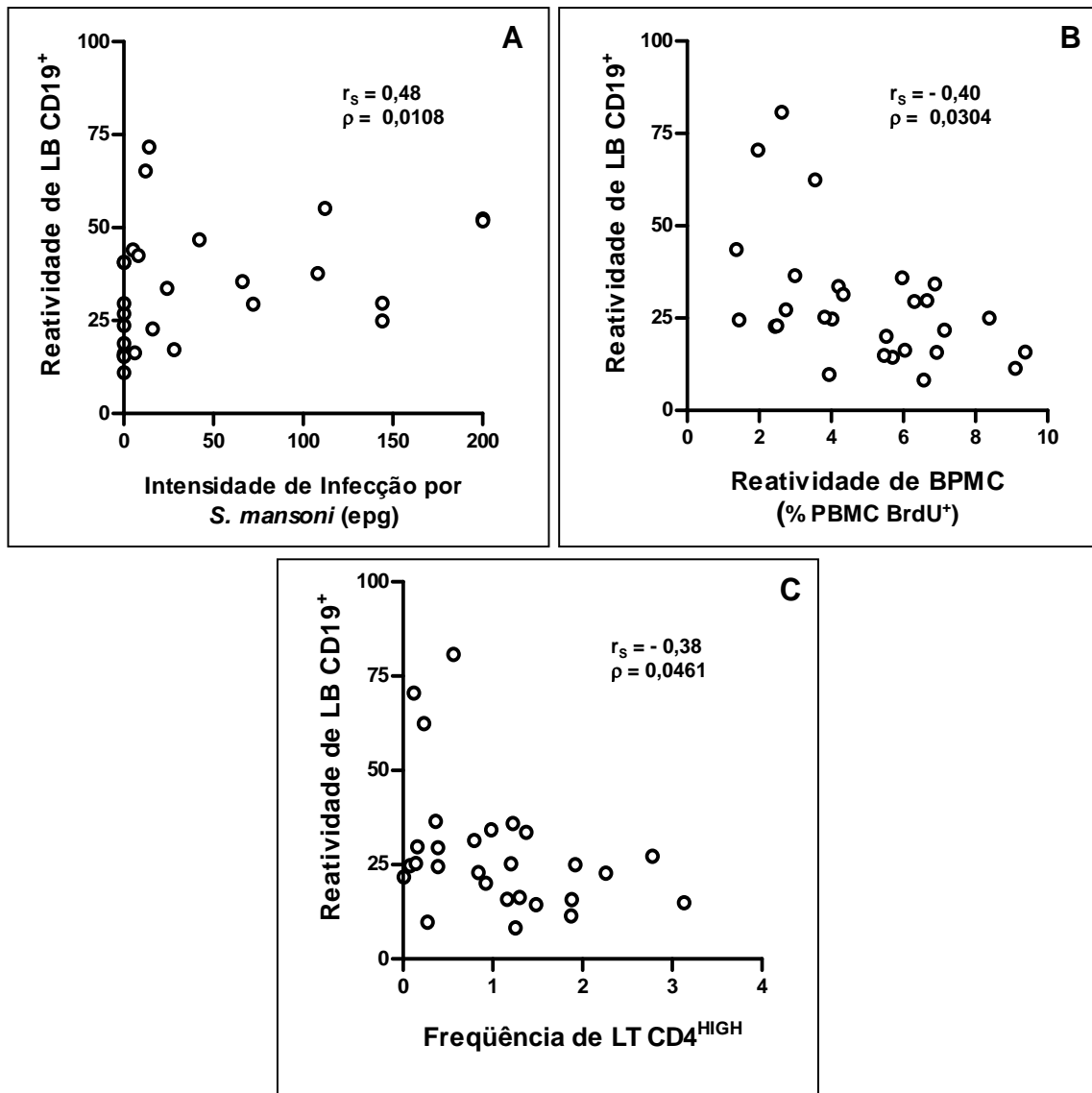
Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre os parâmetros imunológicos obtidos após estimulação com SWAP. Além disso, nenhuma associação foi observada entre os parâmetros imunológicos: frequência e reatividade da população de LT CD3, assim como de suas subpopulações majoritárias LT CD4 e LT CD8 com outros parâmetros analisados independente do estímulo antigênico utilizado (dados não mostrados).

A intensidade de infecção por *S. mansoni* (epg) foi negativamente correlacionada com os parâmetros imunológicos de frequência e reatividade de LT CD4<sup>HIGH</sup> observadas na população total e também no grupo de indivíduos CO, sendo esta a única correlação significativa observada quando analisamos os grupos de indivíduos separadamente (FIG. 26).



**Figura 26** - Correlação negativa entre a intensidade de infecção por *S. mansoni* (epg) versus frequência (A e C) e reatividade (B e D) de LT CD4<sup>HIGH</sup> após estimulação *in vitro* por SEA. (A e B) representam as análises considerando a população total, independente do contexto da infecção. (C e D) representam as análises considerando apenas os dados obtidos para o grupo CO. A força da associação entre as variáveis foi representada pelo valor  $\rho$ , sendo considerados significativos os valores  $\rho < 0,05$ .

Com relação ao parâmetro imunológico “reatividade de LB CD19<sup>+</sup>”, este foi negativamente correlacionado com a frequência *in vitro* de LT CD4<sup>HIGH</sup> e também com a reatividade de PBMC. Porém, a reatividade de LB CD19<sup>+</sup> apresentou correlação positiva com a intensidade de infecção por *S. mansoni* (FIG. 27).



**Figura 27** - Associações da reatividade LB CD19<sup>+</sup> induzida por SEA com a intensidade de infecção por *S. mansoni* a intensidade de infecção por *S. mansoni* e com outros parâmetros imunológicos. **(A)** Correlação positiva entre reatividade LB CD19<sup>+</sup> e intensidade de infecção por *S. mansoni*. Correlação negativa entre reatividade LB CD19<sup>+</sup> e reatividade de PBMC **(B)** e frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> **(C)**. A força da associação entre as variáveis foi representada pelo valor  $\rho$ , sendo considerados significativos os valores  $\rho < 0,05$ . A reatividade de PBMC foi avaliada pela metodologia de incorporação de <sup>3</sup>H-Td e os resultados expressos como índice de estimulação (IE).

## **5. DISCUSSÃO**

*“Se encararmos o mundo com a mente vazia,  
nossa experiência será merecidamente sem sentido.  
A experiência não dá sentido aos conceitos;  
os conceitos, sim, podem dar sentido às experiências”*

**Theobald, 1968**



## 5.1 Reatividade *in vitro* de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de $^3\text{H-Td}$ ou BrdU incorporados ao DNA

Proliferação de linfócitos tem sido utilizada para avaliar a reatividade celular induzida por antígenos do *S. mansoni* nos estudos sobre a resposta imune antígeno-específica (Gazzinelli *et al.* 1983a e 1985; Bahia-Oliveira *et al.* 1992; Viana *et al.* 1994; Malaquias *et al.* 1997; Groux *et al.* 1998; Mduluzza *et al.* 2001; Corrêa-Oliveira *et al.* 2002; Geiger *et al.* 2002).

Diferentes metodologias já foram descritas para avaliar a resposta de proliferação celular induzida por antígenos ou mitógenos. Duas destas metodologias empregam o mesmo princípio que se baseia na entrada de nucleosídeos pirimidinos ( $^3\text{H-Td}$  ou BrdU) nas células através de um processo de difusão facilitada pela ação de enzimas intracelulares (permeases). Na célula, os nucleosídeos são fosforilados pela enzima timidina quinase, uma enzima da via de recuperação dos nucleotídeos.

Durante o processo de replicação do DNA, o monofosfato de  $^3\text{H-Td}$  ou de BrdU compete, então, com a timidina monofosfatada produzida pela via *de novo* (Riechard 1988) *apud* (Reome *et al.* 2000). Apesar de terem o mesmo princípio, as duas metodologias diferem na forma de detecção do nucleosídeo incorporado que, na técnica da  $^3\text{H-Td}$  é feita através da detecção da radioatividade pela cintilação líquida (Gazzinelli *et al.* 1983b).

Na técnica que utiliza BrdU, anticorpos monoclonais específicos contra este nucleosídeo são conjugados com 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 de BrdU incorporado (Gratzner 1982).

O método da incorporação de  $^3\text{H-Td}$  tem sido tradicionalmente descrito nos estudos sobre a resposta imune induzida contra antígenos do *S. mansoni* e têm revelado a existência de associações de distintos perfis de resposta com as diferentes formas clínicas da esquistossomose (Colley *et al.* 1977; Ottensen *et al.* 1978; Nash *et al.* 1982; Gazzinelli *et al.* 1985).

Apesar da eficiência e da tradicional utilização da metodologia de incorporação de  $^3\text{H-Td}$ , a técnica que utiliza a incorporação de BrdU tem a vantagem de permitir a combinação de anticorpos específicos contra diferentes moléculas de superfície e/ou intracitoplasmáticas, o que possibilita a utilização de análises multiparamétricas em células individuais. Portanto, esta metodologia permite a

realização de análises simultâneas dos aspectos funcionais e fenotípicos de populações celulares envolvidas na resposta imune contra antígenos do parasito.

Neste contexto, os pesquisadores Mehta e Maino (1997) avaliaram simultaneamente a incorporação de BrdU e a expressão de marcadores de ativação e de citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações de linfócitos T presentes em BPMC ativadas pelo superantígeno enterotoxina estafilocócica B (SEB). Neste estudo os autores demonstraram que as células que incorporaram BrdU não produziam as citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  e vice-versa. Além disso, a expressão de citocinas foi transitória, ocorrendo dentro das primeiras 24 horas, enquanto a síntese de DNA só foi detectada 24 horas após a estimulação com SEB, sugerindo que as atividades de expressar citocinas e sintetizar DNA apresentam cinéticas distintas e não ocorrem simultaneamente (Mehta & Maino 1997).

Em nosso estudo, utilizamos as duas metodologias descritas acima para avaliar a indução de resposta antígeno-específica contra SEA e SWAP, sendo que a comparação do desempenho destas metodologias demonstrou a existência de correlação positiva entre as reatividades *in vitro* avaliadas com ambas as metodologias (FIG. 6), corroborando com os resultados previamente descritos na literatura (Dolbeare *et al.* 1983; Gaines *et al.* 1996).

Contudo, apesar de comprovarmos a existência de correlação positiva entre as metodologias, verificamos que os índices de estimulação (IE) obtidos com a metodologia de detecção do BrdU foram mais baixos quando comparados aos mesmos índices obtidos com a metodologia de incorporação de  $^3\text{H-Td}$  (FIGs. 4 e 5).

Uma possível explicação para estes baixos índices de estimulação é que a alta sensibilidade da técnica de detecção do BrdU incorporado pode ter amplificado a detecção da replicação basal nas culturas não estimuladas. Segundo Gratzner, a metodologia de incorporação de BrdU possui alta sensibilidade, permitindo assim, a detecção de baixos níveis de replicação do DNA por células individuais (Gratzner 1982). Esta alta sensibilidade de detecção pode ter influenciado nossos cálculos do índice de estimulação, pois, tanto as culturas controle quanto as culturas estimuladas demonstram proliferação exuberante (dados não mostrados).

Todavia, contrastando com nossos resultados, Gaines e colaboradores (1996) obtiveram índices de estimulação maiores quando utilizaram a metodologia de incorporação por BrdU comparado àqueles obtidos com  $^3\text{H-Td}$ . É importante ressaltar que, no trabalho da equipe de Gaines, a proliferação por detecção de BrdU foi avaliada em ensaios de blastogênese com culturas de sangue total, porém,

culturas de PBMC foram utilizadas nas determinações da incorporação de  $^3\text{H-Td}$ . Este fato não deve ser desconsiderado, já que ambas as metodologias dependem da ação de enzimas quinases da via de recuperação de nucleosídeos para permitir a incorporação dos nucleosídeos fosfatados (timidina e deoxiuridina) ao DNA replicante (Hellerstein 1999).

A eficácia da via de recuperação de nucleosídeos é variável e influenciada pela disponibilidade extracelular dos nucleosídeos, principalmente, em situações onde ocorrem altas taxas de morte celular (Hellerstein 1999). Portanto, considerando-se que altos percentuais de morte celular (principalmente de leucócitos da linhagem granulocítica) ocorrem nas culturas de sangue total de longa duração (Gaines *et al.* 1996) e ainda, que a disponibilidade dos precursores de nucleosídeos trifosfatados será sempre desconhecida (Hellerstein 1999), comparações dos resultados obtidos com as duas metodologias deverão ser sempre cautelosas.

## 5.2 Aspectos funcionais *in vitro* de PBMC

Vários estudos sobre a imunologia da esquistossomose têm revelado que a fase aguda pós-postural desta infecção está associada a uma intensa resposta proliferativa de PBMC direcionada contra SEA e uma fraca resposta direcionada contra SWAP (Colley *et al.* 1977; Ottensen *et al.* 1978; Nash *et al.* 1982; Gazzinelli *et al.* 1985). Porém na fase crônica da doença a resposta imune celular contra SWAP torna-se predominante (Colley *et al.* 1977; Ottensen *et al.* 1978; Nash *et al.* 1982; Gazzinelli *et al.* 1985).

Entretanto, nossos resultados mostram um perfil de proliferação celular diferente daquele descrito na maioria dos trabalhos publicados na literatura, pois observamos uma resposta de proliferação induzida por SEA semelhante àquela induzida por SWAP, como foi demonstrado nas Figuras 4 e 5. Este perfil de resposta pode ser uma característica da população selecionada para nosso estudo que foi composta, principalmente, por indivíduos adultos (mediana da faixa etária entre 37 a 58 anos de idade) provenientes de áreas apresentando moderada a alta prevalência de infecção por *S. mansoni* e carga parasitária moderada.

Trabalhos da literatura demonstraram que a idade dos indivíduos pode influenciar a resposta de proliferação contra antígenos de *S. mansoni* (Gazzinelli *et al.* 1987) e também que a prevalência e a intensidade da infecção podem influenciar a

reatividade de PBMC da população em estudo (Gazzinelli *et al.* 1992). Neste sentido, Gazzinelli e colaboradores (1987) relataram que em PBMC de pacientes portadores da forma crônica intestinal a resposta de proliferação induzida por SWAP se correlacionou negativamente com a idade do indivíduo, sendo que os indivíduos adultos demonstraram uma menor resposta de proliferação comparada àquela observada em crianças.

Em outro estudo, Gazzinelli e colaboradores (1992) também demonstraram que pacientes portadores da forma crônica da esquistossomose mansoni provenientes de duas áreas com alta prevalência e intensidade de infecção apresentaram respostas significativamente maiores ao antígeno SEA, comparadas àquelas observadas em pacientes originários de áreas com baixa prevalência e intensidade de infecção.

Em relação à resposta de PBMC considerando a influência do contexto da infecção por geo-helminthos na resposta imune induzida por antígenos de *S. mansoni*, nossos resultados também diferiram de dados já relatados na literatura. Como demonstrado nas Figuras 4 e 5, a reatividade celular após estimulação por SEA ou SWAP não diferiu significativamente entre os grupos. Porém, Corrêa-Oliveira e colaboradores (2002) estudando as co-infecções por ancilostomídeos, *A. lumbricoides* e *S. mansoni* demonstraram que, após estimulação com SEA, indivíduos co-infectados apresentavam uma resposta proliferativa reduzida comparada àquela apresentada por indivíduos mono-infectados por *S. mansoni*.

Vale ressaltar que o índice de estimulação (IE) utilizado por estes autores foi calculado subtraindo-se os valores (cpm) da cultura estimulada dos valores (cpm) obtidos para a cultura não estimulada (controle). Diferentemente, nossos índices de estimulação foram obtidos pela divisão destes valores. Para verificar se a estratégia de análise explicava a diferença observada entre os resultados, recalculamos o índice de estimulação, porém, não obtivemos resultados diferentes daqueles previamente obtidos (dados não mostrados).

### 5.3 Aspectos funcionais e fenotípicos *in vitro* de LT CD3<sup>+</sup> e LB CD19<sup>+</sup>

Considerando-se que os nossos resultados foram indicativos de que o contexto da infecção não influencia a resposta proliferativa *in vitro* de PBMC estimulados por SEA ou SWAP, nosso próximo questionamento foi se esta ausência de diferenças na reatividade, necessariamente, refletia um envolvimento similar das diferentes populações celulares. Para responder este questionamento avaliamos a resposta de proliferação induzida pelos antígenos de *S. mansoni* nas diferentes populações de linfócitos presentes nas culturas de PBMC.

Como esperado, os resultados desta análise demonstram uma maior frequência e reatividade da população de LT CD3<sup>+</sup> comparada àquelas observadas para LB CD19<sup>+</sup>. O maior envolvimento de LT CD3<sup>+</sup> no desenvolvimento da resposta imune antígeno-específica induzida por *S. mansoni*, e também por outros patógenos, já foi descrita na literatura.

Martins-Filho e colaboradores (1997) estudaram os percentuais das diferentes populações celulares presentes em PBMC de pacientes apresentando diferentes formas clínicas da esquistossomose e relataram maior frequência da população de LT CD3<sup>+</sup> quando comparada com a população de LB CD19<sup>+</sup> em todos os grupos estudados. Avaliações sobre a resposta de proliferação das diferentes populações de linfócitos induzida por antígenos bacterianos e virais (PPD, TT, CMV e VzV) também demonstraram maior detecção de síntese de DNA em populações de LT CD3<sup>+</sup> (> 90%) quando comparada à detecção observada em populações de LB CD19<sup>+</sup> (~4% de detecção) (Gaines *et al.* 1996).

Com relação ao contexto da infecção, nossos resultados sugerem que a presença de co-infecções por geo-helminhos não influencia a resposta de LT CD3<sup>+</sup> contra antígenos de *S. mansoni*. Contudo, as infecções por geo-helminhos parecem modificar os aspectos funcionais de LB CD19<sup>+</sup> específicos contra SWAP. Como demonstrado na Figura 7, apenas os LB CD19<sup>+</sup> presentes em culturas de PBMC de indivíduos do grupo XTO apresentaram maior reatividade após estimulação *in vitro* por SWAP, quando comparados aos resultados obtidos no grupo NI.

Este resultado é interessante, pois dados da literatura sugerem que LB CD19<sup>+</sup> representam importante papel no desenvolvimento de respostas imunes contra *S. mansoni*. Neste sentido, Martins-Filho e colaboradores (1997) relataram que um maior percentual de LB CD19<sup>+</sup> circulantes foi associado à presença de infecção,

apesar de nenhuma associação ter sido estabelecida com a presença de morbidade da doença.

Estudos complementares avaliando a expressão do marcador CD5, que é expresso pela subpopulação de LB-1, relataram um aumento desta subpopulação LB CD19<sup>+</sup> nas formas clínicas da esquistossomose que apresentam comprometimento hepático (Martins-Filho *et al.* 1999; Castro-Silva 2006). Além disso, eventos de reatividade imune humoral induzidos pelo *S. mansoni* também foram associados com as diferentes morbidades da esquistossomose, reforçando a hipótese de que LB CD19<sup>+</sup> podem ter um papel importante no desenvolvimento de formas clínicas graves da infecção (Silveira *et al.* 2002).

Estudos em camundongos também revelaram a participação de células B na indução de resposta imune protetora contra infecção por *S. mansoni*. Assim, a vacinação com cercárias atenuadas por irradiação de camundongos deficientes de células B ou depletado para o gene do IFN- $\gamma$  demonstraram que vacinações efetivas requerem a indução simultânea de mecanismos efetores dependentes de células B e IFN- $\gamma$  (Jankovic 1999). Além disso, em estudos humanos a presença do isotipo IgE (Viana 1995) e IgA (Mutapi 2003) têm sido associados à resistência contra infecções e/ou reinfecções por *Schistosoma*.

Reforçando o achado de que o contexto da infecção influencia os aspectos funcionais de LB CD19<sup>+</sup>, análises de correlação demonstraram uma associação negativa entre a reatividade de LB CD19<sup>+</sup> induzida por SEA com a intensidade de infecção por *S. mansoni*. Além disso, uma correlação negativa também foi encontrada entre este parâmetro e a proliferação de PBMC, como demonstrado na Figura 27.

Estes resultados são interessantes, já que a presença de infecção por geohelminhos também se associa com aumento na carga parasitária de *S. mansoni*, como demonstrado neste estudo (FIG. 2) e também por Fleming e colaboradores (2006).

No entanto, análises complementares precisam ser realizadas para permitir um melhor entendimento da influência das co-infecções na resposta imune de LB CD19<sup>+</sup> induzida contra antígenos de *S. mansoni*. Avaliações de aspectos funcionais e fenotípicos considerando, por exemplo, a subpopulação LB-1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) poderia trazer grandes contribuições.

#### 5.4 Aspectos funcionais e fenotípicos *in vitro* das subpopulações majoritárias de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> e minoritária de LT CD4<sup>HIGH</sup>

Nossos resultados sugerem que o contexto da infecção não influencia a resposta imune das populações majoritárias de LT CD4<sup>+</sup> ou LT CD8<sup>+</sup> induzida por antígenos de *S. mansoni*, pois, nenhuma diferença significativa entre a frequência e a reatividade destas populações de linfócitos foi observada entre os grupos avaliados (TAB. 6, Figuras 09 e 10).

Além disso, a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ativados (caracterizada pela expressão da molécula de superfície HLA-DR) foi semelhante entre os grupos (FIG. 18). Estes resultados foram corroborados pelos resultados de análises complementares realizadas com sangue total, no contexto *ex vivo*, nas quais também não observamos diferenças significativas nas frequências de linfócitos T HLA-DR<sup>+</sup> entre os grupos avaliados (dados não mostrados).

Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois já foi demonstrado que o evento de ativação de LT CD4<sup>+</sup> é importante para o desenvolvimento de formas clínicas mais graves da esquistossomose, sendo a modulação da ativação destes linfócitos se associa com o desenvolvimento da forma crônica assintomática (Martins-Filho *et al.* 1999), que foi a forma clínica avaliada em nosso estudo.

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas na frequência e reatividade dos diferentes tipos celulares, quando avaliamos as subpopulações majoritárias de LT (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), a análise simultânea dos aspectos funcionais e fenotípicos da resposta imune contra antígenos de *S. mansoni* permitiu a identificação de uma população minoritária de LT CD4<sup>HIGH</sup> (Figuras 13 e 14). Estes linfócitos demonstraram ser antígeno-específicos, sendo mais reativos à estimulação por SWAP comparada ao SEA como pode ser observado nas Figuras 16 e 17 e representaram, respectivamente, 3% e 1% dos LT CD4<sup>+</sup> totais obtidos nas culturas estimuladas. Além disso, consistente com dados descritos na literatura, nosso estudo também não detectou a presença destas células CD4<sup>HIGH</sup> nos experimentos realizados com o sangue total dos voluntários, no contexto *ex vivo* (dados não mostrados).

Nossos dados estão de acordo com os achados da literatura, sendo que a presença de células CD4<sup>HIGH</sup> *in vivo* e *in vitro* já foi demonstrada em experimentos com camundongos (Ridgway *et al.* 1998; Krieger *et al.* 2000). Além disso, células T CD4<sup>HIGH</sup> reativas a auto-antígenos isoladas das ilhotas de Langerhans inflamadas de

camundongos diabéticos não obesos corresponderam a 5% de todos os LT CD4<sup>+</sup> (Lejon & Fathman 1999).

Em relação às características apresentadas por estas células T CD4<sup>HIGH</sup>, estudos realizados em humanos e também em murinos revelaram que elas formam uma população antígeno-específica, altamente e recentemente ativadas (Ridgway *et al.* 1998; Lejon & Fathman 1999; Novak *et al.* 1999 e 2001; O'Connor & Devaney 2002; Reijonen *et al.* 2002 e 2003) podendo ser reativa a antígenos estranhos (Ridgway *et al.* 1998; Novak *et al.* 1999; O'Connor & Devaney 2002), a auto-antígenos (Lejon & Fathman 1999; Costa *et al.* 2000; Reijonen *et al.* 2002 e 2003) ou a alo-antígenos (Krieger *et al.* 2000; Ebert & McColl 2001; McCabe *et al.* 2001).

Estudos complementares demonstraram que as células T CD4<sup>HIGH</sup> co-expressam marcadores de ativação e memória celular. Neste sentido, estudos experimentais em murinos demonstraram que células CD4<sup>HIGH</sup> também eram CD45RB<sup>LOW</sup>, CD62L<sup>LOW</sup>, CD69<sup>HIGH</sup>, CD25<sup>+</sup> e CD44<sup>HIGH</sup> (Lejon & Fathman 1999; Ridgway *et al.* 1998; McCabe *et al.* 2001). A ocorrência deste perfil de células ativadas/memória CD45RA<sup>LOW</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> também foi observada em humanos (Ebert & McColl 2001).

Novamente consistente com os dados da literatura, nossos resultados demonstraram que a frequência de células CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> ou HLA-DR<sup>+</sup> foi maior na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> comparada à subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> convencionais. Contudo, a frequência de células CD62L<sup>+</sup> ou CD38<sup>+</sup> foi semelhante nas duas subpopulações de LT auxiliares. Considerando que após reconhecimento do antígeno a expressão das moléculas CD62L e CD38 diminuem e ocorre aquisição seqüencial dos marcadores de ativação, esses resultados são consistentes com o perfil de células altamente e recentemente ativadas.

Nossos resultados também sugerem que os LT CD4<sup>HIGH</sup> identificados neste estudo apresentam fenótipo de memória, pois, a análise da expressão da molécula CD45RO demonstrou maior frequência de células expressando este marcador na subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup>. Corroborando este resultado, uma maior razão CD45RO<sup>+</sup>:CD45RO<sup>-</sup> e uma menor razão CD45RA<sup>+</sup>:CD45RA<sup>-</sup> foi observada. Além disso, observamos uma correlação negativa ( $r_s = -0,77$  e  $p = 0,0368$ ) entre a expressão destes marcadores nos LT CD4<sup>HIGH</sup> após estimulação por SEA, sugerindo a perda da isoforma CD45RA e aquisição de CD45RO.



Após identificar a presença e caracterizar a subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup>, nosso próximo questionamento foi se haveria associação entre estes linfócitos com outros parâmetros da resposta imune induzida por antígenos ou com características da infecção, tais como o contexto da infecção ou a carga parasitária.

Nossos resultados demonstraram que maiores freqüências e reatividades de LT CD4<sup>HIGH</sup> induzidos contra SEA estão correlacionadas a uma redução na carga parasitária de *S. mansoni* e também na reatividade de LB CD19<sup>+</sup> (FIGs 26 e 27). Além disso, maior reatividade de LB CD19<sup>+</sup> foi associada a cargas parasitárias elevadas. Esta associação negativa entre LT CD4<sup>HIGH</sup> e LB CD19<sup>+</sup> específicos contra SEA reforça os achados de Lundy e colaboradores (2001) de que LB CD19<sup>+</sup> ativados podem mediar diretamente a apoptose de LT CD4<sup>+</sup> presentes em granulomas de camundongos infectados por *S. mansoni* e que a apoptose é mediada pela ligação Fas/FasL.

Consistente com estes dados, eventos de apoptose tem sido associado à modulação da resposta imune induzida por SEA em pacientes portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose (Carneiro-Santos *et al.* 2000, Swainson *et al.* 2005). E estudos complementares demonstraram que a subpopulação de células esplênicas B-1a FasL<sup>+</sup> são importantes mediadores da apoptose de LT CD4<sup>+</sup> induzida por SEA, sendo que a expressão máxima de FasL sobre estas células é dependente de estimulação antigênica e da presença de IL-4 e IL10 (Lundy & Boros 2002).

Assim, o conjunto de nossos resultados reforça os dados de que a interação entre LT CD4<sup>HIGH</sup> e LB CD19<sup>+</sup> tem importante papel na indução da resposta imune contra SEA. Além disso, é possível inferir que o microambiente proporcionado pela presença de co-infecções por geo-helmintos possa potencializar a indução de mecanismos moduladores da resposta imune induzidos por SEA e SWAP. Consistente com esta hipótese, alguns estudos demonstram que frações específicas do antígeno SWAP, especificamente a proteína multivalente PIII, pode modular a proliferação celular e a reação granulomatosa, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Gustavson *et al.* 2002; Zouain *et al.* 2004).

Contudo, considerando-se que nosso estudo avaliou a influência das co-infecções por geo-helmintos na resposta imune contra antígenos de *S. mansoni* apenas durante a fase crônica intestinal da esquistossomose, não foram associados os aspectos funcionais e fenotípicas das populações de CD4<sup>HIGH</sup> com morbidade.

Portanto, nossos resultados não nos permitem inferir se a frequência e reatividade de LT CD4<sup>HIGH</sup> são alteradas nas formas graves da doença.

Trabalhos recentes demonstraram que células T CD4<sup>HIGH</sup> antígeno-específicas apresentam funções efetoras que podem ser associadas ao desenvolvimento de imunopatologias, tais como doenças auto-imunes (Lejon & Fathman CG 1999; Costa *et al.* 2000; Reijonen *et al.* 2002 e 2003) ou rejeição a transplante de tecidos (Krieger *et al.* 2000).

Entretanto, vários trabalhos têm descrito uma subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que apresentam propriedades reguladoras da resposta imune que tem frequência e especificidade antigênicas semelhantes às descritas para a população de células T CD4<sup>HIGH</sup> (Takahashi *et al.* 2000; Baecher-Allan *et al.* 2001; Shevach 2001; Apostolou *et al.* 2002; Belkaid *et al.* 2002; McGuirk & Mills 2002; Manzotti *et al.* 2002; Birebent *et al.* 2004; Holm *et al.* 2004; Nielsen *et al.* 2004; Walker *et al.* 2005).

Estes trabalhos relatam que, além da alta expressão do marcador CD25, as células reguladoras apresentam expressão diferencial de vários outros marcadores de superfície, tais como: CTLA-4 (Takahashi *et al.* 2000; Dieckmann *et al.* 2001; Apostolou *et al.* 2002; Manzotti *et al.* 2002; McGuirk & Mills 2002; Birebent *et al.* 2004; Holm *et al.* 2004), CD45RO<sup>HIGH</sup> (Baecher-Allan *et al.* 2001; Shevach 2001; Holm *et al.* 2004) HLA-DR (Baecher-Allan *et al.* 2001; Holm *et al.* 2004), CD45RA<sup>LOW</sup> (McGuirk & Mills 2002).

Entretanto, a expressão destes marcadores de superfície não é suficiente para caracterizar a subpopulação de linfócitos T reguladores, pois, a regulação positiva ou negativa destes marcadores pode ser induzida em todas as células T por diferentes situações fisiológicas, tais como ativação ou diferenciação celular.

Neste sentido, Thornton e colaboradores (2000) descreveram que populações de células T CD25<sup>+</sup> recentemente ativadas podem ser compostas de uma mistura de células supressoras e efetoras ativadas *in vivo*. Estudos em camundongos também demonstraram que a exposição ao antígeno, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pode induzir dois subconjuntos de células T funcionalmente distintas que residem dentro de uma sub-população de células T CD4<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45RB<sup>LOW</sup>, sendo um conjunto formado por células T de memória convencionais que proliferam e secretam citocinas em resposta à ativação e o outro subconjunto formado por células T reguladoras que inibem a ativação *in vitro* de outras células T (Read *et al.* 1998). Modelos de transferência adotiva em camundongos também demonstraram que células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> co-expressando o marcador CD62L<sup>LOW</sup> apresentam a

habilidade de causar inflamação pulmonar alérgica, revelando assim uma ação efetora (Wise *et al.* 1999).

Deste modo, apenas a análise da expressão destes marcadores de superfície não permite caracterizar a subpopulação de LT CD4<sup>HIGH</sup> como uma população com função efetora ou moduladora da resposta imune. Porém, recentemente foi descrita a avaliação da expressão de fator de transcrição *Foxp3* como uma promissora ferramenta para identificar células T reguladoras. Diversos trabalhos têm relatado que a expressão deste fator de transcrição é essencial para o desenvolvimento e função das células T reguladoras (Hori *et al.* 2003; Nielsen *et al.* 2004; Walker *et al.* 2005). No entanto, a expressão de *Foxp3* não foi avaliada em nosso estudo.

### 5.5 Papel biológico da regulação positiva do marcador CD4

CD4 é uma glicoproteína transmembrana de 58KDa, membro da família dos receptores tipo imunoglobulina. Esta glicoproteína pleiotrópica apresenta uma porção extracelular dobrada em quatro domínios que permitem a interação com outras proteínas, tais como: TCR, MHC-II, IL-16 e HIVgp120 (Kitchen *et al.* 2002). A cauda citoplasmática da molécula CD4 se associa de forma não covalente com p56<sup>lck</sup>, uma proteína tirosina quinase membro da família Src (Kitchen *et al.* 2002). A ligação dos domínios extracelulares da molécula CD4 ao ligante específico induz a fosforilação desta lck e, em seguida, da cadeia CD3 $\zeta$  do complexo CD3/TCR/antígeno, disparando cascatas de transdução de sinais (Bryl *et al.* 2001).

Um estudo sobre os eventos de transdução de sinais durante a ativação de PBMC em pacientes com esquistossomose demonstrou a importância da fosforilação de lck. Além disso, este estudo também demonstrou que a estimulação por diferentes antígenos de *S. mansoni* induz distintos padrões de fosforilação das proteínas tirosinas quinases obtidas de PBMC destes pacientes. Neste sentido, as proteínas lck, ZAP-70 e Shc foram mais ativadas em linfócitos estimulados por SWAP comparados àqueles estimulados por SEA (Almeida *et al.* 2001).

A expressão de CD4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é normalmente constante, entre 90.000 a 100.000 moléculas/célula, sendo que a regulação de sua expressão pode ser mantida por diversos mecanismos, tais como: internalização de CD4 induzida por ligante apropriado ou por proteólise (Bryl *et al.* 2001). O controle da expressão destas moléculas tem papel importante, tanto na maturação quanto na

função destas células, já tendo sido descrito que a ligação do antígeno ao TCR induz uma diminuição nos níveis das moléculas CD3 e CD4 que é dependente da fosforilação da proteína quinase C (Weyand *et al.* 1987). Além disso, estes autores sugerem que a modulação da expressão destas moléculas após ativação pode ser interpretada como um mecanismo de realimentação negativa importante para terminar a ativação induzida por antígeno e manter a homeostase de LT.

Considerando o exposto acima, a identificação da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>HIGH</sup> antígenos-específicos traz consigo um questionamento importante: qual seria a correlação entre a regulação positiva da molécula de superfície CD4 após ativação antigênica e a função efetora da célula? Ou seja, qual o papel biológico da alta expressão de CD4 após ativação antígeno específica?

A interação entre a molécula CD4 com outras proteínas é importante para a atividade desta molécula. Neste sentido, é bem conhecida a atividade de estabilização do complexo TCR/antígeno/MHC-II através do reconhecimento e ligação da molécula CD4 a determinantes polimórficos do MHC-II (Weyand *et al.* 1987). Além disso, funções alternativas adicionais já foram descritas, entre elas, a adesão celular e a função de receptor quimiotático (Kitchen *et al.* 2002; Swainson *et al.* 2005).

Estudos utilizando subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> co-expressando a molécula CD4 têm permitido demonstrar importantes funções de CD4 após ativação recente de células previamente primadas por antígenos. Neste sentido, Kitchen e colaboradores (2002) demonstraram que a ativação de células T CD8<sup>+</sup> induziu a expressão “de novo” da molécula CD4 e ainda, que a ligação de CD4 com a citocina IL-16 induziu quimiotaxia de forma dose-dependente. Além disso, o nível de expressão da molécula CD4 sobre as células T CD8<sup>+</sup> foi diretamente proporcional aos níveis de sinais de co-estimulação recebidos.

Swainson e colaboradores (2005) avaliaram uma população de timócitos humanos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e demonstraram que a expressão de CD4 identifica uma população de células que se dividem rapidamente, co-expressam o receptor de transferrina (CD71) e altos níveis de CXCR4, uma proteína da superfamília dos receptores acoplados a proteína G que é expresso por células durante a embriogênese e também em células de memória. Esta população apresentou quimiotaxia aumentada dependente da ligação de CXCR4 pelo ligante CXCL12 (SDF-1). Consistente com este relato, foi demonstrada uma associação constitutiva entre os receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR5, um receptor de quimiocinas

relacionado à inflamação. Esta associação foi dependente de CD4 e preveniu ou reduziu endocitose espontânea de CXCR4, aumentando assim, a densidade deste receptor na superfície celular (Wang *et al.* 2004).

Além da quimiotaxia já descrita na literatura, um estudo utilizando células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> presentes em glândulas adenóides demonstrou que a ligação da quimiocina CXCL12 nos receptores CXCR4 também pode transmitir sinais anti-apoptóticos às células CD45RO<sup>+</sup> através de ativação da proteína quinase AKT/PKB (Pajusto *et al.* 2004). Neste estudo foi relatado que a proteína quinase AKT pode ser ativada pela fosfatidil-inositol 3 quinase e transmitir sinais de sobrevivência por diversos mecanismos, dentre eles, a interferência com a atividade das proteínas anti-apoptose pertencentes à família bcl-2.

Consistente com as observações do possível envolvimento da molécula CD4 com transmissão de sinais de sobrevivência e expansão, Ridgway e colaboradores (1998) relataram que a subpopulação de células CD4<sup>HIGH</sup> continham todas as células proliferantes, sendo que o aumento no percentual de células CD4<sup>HIGH</sup> em culturas estimuladas por 96 horas na presença de antígenos específicos resultou da morte de outras células e de um aumento absoluto no número de células CD4<sup>HIGH</sup>. Como demonstrado na Figura 13, as células que incorporaram BrdU após estimulação antigênica (ou seja, células reativas ao antígeno) expressavam maior densidade do marcador CD4 de superfície, similar aos de Ridgway e colaboradores.

É importante também ressaltar que, em relação à esquistossomose, evidências experimentais previamente relatadas sugerem que a apoptose representa um papel importante na modulação da resposta imune induzida por SEA em pacientes apresentando a forma clínica intestinal da esquistossomose (Carneiro-Santos *et al.* 2000, Lundy *et al.* 2001, Lundy & Boros 2002). De forma interessante, nossos resultados demonstram menor frequência e reatividade de LT CD4<sup>HIGH</sup> específicos contra SEA comparadas àquelas observadas contra SWAP (Figuras 14 e 16).

Com relação à expressão dos receptores de quimiocinas, Secor e colaboradores (2003) relataram que LT CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de pacientes portadores de esquistossomose ativa demonstraram maiores densidades de expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 comparados aos pacientes tratados. Estudos complementares demonstraram expressão diferencial destes receptores em diferentes formas clínicas da esquistossomose e uma

associação entre a expressão destes receptores e o desenvolvimento de patologias (Teixeira-Carvalho *et al.* 2004, Sousa *et al.* 2005).

Neste contexto, um estudo envolvendo pacientes com diferentes formas clínicas da esquistossomose mansoni demonstrou um aumento de CCR5 e CXCR4 em células de pacientes portadores da forma crônica intestinal quando comparado às outras formas clínicas da doença (Teixeira-Carvalho *et al.* 2004). E um estudo experimental demonstrou que camundongos deficientes do receptor CCR5 apresentaram aumento da patologia (Sousa *et al.* 2005).

Deste modo, podemos inferir que LT CD4<sup>+</sup> previamente primados por antígenos de *S. mansoni* e recentemente ativados podem expressar “de novo” a molécula CD4, aumentando assim a densidade desta molécula de superfície (LT CD4<sup>HIGH</sup>). Além disso, parece provável que diferentes ligantes de CD4 com atividades quimiotáticas, proliferativas e, ou anti-apoptóticas podem regular a resposta imune por selecionar e enriquecer determinadas populações celulares que apresentem receptores ou padrões de expressão de citocinas e quimiocinas distintos, além de recrutar estas células para sítios de infecção e, ou inflamação *in vivo*.

Em suma, nosso trabalho demonstra a importância de análises mais aprofundadas das propriedades funcionais e fenotípicas desta população de LT CD4<sup>HIGH</sup> como uma ferramenta para melhor caracterizar esta subpopulação de células T e suas funções. É também importante avaliar o papel destas células no desenvolvimento de susceptibilidade/proteção contra a infecção por *S. mansoni*, considerando o contexto da infecção. Portanto, muitas questões sobre esta subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> ainda necessitam ser esclarecidas, dentre elas: qual é o perfil de expressão dos receptores CCR5/CXCR4 e de seus ligantes? Qual o perfil de expressão e atividade das proteínas que transmitem sinais de sobrevivência e morte celular? Como os antígenos SEA e SWAP influenciam as vias de transdução de sinais que levam à quimiotaxia e sobrevivência das células CD4<sup>HIGH</sup>? Como as co-infecções por geo-helmintos interferem nestas vias de sinalização celular?

Para responder a estas questões há a necessidade de se avaliar a expressão de moléculas das vias de transdução de sinais, *Foxp3*, de quimiocinas, citocinas e seus receptores. Outra perspectiva interessante poderá ser a avaliação da frequência e reatividade destas células em pacientes portadores das outras formas clínicas da esquistossomose, considerando a presença ou ausência de co-infecções por geo-helmintos.

## **6. CONCLUSÕES**

*“O importante é você saber a verdade.  
Até saber, até realmente compreender,  
só poderá demonstrá-la em coisas menores...  
Mas deve se lembrar sempre que não saber,  
não impede a verdade de ser verdadeira”.*

***Richard Bach***

A reatividade in vitro de PBMC avaliada pelas metodologias de detecção de  $^3\text{H-Td}$  e BrdU são similares, validando o uso da metodologia de incorporação de BrdU nas análises funcionais e fenotípicas de LT CD4<sup>+</sup>.

A resposta de LB CD19<sup>+</sup> antígeno-específicos é influenciada pelo contexto da infecção, sendo que apenas na presença de mono-infecção por *S. mansoni* ocorre um aumento da frequência de LB CD19<sup>+</sup> específicos contra SWAP.

A presença de mono ou co-infecção não influencia a resposta da população de LT CD3<sup>+</sup> nem de suas subpopulações majoritárias CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Entretanto, a subpopulação minoritária de LT CD4<sup>HIGH</sup> antígeno-específica é influenciada pela presença da esquistossomose, independente da presença de co-infecções, apresentando uma diminuição em sua frequência quando estimulada com SEA.

Concluimos ainda que, em indivíduos portadores da forma crônica intestinal da esquistossomose, o microambiente proporcionado pela presença de co-infecções por geo-helminthos induz uma redução na frequência de LT CD4<sup>HIGH</sup> antígeno-específicos direcionados contra SWAP.

Além disso, a população de LT CD4<sup>HIGH</sup> antígeno-específica é formada por células altamente e recentemente ativadas que apresentam fenótipo de memória, sendo este padrão fenotípico independente do contexto da infecção.

Finalmente, a presença de menor frequência e reatividade de LT CD4<sup>HIGH</sup> antígeno-específicos e maior carga parasitária por *S. mansoni* em indivíduos co-infectados sugere possível participação destes LT CD4<sup>HIGH</sup> em mecanismos protetores contra a esquistossomose.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

*“Juntar esforços na construção do conhecimento,  
desintegrando-se no outro para, com ele, reintegrar-se no novo”.*

***Autor desconhecido***

- Abdel-Megeed KN, Abdel-Rahman EH and Derbala AM (2005) Identification and diagnostic evaluation of cross-reactive antigen between hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* and *Trichinella spiralis* larval extract. *J Egypt Soc Parasitol* **35**:497-509.
- Almeida CA, Leite MF and Goes AM (2001) Signal transduction events in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Schistosoma mansoni* antigens. *Hum Immunology* **62**:1159-1166.
- Silveira AMS, Gazzinelli G and Corrêa-Oliveira R (2002) Esquistossomose mansoni efeito da infecção na resposta humoral e celular de indivíduos com e sem fibrose periportal, in *Departamento de Bioquímica e Imunologia* pp 87 f, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Apostolou I, Sarulhan A, Klein L and von Boehmer H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature Immunol* **3**:756-763.
- Araújo A and Ferreira LF (2000) Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**:89-93.
- Araújo A, Ferreira LF and Confalonieri U (1981) A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. *Rev Bras Biol* **41**:873-881.
- Araújo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E and Carvalho EM (1996) Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol* **26**:1399-1403.
- Attallah AM, Ghanem GE, Ismail H and El Waseef AM (2003) Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *Am J Trop Med Hyg* **68**:647-651.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ and Hafler DA (2001) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* **167**:1245-1253.
- Bahia-Oliveira LMG, Gazzinelli G, Eloi-Santos S, Cunha-Melo JR, Alves-Oliveira LF, Silveira AM, Viana IRC, Carmo J, Souza A and Corrêa-Oliveira R (1992) Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**:57-61.
- Barbosa CS, Montenegro SML, Abath FGC and Domingues ALC (2001) Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**:169-172.
- Behnke JM (1987) Do hookworms elicit protective immunity in man? *Parasitol Today* **3**:200-206.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM and Sacks DL (2002) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**:502-507.
- Bentwich Z (2000) Good worms or bad worms: do worm infections affect the epidemiological patterns of other diseases. *Parasitol Today* **16**:312-312.

- Bentwich Z, Weisman Z, Moroz C, Bar-Yehuda S and Kalinkovich A (1996) Immune dysregulation in Ethiopian immigrants in Israel: relevance to helminth infections? *Clin Exp Immunol* **103**:239-243.
- Bethony J, Blangero WJ, Kloos H, Gazzinelli A, Soares-Filho B, Coelho L, Alves-Oliveira LF, Williams-Blangero S, Loverde Philip T and Corrêa-Oliveira R (2002) Additive host genetic factors influence fecal egg excretion rates during *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **67**:3336-3343.
- Bethony J, Silveira AMS, Alves-Oliveira LF, Thakur A, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R and Loverde PT (1999) Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic area in Brasil. *The Journal of Infectious Diseases* **180**:1665-1673.
- Beverley PCL and Maini MK (2000) Differences in the regulation of CD4 and CD8 T-cell clones during immune responses. *Phil Trans R Soc Lond B* **355**:401-406.
- Bilharz TM (1852) Fernere Beobachtungen über das die Pfortader des Menschen bewohnende Distomum haematobium und sein zu gewissen. *Wschift Zol Leipzig* **4**:72-76.
- Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, Beauplet A, Robillard N and Semana G (2004) Suppressive properties of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* **34**:3485-3496.
- Black APB, Bhayani H, Ryder CAJ, Gardner-Medwin JMM and Southwood T (2002) T-cell activation without proliferation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res* **4**:177-183.
- Booth M, Mayombana C and Kilima P (1998) The population biology and epidemiology of schistosome and geohelminth infections among schoolchildren in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**:491-495.
- Borkow G and Bentwich Z (2000) Eradication of helminthic infections may be essential for successful vaccination against HIV and tuberculosis. *Bull WHO* **78**:1368-1369.
- Borkow G, Weisman Z, Leng Q, Stein M, Kalinkovich A, Wolday D and Bentwich Z (2001) Helminths, human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Scand J Infect Dis* **33**:568-571.
- Brooker S, Miguel EA, Moulin S, Luoba AI, Bundy DAP and Kremer M (2000) Epidemiology of single and multiple species helminth infections among schoolchildren in Busia district, Kenya. *East Afr Med J* **77**:157-161.
- Bryl E, Gazda M, Foerster J and Witkowski JM (2001) Age-related increase of frequency of a new, phenotypically distinct subpopulation of human peripheral blood T cells expressing lowered levels of CD4. *Blood* **98**:1100-1107.
- Buckton KE, Court BWM and Smith PG (1967) Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis. *Nature* **214**:470-473.

- Burton DR and Woof JM (1992) Human antibody effector function. *Advances in Immunology* **51**:1-84.
- Butterworth AE, Bensted-Smith R, Capron A, Capron M, Dalton PR, Dunne DW, Grzych JM, Kariuki HC, Khalife J and Koech D (1987) Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology* **94**:281-300.
- Carneiro-Santos P, Martins-Filho OA, Alves-Oliveira L F, Silveira AMS, Coura-Filho P, Viana IRC, Wilson RA and Corrêa-Oliveira R (2000) Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol* **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 (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* **27**:71-76.
- Castro-Silva P (2006) Avaliação do efeito da esplenectomia sobre a resposta imune celular de pacientes portadores da forma crônica hepatoesplênica da esquistossomose mansoni., in *Programa de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas* pp 118, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Chamone M, Marques CA, Atuncar GS, Pereira ALA and Pereira LH (1990) Are the interactions between schistosomes and intestinal nematodes? *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**:557-558.
- Cheever AW and Andrade ZA (1967) Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **61**:626-639.
- Cheever AW, Byram JE, Hieny S, von Lichtenberg F, Lunde MN and Sher A (1985) Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B cell depleted mice. *Parasite Immunol* **7**:387-398.
- Chensue SW, Warmington KS, Ruth J, Lincoln PM and SL K (1994) Cross-regulatory 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* **98**:395-400.
- Colley DG, Cook JA, Freeman GL, Bartholomew RK and Jordan P (1977) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigen preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **53**:420-433.
- Colley DG, Garcia AA, Lambertucci JR, Parra JC, Katz N, Rocha RS and Gazzinelli G (1986) Immune responses during human schistosomiasis XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease. *Am J Trop Med Hyg* **35**:793-802.
- Colley DG, Parra JC, Montesano MA, Lima M, Nascimento E, Doughty BL, Goes Alfredo M and Gazzinelli G (1987) Immunoregulation in human schistosomiasis by idiotypic interactions and lymphokine-mediated mechanisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **82**:105-109.

- Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Levine MM, Griffin GE and Nutman TB (2001) Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* **69**:1574-1580.
- Corrêa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos-Carvalho O and Gazzinelli G (1988) 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* **38**:348-355.
- Corrêa-Oliveira R, Golgher DB, Oliveira GC, Carvalho OS, Massara CL, Caldas IR, Colley DG and Gazzinelli G (2002) Infection with *Schistosoma mansoni* correlates with altered immune responses to *Ascaris lumbricoides* and hookworm. *Acta Tropica* **83**:123-132.
- Corrêa-Oliveira R, Malaquias LCC, Falcão PL, Viana IRC, Bahia-Oliveira LMG, Silveira AMS, Fraga LAO, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA and Gazzinelli G (1998) Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *S. mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res* **31**:171-177.
- Costa GL, Benson JM, Seroogy CM, Achacoso P and Fathman CG (2000) Targeting rare populations of murine antigen-specific T lymphocytes by retroviral transduction for potential application in gene therapy for autoimmune disease. *J Immunol* **164**:3581-3590.
- Coura JR and Amaral RS (2004) Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:13-19.
- Crompton DWT (2000) The public health importance of hookworm disease. *Parasitology* **121**:39-50.
- Curry AJ, Else KJ, Jones F, Bancroft A, Grencis RK and Dunne DW (1995) Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. *J Exp Med* **181**:769-774.
- da Silva NR (2003) Impact of mass chemotherapy on the morbidity due to soil-transmitted nematodes. *Acta Tropica* **86**:197-214.
- Damian RT (1997) Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* **115**:169-175.
- de Jesus AM, Almeida RP, Bacellar O, Araujo MI, Demeure C, Bina JC, Dessein AJ and Carvalho EM (1993) Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. *Eur J Immunol* **23**:152-158.
- de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida R P, Rêgo MAV, Burattini MN, Pearce EJ and Carvalho EM (2002) Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* **185**:98-105.

- Deelder AM, Miller RL, de Jonge N and Krijker FW (1990) Detection of schistosome antigen in mummies. *Lancet* **335**:724-725.
- Demeure CE, Rihet P, Abel L, Ouattara M, Bourgois A and Dessein AJ (1993) Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J Infect Dis* **168**:1000-1008.
- Dieckmann D, Plöttner H, Berchtold S, Berger T and Schuler G (2001) *Ex vivo* isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* **193**:1303-1310.
- Dieckmann D, Plöttner H, Dotterweich S and Schuler G (2005) Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells suppress antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells but induce a suppressive phenotype only in CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunology* **115**:305-314.
- Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG and Gray JW (1983) Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *PNAS* **80**:5573-5577.
- Dutton RW, Bradley LM and Swain SL (1998) T cell memory. *Ann Rev Immunology* **16**:201-223.
- Ebert LM and McColl SR (2001) Coregulation of CXC chemokine receptor and CD4 expression on T lymphocytes during allogeneic activation. *J Immunol* **166**:4870-4878.
- El-Ansary A and Al-Daihan S (2005) Stage-specifically expressed schistosome proteins as potential chemotherapeutic targets. *Med Sci Monit* **11**:94-103.
- Elias D, Akuffo H, Thors C, Pawlowski A and Britton S (2005) Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clin Exp Immunol* **139**:398-404.
- El-Kady IM, Lotfy M, Badra G, El-Masry S and Waked I (2005) Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-18 and IFN- $\gamma$  cytokines pattern in patients with combined hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni* infections. *Scand J Immunol* **61**:87-91.
- Ellner JJ, Olds GR, Osman GS, El Kholy A and Mahmoud AAF (1981) Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* **162**:300-312.
- Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG and Corrêa-Oliveira R (1989) Idiotype sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J Clin Invest* **84**:1028-1031.
- Engels D, Nahimana S, Gryseels B. (1996) Comparison of the direct faecal smear and two thick smear techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**: 523-525.
- Esparza I, Ruppel A, Mestan J and Krammer PH (1988) Preactivation of macrophages in mice acutely infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunobiology* **177**:105-119.

- Fairley NH (1951) Schistosomiasis and some of its problems. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **45**:279-306.
- Falcão PL, Malaquias LCC, Martins-Filho OA, Silveira AMS, Passos VMA, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL and Corrêa-Oliveira R (1998) Human schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation, in *Parasite Immunol* pp 447-454.
- Fallon PG, Fookes RE and Doenhoff MJ (1996) Protection of mice against *Schistosoma mansoni* infection by passive transfer of sera from infected rabbits. *Parasite Immunol* **18**:7-14.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Chame M and Ribeiro BM (1987) Encontro de ovos de ancilostomídeos em coprólitos humanos datados de 7.230<sup>+</sup>/80 anos, Piauí, Brasil. *An Acad Bras Ci* **59**:280-281.
- Fiorentino D, Zlotnik F and Mosmann TR (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* **147**:3815-3821.
- Fleming FM, Brooker S, Geiger SM, Caldas IR, Corrêa-Oliveira R, Hotez P and Bethony JM (2006) Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop Med Int Health* **11**:56-64.
- Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB and Stadecker MJ (1996) Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol* **156**:3315-3320.
- Gaines H, Anderson L and Biberfeld G (1996) A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods* **195**:63-72.
- Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS and Colley DG (1983a) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. VIII. Differential *in vitro* cellular responsiveness to adult worm and schistosomular tegumental preparations. *Am J Trop Med Hyg* **32**:326-333.
- Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS and Colley DG (1983b) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* **130**:2891-2895.
- Gazzinelli G, Lambertucci JR and Katz N (1985) Immune response during human schistosomiasis. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *J Immunol* **135**:2121-2126.
- Gazzinelli G, Montesano MA, Corrêa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS and Colley DG (1987) Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **82**:65-100.
- Gazzinelli G, Viana IRC, Bahia-Oliveira LMG, Silveira AMS, Queiroz CC, Carvalho OS, Massara CL, Fraga LAO, Colley DG and Corrêa-Oliveira R (1992) Immunological profiles of patients from endemic areas infected with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **87**:139-142.

- Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho O S and Corrêa-Oliveira R (2002) Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol* **24**:499-509.
- Gelfand M (1964) The hypersensitive response of the european to schistosomiasis. *J Trop Med Hyg* **67**:255-256.
- Goes AM, Gazzinelli G, Rocha R, Katz N and Doughty BL (1991) Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. III. In vitro granuloma modulation induced by immune complexes. *Am J Trop Med Hyg* **44**:434-443.
- Graham AL (2002) When T-helper cells don't help: immunopathology during concomitant infection. *The Quartely Review of Biology* **77**:409-434.
- Gratzner HG (1982) The monoclonal antibody to 5-bromodeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**:474-475.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE and Roncarolo MG (1998) Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **160**:3188-3193.
- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F and Sher A (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* **146**:1322-1327.
- Gudmundsdottir H, Wells AD and Turka LA (1999) Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* **162**.
- Gustavson S, Zouain CS, Alves JB, Leite MF and Goes AM (2002) Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. *Parasitol Int* **51**:259-269.
- Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJG and HA W (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* **349**:243-245.
- Hawell-Elkins MR, Elkins DB, Manjula K, Michael E and Anderson RM (1988) An investigation of hookworm infection and reinfection following mass antihelminthic treatment in the south Indian fishing community of Vairavanbuppan. *Parasitology* **9**:565-577.
- Heggors JP, Mwllerz MJ, Elwood E and Herndonlp DN (1995) Ascariasis pneumonitis: a potentially fatal complication in smoke inhalation injury. *Burns* **21**:149-151.
- Hellerstein MK (1999) Measurement of T-cell kinetics: recent methodologic advances. *Trends in Immunology Today* **20**:438-441.
- Holaday BJ, Pompeu MMDL, Jeronimo S, Teixeira MJ, Souza AdQ, Vasconcelos AW, Pearson RD, Abrams JS and Locksley RM (1993) Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kalazar. *J Clin Invest* **92**:2626-2632.



- Holm TL, Nielsen J and Claesson MH (2004) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* **112**:629-641.
- Hori S, Nomura T and Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**:1057-1061.
- Howard SC, Donnelly CA, Kabatereine NB, Ratard RC and Brooker S (2002) Spatial and intensity-dependent variations in associations between multiple species helminth infections. *Acta Tropica* **83**:141-149.
- IBGE (2006) Dados do Censo 2000, com divisão territorial 2001 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>, acesso em 24/02/2006.
- Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D and Lanzavecchia A (1999) The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* **29**:4092-4101.
- James SL (1986) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *J Immunol* **136**:3872-3877.
- James SL, Cook KW and Lazdins JK (1990) Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J Immunol* **145**:2686-2690.
- James SL and Glaven JA (1987) Effects of inhibitors of tumoricidal activity upon schistosomulum killing by activated macrophages. *Infect Immun* **55**:3174-3180.
- Janeway CA, Travers P, Walport M and Capra JD (2001) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Elsevier Science, New York.
- Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, James S, Cheever AW and Sher A (1999) Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- $\gamma$ -dependent effector mechanisms. *J Immunol* **162**:345-351.
- Jefferis R, Lund J and Goodall M (1995) Recognition sites on human IgG for Fc $\gamma$  receptors - the role of glycosylation. *Immunol Lett* **44**:111-117.
- Kalinkovich A, Weisman Z, Greenberg Z, Nahmias J, Eitan S, Stein M and Bentwich Z (1998) Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin Exp Immunol* **114**:414-421.
- Katz N, Chaves A and Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis manoni. *Rev Inst Med Trop* **14**:397-400.
- Keiser J, N'Goran EK, Singer BH, Lengeler C, Tanner M and Utzinger J (2002a) Association between *Schistosoma mansoni* and hookworm infections among schoolchildren in Côte d'Ivoire. *Acta Tropica* **84**:31-41.
- Keiser J, N'Goran EK, Traoré M and et al (2002b) Polyparasitism with *Schistosoma mansoni*, geohelminths and intestinal protozoa in rural Côte d'Ivoire. *J Parasitol* **88**:461-466.

- King CH, Dickman K and Tisch DJ (2005) Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* **365**:1561-1569.
- King CL and Nutman TB (1993) IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN- $\gamma$  in human helminth infections: assessment by B cell precursor frequencies. *J Immunol* **151**:458-465.
- Kitchen S, LaForge S, Patel V, Miceli MC and Zack J (2002) Activation of CD8 T cells induces expression of CD4, which functions as a chemotactic receptor. *Blood* **99**:207-212.
- Kloos H and David R (2002) The Paleoepidemiology of Schistosomiasis in Ancient Egypt. *Human Ecology Review* **9**:14-25.
- Knopf PM and Coghlan RL (1989) Maternal transfer of resistance to *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* **75**:398-404.
- Krieger NR, Fathman CG, Shaw MK and Ridgway WM (2000) Identification and characterization of the antigen-specific subpopulation of alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *in vivo*, in *Transplantation* pp 605-609.
- Kulberg MC, Berzofsky JA, Jankovic DL, Barbieri S, Williams ME, Perrimann P, Sher A and Troye-Blomberg M (1996) T-cell derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B, non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **156**:1482-1489.
- Kullberg M, Pearce E, Hieny S, Sher A and Berzofsky J (1992) Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol* **148**:3264-3270.
- Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT and Chiang BL (2004) Inverse correlation between CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* **117**:280-286.
- Leiper RT (1915) Report on the results of the Bilharzia mission in Egypt, 1915. *J R Army Med Corps* **XXV**:1-55.
- Lejon K and Fathman CG (1999) Isolation of self antigen-reactive cells from inflamed islets of nonobese diabetic mice using CD4<sup>high</sup> expression as a marker. *J Immunol* **163**:5708-5714.
- Lutz A (1916) Observações sobre a evolução do *Schistosoma mansoni*. *Brasil Méd* **30**:385-387.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD and Allen JE (2004) Helminth parasites - masters of regulation. *Immunol Rev* **201**:89-116.
- Maizels RM and Yazdanbakhsh M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Rev Immunol* **3**:733-744.

- Malaquias LCC, Falcão PL, Silveira AMS, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, Pizzolo V, Souza CP, Colley DG and Corrêa-Oliveira R (1997) 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* **46**:393-398.
- Manzotti CN, Tipping H, Perry LCA, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y and Sansom DM (2002) Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* **32**:2888-2896.
- Martins-Filho OA, Cunha-Melo JR, Lambertucci JR, Silveira AMS, Colley DG, Gazzinelli G and Corrêa-Oliveira R (1999) Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. *Dig Dis Sci* **44**:570-577.
- Martins-Filho OA, Dutra WO, Freeman GL, Silveira AMS, Rabelo A, Colley DG, Prata A, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R and Carvalho-Parra J (1997) Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. *Scand J Immunol* **46**:304-311.
- McCabe MJJ, Singh KP and Reiners JJJ (2001) Low level lead exposure *in vitro* stimulates the proliferation and expansion of alloantigen-reactive CD4<sup>high</sup> T cells. *Toxicology App Pharmacology* **177**:219-231.
- McGuirk P and Mills KHG (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* **23**:450-455.
- Mduluza T, Ndhlovu PD, Midzi N, Mary C, Paris CP, Turner CMR, Chandiwana SK, Woolhouse ME, Dessein AJ and Hagan P (2001) T cell clones from *Schistosoma haematobium* infected and exposed individuals lacking distinct cytokine profiles for Th1/Th2 polarization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**:89-101.
- Mehta BA and Maino VC (1997) Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* **208**:49-59.
- Mendoza L (2006) A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *BioSystems* **84**(2):101-114
- Montesano MA, Colley DG, Eloi-Santos S, Freeman GL Jr and Secor WE (1999) Neonatal idiotypic exposure alters subsequent cytokine, pathology and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Exp Med* **189**:637-645.
- Montesano MA, Freeman GL Jr, Secor WE and Colley DG (1997) Immunoregulatory idiotypes stimulate T helper 1 cytokine responses in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Immunol* **158**:3800-3804.
- Montesano MA, Lima MS, Corrêa-Oliveira R, Gazzinelli G and Colley DG (1989) Immune responses during human schistosomiasis mansoni: XVI. Idiotypic differences in antibody preparations from patients with different clinical forms of infection. *J Immunol* **142**:2501-2506.

- Morgan JAT, Dejong RJ, Adeoye GO, Ansa EDO, Barbosa CS, Brémond P, Cesari IM, Charbonnel N, Corrêa LR, Coulibaly G, D'andrea PS, de Souza CP, Doenhoff MJ, File S, Idris MA, Incani RN, Jarne P, Karanja DMS, Kazibwe F, Kpikpi J, Lwambo NJS, Mabaye A, Magalhães LA, Makundi A, Moné H, Mouahid G, Muchemi GM, Mungai BN, Séné M, Southgate V, Tchuem Tchuente LA, Théron A, Yousif F, Zanotti-Magalhães EM, Mkoji GM and Loker ES (2005) Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecology* **14**:3889-3902.
- Mosmann TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL (1986) Two types of murine T cell clone: 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348-2357.
- Mosmann TR and Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* **17**:138-146.
- Murray CJL, Lopez AD and Cambridge MA (1996) The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. OMS.
- Mutapi F, Hagan P, Woolhouse MEJ, Mduluzza T and Ndhlovu PD (2003) Chemotherapy-induced, age-related changes in antischistosome antibody responses. *Parasite Immunol* **25**:87-97.
- Nacher M (2004) Interactions between worm infections and malaria. *Clin Rev Allergy Immunol* **26**:85-92.
- Nash TE, Cheever AW, Ottesen EA and Cook JA (1982) Schistosome infections in humans: perspectives and recent findings. *Ann Intern Med* **97**:740-754.
- Nielsen J, Holm TL and Claesson MH (2004) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* **112**:642-650.
- Noureldin MS, el-Shinnawy H and Abou Elenin A (2000) Serum pretreatment with *Schistosoma mansoni* antigens for serological diagnosis of fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol* **30**:157-168.
- Novak EJ, Liu AW, Nepom GT and Kwok WW (1999) MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4<sup>+</sup> T cells proliferating in responses to influenza A antigen. *J Clin Invest* **104**:R63-R67.
- Novak EJ, Masewicz SA, Liu AW, Lernmark A, Kwok WW and Nepom GT (2001) Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4<sup>high</sup> proliferating subset. *Int Immunol* **13**:799-806.
- O'Connor RA and Devaney E (2002) Nitric oxide the expansion of antigen-specific T cells in mice infected with *Microfilariae pahangi*. *Infect Immun* **70**:5997-6004.
- OMS (2001) Report of the WHO informal consultation of schistosomiasis in low transmission areas: control strategies and criteria for elimination, pp 56, Organização Mundial da Saúde, London.

- OMS (2002) WHO Technical Report Series: Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis, pp 63, Organização Mundial da Saúde, Geneva.
- Ottensen E, Hiatt R, Cheever A, Sotomayer Z and Neva F (1978) The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man, in *Clin Exp Immunol* pp 37-47.
- Pajusto M, Ihalainen N, Pelkonen J, Tarkkanen J and Mattila PS (2004) Human *in vivo*-activated CD45RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are susceptible to spontaneous apoptosis that can be inhibited by the chemokine CXCL12 and IL-2, -6, -7 and -15. *Eur J Immunol* **34**:2771-2780.
- Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M and Cruikshank WW (1998) Synergistic activation of CD4<sup>+</sup> T cells by IL-16 and IL-2. *J Immunol* **160**:2115-2120.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**:603-608.
- Parra JC, Gazzinelli G, Goes AM, Moyes RB, Rocha R, Colley DG and Doughty BL (1991) Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. *J Immunol* **147**:3949-3954.
- Parra JC, Lima MS, Gazzinelli G and Colley DG (1988) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XV. Anti- idiotypic T cells can recognize and respond to anti-SEA idiotypes directly. *J Immunol* **140**:2401-2405.
- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA and Sher A (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* **173**:159-166.
- Pearce EJ and Pedras-Vasconcelos J (1997) *Schistosoma mansoni* infection induces a type 1 CD8<sup>+</sup> cell response. *Behring Inst Mitt* **99**:79-84.
- Peres A, Bauer M, da Cruz IB, Nardi NB and Chies JAB (2003) Immunophenotyping and T-cell proliferative capacity in a healthy aged population. *Biogerontology* **4**:289-296.
- Perrin GQ, Johnson HM and Subramaniam PS (1999) Mechanism of interleukin -10 inhibition of T-helper cell activation by superantigen at the level of the cell cycle. *Blood* **93**:208.
- Petney TN and Andrews RH (1998) Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int J Parasitology* **28**:377-393.
- Pirajá da Silva MA (1908) Contribuição para o estudo da schistosomíase na Bahia. *Brasil Méd* **22**:281-283.
- Pritchard DI, Hewitt C and Moqbrl R (1997) The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* **115**:S33-S44.

- Pritchard DI and Walsh EA (1995) The specificity of the human IgE response to *Necator americanus*. *Parasite Immunol* **17**:605-607.
- Quinnell RJ, Woolhouse MEJ, Walsh EA and Pritchard DI (1995) Immunoepidemiology of human necatoriasis: correlations between antibody responses and parasite burdens. *Parasite Immunol* **17**:313-318.
- Rabello A (1995) Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **90**:277-280.
- Raso G, Luginbühl A, Adjoua CA, Tian-Bi NT, Silué KD, Matthys B, Vounatsou P, Wang Y, Dumas ME, Holmes E, Singer BH, Tanner M, N'Goran EK and Utzinger J (2004) Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. *Int J Epidemiol* **33**:1092-1102.
- Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R and Powrie F (1998) CD38<sup>+</sup> CD45RB low CD4<sup>+</sup> T cells: a population of T cells with immune regulatory activities *in vitro*. *Eur J Immunol* **28**:3435-3447.
- Reijonen H, Knok WW and Nepom GT (2003) Detection of CD4<sup>+</sup> autoreactive T cells in T1D using HLA class II tetramers. *Ann N Y Acad Sci* **105**:82-87.
- Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, Heninger A, Liu AW, Knok WW and Nepom GT (2002) Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects. *Diabetes* **51**:1375-1382.
- Reome JB, Johnston DS, Helmich BK, Morgan TM, Dutton-Swain N and Dutton RW (2000) The effects of prolonged administration of 5-bromodeoxyuridine on cells of the immune system. *J Immunol* **165**:4226-4230.
- Rey L (2001) Um século de experiência no controle da ancilostomíase. *Rev Soc Bras Med Trop* **34**:61-67.
- Rezende SA, Silva-Teixeira DN, Drummond SC and Goes AM (1997) IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs induced by immune complexes. *Scand J Immunol* **46**:96-102.
- Ridgway W, Fassò M and Fathman CG (1998) Following antigen challenge, T cells up-regulate cell surface expression of CD4 *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* **161**:714-720.
- Riechard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann Rev Biochem* **57**:349.
- Rihet P, Demeure CE, Dessein AJ and Bourgois A (1992) Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. *Eur J Immunol* **22**:2063-2070.
- Rosato MT, Jabbour AJ, Ponce RA, Kavanagh TJ, Takaro TK, Hill JP, Poot M, Rabinovitch PS and Faustman EM (2001) Simultaneous analysis of surface marker expression and cell cycle progression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* **256**:35-46.

- Ruffer MA (1910) Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 BC). *Br Med J* **1**:16.
- Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat AS, El Refaei M and Perrin PJ (1999) Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol* **162**:1003-1009.
- SABIN VACCINE INSTITUTE (2006) Hookworm as a Global Health Threat, disponível em: <http://www.sabin.org/hookworm%5Fintro.htm>, acesso em 24/02/2006.
- Sambon LW (1907) Remarks on *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* **10**:303-304.
- Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Jesus AR and Carvalho EM (2004) Clinical and immunological consequences of human T cell leukemia virus type-I and *Schistosoma mansoni* co-infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:121-126.
- Schutte CH, Eriksson IM, Anderson CB and Lamprecht T (1981) Intestinal parasitic infections in black scholars in northern KwaZulu. *S Afr Med J* **60**:137-141.
- Secor WE, Shah A, Mwinzi PMN, Ndenga BA, WattaCO and Karanja DMS (2003) Increased density of Human Immunodeficiency Virus type coreceptors CCR5 and CXCR4 on the surfaces of CD4 T Cells and monocytes of patients with *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* **71**:6668-6671.
- Shevach EM (2001) Certified professionals: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *J Exp Med* **193**:1303-1310.
- Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH and Modlin RL (1993) Immunossuppressive role for IL-10 and IL-4 in human infections. *In vitro* modulation on T cell responses in leprosy. *J Immunol* **150**:5501-5510.
- Silveira AMS, Bethony J, Gazzinelli A, Kloos H, Fraga LAO, Álvares MCB, Prata A, Guerra HL, Loverde PT, Corrêa-Oliveira R and Gazzinelli G (2002) High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigen in individuals with periportal fibrosis. *Am J Trop Med Hyg* **66**:542-549.
- Smythies LE, Couslon PS and Wilson A (1992) Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol* **149**:3654-3658.
- Steel C and Nutman TB (2003) CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. *J Immunol* **170**:1930-1938.
- Srahna M, Van-Grunsven LA, Remale JE and Vandenberghe P (2005) CTLA-4 interacts with STAT 5 and inhibits STAT 5 -mediated transcription. *Immunology* **117**:396-401.
- Sun J, Stalls MA, Thompson KL and van Houten NF (2003) Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. *Cell Immunol* **225**:33-41.

- Swainson L, Kinet S, Manel N, Battini JL, Sitbon M and Taylor N (2005) Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis. *PNAS* **102**:12867-12872.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW and Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**:303-309.
- Taylor MM and Turton JA (1976) Antigen induced lymphocyte blastogenesis in a hookworm (*Necator americanus*) infections in man. *Tropenmed Parasit* **27**:89-92.
- Tchuem Tchuenté LA, Behnke JM, Gilbert FS, Southgate VR and Vercruyse J (2003) Polyparasitism with *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted helminth infections among school children in Loum, Cameroon. *Trop Med Int Health* **8**:975-986.
- Thornton AM and Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* **164**:186-190.
- Torres VM (1976) Dermatologic manifestations of schistosomiasis mansoni. *Arch Dermatol* **112**:1539-1542.
- van Dam GJ, Stelma FF, Gryseels B, Falcao Ferreira ST, Talla I, Niang M, Rotmans JP and Deelder AM (1996) Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal. *J Infec Dis* **173**:1232-1241.
- Viana IRC, Corrêa-Oliveira R, Carvalho OS, Massara CL, Colosimo E, Colley DG and Gazzinelli G (1995) Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant living in an endemic area. *Parasite Immunol* **17**:297-304.
- Viana IRC, Sher A, Carvalho OS, Massara CL, Eloi-Santos SM, Pearce EJ and Colley DG (1994) Interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**:466-470.
- Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF and Buckner JH (2005) De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *PNAS* **102**:4103-4108.
- Wang J, Alvarez R, Roderiguez G, Guan E and Norcross MA (2004) Constitutive association of cell surface CCR5 and CXCR4 in the presence of CD4. *J Cell Biochemistry* **93**:753-760.
- Weyand CM, Goronzy J and Fathman CG (1987) Modulation of CD4 by antigenic activation. *J Immunol* **138**:1351-1354.
- Wise JT, Baginski TJ and Mobley JL (1999) An adoptive transfer model of allergic lung inflammation in mice is mediated by CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **162**:5592-5600.



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

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW and Mentink-Kane MM (2004) Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev* **201**:156-167.

Zouain CS, Falcão PL, Goes TS, Leite MF and Goes AM (2004) *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates *in vitro* granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4 and CD86 expression in humans. *Immunology Letters* **91**:113-118.

**ANEXOS**

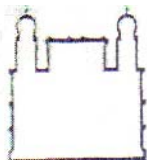
## ANEXO A

Finalidades dos anticorpos utilizados nos ensaios de proliferação e fenotipagem celular.

<b>Anticorpos</b>	<b>Objetivos</b>
anti-CTLA-4	Marcador de co-estimulação celular
anti-BrdU	Marcador de proliferação celular
anti-CD3	Marcador de linfócitos T
anti-CD4	Marcador de linfócitos T auxiliares
anti-CD3	Marcador de linfócitos T
anti-CD4	Marcador de linfócitos T auxiliares
anti-CD8	Marcador de linfócitos T citotóxicos
anti-CD19	Marcador de linfócitos B
anti-CD25	Marcador de ativação intermediária
anti-CD38	Marcador de ativação inicial
anti-CD44	Marcador de células de memória
anti-CD45RA	Marcador de células de não primadas
anti-CD45RO	Marcador de células de memória
anti-CD62L	Marcador ativação inicial
anti-CD69	Marcador ativação inicial
anti-CD4	Marcador de linfócitos T auxiliares
anti-CD25	Marcador de ativação intermediária
anti-HLA-DR	Marcador de ativação tardia

**ANEXO B**

Cópia do protocolo de aprovação do projeto: Interrelação entre a genética e a co-infecção helmíntica” (“Host Genetic Correlates of Helminthic Coinfection”), pelo Comitê de Ética do CPqRR - FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo CruzCentro de Pesquisas René Rachou  
Comitê de Ética em Pesquisa**PARECER Nº 002/2000 – CEP CPqRR****Protocolo nº:** 003/2000**Projeto de Pesquisa:** *Interrelação entre a genética do hospedeiro e a coinfecção helmíntica”.***Pesquisador Responsável:** Jeffrey Bethony**Instituição:** Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ**Data de entrada no CEP:** 18/08/2000

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, 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.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação: PROJETO APROVADO**

Belo Horizonte, 04 de setembro de 2000

Alvaro Romanha  
Vice-Coordenador do CEP CPqRR