

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS
NA ANCILOSTOMÍASE HUMANA**

Lívia Silva Araújo Passos

Belo Horizonte
Fevereiro/2013

Lívia Silva Araújo Passos

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA ANCILOSTOMÍASE HUMANA

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

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

Fevereiro/2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos-LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG

Prof^ª. Dr^ª. Daniella C. Bartholomeu

Dr^ª. Natasha Delacqua Ricci

Msc. Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

Msc. Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Ana Clara Gazzinelli Guimarães

Escola de Enfermagem - ICB/UFMG

Prof^ª. Dr^ª. Andréia Gazzinelli

Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Msc. Jacqueline Araújo Fiúza

ÓRGÃOS FINANCIADORES: CNPq, FAPEMIG, PAPES/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão Pedro que sempre acreditaram no meu potencial e participaram de todos os meus momentos. Obrigado por todo amor e carinho que foram fundamentais para essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão pelo imenso amor, confiança e pelos exemplos de honestidade e luta. Obrigada por compartilharem das minhas alegrias e angústias e por estarem sempre do meu lado. Amo vocês!

Ao Prof. Ricardo Fujiwara meu agradecimento por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança no meu trabalho, pela orientação, pelos ensinamentos e por ter aberto portas na minha vida profissional. Obrigado pelo convívio sempre agradável, e pelo exemplo de profissão e humanidade.

À minha co-orientadora Lílian, pela atenção, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e direcionamento neste trabalho, pela paciência e amizade. Obrigada!

À Prof^a Daniella Bartholomeu, pelas sugestões e por oferecer ótimas condições de trabalho.

À Michele, sempre muito disposta a ajudar e que durante esses dois anos se tornou uma grande amiga! Você é demais! Obrigada por tentar resolver tudo sempre da melhor maneira, pelo carinho e principalmente pela alegria que tornaram meus dias mais tranquilos e prazerosos.

Aos meus colegas Sebastian, Pavãozinho, Fernandão, Nats (Biga), Piri, Gui Ginasta, Zé Graça, Ronds, Lú, querida Flavs, Curumim, Shrimp, Wagner Sabotador, Carol Cavalcante, Anny, Daihana, Ronize e Cris pela ÓTIMA convivência e pela ajuda. Somos um time e tanto!

À Aninha, pela IMENSA ajuda, disponibilidade e competência, mas principalmente pela grande amizade que construímos. Muito obrigada, amo você!

Ao Tizi, que foi sempre tão presente em todas as etapas deste trabalho, pelas palavras de incentivo, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade, enfim... por TUDO que fez por mim. Sou imensamente grata a sua ajuda e dedicação.

Ao PG, fundamental para realização desse trabalho, obrigada pelas sugestões, pela disponibilidade, pelos conselhos, pelo incentivo e pela amizade. Essa vitória é nossa! Muito obrigada.

À turma do Pepino, a melhor da história da Parasitologia! Em especial aos colegas Kero Kléber, Lú Lima, Bruna, Thaís, Julinha e Pavão. Obrigada!

À Denise Lemos, importante na minha trajetória desde o primeiro dia de iniciação científica. Obrigado por toda a ajuda e pela amizade. Você é um exemplo para mim.

À toda minha família: avós, tios, primos e primas que sempre me deram muito carinho e incentivo para seguir adiante. Vocês são mais que especiais, muito obrigada!

As meus queridos e eternos amigos, Diana, Preta, Deco, Furby, Mí, Lílian, Laís, muito obrigada pelo carinho e pela amizade durante todos esses anos.

Ao Thiago, pelo incentivo, pela IMENSA paciência, pelo amor e companheirismo. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos colegas do CpqRR , em especial Jerusa, Laís, Daniel, Aretha, Fabi Rocha, Fabi Paixão, Maurício e Amandinha. Obrigada por fazerem parte dessa história.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de aprendizado.

Às instituições de ensino - Universidade Federal de Minas Gerais e Centro de Pesquisas René Rachou que proporcionaram ótimas condições para meu aprendizado e minha formação acadêmica.

Aos órgãos financiadores que proporcionaram a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	iii
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais da infecção por ancilostomídeos.....	2
1.1.1 Etiologia e distribuição mundial.....	2
1.1.2 Ciclo Biológico.....	6
1.2.3 Fisiopatologia.....	7
1.2 Aspectos da resposta imune na infecção por ancilostomídeos.....	8
1.2.1 Modulação da resposta imune na ancilostomíase humana.....	10
1.3 Ativação de macrófagos.....	13
1.3.1 Ativação de macrófagos em infecções parasitárias.....	20
2. Justificativa.....	22
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4. População, Materiais e Métodos.....	26
4.1 Delineamento experimental.....	27
4.2 Caracterização da população estudada.....	28
4.3 Exame parasitológico de fezes.....	29
4.4 Coleta de sangue periférico.....	29
4.5 Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	31
4.6 Congelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em <i>RNA later</i> ®.....	31
4.7 Congelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em nitrogênio líquido.....	32
4.8 Imunofenotipagem de células mononucleares do sangue periferico (PBMCs) por citometria de fluxo.....	33
4.9 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	35
4.10 Reação de PCR em Tempo Real.....	36

4.11 Separação magnética de monócitos do sangue periférico por seleção positiva com microesferas magnéticas anti-CD14 ⁺	38
4.12 Manutenção da cepa de <i>A.ceylanicum</i>	41
4.13 Produção de antígenos: escretados/secretados de vermes adulto (Es) e extrato bruto de verme adulto (Br).....	42
4.14 Cultura de monócitos do sangue periférico na presença e ausência de antígenos Es e Br.....	44
4.14 Análise dos dados.....	44
5. Resultados	45
5.1 Avaliação do perfil de monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (grupo NI) e de pacientes mono infectados por <i>N. americanus</i> (grupo INF).....	46
5.2 Análise da produção das citocinas IL-10 e IL-12 em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos mono infectados por <i>N. americanus</i> (grupo INF).....	47
5.3 Análise da expressão de IL-4 em PBMCs de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos mono infectados por <i>N. americanus</i> (grupo INF).....	49
5.4 Análise imunofenotípica da expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo de ativação “não clássico” em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos mono infectados por <i>N. americanus</i> (grupo INF).....	50
5.5 Análise da expressão de genes relacionados aos fenótipos regulador (iNOS) e alternativamente ativado (Arg-1) em PBMCs do sangue periférico de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos mono infectados por <i>N. americanus</i> (grupo INF).....	53
5.6 Análise imunofenotípica da expressão de moléculas relacionadas aos fenótipos de ativação “não clássico” em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) após estimulação com antígeno excretado/secretado e antígeno bruto de <i>A. ceylanicum</i>	55
6. Discussão	57
7. Conclusão	58
8. Bibliografia	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AP-1 - Ativador de proteína 1
- APC - Alofococianina
- APCs - Células apresentadoras de antígenos
- Arg-1 - Arginina- 1
- BSA - Albumina bovina sérica
- B7.1 - Molécula de co-regulação de ativação celular
- B7.2 - Molécula de co-regulação de ativação celular
- Bp - pares de bases
- Br - Antígeno bruto
- CC - Cultura controle
- CCL - *Chemokine ligand*
- CD - *Cluster of differentiation*
- CD4 - Molécula de indentificação de células T *helper*
- CD14 - Marcador para população de monócitos
- CD16 - Molécula de indentificação de células NK; receptor de baixa afinidade para IgG
- CD23 - Molécula co-estimuladora de proliferação; receptor de baixa afinidade para IgE
- CD23s - Molécula co-estimuladora de proliferação solúvel
- CD32 - Receptor de baixa afinidade para IgG
- CD64 - Receptor de IgG
- CD163 - *scavenger receptor*
- CD206 - Receptor de manose
- CSF1 - Fator 1 de crescimento de colônia
- CXCL9 - *Monokine- induced by Interferon- γ*
- CXCL10 - *Interferon- γ - induced Protein- 10*
- DALYs - disability-adjusted life years
- DCIR - Imunoreceptor de células dendríticas
- DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule*
- EDTA- Etilenodiaminotetracético
- Es - Antígeno excretado/secretato

EST - Cultura estimulada
EST 1 - Estabilina 1
ERK - *extracellular-signal-regulated kinase*
Fc γ R - receptores de porção Fc de imunoglobulinas
FITC - Isoticianato de fluoresceína
Fizz/RELM - α - proteína encontrada na zona inflamatória
FL - Fluorescência
GAPDH - Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase
GPCRs - ligantes da proteína acopladora G
HTS - Helmintíases transmitidas pelo solo
IDF1 - fator 1 de crescimento de insulina
Ig - Imunoglobulina
IFN- γ - Interferon - γ
INF - Grupo de indivíduos não infectados por *N. Americanus*
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
IL- Interleucina
IRF3 - *Interferon regulatory factor 3*
L1 - Larva de primeiro estágio
L2 - Larva de segundo estágio
L3 - Larva de terceiro estágio
L4 - Larvas de quarto estágio
LIGHT- citocina membro da superfamília TNF
LMC - Larva Migrans Cutanea
LPS - Lipopolissacarídeo
M1- Macrófagos associados a resposta Th1
M2 - Macrófagos associados a resposta Th1
MFI - Intensidade média de fluorescência
MFF - Solução fixadora
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MMP9 - Matriz metalopeptidase 9
MR - Receptor de manose (CD206)

mRNA - RNA mensageiro

NK - *Natural Killer*

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NI - Grupo de indivíduos não infectados por helmintos

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPG - Ovos por grama de fezes

PBS - Tampão fosfato salínico

PBS P - Tampão fosfato salínico permeabilizante

PBS W - Tampão fosfato salínico de lavagem

PE - Ficoeritrina

PECy5 - Ficoeritrina/Cychrome

pH - potencial hidrogeniônico

PMN - Células polimorfomucleares

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio de cultivo celular

Rq - Quantidade relativa

SSC - *Side scatter* (Granulosidade celular)

SPHK1- esfingonosina quinase 1

STAT1 - *Signal Transducers and Activators of Transcription 1*

STAT6 - *Signal Transducers and Activators of Transcription 6*

Th1 - Células T CD4⁺ produtoras de citocinas do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4⁺ produtoras de citocinas do padrão 2 de citocinas

Th17 - Células T CD4⁺ produtoras de IL-17

TLR - *Toll like receptors*

TNF- Fator de necrose tumoral

VIIIA - Fator de coagulação VIIIA

VEGF- Fator de crescimento vascular endotelial

VSG - Glicoproteína de superfície variante

YM - moléculas *quitinase-like*

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da ancilostomíase em 2005. Fonte: Hotez *et al.*, 2005.

Figura 2: Os três principais subtipos de população de macrófagos. Adaptado de Fleming e Mosser (2011).

Figura 3: Esquema geral da metodologia utilizada no estudo.

Figura 4: Análise da pureza e do rendimento de monócitos, após purificação células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em coluna magnética. A) Perfil fenotípico de PBMCs totais. B) Perfil fenotípico de PBMCs depletadas de células CD14⁺. C) Perfil fenotípico de células CD14⁺ após eluição da coluna magnética. Para todos os esquemas (A, B e C), a esquerda, perfil da população em função da granulocidade, ao meio, análise da expressão de CD3⁺e CD14⁺ em função das fluorescências 2 (FL-2) e 3 (FL-3) respectivamente. E, à direita, percentual de células CD3⁺e CD14⁺.

Figura 5: Perfil hematológico de monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI n =13) e de indivíduos mono infectados por *N. americanus* (INF n=19). Os resultados estão expressos pela mediana do valor absoluto de monócitos/mm³ (barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos está representada pelo valor p.

Figura 6: Expressão das citocinas IL-10 e IL-12 em monócitos (CD14⁺) do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI n=17) (A), de indivíduos mono infectados por *N. americanus* (INF n=17) (B) e razão da expressão das citocinas IL-10 e IL-12 entre indivíduos NI e INF (C). Os resultados estão expressos pela média do valor absoluto de monócitos por mm³ (barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos estão representadas pelo valor de p.

Figura 7: Análise da expressão de IL-4 em PBMCs de indivíduos não infectados (NI n=5) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF n=9). Os resultados estão expressos pela mediana da quantidade relativa (Rq) (barras) de moléculas alvo para cada molécula do controle endógeno (GAPDH) e pela dispersão dos valores individuais (círculos).

Figura 8: Avaliação da expressão de (A) CD206, (B) CD206⁺IL-10⁺, (C) CD206⁺CD23⁺IL-10⁺ em PBMCs de indivíduos não infectados (NI (A) n=17, (B) n= 13, (C), n=11) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF (A) n=18, (B) n= 16, (C) n=12). Os resultados estão expressos pela média do valor absoluto de monócitos por mm³ (barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos está representada pelo valor de p.

Figura 9: Análise da expressão de Arg-1 (A) e iNOS (B) em PBMCs de indivíduos não infectados (NI (A) n=7 (B) n=6) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF (A) n=13 (B) n=10). Os resultados estão expressos pela mediana da quantidade relativa (Rq) (barras) de moléculas alvo para cada molécula do controle endógeno (GAPDH) e a dispersão dos valores individuais (círculos).

Figura 10: Avaliação da expressão de CD206⁺IL-10⁺ (A,B) e CD206⁺CD23⁺IL-10⁺ (C,D) em cultura de monócitos de indivíduos não infectados (NI) estimulados (EST) com antígenos excretado/secretado do parasito (Es n=9), antígeno bruto (Br n=9) e em culturas controles (CC n=9). Os resultados estão expressos por percentual de células positivas para as moléculas avaliadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população avaliada **p.29**

Tabela 2: Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de PBMCs

Tabela 3: Iniciadores utilizados para realização da PCR em tempo Real

RESUMO

A ancilostomíase é uma das doenças parasitárias crônicas de maior prevalência no mundo, com uma estimativa entre 576 a 740 milhões de indivíduos infectados. Estudos da biologia do parasito demonstram que os ancilostomídeos conseguem sobreviver em seus hospedeiros por vários anos, mesmo diante de uma resposta imune robusta, o que representa um forte indicativo da evasão imunológica pelo parasito. Entretanto, devido a escassez de estudos voltados para o estudo da resposta celular na ancilostomíase humana e experimental, os mecanismos de evasão desencadeados pelo parasito, dentre eles o perfil de ativação de monócitos na infecção, ainda não foram abordados. No presente estudo, avaliou-se, por meio de imunofenotipagem e pela expressão de alguns genes o tipo de ativação envolvida na infecção natural por ancilostomídeos. Além disso, verificou-se a capacidade de antígenos do parasito em converter o fenótipo de monócitos de indivíduos não infectados para um perfil semelhante ao observado nos monócitos de indivíduos infectados residentes em áreas endêmicas. Nossos resultados mostraram que indivíduos naturalmente infectados por ancilostomídeos possuem uma maior frequência de monócitos quando comparados aos indivíduos controles (não infectados) e que esses monócitos possuem características reguladoras evidenciadas principalmente pela elevada expressão de IL-10. Além disso, esses indivíduos possuem elevada expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) associado ao aumento da expressão de receptores de IgE de baixa afinidade (CD23 e baixa produção de IL-12. Ao verificarmos, em monócitos desses mesmo indivíduos, moléculas associadas ao perfil de ativação alternativo tais como: receptores de manose (CD206), expressão de IL-4 e de arginase-1 não foi observado diferenças significativas em relação ao grupo controle. Esses dados em conjunto, nos permitem concluir que monócitos de indivíduos naturalmente infectados por ancilostomídeos possuem predominantemente características reguladoras e que portanto, podem estar contribuindo para a sobrevivência prolongada do parasito no organismo do hospedeiro, uma vez que essas células podem estar contribuindo para a modulação de sua resposta imunológica.

ABSTRACT

The hookworm is one of the most prevalent parasitic chronic diseases, infecting an estimated 740 million people in tropical and subtropical regions of the world. A robust but ineffective immune response against the parasite allows it to survive in their host for several years, which is a strong indicator of immune evasion by the parasite. However, due to lack of studies about the cellular immune response in experimental and human hookworm infected, the evasion mechanisms triggered by the parasite, including the profile of activation of monocytes in infection, has not been addressed. In the present study, we evaluated by immunophenotyping and by the expression of some genes associated with different profiles of monocyte activation in the natural infection hookworms. Moreover, we verified the ability of parasite antigens in converting the phenotype profile of monocytes from controls individuals for resembling profile to that seen in monocytes infected individuals living in endemic areas. Our results showed that hookworm infected individuals have a higher frequency of monocytes when compared to controls and those monocytes have regulatory characteristics evidenced mainly by the high expression of IL-10. Furthermore, these individuals have elevated expression of nitric oxide synthase (iNOS) associated with the increased expression of IgE receptors low affinity (CD23) and low expression of IL-12. The evaluation of molecules associated with alternative activation profile in these monocytes such as mannose receptors (CD206), expression of IL-4 and arginase-1 showed no differences compared with the control group. Such data together, enabling us to conclude that monocytes from individuals naturally infected have predominantly regulatory characteristics and therefore may contribute to the prolonged survival of the parasite in the host organism, since these cells may contribute to the modulation of their immune response.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da infecção por ancilostomídeos

1.1.1 Etiologia e distribuição mundial

A ancilostomíase é uma doença parasitária de caráter crônico causada por nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae (Ordem: Strongyloidea, Super família Strongyloidea). Nos hospedeiros humanos destacam-se como agentes etiológicos os gêneros *Necator* e *Ancylostoma*, sendo *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* as espécies de maior importância epidemiológica (Bungiro e Cappello, 2004; Hotez *et al.*, 2004; Brooker *et al.*, 2004; Periago e Bethony, 2012). Atualmente, sabe-se que as infecções por *N. americanus* são muito mais prevalentes do que as infecções por *A. duodenale* (Tissenbaum *et al.*, 2000; Geiger *et al.*, 2004; Brooker *et al.*, 2006b; Fleming *et al.*, 2006). Apesar de também infectarem humanos, as espécies *A. ceylanicum*, *A. braziliense* e *A. caninum* não representam relevância epidemiológica por se tratarem de espécies zoonóticas e estarem localizadas em regiões geográficas pontuais (Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004; Periago e Bethony, 2012). Vale ressaltar que as espécies *A. braziliense* e *A. caninum* são agentes causadores da Larva Migrans Cutânea (LMC), dermatose de evolução autolimitada em humanos, caracterizada pela presença de túneis sinuosos cutâneos principalmente nos pés, nádegas e abdome (Brooker *et al.*, 2004; Heukelbach e Feldmeier, 2008; Bowman *et al.*, 2010).

Apesar de alguns documentos egípcios e gregos fazerem referência a certo conhecimento sobre a ancilostomíase, as interpretações desses textos permanecem ainda muito discutíveis. Assim, os escritos de Avicena, famoso médico árabe do século XI, onde são citados pequenos vermes cilíndricos que provocam uma forma de anemia, são considerados as primeiras referências claras acerca da infecção. No Brasil, o primeiro relato

sobre os ancilostomídeos foi feito no ano de 1637; a partir daí diversas outras descrições foram feitas em outras regiões do mundo, inicialmente em Guadalupe e posteriormente em países tropicais e em certas regiões temperadas da América, Europa, Ásia e nas ilhas do Pacífico (Rey, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ancilostomíase é uma das doenças parasitárias crônicas mais prevalentes no mundo, sendo a terceira helmintoses mais freqüente, e é considerada até os dias de hoje como um grande problema de saúde pública (WHO, 2011). Estima-se que atualmente cerca de 576 a 740 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, sendo as regiões de maior endemicidade concentradas na África subsaariana, Ásia ocidental, sul da China, subcontinente indiano e Américas (**Fig.1**) (Garside *et al.*, 1989; De Silva *et al.*, 2003; Hotez, 2003). Os dados de prevalência e distribuição global da ancilostomíase foram estimados com base em um extenso levantamento de literatura realizado na década de 1990, entretanto, atualmente nenhum mecanismo de vigilância internacional se encontra em vigor (Loukas *et al.*, 2006; Bethony *et al.*, 2006; Hotez *et al.*, 2008). As maiores taxas de infecção ocorrem na Indonésia, Bangladesh e Índia, seguida por Nigéria e República democrática do Congo, na África, e pelo Brasil (Hotez *et al.*, 2003, 2008, 2009). Nessas regiões se encontram as 2,7 bilhões de pessoas mais pobres do planeta, as quais sobrevivem com menos de dois dólares por dia e em condições sanitárias extremamente precárias. A ancilostomíase apresenta uma nítida associação com baixos níveis sócios econômicos e representa uma perda de 1.825.000 anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”, DALYs), superando todas as outras doenças parasitárias, com exceção da malária, filariose linfática e leishmanioses (Hotez *et al.*, 2005).

No Brasil, estudos foram realizados com intuito de verificar a prevalência da ancilostomíase por Gonçalves *et al.*, (1990) em Pernambuco no município de São Lourenço da Mata, até mais recentemente, no ano de 2010, por Silva e da Silva em Minas Gerais no município de Patos de Minas. Através desses estudos, trinta no total, sumarizados por Mudenda *et al.*, (2012), pode-se verificar que as áreas endêmicas identificadas até então para ancilostomíase ocorrem desde o Estado do Amazonas até o Paraná, abrangendo, até o momento, dezesseis Estados do Brasil.

O programa de controle preconizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005; WHO, 2008) que é baseado no tratamento periódico em massa de populações afetadas, principalmente de crianças em idade escolar, com drogas anti-helmínticas (Hotez *et al.*, 2005b) tem apresentado efeitos limitados. Isso ocorre devido diversos fatores como: (a) baixa taxa de cura após tratamento com anti-helmíntico (Bennett e Guyatt, 2000), (b) redução da eficácia dos benzimidazóis (droga padrão no controle da ancilostomíase) com o uso periódico e frequente (Albonico *et al.*, 2003) e (c) alta taxa de reinfecção, geralmente observada poucos meses após o tratamento (Albônico *et al.*, 1999) o que torna a ancilostomíase um problema ainda mais grave de saúde pública e que tem sido negligenciado pela comunidade científica internacional.

A estimativa da intensidade de infecção por ancilostomídeos, principal índice epidemiológico utilizado nos levantamentos relacionados às helmintoses transmitidas pelo solo (HTS), são obtidas através da contagem de ovos nas fezes de seus hospedeiros. A Organização Mundial de Saúde define como infecções de intensidade baixa de 1 a 1.999 ovos por grama de fezes (opg), infecções de intensidade moderada de 2.000 a 3.999 opg e infecções de intensidade alta aquelas com contagens superiores a 4.000 opg.

Diferentemente das demais HSTs, como ascariadíase e tricuriíase, em que maiores cargas parasitárias são freqüentes em crianças de 5 a 10 anos, a ancilostomíase possui um padrão oposto de distribuição por idade, com maior intensidade de infecção em adultos e adultos jovens e um segundo pico em pacientes acima dos 60 anos (Palmer *et al.*, 1996). Outro aspecto curioso da ancilostomíase é a heterogeneidade da carga parasitária observada nos indivíduos infectados, observando uma frequência da distribuição de ovos/pessoa na população altamente concentrada, ou seja, uma minoria da população está densamente parasitada, enquanto a maioria libera poucos ovos em suas fezes (Hotez *et al.*, 2004).

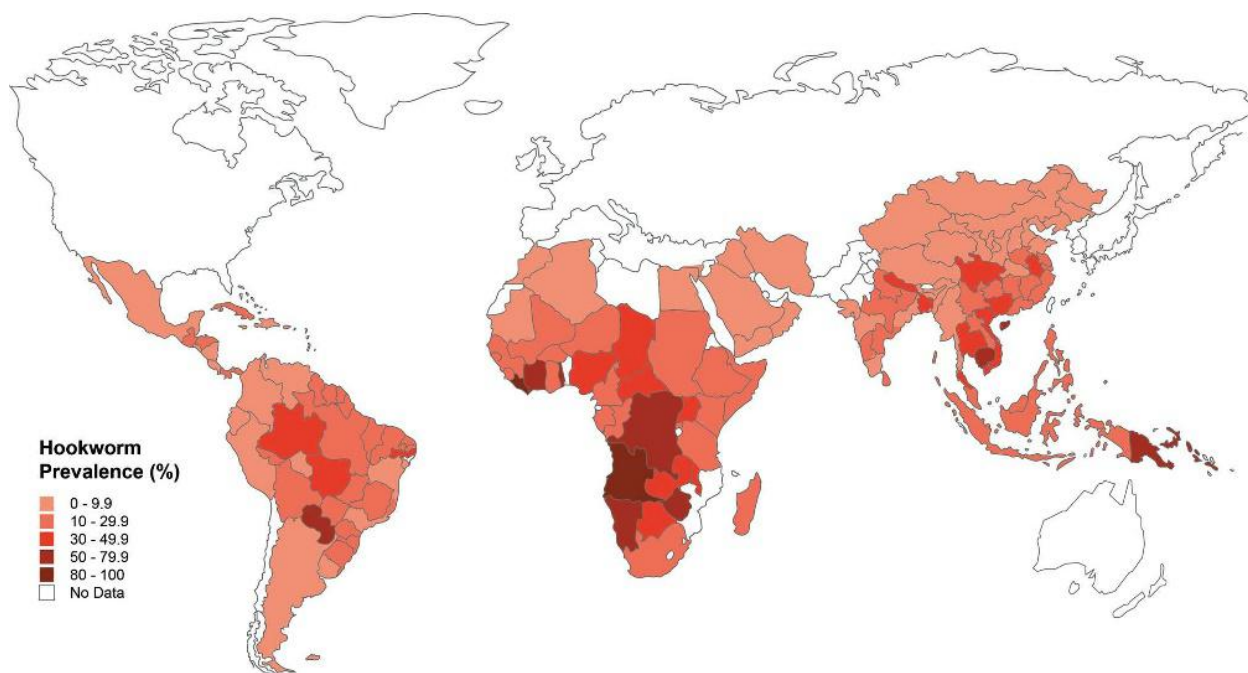


Fig. 1. Distribuição mundial da ancilostomíase em 2005. Fonte: Hotez *et al.*, 2005.

1.1.2 Ciclo biológico

A infecção no hospedeiro humano ocorre quando larvas de terceiro estágio, L3 (filaríóide ou infectante), penetram ativamente através da pele, conjuntiva ou mucosa, ou quando são ingeridas passivamente, no caso de *A. duodenale* (Brooker *et al.*, 2004). Ao contrário das larvas de primeiro e segundo estágio, a L3 não se alimenta e sua sobrevivência depende dos nutrientes estocados em seus tecidos. Dentro de poucas horas as larvas atingem o tecido subcutâneo, invadem os capilares linfáticos e são carregadas para a região dos nódulos linfáticos a partir dos quais alcançam a circulação geral; em seguida são carregadas pela circulação aferente ao átrio e ventrículo direitos atingindo assim a circulação pulmonar. O processo de migração da larva, desde a penetração na pele até sua chegada nos pulmões dura aproximadamente 10 dias.

Nos pulmões, a L3 sofre muda para larva de quarto estágio, penetra nos alvéolos e alcança o parênquima adjacente, causando pneumonite (Síndrome de Löffler) com aparecimento de intenso infiltrado eosinofílico. Geralmente, o quadro de infecção pulmonar não é grave, mas pode perdurar por até um mês a partir do qual as larvas chegarão ao trato respiratório por penetração progressiva nos bronquíolos e brônquios e finalmente na traquéia, auxiliadas pelos movimentos ciliares (Hotez *et al.*, 2005). A migração das larvas pela traquéia induz o reflexo da tosse no hospedeiro fazendo com que, eventualmente, algumas delas sejam deglutidas atingindo assim o trato gastrointestinal.

As larvas de quarto estágio (L4) adquirem uma cápsula bucal provisória que permite a fixação na parede do intestino. Após duas a sete semanas, variando de acordo com a espécie, os vermes alcançam o estágio adulto, diferenciando-se em machos e fêmeas, que

ao atingir maturidade sexual, iniciam a postura de ovos. Esses ovos geralmente passam por quatro a seis estágios celulares até chegarem às fezes do hospedeiro.

Uma vez no ambiente e em condições adequadas de temperatura (20 - 30°C) e umidade, em aproximadamente 24 horas a larva de primeiro estágio (L1) eclode do ovo embrionado. Decorridos aproximadamente dois dias, a larva de primeiro estágio sofre muda e se transforma em larva de segundo estágio (L2) de morfologia similar a larva de primeiro estágio. A larva de segundo estágio se torna letárgica e o desenvolvimento se procede para o terceiro estágio evolutivo, o estágio infectante (L3), que pode sobreviver por dias ou até semanas no solo dependendo das condições do ambiente (Brooker *et al.*, 2004).

O período pré-patente, isto é, desde o momento da penetração das larvas de terceiro estágio até o a eliminação de ovos nas fezes varia entre 35 e 60 dias para *A. duodenale*, de 42 a 60 dias para *N. americanus*, e de 21 a 35 dias para *A. ceylanicum*.

1.1.3 Fisiopatologia

A morbidade da ancilostomíase é resultado da perda de sangue no trato gastrointestinal do hospedeiro, resultante da espoliação sanguínea por larvas de quarto estágio e por vermes adultos (Muller *et al.*, 2000; Hotez *et al.*, 2004a) associado a hemorragia causada pela ruptura de capilares e arteríolas intestinais no local da fixação do parasito que secretam fatores anticoagulantes (Brooker *et al.*, 2004, Hotez *et al.*, 2005b). Em longo prazo, as infecções com cargas parasitárias moderadas e severas, levam a anemia por deficiência de ferro e perda proteica. A anemia ferropriva é detectada em quase todos esses casos e pode haver hipoalbuminemia em pacientes que a perda de sangue intestinal supere a ingestão diária de proteínas e esgotem as reservas proteicas previamente formadas (Roche e Layrisse, 1966; Fleming, 1982; Cooper *et al.*, 1992; Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et*

al., 2005b). Muitas vezes, esse quadro clínico provoca danos no funcionamento neurológico e cognitivo, retardo no crescimento físico e déficits intelectuais (Sakti *et al.*, 1999; Jardim Botelho *et al.*, 2008) que podem resultar em maior número de ausências escolares e conseqüentemente, prejuízos na produtividade econômica futura (Brown, 2005). Em adultos, ocasiona redução da capacidade de trabalho além de complicações materno-fetais como redução na produção de leite e neonatos de baixo peso (Sakti *et al.*, 1999; Jardim Botelho *et al.*, 2008).

1.2 Aspectos da resposta imune na infecção por ancilostomídeos

A resposta imune na infecção por ancilostomídeos inicia-se após a penetração das larvas infectantes (L3) através da pele do hospedeiro que liberam uma grande variedade de moléculas imunorreativas responsáveis por auxiliar no processo de invasão tecidual (Loukas e Prociv, 2001). No caso de espécies antropofílicas, esse processo geralmente é assintomático, entretanto, em infecções por espécies zoonóticas (*A. braziliense* e *A. caninum*) provocam quadros clássicos de coceira e erupção cutânea (Pritchard *et al.*, 1991).

Após as larvas de ancilostomídeos atingirem a corrente sanguínea inicia-se uma nova fase de interação com o sistema imune. Essa fase é caracterizada por elevada produção dos cinco isotipos de imunoglobulinas (Ig) humanas e intenso infiltrado eosinofílico periférico e tecidual, principalmente nos pulmões devido à migração das larvas e a liberação de enzimas que facilitam a penetração nos alvéolos (Prociv, 1997). Infecções experimentais em humanos mostraram que a resposta eosinofílica periférica coincide com a chegada de vermes adultos no intestino do hospedeiro, fato provavelmente relacionado à fixação de larvas de quarto estágio na mucosa duodenal e início da espoliação sanguínea

com consequente aumento da exposição antigênica (Maxwell *et al.*, 1987; Nawalinski e Schad, 1974).

A resposta imune contra os vermes adultos, como na maioria das infecções helmínticas é caracterizada pela produção de IgG1, IgG4 e IgE que é controlada pelas citocinas da resposta Th2, principalmente IL-4 (Maizels *et al.*, 2004). Nessa fase, a ausência de IgA pode estar relacionado à clivagem específica dessas moléculas por proteases secretadas pelos vermes adultos (Pritchard *et al.*, 1995). As imunoglobulinas, IgG4 e IgE são as mais prevalentes na infecção e já foi demonstrado estarem associadas com a cronicidade da doença (Palmer e Bundy, 1995). Nesse sentido, alguns estudos relacionam níveis de imunoglobulinas com o estatus da infecção, uma vez que se observa redução nos níveis dos mesmos após tratamento quimioterápico (Palmer *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2004).

A infecção por ancilostomídeos resulta em uma resposta imune celular mista Th1/Th2, com produção significativa de citocinas típicas tanto da resposta Th1 (IFN- γ e IL-12) quanto da resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Pit *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 2004; Quinnell *et al.*, 2004). Estudo recente mostrou uma robusta resposta Th2 produzida em resposta a antígenos de *N. americanus* e uma presença sistêmica da resposta Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ . Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que células de mucosa duodenal, obtidas por biópsia, após serem re-estimuladas com antígenos do parasito, não produzem IFN- γ , sugerindo que a resposta Th1 desenvolvida após a infecção não é antígeno-específica e sim associada a uma fonte inata (Gaze *et al.*, 2012).

Existem evidências de que a resposta imune protetora contra ancilostomídeos, assim como descrito para outras helmintoses (Anthony *et al.*, 2007) é mediada por componentes da resposta inata e adaptativa frente a uma ativação por citocinas Th2. Assim, a ativação e

expansão de linfócitos T CD4⁺ Th2, altos níveis plasmáticos de IgE (policlonal e parasito-específico), eosinofilia, aumento no número de mastócitos e basófilos e modulação da secreção de citocinas Th1 resultam em uma infecção crônica com sobrevivência do parasito por períodos prolongados no intestino do hospedeiro (5 a 7 anos) (Pritchard *et al.*, 1995; Loukas e Prociv, 2001; Fujiwara *et al.*, 2006a; Anthony *et al.*, 2007).

Apesar da produção de anticorpos e eosinofilia apresentarem uma correlação negativa com carga parasitária e fecundidade do parasito (Pritchard *et al.*, 1995; Pritchard e Walsh, 1995; Quinnell *et al.*, 1995), ainda não é claro se esses eventos possuem um papel na proteção do hospedeiro ou se sinalizam meramente uma mudança para um perfil de resposta Th2 (Fujiwara *et al.*, 2006a).

1.2.1 Modulação da resposta imune na ancilostomíase humana

O desenvolvimento de uma resposta Th2 na ancilostomíase coincide com a patência da infecção e é também concomitante com a modulação de uma resposta Th1 (Mendez *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2006a; Geiger *et al.*, 2007). Paradoxalmente, o parasito consegue sobreviver em seu hospedeiro mesmo em face de uma resposta imune robusta. O fato de a infecção persistir na presença de uma reação vigorosa do sistema imune do hospedeiro, a qual por sua vez não previne futuras reinfecções (Loukas *et al.*, 2005b), é um forte indicativo da evasão da resposta imune pelo parasito. Assim, tem sido proposto que os ancilostomídeos possam criar um sítio de “privilégio imune” em seus arredores. Esta estratégia utilizada pelo parasito permitiria o desenvolvimento de uma resposta imune sistêmica contra o parasito, mas inibiria qualquer função da resposta imune localizada, como por exemplo, de células reativas que migrariam para os locais onde o parasito se aloca (Pritchard e Brown, 2001).

Apesar da evasão da resposta imune ser extensivamente relatada na literatura (Brooker *et al.*, 2004; Geiger *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004a; Hotez *et al.*, 2005b; Loukas *et al.*, 2005b; Mendez *et al.*, 2005; Bethony *et al.*, 2006a; Fujiwara *et al.*, 2006a; Loukas *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2007), os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados. As primeiras evidências que demonstraram a evasão da resposta imune pelo parasito vieram da observação de que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam uma redução da resposta proliferativa de linfócitos frente a antígenos do parasito ou mitógenos (Taylor e Turton, 1976; Maxwell *et al.*, 1987; Olatunde e Onyemelukwe, 1994; Loukas e Prociv, 2001; Maizels *et al.*, 2004; Loukas *et al.*, 2005b; Geiger *et al.*, 2007), e mesmo para antígenos exógenos (Olatunde e Onyemelukwe, 1994; Kalinkovich *et al.*, 1998; Onyemelukwe e Musa, 2001) conforme a intensidade da infecção (Bethony *et al.*, 2006b). A completa restauração da capacidade proliferativa de linfócitos seria observada somente se os pacientes permanecessem livres de infecção por um longo período (Kalinkovich *et al.*, 1998).

Posteriormente, foi demonstrado que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam elevados níveis basais de IL-10, (Geiger *et al.*, 2004; Bethony *et al.*, 2006a), redução da frequência de células T CD4⁺, uma maior frequência de células T com perfil regulador (Ricci *et al.*, 2011), indução de apoptose em linfócitos T (Chow *et al.*, 2000, Gazzinelli-Guimarães *et al.*, 2013), redução da maturação e diferenciação *in vitro* de células dendríticas (Fujiwara *et al.*, 2009), sugerindo a redução de sua capacidade de apresentação antigênica e consequente contribuição na redução da capacidade proliferativa de linfócitos. Outros mecanismos possíveis de evasão da resposta imune descritos na literatura incluem ainda: a produção de metaloproteases pelo parasito, as quais clivam eotaxina e, portanto, poderiam prevenir o recrutamento e a ativação de eosinófilos no sítio

de infecção (Culley *et al.*, 2000), ou de proteínas secretadas que se ligam seletivamente à células *Natural Killer*, induzindo a secreção de IFN- γ , o que poderia redirecionar ou mesmo subverter o perfil local de citocinas (Hsieh *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que os ancilostomídeos excretam e secretam diversos produtos com potencial efeito imunomodulatório. Estudos têm demonstrado que o desafio somente com os produtos de excreção/secreção (Es) induz a uma resposta imune similar a observada durante a infecção por nematódeos em modelos experimentais, a qual é caracterizada pela regulação negativa da proliferação celular (revisado por Loukas *et al.*, 2005). Esses produtos possuem em sua composição diferentes tipos de proteínas, incluindo proteases, inibidores de proteases, lectinas do tipo C, além de proteínas anti-oxidantes e anti-inflamatórias, que poderiam estar associadas com a diminuição da resposta imunológica durante a fase crônica da infecção. (Lokas e Prociv, 2001; Loukas *et al.*, 2005). Esses dados em conjunto ajudam a explicar os mecanismos de evasão promovidos pelo sistema imune e sobrevivência prolongada do parasito no hospedeiro.

Finalmente, a modulação da resposta imune do hospedeiro pelo parasito poderia também ser mediada por outros mecanismos recentemente demonstrados para outras infecções helmínticas, como, por exemplo, a ação de células Th17 (Ricci *et al.*, 2012; Bettelli *et al.*, 2007; Diaz e Allen, 2007; Korn *et al.*, 2007; Reece *et al.*, 2008), pela regulação por histamina (Jutel *et al.*, 2005; 2006a; 2006b) pela regulação de receptores do tipo *Toll* (Babu *et al.*, 2005; 2006; van Riet *et al.*, 2007; Semnani *et al.*, 2008) ou ainda de macrófagos ativados alternativamente (Kreider *et al.*, 2007; Reece *et al.*, 2008). Devido à escassez de trabalhos voltados para o estudo da resposta celular na infecção por

ancilostomídeos, nenhuma dessas vias foram ainda demonstradas para a ancilostomíase humana.

Nesse contexto, uma hipótese que poderia auxiliar na elucidação dos mecanismos imunomodulatórios observados na infecção é a de que pacientes infectados por ancilostomídeos possuem um perfil de ativação de monócitos que favorece o desenvolvimento de um fenótipo regulador. Essa hipótese fundamenta-se em estudos prévios acerca da ancilostomíase humana que evidenciam a presença de fatores tais como (a) aumento de células T reguladoras (Ricci *et al.*, 2011), (b) indução de apoptose em células T (Gazzinelli-Guimarães *et al.*, 2013), (c) elevados níveis basais de IL-10 (Geiger *et al.*, 2004; Bethony *et al.*, 2006a) e (d) elevada produção de imunoglobulinas (Kumar *et al.*, 1980; Pritchard *et al.*, 1992) e consequentemente de imunocomplexos, fatores que estão diretamente relacionados a polarização para um fenótipo regulador de monócitos.

1.3 Ativação de monócitos e macrófagos

Monócitos são células derivadas de progenitores mielóides da medula óssea que fazem parte do sistema imune inato. Ao migrarem para dentro dos tecidos, essas células, passam por alterações em sua fisiologia e passam a ser denominadas macrófagos. Monócitos e macrófagos possuem papéis bem estabelecidos na resposta primária a patógenos, manutenção da homeostase tecidual e desenvolvimento da resposta imune adaptativa, inflamação, reparo de lesões entre outras funções (Gordon e Taylor, 2005). A diversidade de funções exercidas por essas células está relacionada à sua enorme plasticidade e habilidade de se adaptar a uma vasta gama de sinais do microambiente (Biswas e Mantovani, 2012). Quando em estado latente monócitos e macrófagos caracterizam-se por baixa síntese proteica, baixa produção de citocinas e baixa taxa de consumo de oxigênio

(Grage-Griebenow *et al.*, 2001; Hume *et al.*, 2002), entretanto, uma vez iniciado processos de inflamação por danos teciduais ou infecções, passam por um processo de ativação que promovem aumento na produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. No contexto de uma resposta imune específica, o ambiente de citocinas faz com que monócitos e macrófagos passem a induzir programas de ativação especializados (Martinez *et al.*, 2006) que são mais focados e prolongados do que os estímulos inatos e dão origem a alterações de longo prazo na fisiologia dessas células (Gordon, 2007).

Baseados na nomenclatura Th1/Th2, muitos autores se referem aos macrófagos polarizados como células M1 e M2 (Goerd e Orfanos, 1999; Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004, 2005) associados aos fenótipo de ativação clássica e alternativo. Atualmente sabe-se que os macrófagos anteriormente classificados como M2 incluem outros tipos celulares que possuem diferenças dramáticas em sua bioquímica e fisiologia. Assim, novas classificações foram propostas por diversos autores com intuito de diferenciar as subpopulações de macrófagos ativadas por via “não clássica”. Nesse estudo, optamos por utilizar a classificação proposta por Mosser e Edwards (2008), que se baseia nas funções básicas dessas células que são: macrófagos ativados classicamente (defesa do hospedeiro), macrófagos ativados alternativamente (reparo tecidual) e macrófagos reguladores (imunorregulação). No modelo ilustrativo proposto pelo mesmo grupo (Fleming e Mosser, 2011), as três principais populações de macrófagos estão representadas por cores primárias e fazem parte de um espectro de cores para mostrar como essas células podem se desenvolver para exibir características que são compartilhadas por mais de uma população (Fig.2).

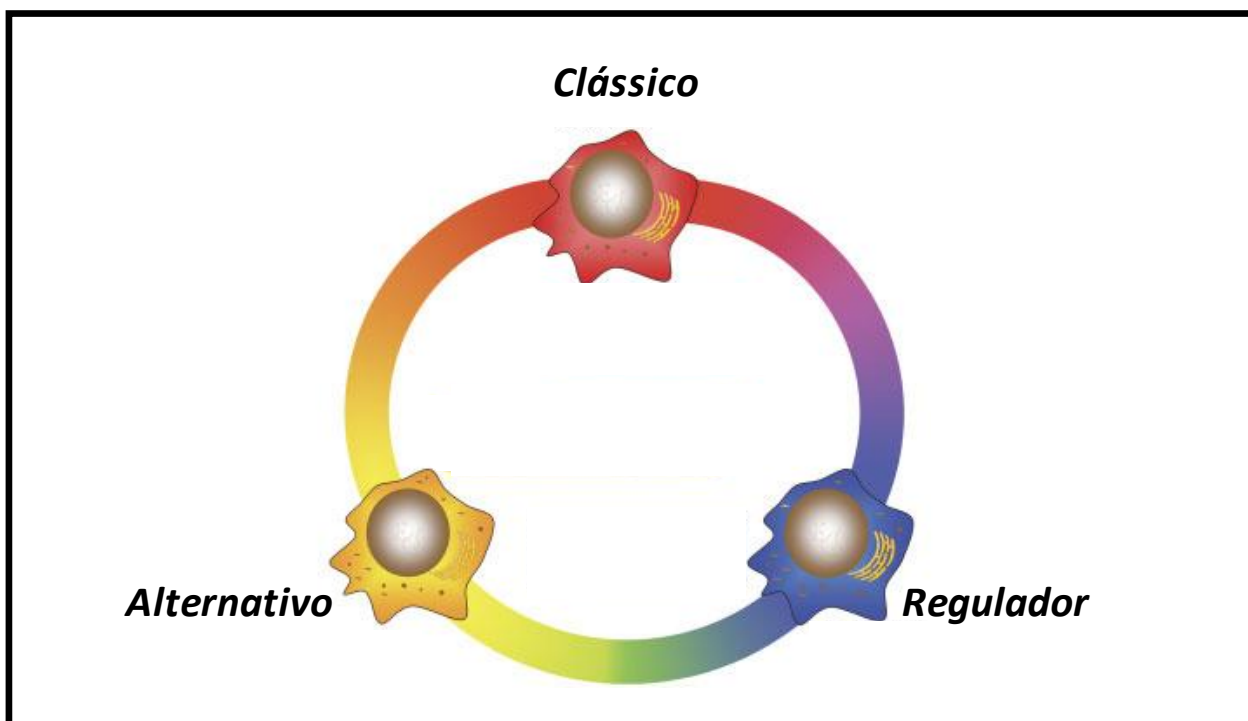


Fig.2. Os três principais subtipos de população de macrófagos. Adaptado de Fleming e Mosser (2011).

Perfil de ativação clássico/ Defesa do hospedeiro

O termo “macrófago classicamente ativado” é usado para designar macrófagos efetores que são produzidos durante respostas imunes mediadas por células. Nessa via de ativação, uma combinação dos sinais interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) resultam em uma população de macrófagos que possuem elevada capacidade microbicida e tumoricida devido à sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, ânions superóxidos e radicais de oxigênio e nitrogênio, fundamentais na eliminação de patógenos intracelulares (Mackness, 1977; Nathan e Shiloh, 2000; O`Shea e Murray, 2008). A produção de IFN- γ pode vir de fontes inatas, de células *Natural Killer* (NK) ou da resposta imune adaptativa Th1. Além disso, alguns agonistas de *Toll Like Receptors* (TLR) podem estimular a produção de IFN- γ e TNF. A produção endógena de IFN- γ pode substituir o

papel das células NK e Th1 na manutenção da ativação clássica de macrófagos (Mosser e Edwards, 2008).

As citocinas produzidas pela ativação clássica de macrófagos (IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23) são importantes componentes da defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, entretanto, podem causar danos teciduais extensivos uma vez que essas citocinas estão associadas à expansão de células Th17, que promovem o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o sítio de inflamação (Kolls e Linden, 2004). Também são observados elevados níveis das quimiocinas CCL15, CCL20, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2008).

Os macrófagos classicamente ativados expressam, em sua superfície, grandes quantidades do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e das moléculas coestimuladoras B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86 respectivamente), sendo assim considerados células com elevada capacidade de apresentação antigênica. Também é observado na superfície desses macrófagos uma elevada expressão de receptores de Interleucina 1 (IL-1R), receptores do tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e TLR4) e receptores opsônicos como por exemplo FcγRI, II e III (CD64, CD32 e CD16 respectivamente) (Mantovani *et al.*, 2004). Nessa via de ativação, a arginina é metabolizada pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que se encontra expressa em altas concentrações (MacMicking *et al.*, 1997).

Perfil de ativação alternativa de macrófagos (Reparo tecidual)

Os macrófagos ativados alternativamente se desenvolvem em resposta aos estímulos das Interleucinas 4 e 13 (IL-4, IL-13) provenientes de fontes inatas ou adaptativas. Com relação às fontes inatas, mastócitos, basófilos e eosinófilos podem produzir IL-4 em resposta ao dano tecidual (Loke *et al.*, 2007) ou em resposta à quitina, biopolímero estrutural presente em alguns fungos e parasitos (Kreider *et al.*, 2007). As fontes adaptativas associadas à resposta Th2 auxiliam no desenvolvimento/manutenção desses macrófagos, e são primariamente induzidas por alterações em superfície de mucosas, principalmente do intestino e pulmões, especialmente em resposta a infecções helmínticas. A IL-4 é capaz de desencadear rapidamente a conversão de fenótipo de macrófagos para uma população de células que são programadas para promover cicatrização tecidual pela indução da atividade da arginase. A arginase converte a arginina em ornitina, aminoácido precursor de poliaminas e colágeno, contribuindo assim para a síntese de matriz extracelular (Ji e Chowla, 2011). Além disso, esses macrófagos secretam outros fatores como VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial), CSF1 (Fator 1 de crescimento de colônia), IL-8 (Interleucina 8) e MMP9 (Matrix metalo peptidase 9) que promovem funções necessárias para o reparo tecidual e remodelamento (Ji e Chawla, 2011). A fibrose tecidual que ocorre durante a fase crônica da esquistossomose tem sido atribuída a uma ativação incontrolada de macrófagos de reparo tecidual (Hesse *et al.*, 2001). Esses macrófagos podem ter efeitos regulatórios indiretos na resposta imune, pois, as poliaminas que são produzidas por essas células podem influenciar na produção de citocinas e suprimir a expansão clonal de linfócitos vizinhos (Wilson *et al.*, 2007).

Em modelos murinos, os macrófagos ativados alternativamente produzem grandes quantidades de quitinases e moléculas *quitinases-like* incluindo YM1/2 (proteína

eosinofílica), Fizz/RELM α (proteína encontrada na zona inflamatória) que possuem papéis na degradação da quitina presente na superfície de alguns parasitos e fungos (Chang *et al.*, 2001; Raes *et al.*, 2002).

O perfil de ativação alternativa induz a produção de Interleucina 1β (IL- 1β), citocina que está associada ao aumento da síntese de colágeno (Goldring e Krane, 1988) e a produção das quimiocinas CCL17 (Wirnsberguer *et al.*, 2006), CCL18 (Kodelja *et al.*, 1998) e CCL22 (Mantovani *et al.*, 2002). Com relação aos marcadores encontrados na superfície desses macrófagos estão o receptor de manose (CD206), receptor de IL-4 (IL-4R), *scavenger receptor* (CD163), DC-SIGN, molécula de adesão a carboidratos manosilados e receptor de Interleucina 27 (IL-27R α) (Martinez *et al.*, 2008). Outros marcadores para essa população de macrófagos tais como IDF1 (fator 1 de crescimento de insulina 1 *like*) (Wynes e Riches, 2003), DCIR (Imunoreceptor de células dendríticas) (Martinez *et al.*, 2006), estabilina 1 (Goerdts e Orfanos, 1999) e Fator de coagulação VIIIa (Torocsik *et al.*, 2005) também já foram descritos.

Perfil regulador (Imunorregulação)

Como descrito para os macrófagos inflamatórios e macrófagos de reparo tecidual, os macrófagos reguladores podem surgir em decorrência a estímulos inatos ou adaptativos. Essa população pode ser gerada *in vitro* após a estimulação com agonistas de TLR na presença de imunocomplexos (Gerber e Mosser, 2001). A combinação desses estímulos leva ao desenvolvimento de uma população de macrófagos que produzem elevados níveis da citocina imunossupressora IL-10. Outros fatores, como glicocorticóides (Sternberg, 2006), também podem levar a esse tipo de polarização. Embora respostas ao estresse não sejam tipicamente consideradas como parte da resposta imune inata, células da glândula

adrenal, ao secretar glicocorticóides, podem inibir macrófagos com funções inflamatórias (defesa ao hospedeiro) pela inibição transcricional de genes de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo assim a estabilidade do mRNA dando origem a macrófagos reguladores. Além desses fatores, diversos outros como: prostaglandinas (Strassmann *et al.*, 1994), células apoptóticas (Erwig e Henson, 2007), IL-10 (Martinez *et al.*, 2008), ligantes da proteína acopladora G (GPCRs), adenosina (Hasko *et al.*, 2007) podem dar origem a esse tipo de macrófago. Fadok *et al.*, (2008) mostraram que a produção de TGF- β por macrófagos, seguida de fagocitose de células apoptóticas na presença de um estímulo pró-inflamatório, também podem contribuir para a função imunorregulatória desses macrófagos. Vale ressaltar que alguns estímulos sozinhos como de prostaglandinas, imunocomplexos e células apoptóticas não são capazes por si só de induzir o fenótipo regulador; entretanto, quando combinados a um segundo estímulo, ligantes TLR, induzem a produção de IL-10 nesses macrófagos (Edwards *et al.*, 2006). Macrófagos reguladores também podem surgir em estágios tardios da resposta imune inata para reduzir a esta resposta e assim limitar a inflamação (Mosser, 2003).

Além da alta produção de IL-10, o fenótipo regulador possui como característica a baixa produção de IL-12. Altos níveis de IL-10 são capazes de inibir a produção e atividade de várias citocinas pró-inflamatórias apesar do fato de que essas células mantêm a capacidade de produzir citocinas inflamatórias (Mosser e Edwards, 2008). Com relação a produção de quimiocinas, já foi mostrado que essa população de macrófagos é capaz de produzir altos níveis de CCL1 através do estímulo de TLR presentes na superfície dessas células em combinação com outros estímulos (Sironi *et al.*, 2006). Similarmente aos macrófagos ativados por via clássica, os macrófagos reguladores também podem

metabolizar a argina através da óxido nítrico sintase e possuem boa capacidade de apresentação antigênica (Edwards *et al.*, 2006). Também já foram estudados como possíveis marcadores dessa população a alta expressão de SPHK1 (esfingonosina quinase 1) e LIGHT (membro da superfamília TNF) (Edwards *et al.*, 2006).

1.3.1 Ativação de macrófagos em infecções parasitárias

Com relação à polarização de macrófagos em infecções parasitárias, atualmente existem uma grande variedade de estudos que mostram uma associação clara entre o perfil de ativação clássico, resposta Th1 e infecções por parasitos intracelulares e por outro lado, estudos que mostram associação entre o perfil de ativação alternativo, resposta Th2 e infecções parasitárias por parasitos extracelulares (Gordon, 2003). Entretanto, com as novas descobertas acerca das diferenças na bioquímica e fisiologia entre as subpopulações de macrófagos “não clássicos” (Edwards *et al.*, 2006) associada à identificação de marcadores para as mesmas, torna-se possível fazer estudos mais focados na função dessas células e da sua participação nos processos patológicos.

Embora a via clássica de ativação de macrófagos seja amplamente descrita para infecções com tripanossomatídeos, estudos já mostraram que estágios intracelulares de alguns parasitos, como por exemplo, amastigotas de *Leishmania spp*, que se ligam às IgGs do hospedeiro promovendo a formação de imunocomplexos que interagem com receptores Fc de macrófagos (FcγR) induzindo o desenvolvimento de macrófagos reguladores (Miles *et al.*, 2005). Outro estudo demonstrou que o *T. brucei*, protozoário extracelular, ao alterar antígenos imunodominantes da família das VSGs (Glicoproteína de superfície variante) para evadir a resposta imune humoral, promove a geração de uma robusta resposta de anticorpos e, conseqüentemente, na formação de imunocomplexos que por sua vez

desencadeia a indução do fenótipo regulador nos macrófagos (de Baetselier *et al.*, 2001). Interessantemente, esses macrófagos também podem produzir óxido nítrico (NO) para tentar conter a infecção (Edwards *et al.*, 2006).

Estudos já demonstraram a indução da formação de macrófagos “não clássicos” (alternativamente ativados) na infecção por helmintos, onde se observa uma resposta imune polarizada Th2. Dentre entre esses estudos, foram demonstrados a formação desses macrófagos na infecção por *Schistosoma mansoni* (Herbert *et al.*, 2004), *Heligomosomoides polygerus* (Anthony *et al.*, 2006), *Nippostrongylus brasiliensis* (Reece *et al.*, 2006), *Taenia crassiceps* (Rodriguez-Sosa *et al.*, 2002), *Trichinella spirallis* (Dzik *et al.*, 2004), *Fasciola hepática* (Donnelly *et al.*, 2005), *Ascaris suum* (Oshiro *et al.*, 2005) e, finalmente, por parasitos filarióides (Nair, Cochrane e Allen, 2003). Alguns desses estudos apontam para o fato de que produtos do parasito também podem estimular a ativação de macrófagos embora uma ativação eficiente só ocorra no ambiente de citocinas do tipo Th2.

2. Justificativa

A ancilostomíase é uma das doenças parasitárias crônicas mais prevalentes no mundo, com estimativa variando entre 576 a 740 milhões de indivíduos infectados. É considerada um grande problema de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento com maior número de casos atingindo as populações rurais e de baixa renda (Silva *et al.*, 2003).

Os ancilostomídeos são parasitos que sobrevivem em seus hospedeiros por vários anos (Loukas e Prociv, 2001) mesmo na presença de uma resposta imune robusta, o que representa um forte indicativo da presença de mecanismos de evasão imunológica (Loukas *et al.*, 2009). A modulação da resposta imune do hospedeiro pelo parasito permite a continuidade de seu desenvolvimento, alimentação e reprodução (Maizels *et al.*, 2004). Além de garantir sua sobrevivência, a modulação da resposta imunológica poderia ter importante implicação em processos vacinais contra a ancilostomíase ou mesmo contra outras infecções.

Considerando os mecanismos de imunomodulação já descritos para a ancilostomíase humana, juntamente com os dados da literatura que indicam que infecções helmínticas propiciam o desenvolvimento de monócitos e macrófagos com o perfil de ativação alternativo/ “não classico”, torna-se relevante o estudo mais detalhado do papel dessas células na infecção por ancilostomídeos. Dessa forma, a determinação do perfil de ativação de monócitos poderá fornecer dados sobre uma possível contribuição dessas células nos mecanismos de modulação da resposta imune do hospedeiro e ampliar a compreensão da biologia da infecção.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de ativação de monócitos na infecção humana por ancilostomídeos.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1- Caracterizar o perfil de monócitos do sangue periférico em indivíduos naturalmente infectados por ancilostomídeos;

3.2.2- Avaliar níveis de expressão das citocinas IL-10 e IL-12 em monócitos de indivíduos naturalmente infectados por ancilostomídeos;

3.2.3- Avaliar a expressão de IL-4 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em indivíduos infectados por ancilostomídeos;

3.2.4- Caracterizar o perfil fenotípico de monócitos de indivíduos infectados por ancilostomídeos;

3.2.5- Avaliar a expressão de arginase-1 e óxido nítrico sintase induzível em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados por ancilostomídeos;

3.2.6- Caracterizar *in vitro* o perfil fenotípico de monócitos cultivados na presença de antígenos excretados/secretados (Es) e de antígeno bruto (Br) derivados de ancilostomídeos.

4. População, Materiais e Métodos

4.1 Delineamento experimental

O presente estudo é um estudo transversal que se iniciou em Janeiro do ano de 2010 no distrito de Virgem das Graças, pertencente ao município de Ponto dos Volantes, região do Vale do Jequitonha, como parte de projetos de pesquisa envolvendo estudos imuno epidemiológicos de algumas helmintoses humanas dentre elas a ancilostomíase (**Fig.3**).

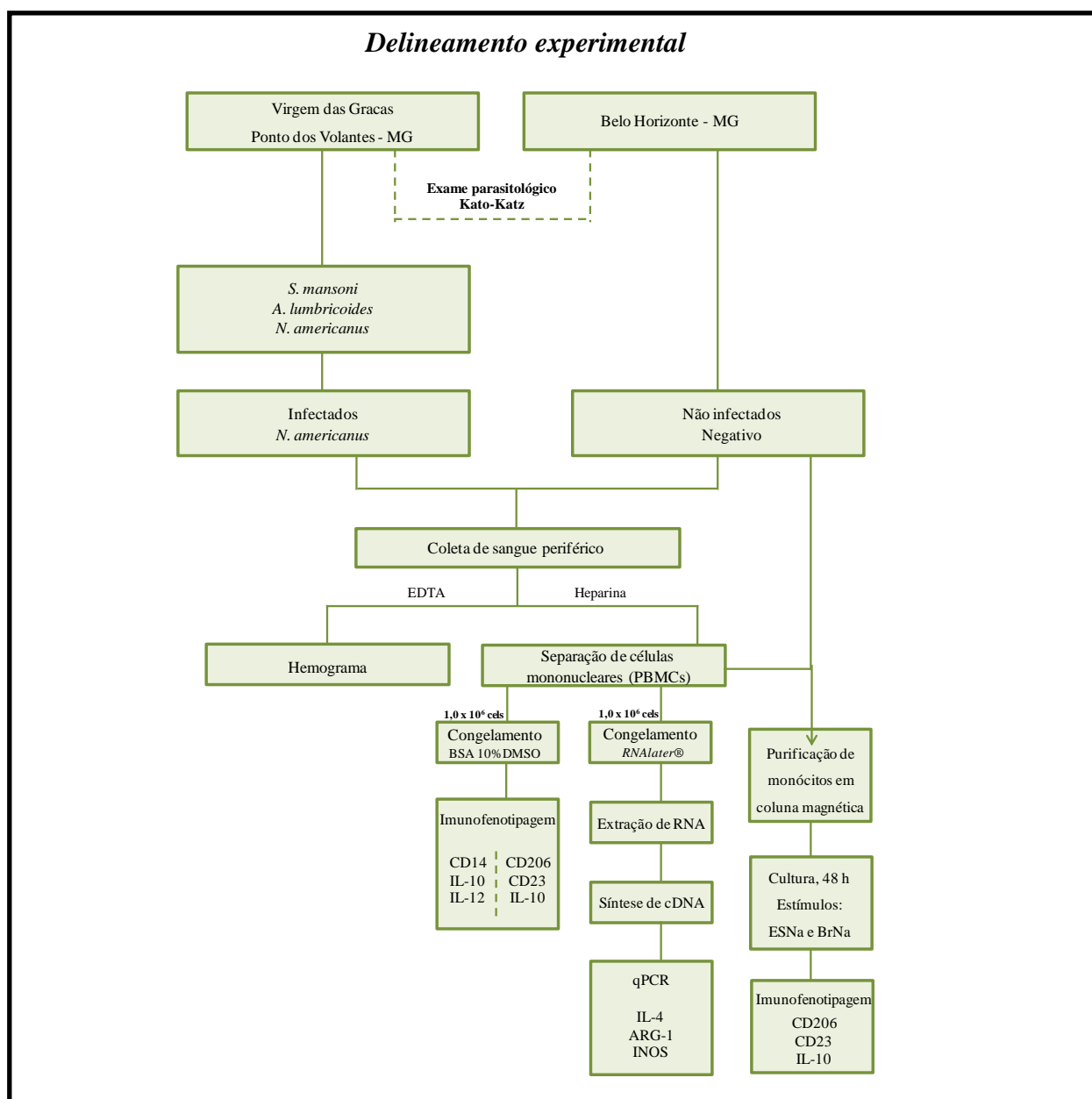


Fig.3. Esquema geral da metodologia utilizada no estudo

4.2 Caracterização da população estudada

Para realização deste trabalho foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos infectados por ancilostomídeos residentes em áreas endêmicas para *N. americanus*. Para constatar a presença ou não de ovos de ancilostomídeos nas fezes desses indivíduos, foi realizado o exame parasitológico de fezes, método Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) e para avaliação do perfil hematológico dos indivíduos com exame parasitológico positivo, foi realizado hemograma completo.

O grupo de pacientes que apresentou exame parasitológico de fezes positivo apenas para ovos de ancilostomídeos (grupo infectado – INF), foi composto por 19 indivíduos (8 mulheres e 11 homens), com idade variando entre 21 e 78 anos e contagem de ovos por grama de fezes variando entre 12 a 840 ovos (**Tab.1**). Neste estudo, adotou-se a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para avaliação de baixas, moderadas e altas cargas parasitárias. Sendo assim, todos os indivíduos deste grupo foram classificados como baixa carga parasitária segundo a OMS.

Os pacientes até o momento da coleta das amostras residiam no distrito de Virgem das Graças, município pertencente a Ponto dos Volantes, área rural. A população dessa região vem sendo avaliada em estudos transversais como parte dos projetos de pesquisa realizados no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas (LIGP/ICB) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)- Belo Horizonte. Os trabalhos de área endêmica foram coordenados pelo Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou – CpqRR) e Dr^a Andréa Gazzinelli (Escola de Enfermagem – UFMG).

Foram utilizadas também amostras de sangue periférico de voluntários com exame parasitológico de fezes negativo para ancilostomídeos e outros helmintos (grupo não

infectado-NI), residentes em área não endêmica (Belo Horizonte) para *N. americanus*, composto por 13 indivíduos (5 mulheres e 8 homens), com idade variando de 23 a 65 anos. Esses indivíduos também passaram por exame hematológico (**Tab.1**).

É importante ressaltar que o exame parasitológico foi realizado anteriormente à coleta sanguínea e que esses pacientes não receberam qualquer medicação imunossupressora nesse período. Após a realização da coleta, todos os pacientes foram submetidos ao tratamento, independente da participação nesse estudo.

Tabela 1- Caracterização da população avaliada

Grupos	Sigla	Variação Idade	Variação Ovos/grama de fezes	Número de indivíduos		
				Masculino	Feminino	Total
Negativos para ovos de helmintos nas fezes	NI	23- 65	0-0	8	5	13
Positivos para ovos de <i>N. americanus</i> nas fezes	INF	21- 78	12-840	11	8	19

4.3 Exame parasitológico de fezes

Recipientes plásticos foram distribuídos aos pacientes para que fossem coletadas duas amostras de fezes de cada indivíduo em dias consecutivos. A presença e o número de ovos do parasito por grama de fezes foram determinados através do exame de 5 lâminas de cada amostra de fezes, utilizando o método parasitológico de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972). A contagem do número de ovos total por grama de fezes de cada paciente foi apresentada

pelo resultado da média aritmética da leitura das cinco determinações e definidas como ovos por grama de fezes (opg).

4.4 Coleta de sangue periférico

Amostras de 5mL de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer – BD, EUA) e encaminhadas ao laboratório terceirizado (Laboratório Paula Castro – Medicina Laboratorial/Belo Horizonte-MG). As determinações foram feitas em contador hematológico eletrônico de células Coulter MD18, EUA. Os parâmetros avaliados foram global de leucócitos e diferencial de células com determinação do percentual e do número absolutos de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos.

Para as demais avaliações propostas para este estudo, foram coletados 30mL de sangue contendo heparina sódica (Vacutainer - BD, EUA). As coletas do sangue periférico da população avaliada foram realizadas nas áreas endêmicas e coordenadas pela Dr^a Andréa Gazzinelli (UFMG).

4.5 Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), aproximadamente 30mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo heparina sódica (Vacutainer - BD, EUA) e aplicados lentamente em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL (Falcon, BD Biosciences, EUA) contendo 15mL de solução Ficoll-Hypaque (Histopaque®1.077, Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente os tubos foram centrifugados a 400g por 40 minutos a 20°C. Ao término da centrifugação formou-se um anel contendo as PBMCs na interface entre plasma e eritrócitos o qual foi coletado e transferido para outros tubos cônicos contendo meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich,

EUA). Posteriormente foram lavadas por duas vezes por centrifugação (400g, 10 minutos a 4°C). Ao final das duas lavagens, as células foram ressuspensas novamente em 1mL de meio RPMI suplementado com 5% soro humano (Sigma-Aldrich), 1,6% de L-glutamina (Invitrogen) e 3,0% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Cultilab), contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição 1:20, em solução de Azul de Turcks (Sigma-Aldrich, EUA) e ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

4.6 Congelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em RNA later®

Parte das células, aproximadamente $1,0 \times 10^6$, foram congeladas em RNAlater® (Life technologies, EUA) para utilização nos métodos envolvendo biologia molecular. Essa solução tem como objetivo preservar tanto a qualidade como a quantidade dos ácidos nucleicos das células, eliminando assim a necessidade de processar as amostras imediatamente após a sua obtenção. As células foram concentradas para o volume $3,0 \times 10^6$ células/mL e, a cada 300µL de suspensão celular foi adicionado 500µL de RNAlater® e então congeladas a -80°C.

No momento do descongelamento, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente até que todo o conteúdo estivesse líquido e em seguida foram centrifugadas para remoção do RNAlater® para posterior extração de RNA total.

4.7 Congelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em nitrogênio líquido

O restante das células mononucleares do sangue periférico foram criopreservadas até o momento da realização dos ensaios por citometria de fluxo. Para tanto, após serem ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL, as PBMCs foram então

ressuspendidas em criotubos (Imec) contendo 1,5mL de solução de congelamento para cada $1,0 \times 10^6$ células. A solução de congelamento é constituída de 90% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) e 10% de Dimetilsulfóxido – DMSO (Merck). Os criotubos foram deixados *overnight* a -80°C em recipiente próprio de congelamento (Nalgene) contendo álcool isopropílico e então transferidos para nitrogênio líquido.

No momento do descongelamento, os tubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido e levados rapidamente ao banho maria 37°C . Antes do descongelamento completo, as amostras foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 15mL (Falcon, BD Biosciences, EUA) contendo 10mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) e mantido em gelo para então ser iniciado o processo de avaliação fenotípica das PBCMs por citometria de fluxo.

4.8 Imunofenotipagem de células mononucleares do sangue periferico (PBMCs) por citometria de fluxo

Alíquotas de 200 μL da suspensão de PBMCs após serem descongeladas, foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, BD Biosciences, EUA) contendo 2 μL de anticorpos monoclonal anti-receptores de superfície celular marcados com fluorocromos específicos (Isoticianato de fluoresceína - FITC; Ficoeritrina - PE, Ficoeritrina/Cychrome -PECy; Alofocianina - APC) (**Tab.2**)

As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, foram adicionadas às amostras 2mL de solução de lavagem (PBS-W) (Solução salina tamponada com fosfato 0,015M - PBS, albumina sérica

bovina- BSA 1% e azida sódica 0,5%) e submetidas à centrifugação a 400g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas novamente com PBS. Em seguida as células foram permeabilizadas com PBS-P (PBS 0,015M, BSA1%, 0,5% azida sódica, 0,5% saponina) para marcação com anticorpos anti-citocinas intracelulares durante 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C e o sobrenadante foi descartado.

Posteriormente foi adicionado as amostras 2 μ L dos anticorpos anti-citocinas (**Tab.2**) e incubadas por um período de 30 minutos. Decorrido o período de incubação, as amostras foram novamente lavadas com PBS-W e centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C e o sobrenadante descartado. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS 0,015M, centrifugadas (400g por 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e em seguida, as amostras foram fixadas com 300 μ L de solução fixadora - Macs Fax Fix (MFF) (10g/L paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - Sigma-Aldrich, EUA). A análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com auxílio de um citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD, EUA), utilizando-se o programa CELLQuestTM para aquisição e análise dos dados. Para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos de tamanho e granulosidade bem como aspectos imunofenotípicos de 10.000 eventos. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da Becton e Dickinson, EUA.

Tabela 2- Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de PBMCs

Marcador	Clone	Concentração
Anticorpos- marcação de superfície celular		
Anti - CD14 FITC	MP9	0,5µg
Anti - CD14 PE	MP9	0,5µg
Anti - CD23 FITC	M-L233	0,5µg
Anti – CD206 PE- Cy5	19.2	0,5µg
Anticorpos- marcação intracitoplasmática		
Anti - IL-10 APC	JES3-19F1	0,25µg
Anti - IL-12 PE	C11.5.14	0,25µg

4.9 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Após o descongelamento das amostras dos indivíduos infectados (INF) e não infectados (NI) armazenadas em RNAlater® (Life technologies, EUA), foi extraído o RNAtotal das mesmas por meio do Kit de extração de RNA NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel, Alemanha) seguindo-se as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi eluído em 60µL de água ultra pura para PCR (Fermentas) e quantificado em espectrofotômetro de absorvância a 260nm (Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop®, ThermoScientific, EUA). Após a quantificação as amostras de RNA foram imediatamente congeladas a - 80°C em tubos isentos de RNase fornecidos pelo Kit e descongeladas a temperatura ambiente anteriormente a síntese de cDNA.

Para síntese de cDNA, foram utilizados em média 100nmol de RNA de cada amostra, 1,0µL de iniciadores (0,5µg/mL) e o sistema de transcriptase reversa Superscript

II (Invitrogen, USA) em volume final de 20 μ L. A reação foi realizada conforme as instruções do fabricante.

Após a reação, para a confirmação da síntese do cDNA, foi feito para cada amostra uma reação de PCR para o gene constitutivo humano Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) (Integrated DNA Technologies –IDT, EUA), utilizando-se 2,0 μ L de cDNA, 1,0 μ L de cada um dos iniciadores, direto e reverso 2mM, 3,0 μ L de dNTPs 5mM (Fermentas) 5,0 μ L de tampão Gotaq 5X (Promega), 1,25 μ L de Taq polimerase (Invitrogen) e 6,75 μ L de água ultra pura para PCR (Fermentas) totalizando um volume final de 20 μ L. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corado com solução de brometo de etídio (Bio-Rad) a 0,25 μ g/mL, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado no fotodocumentador ImageQuant LAS 4.000 (GE Healthcare, USA). No gel foi aplicado, além das amostras, 20 μ L do padrão de peso molecular (Fermentas) de 500 bp.

É importante ressaltar que durante a síntese de cDNA foi feito um controle negativo (branco), onde a transcriptase reversa foi substituída por água ultra pura para PCR (Fermentas) impossibilitando a síntese de cDNA. Essa estratégia teve como objetivo descartar a presença de contaminação por DNA genômico nos iniciadores ou em qualquer outro reagente da PCR.

4.10 Reação de PCR em Tempo Real

Após comprovada ausência de contaminação dos reagentes da PCR com DNA genômico e eficiente transformação do RNA em cDNA, realizou-se então, a PCR quantitativa (qPCR) para avaliação do nível de expressão dos genes que codificam para as proteínas humanas: óxido nítrico sintase induzível (iNOS), Interleucina 4 (IL-4), Arginase-1 (Arg-1) e Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) nos pacientes infectados

(INF) e não infectados (NI) por ancilostomídeos, sendo o GAPDH o gene normalizador da reação. Os iniciadores para os genes GAPDH, Arg-1 e iNOS foram adquiridos da empresa Integrated DNA Technologies (IDT, EUA) com especificidade e valor de eficiência previamente padronizados pelo fabricante. O iniciador para o gene da IL-4 foi desenhado utilizando a versão demonstrativa do programa AlleleID® e foram padronizados em nosso laboratório anteriormente a execução das reações.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp®, Applied Biosystems, EUA) e, para cada gene alvo, foi preparado um master mix composto por: 25µL do iniciador direto, 25µL do iniciador reverso, 250µL de Sybr®- Green (Applied Biosystems, EUA) e 100µL de água ultra pura para PCR, suficientes para preparação de uma placa completa. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

O equipamento utilizado para execução das reações e fornecimento dos resultados foi o ABI PRISM 7500 Sequence Detection SySTEM (Applied Biosystems, EUA). O nível de expressão de cada gene foi determinado pelo método de Quantidade relativa (Rq). Inicialmente foi feita uma curva padrão relativa para cada gene, utilizando-se cinco pontos obtidos por diluição seriada de uma amostra de cDNA com elevada concentração de genes alvos e constitutivo. Para cada indivíduo a Rq de cada gene pelo valor de CT (cyclethreshold) e a equação da reta obtida para cada um dos genes alvos. Os mesmos foram normalizados utilizando a Rq do controle endógeno (GAPDH) e a expressão foi comparada entre os grupos avaliados.

4.11 Separação magnética de monócitos do sangue periférico por seleção positiva com microesferas magnéticas anti-CD14⁺

Para separação dos monócitos por seleção positiva com microesferas magnéticas, amostras de sangue periférico foram coletadas de 10 indivíduos negativos para ovos de ancilostomídeos e outros helmintos nas fezes (grupo NI). Para tanto foram utilizados 6 tubos de 10mL contendo heparina sódica (Vacutainer – BD, EUA). Em seguida foi utilizada a metodologia de separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) descrita no tópico 4.5 deste capítulo.

Após obtidas as PBMCs, as mesmas foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA) e para que fossem removidos resíduos de hemácias foi realizada a lise com 45 mL de cloreto de amônio (NH₄Cl 155mM, KHCO₃10mM e EDTA 0,1Mm) (Sigma-Aldrich, EUA) pH 7,2. Posteriormente os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida centrifugados a 400g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 20mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich, EUA), sendo logo em seguida submetidas novamente a centrifugação a 400g por 10 minutos a 4°C. A partir desta etapa, todos os tubos contendo as PBMCs foram mantidas em banho de gelo para manutenção da estabilidade e viabilidade das células. O procedimento de lavagem/centrifugação foi repetido mais uma vez e em seguida as células foram ressuspensas em 500µL de solução tampão (Solução salina tamponada com fosfato, 0,5% BSA e 2mM EDTA).

Uma vez em solução tampão (2 - 8°C) as amostras foram e incubadas por 30 minutos com 40µL das esferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Alemanha) em banho de gelo. Após a incubação foi acrescentado 1,0 mL de solução tampão e os tubos

foram centrifugados a 400g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e as amostras ressuspensas em 500µL de solução tampão.

A seleção positiva dos monócitos foi feita em coluna magnética LS (Miltenyi Biotec, Alemanha) que tem capacidade para separar $1,0 \times 10^8$ células marcadas em um total de $1,0 \times 10^9$ células, acoplada ao quadro MACS (Miltenyi Biotec, Alemanha). A coluna foi lavada inicialmente com 60mL de solução tampão e posteriormente as PBMCs transferidas para coluna e o fluxo de passagem das células foi monitorado pelo controlador de fluxo (22G) (BD, Irlanda) que é encaixado em um sistema de três caminhos – “3-way stopcock” (UNO Plast Alemanha). As células que possuem os receptores CD14 (monócitos) e que se ligaram às microesferas ficaram retidas na coluna LS. As células que são negativas para esse receptor (CD14) e, portanto, não se ligaram às microesferas magnéticas passaram pela coluna e foram recolhidas em um tubo cônico de polipropileno com capacidade para 15 mL (Falcon, BD Biosciences, EUA), que foi colocado abaixo do sistema “3-way stopcock”.

Os monócitos recuperados foram contados em câmara de Neubauer e utilizados nas culturas na presença dos antígenos excretado/secretado e bruto de *A.ceylanicum* (ES e Br respectivamente).É importante ressaltar que foram aceitas para o uso em cultura, as suspensões celulares com pureza acima de 85,0% de células CD14⁺(**Fig.4**).

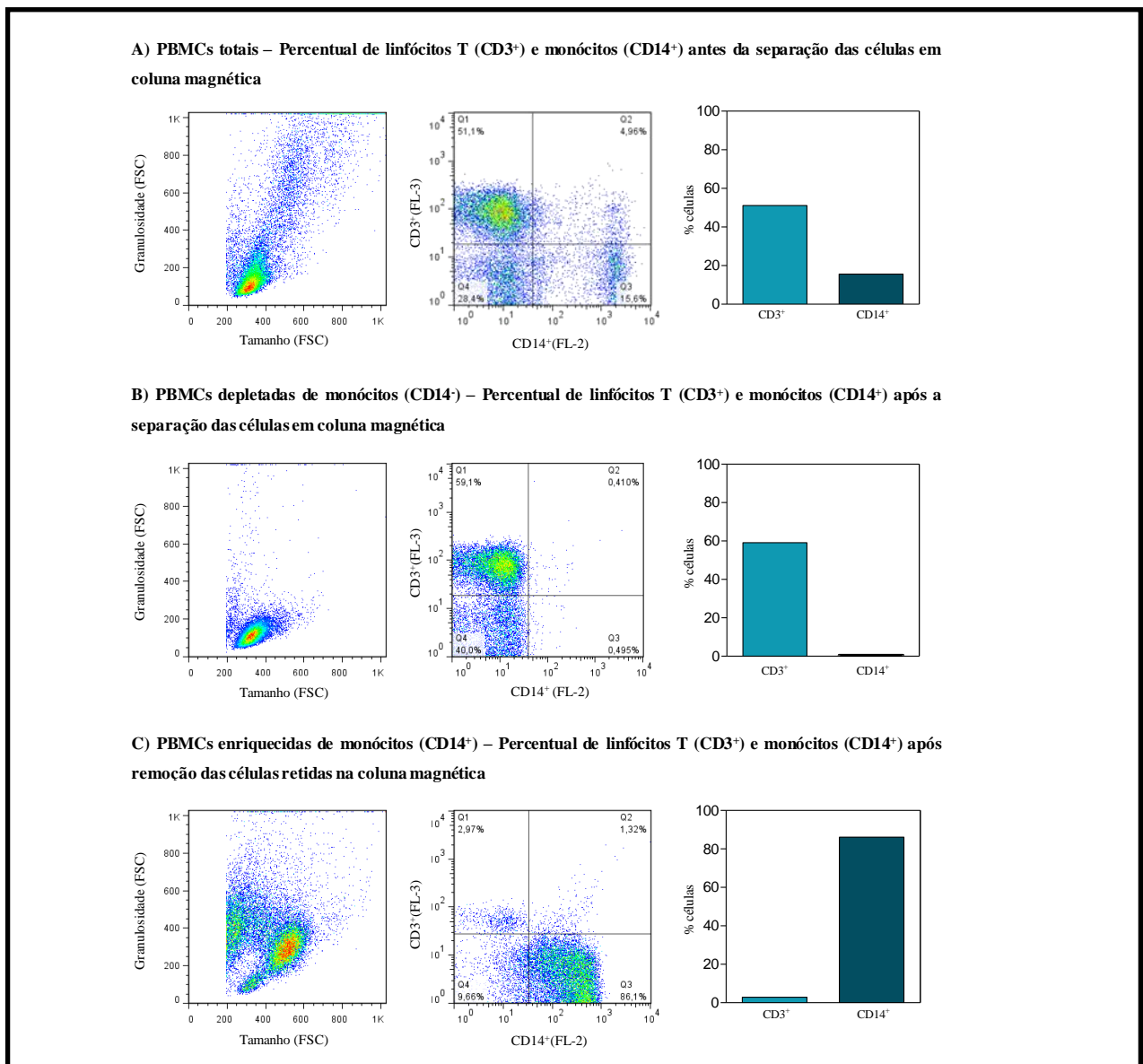


Fig. 4: Análise da pureza e do rendimento de monócitos, após purificação células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em coluna magnética. A) Perfil fenotípico de PBMCs totais. B) Perfil fenotípico de PBMCs depletadas de células CD14⁺. C) Perfil fenotípico de células CD14⁺ após eluição da coluna magnética. Para todos os esquemas (A, B e C), a esquerda, perfil da população em função da granulosidade, ao meio, análise da expressão de CD3⁺ e CD14⁺ em função das fluorescências 2 (FL-2) e 3 (FL-3) respectivamente. E, a direita, percentual de células CD3⁺ e CD14⁺

4.12 Manutenção da cepa de *A.ceylanicum*

Para manutenção da cepa de *A.ceylanicum* foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas ou machos, de 4 a 6 semanas de idade, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, em gaiolas plásticas, em grupos de 5 animais. A limpeza das gaiolas foi feita duas vezes por semana com água, detergente e hipoclorito de sódio 1%. Além disso, foram fornecidas ração granulada balanceada (Labina, Cargill Nutrição Animal) e água potável *ad libitum*. Os animais foram submetidos previamente a infecção ao tratamento oral com 4mg/Kg de Ivermectina (Chemitec, Agro) por sete dias consecutivos (Klement *et al.*, 1996).

As infecções dos animais foram feitas utilizando-se 50 larvas de terceiro estágio (L3) foram então inoculadas nos hamsters com auxílio de uma agulha de gavagem. Decorridos 25 dias após a data da infecção, as fezes dos animais foram coletadas por dois dias consecutivos a partir das quais se realizava o exame de fezes pela técnica de McMaster. Uma vez positivas para ovos de ancilostomídeos nas fezes foram misturadas em vermiculita e incubadas em estufa de câmara úmida 5% de CO₂, 26 °C durante 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a técnica de Baermann Moraes modificado (Barcante *et al.*, 2003) para recuperação das larvas infectantes (L3) que então eram utilizadas para novas infecções.

4.13 Produção de antígenos: excretados/secretados de vermes adulto (Es) e extrato bruto de verme adulto (Br)

Para a produção de antígenos Es e Br, os hamsters foram anestesiados utilizando-se cetamina 225mg/Kg e xilazina 30mg/Kg após 28 dias após a data da infecção.

Inicialmente, para a produção de antígenos Es, os vermes recuperados da mucosa intestinal dos animais, foram depositados em placa de Petri contendo solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,015M, pH 7,4 (PBS), em seguida, os parasitos foram lavados por mais duas vezes também em PBS e outras duas vezes com meio RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) com a finalidade de remover ao máximo os contaminantes presentes. Após as lavagens aproximadamente 100 vermes adultos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 15mL (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA) contendo 4,0mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 3% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) (Cultilab). Em seguida, os tubos foram colocados em cultura em câmara úmida contendo 5% CO₂, 37°C por um período de 96 horas. A cada 24 horas, o sobrenadante contendo os produtos excretados/secretados foram retirados e congelados a -80°C e os 4mL de meio RPMI suplementado repostos. Após o período total de incubação, todos os sobrenadantes foram agrupados em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), concentrados em alta centrifugação em tubos Centricon 10kDa (Millipore, EUA) e filtrados em filtro de seringa estéril 0,22µm. Uma vez estéreis os produtos Es foram armazenados a -80°C até sua utilização nas culturas de monócitos.

Os vermes remanescentes da preparação do antígeno excretado/secretado (Es) foram utilizados para obtenção do extrato bruto (Br). Para tanto, inicialmente foi feita a maceração mecânica dos vermes em solução PBS com auxílio do macerador de tecidos

(Tissue Grinder, Fisher Scientific, EUA) e em seguida, intensificada pelo uso de um sonificador a 40 Wats. O extrato bruto foi mantido sob resfriamento durante o processo que constou de 3 ciclos de 1 minuto em sonicação e 30 segundo em repouso. Em seguida o extrato bruto foi centrifugado por 3 minutos a 400g e 20°C. O sobrenadante foi coletado em outro tubo cônico de polipropileno com capacidade para 50mL e o sedimento descartado e os sobrenadantes armazenados a -80°C até sua utilização na cultura de monócitos.

A quantidade de antígenos para as duas preparações Es e Br foi dosada anteriormente ao seu uso em cultura de células, através do kit comercial BCA (Pierce, EUA) e realizado conforme as instruções do fabricante.

4.14 Cultura de monócitos do sangue periférico na presença e ausência de antígenos Es e Br

Após a obtenção dos monócitos por seleção negativa com microesferas magnéticas anti-CD14 (tópico 4.11), as células foram centrifugadas a 400g, 4°C por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 5% soro humano (Sigma-Aldrich), 1,6% de L-glutamina (Invitrogen) e 3,0% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Cultilab), contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e ajustadas para a concentração desejada ($2,0 \times 10^5$ células/200µL).

Os monócitos purificados foram então transferidos para placa de cultura de células de 48 poços da seguinte forma: para cada um dos indivíduos foi plaqueado 3 poços contendo cada um deles $2,0 \times 10^5$ células (200µL de suspensão celular). No primeiro poço denominado cultura controle (CC) foi adicionado apenas meio RPMI suplementado (300µL). Ao segundo e ao terceiro poço foram adicionados 5µg/100µL dos antígenos Es e

Br respectivamente além de 200µL de RPMI suplementado, de forma que cada poço atingiu um volume final de 500µL. Posteriormente os tubos foram incubados em estufa de câmara úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Decorridas as 48 horas, os monócitos foram removidos da placa e transferidos para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, BD Biosciences, EUA) para avaliação imunofenotípica de acordo com o tópico 4.8 deste capítulo

4.15 Análise dos dados

Para análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos foi utilizado os testes Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Em seguida para comparação entre dois grupos em que os dados foram considerados não-paramétricos foi utilizada o teste Mann-Witney e para os testes entre dois grupos que foram considerados paramétricos foi utilizado Teste. Somente para os dados de cultura de monócitos foi utilizado o teste de Wilcoxon para os dados não-paramétricos e Teste T pareado para os dados paramétricos uma vez que se tratava de comparações da mesma amostra em diferentes tempos experimentais.

Para verificação da presença de *outliers* nos dados foi utilizado o teste de Grubb. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas como $p < 0,05$

5. Resultados

5.1- Avaliação do perfil de monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (grupo NI) e de pacientes monoinfectados por *N. americanus* (grupo INF)

Diante da necessidade de compreender o papel dos monócitos na ancilostomíase humana, neste estudo, nos propomos a avaliar o perfil de ativação dessas células em indivíduos infectados por ancilostomídeos uma vez que essas células podem estar envolvidas nos demais mecanismos de imunoregulação já previamente identificados.

Foi realizado o leucograma nas amostras de sangue periférico dos indivíduos do grupo de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos infectados por ancilostomídeos (grupo INF), residentes em áreas endêmicas para *N. americanus*. A análise dos dados mostrou diferença significativa do número de monócitos/mm³ (**Fig. 5**) no grupo INF (493,5±158,0) em relação ao grupo NI (124,0±96,4) com $p < 0,001$.

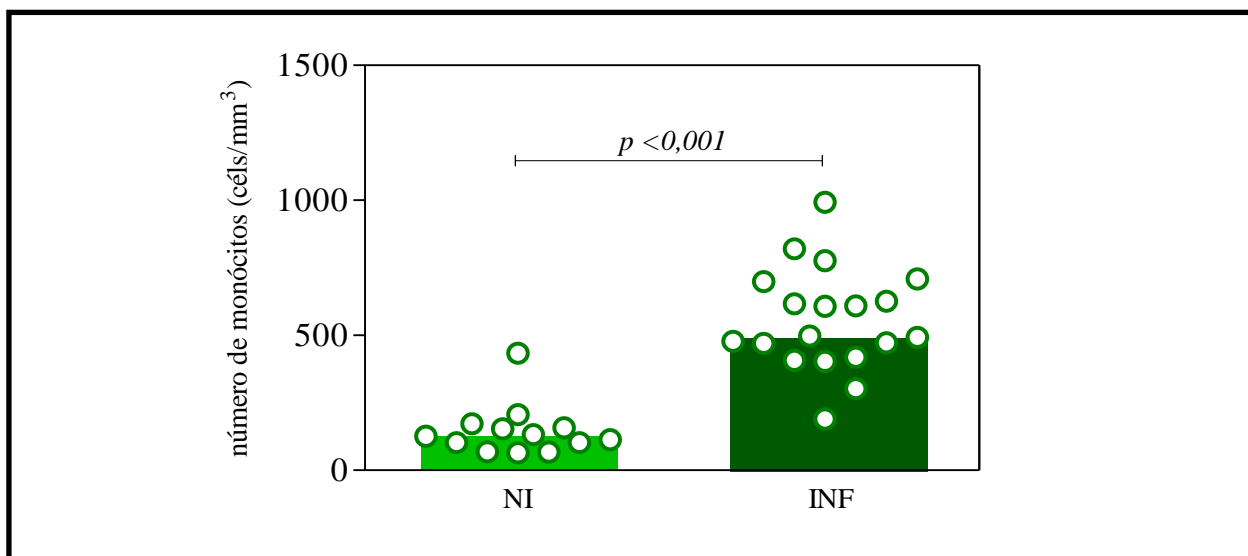


Fig.5: Perfil hematológico de monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI n=13) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF n=19). Os resultados estão expressos pela mediana do valor absoluto de monócitos/mm³ (barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos está representada pelo valor p

5.2- Análise da produção das citocinas IL-10 e IL-12 em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos monoinfectados por N. americanus (grupo INF)

Embora muitos estudos acerca dos perfis de ativação de monócitos e macrófagos em infecções parasitárias extracelulares evidenciem a polarização para o fenótipo alternativo, para o caso da ancilostomíase humana, a presença de um perfil de ativação clássica não pode ser descartado uma vez que se observa a presença de resposta imune do tipo mista, com produção significativa de citocinas tanto da resposta Th1 quanto da resposta Th2. Sendo assim, com intuito de direcionar o estudo de ativação em monócitos, avaliamos imunofenotipicamente por citometria de fluxo, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), as populações positivas para a molécula CD14⁺ e, através de marcação intracelular, a expressão das citocinas IL-12 e IL-10, mediadores com papel chave na determinação do fenótipo de monócitos.

Foi realizada uma avaliação comparativa entre a produção de IL-10 e IL-12 em monócitos (células CD14⁺) nos grupos NI e INF e, posteriormente, uma análise com base na razão entre células CD14⁺IL-10⁺ e células CD14⁺IL-12⁺ nos grupos NI e INF. Os resultados mostraram que, tanto no grupo NI quanto no grupo INF, a produção de IL-10 é significativamente maior que a produção de IL-12 ($p < 0,001$) (**Fig. 6A e 6B**). Porém, ao avaliarmos a proporção entre a produção dessas citocinas nos dois grupos avaliados, observamos que indivíduos infectados (INF) apresentaram frequência significativamente maior ($p < 0,001$) de células CD14⁺IL-10⁺ em relação ao número de células CD14⁺IL-12⁺ ($10,78 \pm 7,77$) quando comparados aos indivíduos controles (grupo NI, $4,01 \pm 1,46$) (**Fig. 6C**). Essa abordagem foi realizada considerando o valor absoluto de monócitos/mm³ para as moléculas avaliadas.

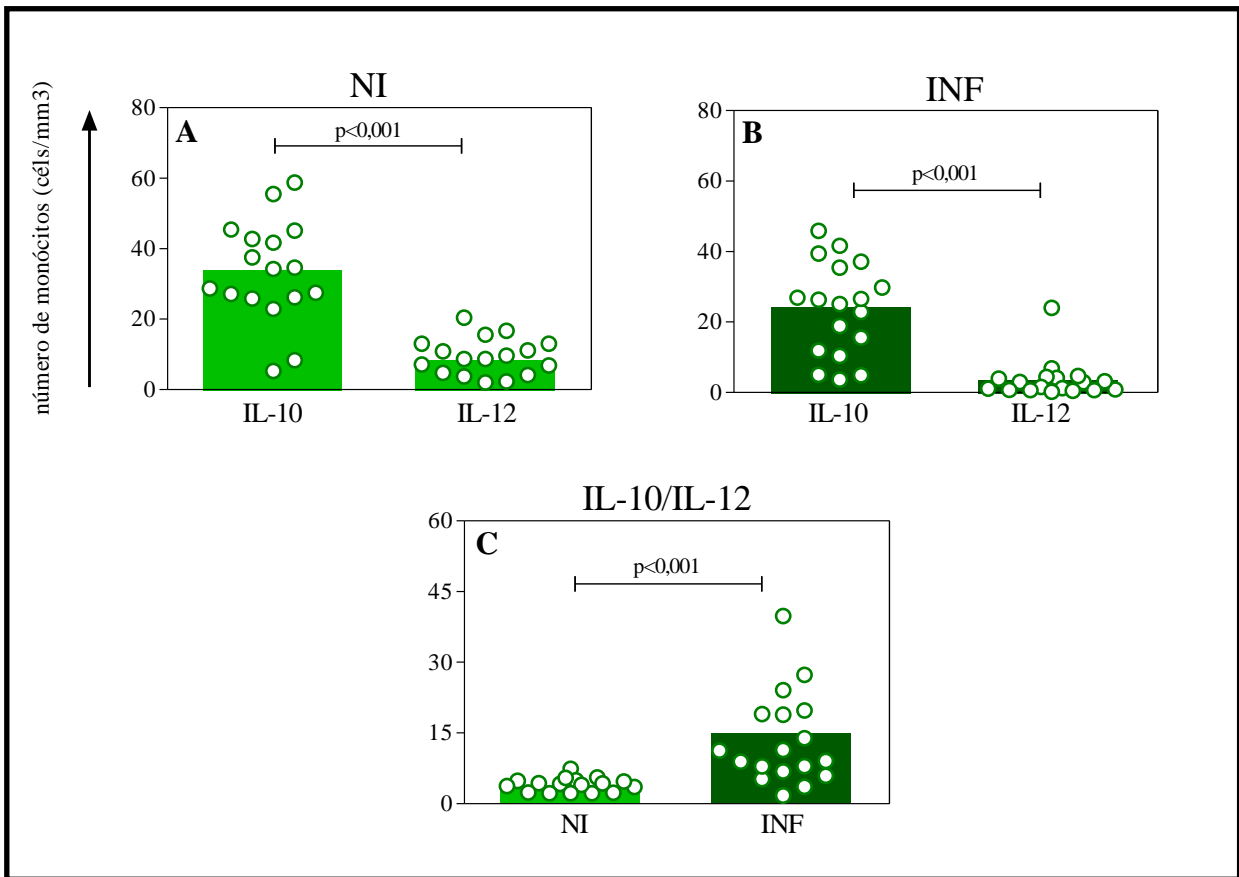


Fig.6: Expressão das citocinas IL-10 e IL-12 em monócitos (CD14⁺) do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI n=17) (A), de indivíduos mono infectados por *N. americanus* (INF n=17) (B) e razão da expressão das citocinas IL-10 e IL-12 entre indivíduos NI e INF (C). Os resultados estão expressos pela média do valor absoluto de monócitos por mm³(barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos estão representadas pelo valor de p.

5.3- Análise da expressão de IL-4 em PBMCs de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (grupo INF)

A partir dos dados obtidos que mostram que monócitos de indivíduos infectados por ancilostomídeos possuem um perfil de produção de citocinas predominantemente regulador (IL-10) em relação ao perfil pró-inflamatório (IL-12) e, portanto, eliminam a hipótese de ativação por via clássica (caracterizada por um perfil oposto de produção dessas citocinas), o próximo passo foi avaliar a expressão de IL-4 em PBMCs, uma vez que esta citocina presente em quantidades significativas no meio é capaz de induzir a ativação para a via alternativa (reparo tecidual). A avaliação dos níveis de expressão do gene de IL-4 não mostrou diferença significativa entre indivíduos infectados e indivíduos controles ($p=1,000$) (**Fig.7**).

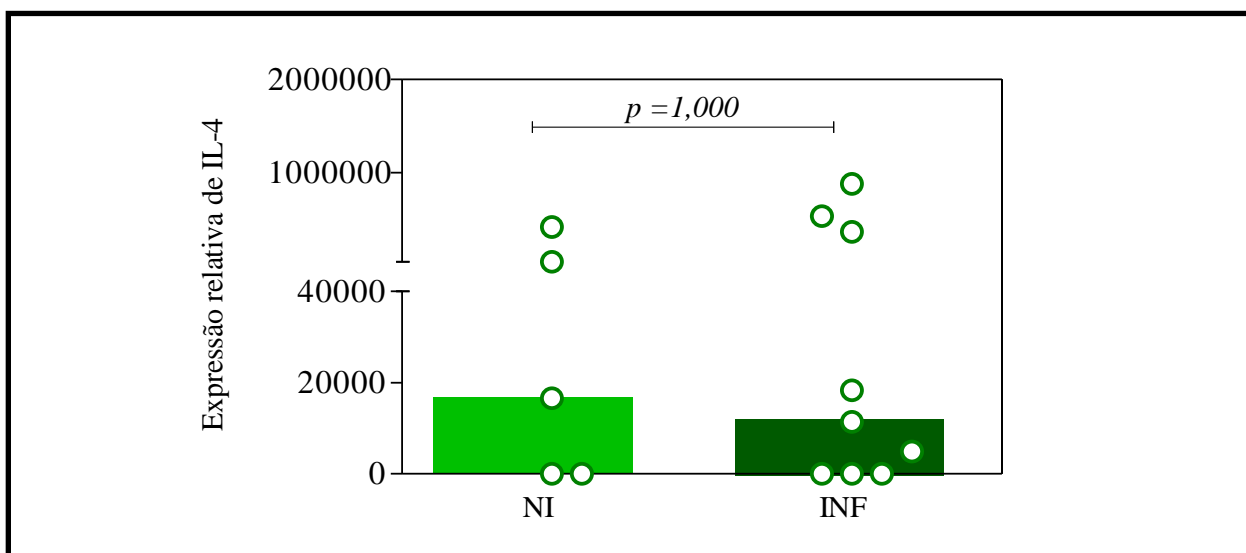


Fig.7: Análise da expressão de IL-4 em PBMCs de indivíduos não infectados (NI n=5) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF n=9). Os resultados estão expressos pela mediana da quantidade relativa (Rq) (barras) de moléculas alvo para cada molécula do controle endógeno (GAPDH) e pela dispersão dos valores individuais (círculos).

5.4- Análise imunofenotípica da expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo de ativação “não clássica” em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos monoinfectados por N. americanus (grupo INF)

A observação de uma elevada produção de IL-10 em monócitos infectados por ancilostomídeos associado a um perfil semelhante de expressão de IL-4 em PBMCs de indivíduos infectados e controles sugere que monócitos de indivíduos do grupo INF possuem um fenótipo predominantemente regulador. Entretanto, a hipótese da polarização para ativação alternativa (reparo tecidual) de monócitos nesses indivíduos, não pode ser desconsiderada.

Nesse sentido, foram avaliados imunofenotipicamente, por citometria de fluxo, alguns marcadores associados aos fenótipos alternativamente ativado e regulador de monócitos. Para tanto, optamos por utilizar como marcador da população de monócitos o receptor de manose (CD206) uma vez que esta molécula além de ser expressa constitutivamente apenas por monócitos e macrófagos e em alguns casos especiais em células dendríticas, possui níveis de expressão diferenciados nas duas subpopulações de fenótipos “não clássicos” (alternativamente ativado e regulador).

A avaliação do nível de expressão da proteína de superfície CD206 foi feita através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (MFI) em PBMCs de indivíduos do grupo NI ($3,054 \pm 0,01$) e do grupo INF ($3,053 \pm 0,04$). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,958$) entre os grupos avaliados (**Fig. 8A**).

Avaliamos também a frequência de células positivas para a molécula de superfície CD206 que também eram positivas para a citocina IL-10 ($CD206^+IL-10^+$). Esta abordagem teve como objetivo reforçar os dados que mostram que na ancilostomíase humana

monócitos são fonte de citocinas reguladoras. Os resultados mostraram que indivíduos do grupo INF apresentaram frequência significativamente maior ($p=0,002$) de células $CD206^+IL-10^+$ ($13,46\pm 10,63$) quando comparados aos indivíduos do grupo NI ($4,77\pm 5,97$). Essa abordagem foi realizada considerando o valor absoluto de monócitos/ mm^3 para as moléculas avaliadas (**Fig. 8B**).

Além disso, foi também avaliado em monócitos duplamente positivos para as moléculas CD206 e IL-10 ($CD206^+IL-10$) aqueles que também eram positivos para o receptor de IgE de baixa afinidade $Fc\gamma RII$ ou CD23 ($CD206^+CD23^+IL-10$). Essa análise teve o intuito de verificar a presença de moléculas relacionadas à ativação celular bem como a produção de mediadores inflamatórios que poderiam auxiliar na determinação do fenótipo de ativação predominante na ancilostomíase humana. Os dados dessa análise mostraram que indivíduos do grupo INF apresentam frequência significativamente maior ($p<0,001$) de células $CD206^+CD23^+IL-10^+$ ($6,07\pm 4,75$) quando comparados aos indivíduos do grupo NI ($0,48\pm 0,51$). Essa abordagem foi realizada considerando o valor absoluto de monócitos/ mm^3 para as moléculas avaliadas (**Fig. 8C**).

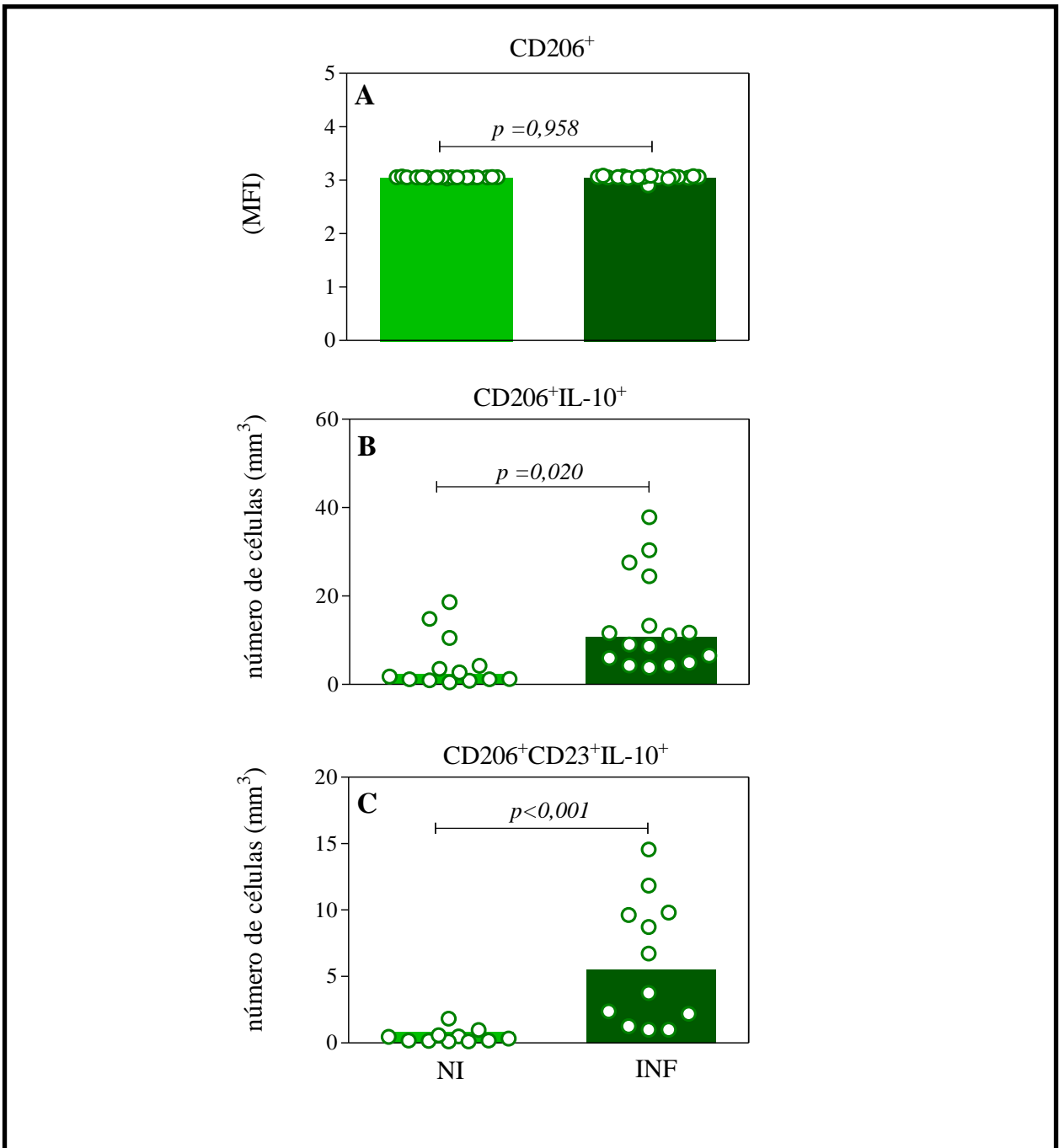


Fig.8: Avaliação da expressão de (A) CD206, (B) CD206⁺IL-10⁺, (C) CD206⁺CD23⁺IL-10⁺ em PBMCs de indivíduos não infectados (NI (A) n=17, (B) n= 13, (C), n=11) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF (A) n=18, (B) n= 16, (C) n=12). Os resultados estão expressos pela média do valor absoluto de monócitos por mm³(barras) e pela dispersão dos valores individuais (círculos). A diferença estatística entre os grupos está representada pelo valor de p.

5.5- Análise da expressão de genes relacionados aos fenótipos regulador (iNOS) e alternativamente ativado (Arg-1) em PBMCs do sangue periférico de indivíduos não infectados (grupo NI) e de indivíduos mono infectados por N. americanus (grupo INF)

Uma vez demonstrado a presença de marcadores que indicam que indivíduos infectados por ancilostomídeos possuem monócitos com fenótipo regulador e objetivando aumentar a veracidade dos dados obtidos, optamos por avaliar também a expressão de genes que estão expressos diferentemente em monócitos ativados alternativamente (reparo tecidual) e monócitos reguladores. Para este fim, avaliamos a expressão dos genes que codificam para arginase-1 (Arg-1) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), enzimas que participam metabolismo da L-arginina.

A avaliação do gene da Arg-1, enzima associada ao reparo de danos teciduais e altamente expresso em monócitos ativados alternativamente, não mostrou diferença significativa entre os grupos avaliados ($p=0,602$) (**Fig. 9A**). Interessantemente, quando avaliamos a expressão do gene da iNOS, enzima relacionada ao perfil regulatório em monócitos, verificou-se que indivíduos do grupo INF apresentam uma maior expressão desse gene quando comparado ao grupo NI ($p=0,022$) (**Fig. 9B**).

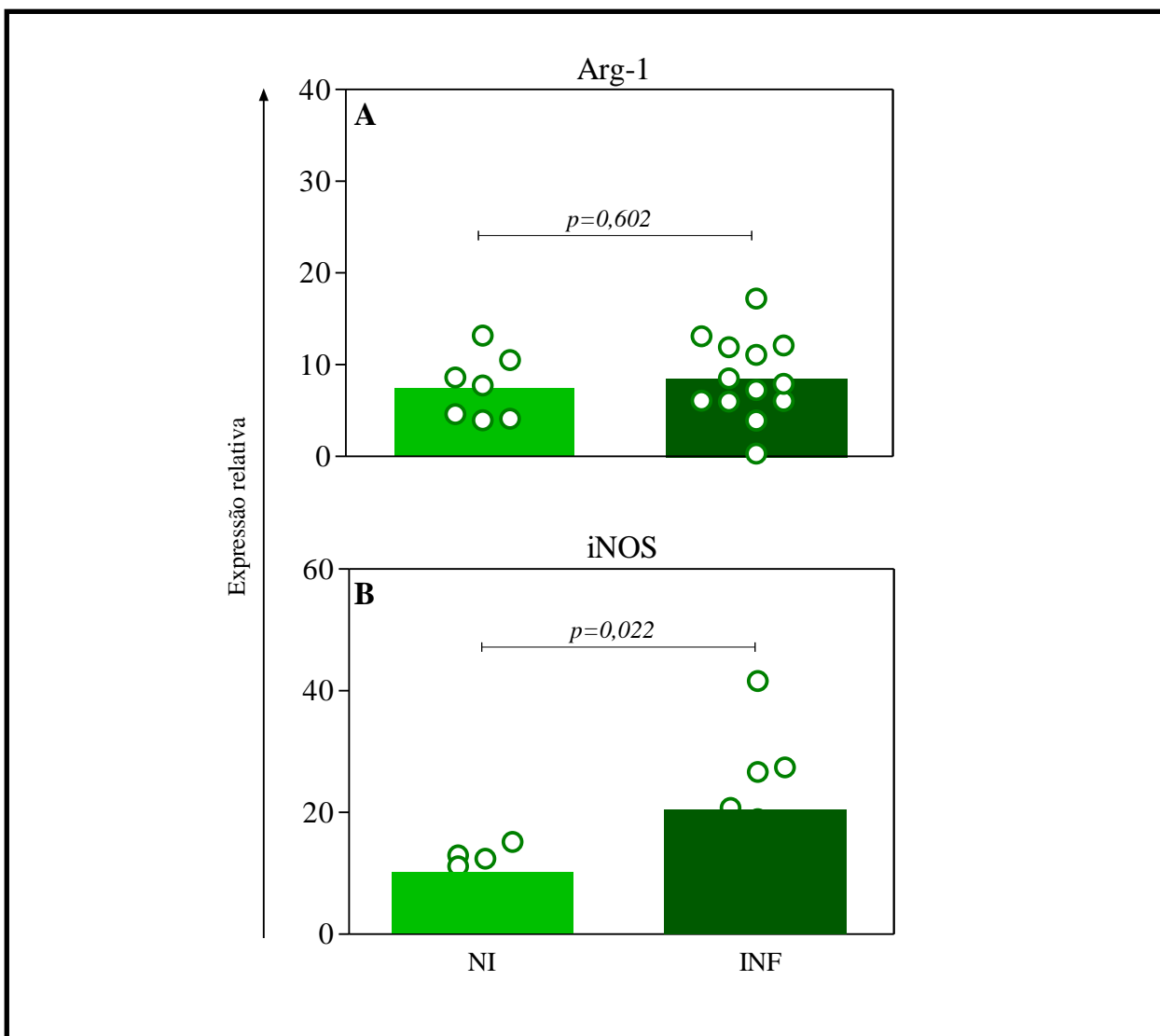


Fig.9: Análise da expressão de Arg-1 (A) e iNOS (B) em PBMCs de indivíduos não infectados (NI (A) n=7 (B) n=6) e de indivíduos monoinfectados por *N. americanus* (INF (A) n=13 (B) n=10). Os resultados estão expressos pela mediana da quantidade relativa (Rq) (barras) de moléculas alvo para cada molécula do controle endógeno (GAPDH) e pela dispersão dos valores individuais (círculos).

5.6- Análise imunofenotípica da expressão de moléculas relacionadas aos fenótipos de ativação “não clássica” em monócitos de indivíduos não infectados (grupo NI) após estimulação com antígeno excretado/secretado e antígeno bruto de A. ceylanicum

Para se avaliar a capacidade dos antígenos de *A. ceylanicum* em promover mudanças associadas ao fenótipo regulador em monócitos de indivíduos não infectados por ancilostomídeos, foram realizadas, após purificação das células em coluna magnética, culturas de monócitos com duração de 48 horas, na presença e na ausência dos antígenos Es e Br do parasito, na concentração de 100µg/mL para ambos. Após o término do período de cultura, foi feita análise imunofenotípica das células por citometria de fluxo.

A avaliação de células duplamente positivas para as moléculas CD206 e IL-10 (CD206⁺IL-10⁺) bem como de células triplamente positivas para as moléculas CD206, CD23 e IL-10 (CD206⁺CD23⁺IL-10⁺) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre culturas estimuladas com antígenos do parasito (Es e Br) e culturas controles (CC) (**Fig. 10A,B,C**). Essa abordagem foi realizada considerando o valor percentual de células para as moléculas avaliadas.

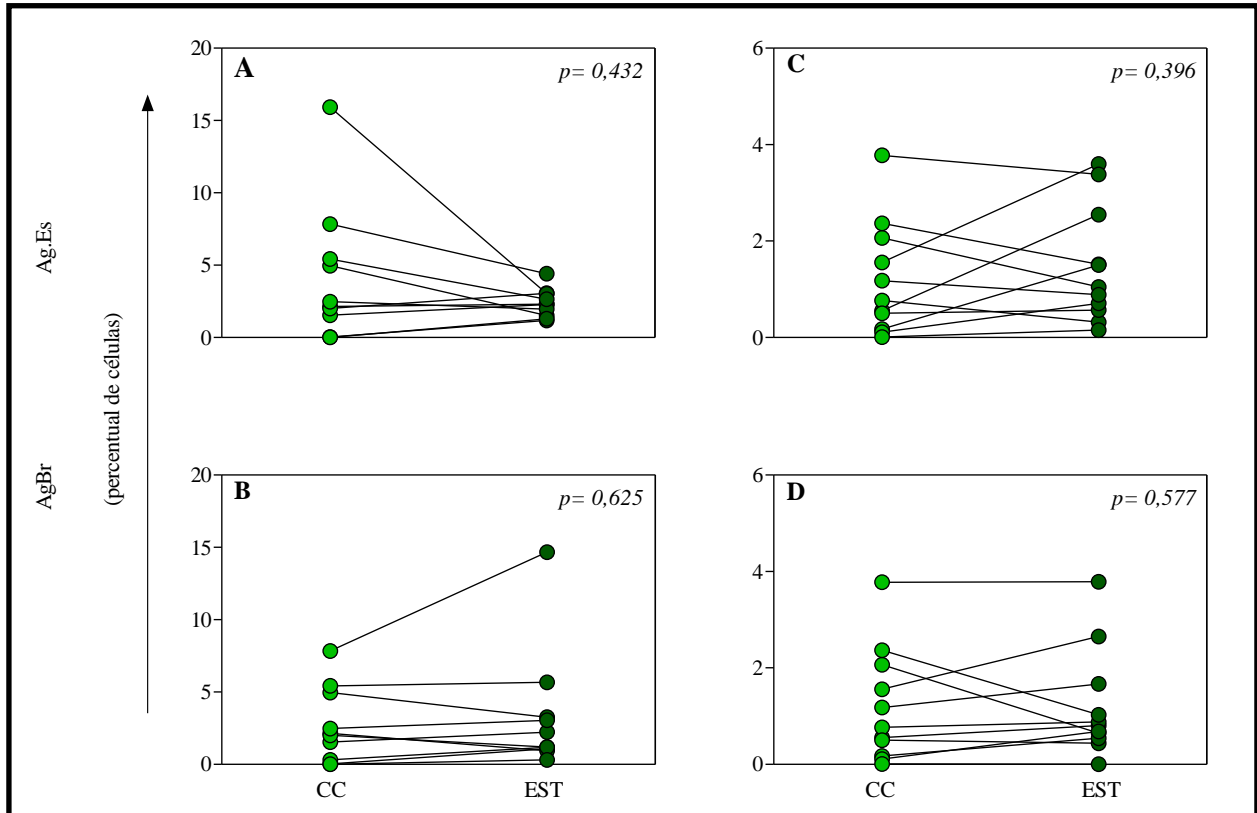


Fig.10: Avaliação da expressão de $CD206^{+}IL-10^{+}$ (A,B) e $CD206^{+}CD23^{+}IL-10^{+}$ (C,D) em cultura de monócitos de indivíduos não infectados (NI) estimulados (EST) com antígenos excretado/secretado do parasito (Es n=9), antígeno bruto (Br n=9) e em culturas controles (CC n=9). Os resultados estão expressos por percentual de células positivas para as moléculas avaliadas.

6. Discussão

Inúmeros são os trabalhos voltados para caracterização bioquímica e funcional das três diferentes populações de macrófagos. Estes estudos buscam identificar diferenças na produção de citocinas e quimiocinas (Martinez *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2004), no metabolismo da arginina (Edwards *et al.*, 2006) e do ferro (Cairo *et al.*, 2011), nos níveis de glutatona (Murata *et al.*, 2002), em receptores de superfície celular (Geissmann *et al.*, 2003; Gordon e Martinez, 2010; Mantovani *et al.*, 2002), entre outras moléculas.

Neste trabalho foram avaliados parâmetros fenotípicos e moleculares de monócitos circulantes de indivíduos infectados por ancilostomídeos com objetivo de investigar o perfil de ativação dessas células na ancilostomíase humana. Foi também avaliado a expressão de alguns genes em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) desses pacientes bem como a capacidade de antígenos de *A. ceylanicum* em induzir, em células de indivíduos não infectados, fenótipo similar ao observado nos pacientes infectados.

Inicialmente foi feita uma avaliação do perfil de monócitos no sangue periférico de indivíduos infectados e não infectados por ancilostomídeos e foi observado aumento do número de células/mm³ em pacientes do grupo INF quando comparados aos indivíduos do grupo NI (**Fig.5**), dados semelhantes aos obtidos por Gazzinelli-Guimarães *et al.* (2013). Alterações hematológicas como esta podem ser observadas em uma grande variedade de processos patológicos como, por exemplo, na tuberculose (Singh *et al.*, 2001), artrite reumatóide (Kojo *et al.*, 2001; Dalbeth e Callan, 2002), endocardite bacteriana (Daland *et al.*, 1956) entre outras. Porém, em infecções parasitárias, o aumento do número de monócitos é comumente observado em infecções por protozoários, como na malária (Akhtar *et al.*, 2012), toxoplasmose (Sklenar *et al.*, 1986) e nas leishmanioses (Kawakami *et al.*, 1996).

Devido à grande variedade de funções exercidas pelos monócitos, a observação do aumento do número absoluto dessas células no sangue periférico de indivíduos infectados, por si só não é capaz de fornecer informações sobre seu papel no contexto da ancilostomíase. Entretanto, sabe-se que uma elevada frequência dessa população pode indicar aumento da reatividade dessas células associada, provavelmente, à uma constante estimulação promovida pela infecção de caráter crônico. Nesse sentido, o presente trabalho buscou contribuir para ampliação do entendimento da participação e função destas células na infecção por ancilostomídeos.

Diversos estudos apresentados na literatura que abordam o perfil de produção de citocinas nas diferentes vias de polarização de monócitos e macrófagos mostram que a proporção entre a produção de IL-12 e IL-10 é determinante na identificação do fenótipo de ativação de macrófagos (Anderson e Mosser, 2002; Mantovani *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Mosser e Edwards, 2008; Biswas e Mantovani, 2010; Fleming e Mosser, 2011). Nesse sentido, ao avaliarmos a expressão dessas citocinas em células CD14⁺ (monócitos) observamos que tanto indivíduos do grupo NI quanto do grupo INF apresentam níveis elevados da citocina IL-10 quando comparados aos níveis de expressão de IL-12 (**Fig. 6A e B**). Entretanto, ao avaliarmos a razão da produção dessas citocinas em monócitos (CD14⁺IL-10⁺/CD14⁺IL-12⁺) nos grupos avaliados, foi constatado que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam um perfil de produção de IL-10 superior ao de IL-12 quando comparados aos indivíduos do grupo NI (**Fig. 6C**).

A utilização do perfil de expressão dessas citocinas como indicadores de polarização de macrófagos baseia-se no fato de que os mediadores envolvidos na ativação dessas células induzem diferentes programas de sinalização intracelular que levarão a transcrição de genes que estão associados aos diferentes fenótipos de macrófagos. Nesse

sentido, a ativação de macrófagos via IFN promove, pela ativação dos fatores de transcrição NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (*activator protein 1*), IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) e STAT1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 1*), a transcrição de genes associados ao fenótipo clássico como, por exemplo, de IL-12p40 (Biswas e Mantovani, 2010). Por outro lado, a ativação de macrófagos envolvendo imunocomplexos irá promover, por ativação de ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), a produção de IL-10, caracterizando um perfil de ativação oposto ao perfil clássico (Fleming e Mosser, 2011). Vale ressaltar que, uma elevada produção de IL-10 é capaz de inibir a ativação de TLR4, receptores que ao se ligarem a lipopolissacarídeos (LPS) são também capazes de induzir a transcrição de genes associados ao fenótipo clássico de ativação (Biswas e Mantovani, 2010).

A via de ativação alternativa, vinculada a função de reparo tecidual, é promovida por estímulos provenientes da resposta Th2, em particular, em resposta a ligação das citocinas IL-4 e IL-13 em seus receptores na superfície de monócitos. Uma vez ativado por essa via, monócitos e macrófagos, através de sinais de transcrição via STAT6 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 6*), tem sua capacidade de pinocitose e endocitose aumentadas, inibição da produção de óxido nítrico com consequente aumento da atividade da arginase, aumento expressão de MHC-II e outros mediadores de remodelação tecidual (Martinez *et al.*, 2009).

No presente estudo, a avaliação do nível de expressão do gene que codifica IL-4 em PBMCs não mostrou diferenças significativas entre os grupos avaliados (**Fig. 7**). Assim, o fato de células de indivíduos dos dois grupos apresentaram expressão similar do gene em questão, sugere a inexistência de ambiente favorável para polarização alternativa de monócitos nos indivíduos infectados por ancilostomídeos.

Os dados até então obtidos sugerem que a população de monócitos envolvida na infecção por ancilostomídeos são os monócitos reguladores, uma vez que, observa-se elevada proporção da produção de IL-10 em relação a produção de IL-12 associado a constatação de níveis similares de expressão de IL-4 aos observados no grupo controle (NI).

Nesse sentido, foram avaliados também o nível de expressão dos genes que codificam para arginase-1 (Arg-1) e óxido nítrico sintase indizível (iNOS), enzimas envolvidas no metabolismo da arginina. Os resultados mostraram que não há diferença na expressão de Arg-1 entre indivíduos do grupo INF e do grupo NI. Macrófagos ativado alternativamente (reparo tecidual) expressam elevados níveis de Arg-1, que confere a essas células grande potencial em converter arginina em poliaminas e hidroxiprolina, contribuindo diretamente para síntese de matriz extracelular (Hesse *et al.*, 2001). Por outro lado, interessante, observou-se um aumento na expressão de iNOS no grupo INF em relação ao grupo NI. Edwards *et al.*, (2006) mostrou que macrófagos regulatórios gerados *in vitro* eram capazes, assim como os macrófagos ativado por via clássica, de produzir óxido nítrico (NO), evidenciando que essas células podem manter alguma capacidade em limitar infecções intracelulares, apesar do fato de que esse não é seu papel fisiológico primário (Fleming e Mosser, 2011).

Para identificação do perfil de ativação em monócitos, marcadores de superfície celular também são utilizados, dentre eles o receptor de manose (MR). O MR é um receptor ligante de carboidratos, expresso em determinadas populações de monócitos, macrófagos, em células dendríticas inflamatórias de tecidos linfóides e no endotélio não vascular. O MR (CD206) está em constante trânsito entre membrana plasmática e compartimento endossomal (Gazi e Pomares, 2009). O processo de ativação celular tem importante efeito

sobre a expressão desses receptores na superfície celular uma vez que o aumento da sua expressão está associado ao aumento do número de ligantes. Dentre funções já descritas para este receptor estão a remoção de moléculas endógenas, promoção de apresentação antigênica, modulação de ativação celular e internalização de colágeno (Pomares, 2012) *In vitro*, o tratamento com IL-4 e IL-13 induz aumento da expressão dos níveis de CD206 enquanto que o tratamento com INF- γ e LPS tem efeito negativo na expressão dos mesmos (Taylor *et al.*, 2005). Em humanos e camundongos, MR é considerado um indicador altamente confiável de ativação alternativa (reparo tecidual).

Diante do exposto avaliamos a expressão de células CD206⁺ em PBMCs de indivíduos infectados e não infectados por ancilostomídeos. A observação de que os dois grupos estudados apresentaram níveis similares (**Fig. 8A**) de expressão de MR e de IL-4, citocina envolvida no desencadeamento da transcrição do gene que codifica para este receptor (Stein *et al.*, 1992), reforça a hipótese de que a população de monócitos predominantemente envolvida na infecção por ancilostomídeos são os monócitos imunorregulatórios. Além disso, a expressão de CD206 em PBMCs foi avaliada concomitantemente com a marcação intracitoplasmáticas de IL-10, de forma a determinar possível corroboração com os dados observados em células CD14⁺ (**Fig. 8A e B e Fig. 6B e C**).

Conjuntamente com os ensaios imunofenotípicos para avaliação de células CD206⁺ e CD206⁺IL-10⁺ foi realizado a avaliação da expressão do receptor de IgE de baixa afinidade (Fc γ RII), o CD23. Nossos dados evidenciaram um aumento de monócitos produtores de IL-10 apresentando o receptor CD23 (CD206⁺CD23⁺IL-10⁺) em indivíduos do grupo INF quando comparados aos indivíduos do grupo NI (**Fig. 8C**). O receptor de IgE de baixa afinidade (CD23 ou Fc γ RII) é uma molécula expressa na superfície de monócitos,

neutrófilos eosinófilos e células B que participa da regulação da síntese de IgE através da clivagem proteolítica dessa molécula com consequente liberação de sua forma solúvel (CD23s) no plasma que promove mecanismos de *feedback* negativo (Pritchard, 1997). Além disso, o CD23 está envolvido nos processos de ativação celular e citotoxicidade. A ligação de IgE ao CD23 aumenta a capacidade de apresentação antigênica das células e resulta em produção e liberação de NO (Vouldoukis *et al.*, 1995), nesse sentido, o bloqueio deste receptor tem sido utilizado como alvo terapêutico para o tratamento de doenças autoimunes (Acharya *et al.*, 2010).

Diante disso e de dados da literatura que indicam que indivíduos infectados por ancilostomídeos produzem elevados níveis de IgE (Loukas e Prociv, 2001; Fujiwara *et al.*, 2006), podemos sugerir que o aumento da expressão de CD23 em monócitos de indivíduos infectados por ancilostomídeos pode estar associada a elevada expressão de iNOS (**Fig. 9B**) observada no presente trabalho e que, o aumento de CD23, pode indicar que essas células possuem boa capacidade de apresentação antigênica. Vale ressaltar que, por outro lado, macrófagos ativados alternativamente (reparo tecidual) apresentam propriedades opostas, com baixa expressão de iNOS e ausência da capacidade de apresentação antigênica (Fleming e Mosser, 2011).

Uma vez definido o perfil regulador em monócitos na ancilostomíase humana, nos questionamos se antígenos do parasito eram capazes de induzir o perfil imunofenotípico observado nos indivíduos infectados de área endêmica. Assim, monócitos purificados a partir de células de indivíduos não infectados, foram colocados em cultivo na presença de antígenos excretados/secretados e bruto de *A. ceylanicum*. As análises imunofenotípicas dos marcadores CD206, CD23 e IL-0 não evidenciaram indução de fenótipo similar ao observado em indivíduos infectados por *N. americanus* com aumento da expressão de IL-

10 e do receptor CD23. Esses resultados nos alertaram para hipóteses que podem estar associados a indução do fenotípico regulador em monócitos. Uma dessas hipóteses é de que a exposição única dos monócitos aos antígenos do parasito não promovem alterações na expressão das moléculas em questão (CD206, CD23 e IL-10) uma vez que as condições estabelecidas *in vitro* não refletem as condições de área endêmica em que os indivíduos são constantemente expostos e estimulados pelo parasito. Além disso, os componentes do antígeno talvez não possuam a complexidade de mediadores necessários para desencadear esse tipo de polarização, indicando assim a importância da presença de outras células e mediadores imunes no microambiente.

Os resultados desse trabalho auxiliam na compreensão da interação entre os mecanismos imunomodulatórios envolvidos na infecção por ancilostomídeos que permitem a sobrevivência prolongada do parasito no organismo do hospedeiro. Entre os mecanismos já propostos, a observação de uma elevada frequência de células T reguladoras (Ricci *et al.*, 2011) podem atuar como fonte de TGF- β e IL-10 promovendo um ambiente favorável para o desenvolvimento de monócitos reguladores (Tiemessen *et al.*, 2007; Mosser e Edwards, 2008), uma vez que essas citocinas são importantes estímulos para esta via de polarização. A observação de altos níveis séricos de imunoglobulinas, principalmente IgG4 e IgE secretadas por linfócitos B (Palmer e Bundy, 1995) contribuem para a formação de imunocomplexos que podem se ligar a receptores (Fc γ R) na superfície de monócitos e promover a transcrição de genes associados ao fenotipo regulador (Biswas e Mantovani, 2010). Estudos já demonstraram que células apoptóticas são importantes moduladoras da função de macrófagos (Voll *et al.*, 1997; Erwig e Henson, 2007) e interessante, Gazzinelli-Guimarães *et al.*, (2013) mostrou que antígenos de ancilostomídeos possuem potencial efeito citotóxico e pró-apoptótico em linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos B em

indivíduos infectados por *N. americanus*. Além de ser um importante mecanismo de evasão da resposta imune desenvolvido pelo parasito, a indução de apoptose em células do hospedeiro contribui duplamente para a modulação do sistema imune uma vez que também fornece sinais para indução da formação de monócitos reguladores.

7. Conclusão

Após a realização deste trabalho, podemos concluir que indivíduos naturalmente infectados por ancilostomídeos apresentam uma elevada frequência de monócitos circulantes e que essas células apresentam perfil predominantemente regulador, participando principalmente como fonte de IL-10. Dessa forma, essa população, conjuntamente com os demais mecanismos de evasão e regulação já descritos para a ancilostomíase humana, pode contribuir para a sobrevivência prolongada do parasito no organismo do hospedeiro através da modulação da resposta imune.

8. Referências bibliográficas

Acharya, M., Borland, G., Edkins, A. L., MacLellan, L. M., Matheson, B. W., Cushley, W. (2010). CD23/Fc γ R2: molecular multi-tasking. *ClinExpImmunol*, v.162(1), p. 12–23.

Akhtar, S., Gumashta, R., Mahore, S., Maimoon, S. (2012). Hematological changes in malaria: A comparative study. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v.2, p.15-19.

Albonico, M., Crompton, D. W., Savioli, L. (1999). Control strategies for human intestinal nematode infections. *AdvParasitol*, v. 42, p. 277-341.

Albonico, M., Bickle, Q., Ramsan, M., Montresor, A., Savioli, L., Taylor, M. (2003). Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull World Health Organ*, v. 81, p. 343-52.

Anderson, C. A., Mosser, D. M. (2002). A novel phenotype for activated macrophages: the type II activated macrophage. *J. LeukocBiol*, v. 72, p.101–106.

Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., Alem, F., Hamed, H. A., Roza, C. T., Boucher, J., Van Rooijen, N., and Gause, W. C. (2006). Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Medicine*, v.12, p.955–960.

Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., JR., Stadecker, M. J., Gause, W. C. (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*, v. 7, p. 975-87.

Babu, S., Blauvelt, C. P., Kumaraswami, V., Nutman, T. B. (2005). Diminished expression and function of TLR in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. *J Immunol*, v. 175, p. 1170-6.

Babu, S., Blauvelt, C. P., Kumaraswami, V., Nutman, T. B. (2006). Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol*, v. 176, p. 3885-9.

Barcante, J. M., Barcante, T. A., Dias, S. R., Vieira, L. Q., Lima, W. S., Negrao-Correa, D. (2003). A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res*, v.89, p. 89-93.

Bennett, A., Guyatt, H. (2000). Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. *Parasitol Today*, v. 16, p. 71-4, 2000.

Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, v. 8, p. 345-50.

Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, v. 367, p. 1521-32.

Biswas, S., Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, v.11, p.889-896.

Biswas S.K., Mantovani, A.(2012).Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab*,v. 15, p. 432-437.

Bowman, D. D., Montgomery, S. P., Zajac, A. M., Eberhard, M. L., Kazacos, K. R. (2010). Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends Parasitol*, v.26, p. 162-167.

Brooker, S., Rowlands, M., Haller, L., Savioli, L., Bundy, D. A. P. (2000). Towards an atlas of human helminth infection in sub-Saharan Africa: the use of geographical information systems (GIS). *Parasitology Today*, v.16, p. 303–307.

Brooker, S., Bethony, J., Hotez, P. J.(2004). Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol*, v. 58, p. 197-288.

Brooker, S., Clements, A.C.A., Bundy, D. A. P. (2006). Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv. Parasitol*, v.6, p.223–265.

Brown, M. (2005). Intestinal helminths. *Medicine*, v. 33, p. 54-57.

Bungiro, R., Cappello, M. (2004). Hookworm infection: new developments and prospects for control. *Curr Opin Infect Dis*, v. 17, p. 421-6.

Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A., Locati, M. (2011). Iron Trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol*, v.32(6), p. 241-7.

Chang, N. C. A., Hung, S. I., Hwa, K. Y., Kato, I., Chen, J. E., Liu, C. H., Chang, A. C. (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem*, v. 276, p.17497–17506.

Chow, S. C., Brown, A., Pritchard, D. (2000). The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol*, v. 22, p. 21-9.

Cooper, E. S., Whyte-Alleng, C. A., Finzi-Smith, J. S., MacDonald, T. T. (1992). Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. *Parasitology*, v. 104 Suppl, p. 91-103.

Culley, F. J., Brown, A., Conroy, D. M., Sabroe, I., Pritchard, D. I., Williams, T. J. (2000). Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. *J Immunol*, v. 165, p. 6447-53.

Daland, G.A., Gottlieb, L., Wallerstein, R.O., et al. (1956). Hematologic observations in bacterial endocarditis. J Lab Clin Med, v.48, p.827–845.

Dalbeth, N., Callan, M. F. (2007). Phenotypic and functional analysis of synovial natural killer cells. *Methods Mol Med*, v.136, p.149-163.

de Baetselier, P., Namangala, B., Noë'l, W., Brys, L., Pays, E. and Beschin, A. (2001) Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis, *Int J Parasitol*, v.31, p.575–587.

de Silva, N.R., Brooker, S., Hotez, P.J., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol*, v. 19, p. 547-51.

Diaz, A., Allen, J. E. (2007). Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol*, v. 37, p. 3319-26.

Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J. P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun*, v.73, p.166–173.

Dzik, J. M., Golos, B., Jagielska, E., Zielinski, Z., Walajtys-Rode, E. (2004). A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*, v.26, p.197-205.

Edwards, P. J., Zhang, X., Frauwirth, A. K., Mosser, D.M. (2006). Biochemical and functional characterization of Three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*, v. 80(6), p. 1298-1307.

Erwig, L., Henson, P. M. (2007). Immunological Consequences of Apoptotic Cell Phagocytosis. *Am J Pathol*, v. 171(1), p. 2-8.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, v.101, p.890-898.

Fleming, A. F. (1982). Iron deficiency in the tropics. *Clin Haematol*, v. 11, p. 365-88.

Fleming, F. M., Brooker, S., Geiger, S. M., et al. (2006). Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop Med Int Health*, v.11 (1), p.56–64.

Fleming, B.D., Mosser, D. M. (2011). Regulatory macrophages: Setting the Threshold for Therapy. *Eur J Immunol*, v. 41, p. 2470-2525.

Fujiwara, R. T., Geiger, S. M., Bethony, J., Mendez, S. (2006a). Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol*, v. 28, p. 285-93.

Fujiwara, R. T., Cançado, G. G., Freitas, P. A., Santiago, H. C., Massara C. L., dos Santos Carvalho et al., (2009). *Necatoramericanus* infection: a possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3(3): e399.

Garside, P., Behnke, J. M., Rose, R. A. (1989). The immune response of male DSN hamsters to a primary infection with *Ancylostomaceylanicum*. *Journal of Helminthology*, v.63, p.251–260.

Gazi, U., Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, v. 214, p. 554-561.

Gaze, S., McSorley, J. H., Daveson, J., Jones, D., Bethony, M. J., Oliveira, L. M., Speare, R., McCarthy, J. S., Engwerda, R. C., Croese, J., Loukas, A. (2012). Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLoS pathogens*, v. 8(2), e1002520.

Gazzinelli-Guimarães, P.H., Souza-Fagundes, E., Cançado, G., Martins, V., Dhom-Lemos, L., Ricci, N., Bueno, L., Miranda, R., Guatimosim, S., Gazzinelli, A., Corrêa-Oliveira, R., Bartholomeu, D., Fujiwara, R.(2013). Cell apoptosis induced by hookworm antigens: a strategy of immunomodulation. *Front Biosci*, v. 5, P.662-75.

Geiger, S.M., Massara, C.L., Bethony, J., Soboslay, P.T., Correa-Oliveira, R.(2004). Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *ClinExpImmunol*, v. 136, p. 334-40.

Geiger, S. M., Caldas, I. R., Mc Glone, B. E., Campi-Azevedo, A. C., De Oliveira, L. M., Brooker, S., Diemert, D., Correa-Oliveira, R., Bethony, J. M. (2007). Stage-specific immune responses in human *Necatoramericanus* infection. *ParasiteImmunol*, v. 29, p. 347-58.

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, v.19, p.71–82.

Gerber, J. S., Mosser, D. M. (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol*, v.166(11), p. 6861-8.

Goerdts, S., Orfanos, C. E. (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen presenting cells. *Immunity*, v.10, p. 137–142.

Goldring, M. B., Krane, S. M. (1987). Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J BiolChem*, v. 262(34), p. 16724–16729.

Gonçalves, J. F., Tanabe, M., Medeiros, FdPdM., Aca, Ids., Motta, SRNd., Tateno, S., Takeuchi, T. (1990). Parasitological and serological studies on amoebiasis and other intestinal parasitic infections in the rural sector around Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 32, p. 428-435.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Rev Immunol*, v. 3, p. 23–35.

Gordon, S., Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol*, v.5, p. 953–964.

Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, v. 37, p.S9–S17.

Gordon, S., Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, v. 32(5), p. 593-604.

Grage-Griebenow, E., Flad, H. D., Ernst, M. (2001). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets, *J LeukocBiol*, v.69, p. 11–20.

Hasko, G., Pacher, P., Deitch, E. A., Vizi, E. S. (2007). Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *PharmacolTher*, v.113, p. 264–275.

Herbert, D. R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., et al. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during

schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, v. 20, p.623–635.

Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A.W., Pearce, E. J., Wynn, T.A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type1/type2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol*, v. 167, p. 6533–6544.

Heukelbach, J., Feldmeier, H. (2008). Epidemiological and clinical characteristics of hookworm-related cutaneous larva migrans. *Lancet Infect Dis*, v.8, p. 302-309.

Hotez, P.J., Zhan, B., Bethony, J.M., Loukas, A. et al. (2003). Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. *Int J Parasitol* v. 33, p. 1245-58.

Hotez, P. J., Brooker, S., Bethony, J. M., Bottazzi, M. E., Loukas, A., Xiao, S. (2004a). Hookworm infection. *N Engl J Med*, v. 351, p. 799-80.

Hotez, P.J., Bethony, J.M., Bottazzi, M.E., Brooker, S., Buss, P. (2005). Hookworm: “The great infection of mankind”. *PLoS Med*, v. 2(3), p. 187-191.

Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, v.2, e300.

Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L., Molyneux, D. H. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*, v. 373, p.1570–1575.

Hsieh, G. C., Loukas, A., Wahl, A. M., Bhatia, M., Wang, Y., Williamson, A. L., Kehn, K. W., Maruyama, H., Hotez, P. J., Leitenberg, D., Bethony, J., Constant, S. L. (2004). A secreted protein from the human hookworm *Necator americanus* binds selectively to NK cells and induces IFN-gamma production. *J Immunol*, v. 173, p. 2699-704.

Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A., Ravasi, T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol*, v. 72, p. 621–627.

Jardim-Botelho, A., Brooker, S., Geiger, S.M., Fleming, F., Souza Lopes, A.C., Diemert, D.J., Correa-Oliveira, R., Bethony, J.M. (2008). Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. *Trop Med Int Health*, v. 13, p. 458-67.

Ji, O., Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*, v. 6, p. 275-97.

Jutel, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2005). Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 137, p. 82-92.

Jutel, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2006a). Histamine receptors in immune regulation and allergen-specific immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am*, v. 26, p. 245-59, vii, 2006.

Jutel, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2006b). The role of histamine in regulation of immune responses. *ChemImmunol Allergy*, v. 91, p. 174-87.

Kalinkovich, A., Weisman, Z., Greenberg, Z., Nahmias, J., Eitan, S., Stein, M., Bentwich, Z. (1998). Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *ClinExpImmunol*, v. 114, p. 414-21.

Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972). A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 14, p. 397-400.

Klement, P., Augustine, J.M., Delaney, K.H., Klement, G., Weitz, J. I. (1996). An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab AnimSci*, v. 46, p. 286-90.

Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M., Sumida, T. (2001). Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18, BV11 doublenegative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*, v. 44, p. 1127-1138.

Kodelja, V., Muller, C., Politz, O., Hakij, N., Orfanos, C. E., Goerdts, S. (1998). Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*, v.160, p.1411–1418.

Kolls, J. K., Linden, A. (2004). Interleukin 17 family members and inflammation. *Immunity*, v.21, p. 467-476.

Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., Bettelli, E. (2007). Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*, v. 19, p. 362-71.

Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*, v. 19, p. 448-53.

Kumar, N., Gupta, P. S., Saha, K., Misra, R. C., Agarwal, D. S., Chuttani, H. K. (1980). Serum and intestinal immunoglobulins in patients of ancylostomiasis. *Indian J Med Res*, v.71, p.531–537.

Loke, P., Gallagher, I., Nair, M. G., Zang, X., Brombacher, F., Mohrs, M., Allison, J. P., Allen, J.E. (2007). Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol*, v.179(6), P. 3926-36.

Loukas, A., Prociv, P. (2001). Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 14, p. 689-703.

Loukas, A., Bethony, J. M., Mendez, S., Fujiwara, R. T., Goud, G. N., Ranjit, N., Zhan, B., Jones, K., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J. (2005a). Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *PLoS Med*, v. 2, p. e295.

Loukas, A., Constant, L.S., Bethony, J.M. (2005b). Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunol Med Microbiology*, v.43, p. 115-124.

Loukas, A., Bethony, J., Brooker, S., Hotez, P. (2006). Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, v. 6, p. 733-41.

Mackness, G. B. (1977). Cellular immunity and the parasite. *AdvExp Med Biol*, v.93, p. 65-73.

MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *AnnuRevImmunol*, v.15, p. 323-350.

Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., Allen, J. E. (2004). Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev*, v. 201, p. 89-116.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TrendsImmunol*, v. 23, p.549-55.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani S., et al. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, v.25, p. 677-686.

Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, v.23, p.344-346.

Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol*, v. 37, p.14 –16.

Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*, v.177, p. 7303–7311.

Martinez, O. F., Helming, L., Gordon, S. (2008). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 451-83.

Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *J Leuk Bio*, v.92, p. 1-10.

Maxwell, C., Hussain, R., Nutman, T.B., Poindexter, R. W., Little, M. D., Schad, G. A., Ottesen, E. A. (1987). The clinical and immunologic responses of normal human volunteers to low dose hookworm (*Necator americanus*) infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 37, p.126–1234.

Mendez, S., Valenzuela, J. G., Wu, W., Hotez, P. J. (2005). Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostomaceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect Immun*, v. 73, p. 3402-7.

Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. B., Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *JEM*, v. 201(5), p.747-754

Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leuk Bio*, v.73, p.209-212.

Mosser, D.M., Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat R Immunol*, v.8, p. 958-69.

Mudenda, B. N., Malone, B. J., Kearney, T. M., Mischler, D. P., et al. (2012). Modeling the ecological niche of hookworm in Brazil based on climate. *Geospatial Health*, v. 6(3), P. 11-23.

Muller, F., Tobler, H. (2000). Chromatin dimution in the parasitic nematodes *ascarisuum* and *parascarisunivalens*. *Int J Parasitol*, v.30, p.391-9.

Muller, R. *Worms and Human Disease*. (2001). Second Edition, The London School of Hygiene and Tropical Medicine, UKPublication Number of Pages: 320.

Murata, Y., Shimamura, T., Hamuro, J. (2002). The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *IntImmunol*, v.14(2), p. 201-12.

Nair, M. G., Cochrane, D. W., Allen, J. E. (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of *Ym1* and *Fizz1* that can be partly replicated *in vitro*. *Immunology Letters*, v. 85, p. 173.

Nathan, C., Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *ProcNatlAcadSci USA*, v. 97, p. 8841±8848.

Nawalinski, T. A., Schad, G. A. (1974). Arrested development in *Ancylostomaduodenale*: course of a self-induced infection in man. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.23, p.895–898.

Olatunde, B. O., Onyemelukwe, G. C. (1994). Immunosuppression in Nigerians with hookworm infection. *Afr J Med MedSci*, v. 23, p. 221-5.

Onyemelukwe, G. C., Musa, B. O. (2001). T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *Afr J Med MedSci*, v. 30, p. 255-9.

O`Shea, J .J., Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, v.28, p. 477-487.

Oshiro, T. M., Macedo, M. S., Macedo-Soares, M. F. (2005). Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascarissuum*. *Inflammation Research*, v.54, p.17-21.

Palmer, D.R., Bundy, D.A.(1995).Epidemiology of human hookworm and *Ascarislumbricoides* infestations in rural Gambia. *East Afr Med J*,v. 72, p. 527-30.

Palmer, D. R., Bradley, M., Bundy, D. A. (1996). IgG4 responses to antigens of adult *Necatoramericanus*: potential for use in large scale epidemiological studies. *Bull. World Health Organ*, v. 74, p. 381-86.

Periago, V. M., Bethony, M. J. (2012). Hookworm virulence factors: making the most of the host. *Microbes and Infection*, v. xx, p. 1-14.

Pit, D. S., Polderman, A. M., Baeta, S., Schulz-Key, H., Soboslay, P. T. (2001). Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with *Necatoramericanus* and *Oesophagostomumbifurcum*. *Parasitol Res*, v. 87, p. 722-9.

Pritchard, D. I., Quinnell, R. J., McKean, P.G. et al. (1991) Antigenic cross-reactivity between *N. americanus* and *Ascarislumbricoides* in a community in Papua New Guinea infected predominantly with hookworm. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.85, p. 511–514.

Pritchard, D.I., Walsh, E.A., Quinell, R. J., Raiko, A., Edmonds, P., Keymer, A. E. (1992). Isotypic variation in antibody responses in a community in Papua New Guinea to larval and adult antigens during infection, and following reinfection, with the hookworm *Necator americanus*. *Parasite Immunology*, v.14, p. 617–631.

Pritchard, D. I., Walsh, E. A. (1995). The specificity of the human IgE response to *Necator americanus*. *Parasite Immunol*, v. 17, p. 605-7.

Pritchard, D. I., Quinell, R. J., Walsh, E. A. (1995). Immunity in humans to *Necator americanus*: IgE, parasite weight and fecundity. *Parasite Immunol*, v. 17, p. 71-5.

Pritchard, D. I. (1995). The pro-allergic influences of helminth parasites. *MemInstOswaldo Cruz*, suplemento 2, p. 15-18.

Prociv P. (1997). Pathogenesis of human hookworm infection: insights from a ‘new’ zoonosis. *Chemical Immunology*, V.66, p. 62–98.

Pritchard, D. I., Brown, A. (2001). Is *Necator americanus* approaching a mutualistic symbiotic relationship with humans? *Trends Parasitol*, v. 17, p. 169-72.

Quinell, R. J., Pritchard, D. I., Raiko, A., Brown, A. P., Shaw, M. A. (2004). Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *J Infect Dis*, v. 190, p. 430-8.

Raes, G., de Baetselier, P., Noë'l, W., Beschin, A., Brombacher, F., Hassanzadeh, Gh. G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J LeukocBiol*, v. 71, p.597–602.

Rey, L. *Parasitologia: Ancilostomídeos e Ancilostomíase: e os parasitos*. (2001). 3ª ed., Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, p.601.

Reece, J. J., Siracusa, M. C., Scott, A. L. (2006). Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun*, v.74, p. 4970-4981

Reece, J. J., Siracusa, M. C., Southard, T. L., Brayton, C. F., Urban, J. F., Jr., Scott, A. L. (2008). Hookworm-induced persistent changes to the immunological environment of the lung. *Infect Immun*, v. 76, p. 3511-24.

Ricci, N., Fiúza, A.J., Bueno, L., Cançado, G., Gazzinelli-Guimarães P. H., Martins, V G., Matoso, L., Miranda, R., Geiger, S. M., Correa-Oliveira, R., Gazzinelli, A., Bartholomeu, D., Fujiwara, R. T. (2011). Induction of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells during Human Hookworm Infection Modulates Antigen-Mediated Lymphocyte Proliferation. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5(11), e1383.

Roche, M., Layrisse, M. (1966). The nature and causes of "hookworm anemia". *Am J Trop Med Hyg*, v. 15, p. 1029-102.

Rodriguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L. E., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I. (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taeniocrassiceps*. *Infect Immun*, v. 72, p. 4552-4560.

Sakti, H., Nokes, C., Hertanto, W. S., Hendratno, S., Hall, A., Bundy, D. A., Satoto. (1999). Evidence for an association between hookworm infection and cognitive function in Indonesian school children. *Trop Med Int Health*, v. 4, p. 322-34.

Semnani, R. T., Venugopal, P. G., Leifer, C. A., Mostbock, S., Sabzevari, H., Nutman, T. B. (2008). Inhibition of TLR3 and TLR4 function and expression in human dendritic cells by helminth parasites. *Blood*, v. 112, p. 1290-8.

Sklenar, V., Miyashiro, H., Zon, G., Miles, T. H., Bax, A. (1986). Assignment of the ³¹P and ¹H resonances in oligonucleotides by two-dimensional NMR spectroscopy. *Febs letters*, v. 208, p. 94-98.

Silva, L. P., da Silva, R. M. G. (2010). Occurrence of entoparasites in ceters educations child of the municipality of Patos of Minas, MG, Brazil. *J Bioscience*, v. 26, p. 147-51.

Singh, K. K., Zhang, X., Patibandla, A. S., Chien, P.Jr., Laal, S. (2001). Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological

immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infect Immun*, v.69, p.4185-4191.

Sironi, M., Martinez, O. F., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., et al. (2006). Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, type 2). *J Leukoc Biol*, v.80, p.342–349.

Stein, M., Keshav, S., Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, v.176, p. 287-292.

Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immune: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*, v.6, p. 318-328.

Strassmann, G., Patil Koota V., Finkelman F., Fong M., Kambayashi T. (1994). Evidence for the involvement of interleukin-10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. *J Exp Med*, v.180, p.2365–2370.

Taylor, M. M., Turton, J. A. (1976). Antigen-induced lymphocyte blastogenesis in a hookworm (*Necator americanus*) infection in man. *Tropenmed Parasitol*, v. 27, p. 89-92.

Taylor, P. R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. (2005a). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol*, v. 26, p.104-10.

Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., Gordon, S. (2005b). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, v.23, p.901-44.

Teixeira-Carvalho, A., Fujiwara, R. T., Stemmy, E. J., Olive, D., Damsker, J. M., Loukas, A., Corrêa-Oliveira, R., Constant, S. L., Bethony, J. M. (2008). Binding of excreted and/or secreted products of adult hookworms to human NK cells in *Necator americanus*-infected individuals from Brazil. *Infect Immun*, V. 76(12), p.5810-16.

Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J., John, S., Taams, L. S.(2007).CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *ProcNatlAcad*, v. 104, p.19446–19451.

Tissenbaum, H. A., Hawdom, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L., Ruvkun, G. (2000).A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditiselegans* and *Ancylostomacanicum*. *Proc. Natl Acad. Sci*, v. 97, p.460–465.

Torocsik, D., Bardos, H., Nagy, L., Adany, R. (2005). Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*, v.62, p.2132-9.

vanRiet, E., Hartgers, F. C., Yazdanbakhsh, M.(2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology*, v. 212, p. 475-90.

Vouldoukis, I., Riveros-Moreno, V., Dugas, B., Ouaz, F., Bécherel, P., Debré, P., Moncada, S., Mossalayi, M. D.(1995). The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *ProcNatlAcadSci*, v. 92(17), p. 7804-08.

Voll, R. E., Hermann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R. (1997).Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, v. 390, p.350–351.

Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R., Wynn, T. A. (2007).Immunopathology of schistosomiasis.*Immunol Cell Biol*, v. 85(2), p. 148-54.

Wirnsberger, G., Hebenstreit, D., Posselt, G., Horejs-Hoeck, J., Duschl, A. (2006). IL-4 induces expression of TARC/CCL17 via two STAT6 binding sites. *Eur J Immunol*, v. 36, p.1882–1891.

World Health Organization. (2005). New technology for sustaining deworming. Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Geneva.

World Health Organization. (2008). Worm control (www.who.int/wormcontrol). 3 de agosto de 2008.

World Health Organization. (2011). Eliminating Soil-Transmitted Helminthiasis as a public health problem in children progress report 2001–2010 and strategic plan 2011–2020.

Wynes, M. W., Riches, D. W. (2003). Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J immunol*, v. 171, p.3550-3559.