

**INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO PERFIL DE SÍNTESE DE
CITOCINAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DA INFECÇÃO
CRÔNICA PELO *Schistosoma mansoni***

Elaine Speziali de Faria

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Co-Orientadores: Rodrigo Corrêa-Oliveira

Jeffrey Bethony

Área de concentração: Imunologia

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Elaine Speziali de faria

**INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO PERFIL DE SÍNTESE DE
CITOCINAS EM INDIVÍDUOSPORTADORES DA INFECÇÃO
CRÔNICA PELO *Schistosoma mansoni***

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-Orientadores: Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira

Dr. Jeffrey Bethony

Área de concentração: Imunologia

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção
Do Título de Doutor em Ciências

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do
Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e
Laboratório Celular e Molecular do
Centro de Pesquisas René Rachou do
Instituto Oswaldo Cruz

Apoio Financeiro: Organização Mundial de Saúde (WHO),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

“O correr da vida embrulha tudo
A vida é assim:
Esquenta e esfria,
Aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta,
O que ela quer da gente é coragem”.

(Guimarães Rosa)

Aos meus queridos pais Luiz e Marly, e ao meu irmão Dálcio, por me fortalecerem sempre e me ajudarem a trilhar mais esse caminho pedregoso e ao mesmo tempo tão lindo. São meus exemplos de perseverança e luta.

Simplesmente obrigada por fazerem parte da minha vida!

À Ana

“Da gratidão surge a nobreza e os sentimentos mais puros, visto que nela reside o mais puro excelso da natureza”.

Obrigada pela orientação e confiança em mim!

Às amigas: Andréa, Ariane, Denise, Lorena e Vanessa

“Na vida nos deparamos com pessoas comuns, mas que se fazem especiais não por suas qualidades específicas, nem por virtudes admiráveis. Especiais sim, por serem capazes de conquistar o outro, com humildade”.

Obrigada por fazerem do meu ambiente de trabalho um lugar especial!

Agradecimentos aos Colaboradores

- Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela sua valiosíssima colaboração e orientação na análise, interpretação e discussão de todos os resultados desse trabalho.

- À Dr^a. Andréa Gazzinelli, pela coordenação de todo o trabalho de campo nas áreas endêmicas de Virgem das Graças e Córrego do Onça.

- À Dr^a. Lúcia Alves O. Fraga, por todo o trabalho de campo e coleta de material nas áreas endêmicas.

Agradecimentos Especiais

À Dr^a. Ana Maria Caetano de Faria, acima de tudo pela orientação, confiança, carinho, compreensão e pela amizade conquistada ao longo desses anos. Mas também pela competência profissional e exemplo de pesquisadora e imunologista que é.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira, pela sua co-orientação e, principalmente, por me aceitar com muito carinho e abrir as portas do seu laboratório de Imunologia Celular e Molecular dando-me a oportunidade para desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Jeffrey Bethony, pela sua co-orientação e sua contribuição fundamental na realização da parte epidemiológica e estatística deste trabalho.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela sua valiosíssima colaboração, orientando-me na análise de todos os resultados através da utilização do FACS. Uma pessoa especial e, acima de tudo, um exemplo de pesquisador.

À Andréa, uma pessoa admirável. Só tenho a agradecer, pela contribuição incontestável na minha vida profissional, pelas inúmeras discussões e, pela sua terna amizade.

À Ariane, Denise, Isabela Gusmão, Lorena e Vanessa pela participação e inquestionável auxílio na parte experimental deste trabalho.

À Clari, Tiza e Eliane, obrigada pelo apoio e carinho dispensados a mim.

À Ana Pacheco, pela sua dedicação em deixar nosso material de trabalho sempre muito bem limpo e organizado.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Celular e Molecular pela convivência tão boa e agradável no dia a dia.

Às amigas: Léia, Juscilene e Frank pela incontestável amizade e, por simplesmente, fazerem parte da minha vida nesses longos anos de trabalho.

Ao amigo Adolfo pelo auxílio e carinho em todos os momentos que necessitei nesta jornada.

À Alice, Dani, Magda e Wesley pelo carinho e apoio fundamental nesta etapa final.

Aos amigos do laboratório de Imunobiologia pelo carinho e gratificante convívio.

À Celise pela disposição em ajudar na parte burocrática.

Aos pacientes que sem os quais teria sido impossível a execução dessa tese.

Acima de tudo, a DEUS.

Muito Obrigada.

Índice

1. Introdução	23
1.1 Senescência e o sistema imune	23
1.2 A esquistossomose mansônica	28
A) Aspectos gerais	28
B) <i>Schistosoma mansoni</i> (ciclo de vida)	29
C) Patogenia da doença	29
1.3. Importância do sistema imune na esquistossomose	31
1.4. Senescência e esquistossomose	36
2. Objetivo geral	40
2.1 Objetivos específicos	40
3. Materiais e Métodos	41
3.1. Caracterização da população avaliada	41
3.2. Tabela 1: característica da população avaliada	42
3.3. Obtenção do antígeno solúvel do ovo do parasito (SEA)	42
3.4. Obtenção do antígeno solúvel do verme adulto (SWAP)	42
3.5. Análise de citocinas intracelulares em linfócitos totais do sangue periférico, após estimulação de curto prazo, <i>in vitro</i>	43
3.6. Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados	45
3.7. Análise estatística	45
3.8. “Desenho experimental” da população estudada	46

4. Resultados 48

4.1. Análise do perfil total de citocinas intracelulares em linfócitos e células NK de indivíduos negativos e infectados jovens, adultos e idosos após cultura *in vitro* sem estimulação 51

A) IL-2 total 51

B) IFN- γ total 53

C) IL-4 total 54

D) IL-10 total 57

4.1.1. Análise da frequência de sub-populações de células NK e linfócitos (B, TCD4 e TCD8) do sangue periférico positivos para as citocinas intracelulares do tipo 1 (IL-2 e IFN- γ) e do tipo 2 (IL-4 e IL-10) de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades 59

A) Células NK 59

B) Linfócitos B 61

C) Linfócitos TCD4 63

D) Linfócitos TCD8 65

4.2. Análise da frequência de sub-populações de células NK e linfócitos B, T CD4⁺, T CD8⁺ do sangue periférico positivos para citocinas do tipo 1 e tipo 2 de indivíduos negativos e infectados, após breve estimulação *in vitro* com SEA ou SWAP 67

A) Células NK 68

B) Linfócitos B 71

C) Linfócitos TCD4 74

D) Linfócitos TCD8 77

4.3. Contribuição dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ para o perfil de síntese de citocinas de indivíduos negativos e infectados em faixas etárias diferentes	80
5. Discussão	88
6. Conclusões	118
7. Bibliografia	119

Lista de Figuras

- Figura 1-** Análise de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo 24
- Figura 2-** Perfil total de síntese de IL-2 por linfócitos do sangue periférico, não estimulados, de indivíduos negativos e infectados, pertencentes a faixas etárias diferentes 30
- Figura 3-** Perfil total de síntese de IFN- γ por linfócitos do sangue periférico, não estimulados, de indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 32
- Figura 4-** Perfil total de síntese de IL-4 por linfócitos do sangue periférico, não estimulados, de indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 34
- Figura 5-** Perfil total de síntese de IL-10 por linfócitos do sangue periférico, não estimulados, de indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 36
- Figura 6-** Frequência de Células NK (CD16) positivos para as citocinas intracelulares IL-4 e IFN- γ não estimulados em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 38
- Figura 7-** Frequência de linfócitos B (CD19) positivos para as citocinas intracelulares IL-4 e IL-10 não estimulados, em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 40
- Figura 8-** Frequência de linfócitos T CD4 positivos para as citocinas intracelulares IL-2, IFN- γ , IL-4, e IL-10 não estimulados, em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 42
- Figura 9-** Frequência de linfócitos T CD8 positivos para as citocinas intracelulares IL-2, IFN- γ , IL-4, e IL-10 não estimulados, em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 44
- Figura 10-** Frequência de Células NK (CD16) positivas para as citocinas intracelulares IL-4 e IFN- γ estimulados com SEA ou SWAP em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 47

- Figura 11-** Frequência de linfócitos B (CD19) positivos para as citocinas intracelulares IL-4 e IL-10 estimulados com SEA ou SWAP em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 50
- Figura 12** Frequência de linfócitos T CD4 positivos para as citocinas intracelulares IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 estimulados com SEA ou SWAP em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 53
- Figura 13-** Frequência de linfócitos T CD8 positivos para as citocinas intracelulares IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 estimulados com SEA ou SWAP em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes 56
- Figura 14** - Perfil de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺ de indivíduos dos grupos entre 10 a 69 anos e, entre 70 a 95 anos negativos e infectados estimuladas ou não com os antígenos do parasito (SEA ou SWAP) 59
- Figura 15** - Perfil de células TCD8⁺IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺, de indivíduos dos grupos entre 10-24 anos e, entre 25-95 anos negativos estimuladas ou não com antígenos SEA ou SWAP 60
- Figura 16** - Perfil de células CD8⁺IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺, de indivíduos dos grupos entre 10-24 anos e, entre 25-95 anos infectados estimuladas ou não com antígenos SEA ou SWAP 61
- Figura 17** - Perfil de síntese de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades 62
- Figura 18** - Perfil de síntese de IL-2 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades 63
- Figura 19** - Representação gráfica resumida das alterações mais importantes encontradas em indivíduos jovens e idosos com relação à síntese de diferentes citocinas por populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico 65

Lista de Abreviaturas

- ACT:** indivíduos esquistossomóticos que apresentam a forma aguda da doença
- APC:** célula apresentadora de antígenos
- AICD:** morte celular induzida pela ativação
- BCR:** receptor de célula B
- CERC:** antígeno solúvel da cercária
- CD44:** receptor de adesão
- CD62L:** receptores ligados a migração de linfócitos para linfonodos periféricos
- CD45RB:** marcador de superfície ligado ao fenótipo de memória ou virgem das células T CD4⁺ e TCD8⁺
- CD3:** marcador de superfície para linfócitos
- CD4:** marcador de superfície para linfócitos T com função auxiliadora
- CD8:** marcador de superfície para linfócitos T com função citotóxica
- CD14:** marcador de superfície para população de monócitos
- CD16:** marcador de superfície para população de células NK e linfócitos T
- CD19:** marcador de superfície para população de linfócitos B
- ConA:** concanavalina A
- DTH:** hipersensibilidade do tipo tardia
- EAE:** encefalomielite autoimune experimental
- Fas:** molécula CD95
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína, equivalente à fluorescência tipo 1
- FLS:** FACS Lysing Solution, solução de lise de eritrócitos
- FL1:** fluorescência do tipo 1 (verde)
- FL2:** fluorescência do tipo 2 (laranja)
- FSC:** difração do raio laser, proporcional ao tamanho celular
- GALT:** tecido linfóide associado à mucosa
- ICAM-1:** *intercellular adhesion molecule-1*
- IL-2:** interleucina 2
- IL-2R:** receptor de IL-2

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-10: interleucina 10

rIL-10: IL-10 recombinante

IL-13: interleucina 13

IFN- γ : interferon-gama

HPA: *hypothalamic-pituitary-adrenal*

KLH: *Keyhole limpet haemocyanin*

LFA-1: *leucocyte functional antigen-1*

MCP-1: Proteína quimiotática para monócitos 1

MFF: mack's facs fix, solução fixadora para ensaios de fluorescência celular

MIP1- α : Proteína inflamatória quimiotática para macrófago -1 α

MG: Macrófagos do granuloma hepático

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

μ MT: camundongos deficientes em células B

NK: células *natural killer*

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

PB-SEA: pérolas de poliacrilamida conjugadas a SEA

PBS-P: solução permeabilizante de células

PBS-W: solução de lavagem de células

PE: ficoeritrina, equivalente à fluorescência do tipo 2

PFC: células formadoras de placas

PHA: *phytohemagglutinin M-form*

PMA: éster de forbol utilizado como estimulador inespecífico de células

RPMI: meio de cultivo celular para ensaios de estimulação *in vitro*.

SEA: antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma mansoni*

SWAP: antígeno solúvel do verme adulto de *Schistosoma mansoni*

SSC: refração e reflexão do raio laser, proporcional à granulosidade e complexidade interna de uma célula

TCR: receptor de célula T

TLR - *receptores do tipo Toll-like*

Thy 1⁺: células recém migradas do timo

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Trg: células T reguladoras

Resumo

A imunosenescência têm sido bem descrita em humanos e em uma variedade de espécies animais apresentando grande influência nas alterações funcionais do sistema imune que podem ser observadas tanto em órgãos linfóides, quanto nos componentes celulares do sistema imunológico. Foi demonstrado, por exemplo, alterações no fenótipo, repertório e ativação dos linfócitos, bem como no perfil de citocinas produzido por essas células. Existe, também uma forte associação entre resistência a infecções e reinfecções por parasitos helmínticos *Schistosoma sp.* e senescência. Na esquistossomose humana, por exemplo, a intensidade de infecção aumenta muito nas duas primeiras décadas de vida. A partir dos 30 anos de idade, esses mesmos indivíduos apresentam um declínio progressivo na intensidade da infecção que poderia ser devido à presença de mecanismos imunomoduladores. É uma doença crônica e se sobrepõe ao processo de envelhecimento. Nesse estudo, estudamos a influência das alterações imunológicas que ocorrem durante a senescência na esquistossomose humana. Indivíduos entre 10-95 anos de idade foram divididos em 4 grupos (10-24; 25-49; 50-69 e 70-95) de acordo com a intensidade da infecção em função dessa categoria (>100 ovos/g fezes), de ambos os sexos, moradores de área endêmica. Indivíduos que se mostraram negativos para ovos no exame de fezes pertencentes às mesmas faixas etárias descritas acima foram considerados nosso grupo controle. Nós analisamos, por citometria de fluxo, o perfil de síntese de citocinas por leucócitos do sangue periférico (células NK, linfócitos B, TCD4 e TCD8) após incubação *in vitro* de 5 horas com meio de cultura ou com os antígenos (SEA ou SWAP). Ao analisarmos os leucócitos totais do sangue periférico observamos, na cultura não estimulada, que o envelhecimento está associado ao aumento do percentual de IL-10 por leucócitos do sangue periférico em indivíduos idosos negativos e infectados, sugerindo um aumento na capacidade de modular a infecção maior que os indivíduos jovens. Além disso, também observamos paralelo ao aumento de IL-10, o aumento no percentual de IL-2 por esses leucócitos nos indivíduos infectados mais idosos (70-95 anos), sugerindo o aumento da reatividade celular ou apoptose das células. O perfil de síntese de citocinas por células NK, linfócitos B, TCD4 e TCD8, não estimulados, mostrou-se também bastante alterado

com o envelhecimento. Nós observamos que, na idade jovem, há uma grande participação dos linfócitos T CD8⁺ caracterizado pelo aumento IL2⁺,IFN- γ ⁺,IL-4⁺. Com a infecção, esse perfil muda, levando à diminuição dessas células positivas para IL-2 e IL-4, mas mantendo alto o percentual de células positivas para IL-10 e IFN- γ . Com o envelhecimento, observamos um perfil diferente. Existe uma grande contribuição de células T CD4⁺ caracterizado pelo aumento de células IL-10⁺ e IFN- γ ⁺. Com a infecção, evidenciamos uma forte contribuição de ambas as subpopulações de linfócitos. Ocorre a diminuição de células T CD4⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ e o aumento de células CD4⁺IL-2⁺. Com relação aos linfócitos T CD8⁺, ocorre uma leve diminuição de células IL-4⁺ e IFN- γ ⁺ e um aumento de células CD8⁺ IL-10⁺ nessa faixa etária. Ao estimularmos a cultura de células com antígenos solúveis do ovo (SEA) ou antígenos solúveis do verme adulto (SWAP), os indivíduos idosos infectados (70-95 anos) mostraram um aumento no percentual de células CD16⁺IFN- γ ⁺ que não foi observado em indivíduos negativos idosos (70-95 anos) e, uma diminuição no percentual de linfócitos B positivos para IL-10. Os resultados mostram que as diferenças se localizam nos polos extremos da vida. Os indivíduos adultos entre 25 e 69 anos apresentam padrões relativamente estáveis de síntese de citocinas. No entanto, diferenças marcantes nos padrões de citocinas positivas principalmente para células CD4⁺, CD16⁺ e CD8⁺ foram observadas em indivíduos negativos e infectados acima de 70 anos de idade. Esses dados sugerem fortemente que as alterações imunológicas encontradas estão relacionadas ao processo do envelhecimento. Além disso, a manutenção do percentual elevado de IL10 (mesmo que sintetizado por diferentes populações celulares) nos indivíduos infectados idosos provavelmente está diretamente relacionada à indução de mecanismos imunomoduladores típicos da fase crônica da infecção. Podemos dizer que o envelhecimento tem um forte efeito no percentual de citocinas e na imunidade a infecção pelo *S. mansoni*.

Abstract

The immunosenescence have been well described in humans and in a variety of animal species presenting large influence on the immune system functional changes which can be observed both in lymphoid organs and in cell components of immune system. It was demonstrated, for example, changes on the phenotype, repertoire and lymphocyte activation, as well as on the cytokine profile produced by this cells. There are also a strong association between the resistance to *Schistosoma sp.* helminthic infection and reinfection and senescence. In human schistosomiasis, for example, the worm burden increase in the two first decades of life.

These same individuals, from the age of 30, show a progressive decline in the intensity of infection that could be due to the presence of immunomodulatory mechanisms. Schistosomiasis is a chronic disease and overlap to the aging process. This study, we assess the influence of the immunological changes that occur during senescence in human schistosomiasis. Individuals between 10 and 95 years old, of both gender, living in endemic area, were segregated in four groups of age (10-24; 25-49; 50-69 e 70-95). In each group, the subjects were categorized according the worm burden in either no eggs in faeces or more than 100 eggs/g of faeces. Individuals that presented no egg in faeces exam belonging to the same age group, described above, were considered our control group. We analyzed, with flow cytometry, the cytokine profile produced by periferic blood leucocytes (NK cells, B lymphocytes, T cells CD4+ and T cells CD8+) after 5 hours of in vitro incubation with either no stimuli or specific antigen stimulation (SEA or SWAP). When we analyzed the total leucocytes of periferic blood, we observed, in non-stimulated culture, that aging is associated to the increase of the frequency of leucocyte producing IL-10 from elderly infected and not infected, suggesting a greater ability to modulate the infection than young subjects. Moreover, we also observed, together to the increased of IL-10, the increase on the frequency of IL-2 in the leucocytes from older infected individuals (70 to 95 years old), suggesting the gain on the cellular reactivity or cell apoptosis. The cytokine profile produced by NK cells, B lymphocytes, T cells CD4+ and T cells CD8+, not stimulated,

shows also very altered with aging. We observed that, in younger ages, there are a strong participation of the T CD8 lymphocytes characterized by the increase of IL-2⁺,IFN- γ ⁺,IL-4⁺ cells. With infection, this profile changes, taking a decrease of this IL-2 and IL-4 positive cells, but keeping the high percentage of IL-10 and IFN- γ positive cells. With aging process, we observed a different profile. There is a important contribution of the TCD4 cells characterized by the increase of IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ cells. In the infection context, we noted a strong contribution of both the subpopulation of lymphocytes. It occurs a decrease of T CD4⁺IL-10⁺ and IFN- γ ⁺ cells and the increase of CD4⁺IL-2⁺ cells. Regarding to the TCD8⁺ lymphocytes, occurs a slight decrease of IL-4⁺ and IFN- γ ⁺ cells and an increase of the CD8⁺ IL-10⁺ cells in this age. With either the SEA-stimulation or SWAP-stimulation, the infected elderly (70 to 95 years old) showed an increase on the CD16⁺IFN- γ ⁺ cells percentage that was not observed in negative elderly (70 to 95 years old), and, a decrease on the B cells percentage IL-10 positives. The results shows that the differences are located in the extremes of lifetime. The adults subjects between 25 and 69 years old presents stables pattern of cytokine synthesis. However, outstanding differences on the positive cytokine pattern to CD4⁺, CD16⁺ and CD8⁺ cells were observed in negative and infected individuals over 70 years old. This data strongly suggest that the immunological changes found are aging-related. In addition, the maintenance of the high percentage of IL-10 (even that produced by different cells populations) in the elderly infected individuals probably is directed related to the induction of immunomodulatory mechanisms typical of the chronic phase of infection. We can say that aging has a strong effect on the percentage of cytokine and on the immunity to the *S. mansoni* infection.

1. Introdução

1.1. Senescência e o Sistema Imune

O processo de senescência tem sido bem descrito em humanos e em uma variedade de espécies animais, principalmente em roedores, como uma das grandes fontes de alterações funcionais do sistema imune. Tais modificações podem ser observadas tanto em órgãos linfóides, quanto nos componentes celulares do sistema imune. O principal efeito do envelhecimento no sistema imune pode ser observado no timo. Este órgão, local primário para desenvolvimento de células T, é composto pelas regiões cortical e medular que durante o processo de senescência sofre grande atrofia caracterizada pela perda da região cortical, mas não da região medular. Essa atrofia acarreta a perda de timócitos imaturos resultando na diminuição da população de células presentes nesse local. O mais importante é que alterações no epitélio cortical afetam a maturação das células T por interferência no processo de seleção dos linfócitos. Além disso, foi demonstrado que durante o envelhecimento a matriz extracelular presente no timo (importante para a manutenção da integridade desse órgão, bem como para o desenvolvimento dos timócitos) encontra-se aumentada, ocasionando, então, em uma timopoiiose degenerativa (Takeoka *et al.*, 1996).

Duas hipóteses são propostas para explicar a atrofia tímica associada ao envelhecimento. A primeira delas propõe que o número de células tronco migrantes da medula óssea para o timo está diminuído o que levaria à diminuição da produção de timócitos (Tyan, 1977; Eren *et al.*, 1990; Hartwing *et al.*, 1994). A segunda hipótese sugere que a atrofia tímica estaria relacionada à deficiência no processo de diferenciação das células progenitoras que migraram para o timo. Essa hipótese se fundamenta em análises fenotípicas dos estágios de diferenciação intratímica das células T de animais de várias idades as quais revelaram que o número de células imaturas $CD44^+ CD25^-$, que apresentam o fenótipo triplo-negativas $CD3^- CD4^- CD8^-$ não diminui com a idade. Entretanto, ocorre uma redução, nos animais idosos, na população de células T triplo negativas com o fenótipo $CD44^- CD25^+$ característico de células maduras. Este último

dados revelou uma ineficiência na transição do fenótipo mais imaturo para o mais maduro. Além disso, foi demonstrado que a deficiência no processo de diferenciação estaria relacionada ao rearranjo ineficiente do DNA para produção da cadeia β do TCR das células T (Aspinall, 1997; Thoman, 1997). Em conjunto, esses trabalhos sugerem que tanto a diminuição da frequência dos progenitores de células T que migram para o timo, bem como a disfunção no processo de diferenciação intratímica dos timócitos podem estar relacionados com a atrofia do órgão durante o envelhecimento.

Existem relatos na literatura mostrando que o envelhecimento também estaria relacionado a alterações nos fenótipos das células T periféricas. Tais alterações poderiam incluir mudanças em receptores de adesão (CD44), receptores ligados a migração de linfócitos para linfonodos periféricos (CD62L) e marcadores característicos dos fenótipos de “memória” ou “virgem” (CD45R) das células T $CD4^+$ e $CD8^+$, bem como alterações na proporção de tais células. Vários autores mostraram que camundongos idosos apresentariam uma diminuição na proporção de linfócitos T $CD4^+$, mas não de células T $CD8^+$, quando comparados com animais jovens. Além disso, a frequência de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados (caracterizado pela expressão $CD44^{hi} CD45RB^{lo} CD62L^{lo}$) nos animais idosos seria muito maior. Por outro lado, a proporção de células T “virgens” (caracterizada pela presença dos marcadores $CD44^{lo} CD45RB^{hi} CD62L^{hi}$) em camundongos idosos estaria diminuída (Ernst, 1993; Barrat *et al.*, 1995; Kurashima *and* Utsuyama, 1997; Timm *and* Thoman, 1999).

Entre outras observações relacionadas à composição das sub-populações de células T, Wakikawa e colaboradores observaram também a diminuição na expressão das cadeias α e β do receptor de IL-2 (CD25 e CD122 respectivamente, que são importantes no processo de proliferação celular) bem como na expressão da molécula co-estimuladora CD28 em células T estimuladas pelo mitógeno concanavalina A (ConA) em camundongos idosos quando comparado com os animais jovens (Wakikawa *et al.*, 1997). Essa diferença também foi observada em humanos, pois alguns autores demonstraram um aumento de linfócitos T $CD8^+CD28^-$ em indivíduos idosos após estimulação *in vitro*. A explicação seria a perda da expressão dessa molécula na membrana da célula e não a expansão de clones $CD28^-$ (Pawalec, *et al.*, 2001).

O acúmulo de células T expressando um fenótipo de “memória” em animais e indivíduos idosos poderia explicar algumas, mas não todas, as alterações associadas ao envelhecimento. Ele pode explicar, por exemplo, as alterações observadas no potencial para produção de citocinas secretado pelos linfócitos T de animais e indivíduos idosos, uma vez que as células T “virgens” secretam um perfil de citocinas diferente das células T ativadas. Um conjunto de experimentos mostrou que a síntese de IL-2 por células T CD4⁺ ativadas está diminuída em relação à síntese da mesma citocina pelas células “virgens”. Em contrapartida, a produção de citocinas efetoras tais como IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ por essas células T apresentou-se aumentada com o envelhecimento, fato consistente com a maior concentração de linfócitos T ativados nos animais idosos (Hobbs *et al.*, 1993, 1994). Além disso, observou-se que as alterações no perfil de citocinas relacionadas ao envelhecimento ocorrem gradualmente ao longo da vida do animal ou do indivíduo e não abruptamente no animal já senil (Hobbs *et al.*, 1993).

Em humanos, os resultados relacionados ao perfil de citocinas produzido por linfócitos T em idosos não são claros. Existem trabalhos que mostram o aumento na produção de IFN- γ (Born *et al.*, 1995) ou a sua diminuição (Candore *et al.*, 1993, Caruso *et al.*, 1996). Para a produção de IL-4 também alguns autores relatam, outros não observam alteração na sua produção (Al-Rayes *et al.*, 1992, Candore *et al.*, 1993, Caruso *et al.*, 1996). Com relação a IL-2, alguns autores mostram um impedimento na síntese desta citocina e essa diminuição poderia não estar associada a uma frequência alterada de linfócitos T CD45RA⁺ e CD45RO⁺, diferentemente do observado em modelos animais. O bloqueio na produção de IL-2 foi observado em indivíduos idosos que não apresentaram alterações nos fenótipos de células T CD45RA⁺/CD45RO⁺ (Karanfilov *et al.*, 1999). O aumento dramático na produção constitutiva de IL-6 e IL-10 observada em animais e humanos idosos parece estar relacionado a vários distúrbios na reatividade imunológica relacionados ao processo de senescência (Daynes *et al.*, 1993).

As células T CD8⁺ também sofrem alterações com relação à produção de citocinas durante o processo de envelhecimento. De maneira similar às alterações em linfócitos T CD4⁺, ocorre um aumento na produção de citocinas efetoras como IL-4 e de INF- γ e uma redução na secreção de IL-2 em animais idosos quando comparados com animais jovens (Mu *and* Thoman, 1999).

Esses defeitos na produção de citocinas, na verdade, refletem outras alterações importantes observadas durante o envelhecimento: a) o acúmulo de linfócitos T expressando um fenótipo de células ativadas, resultado do processo natural e cumulativo de ativação e da diminuição no aporte de células virgens do timo; b) mudanças nas interações com as células apresentadoras de antígeno que também apresentam alterações com o envelhecimento; c) várias alterações na transmissão de sinais nos linfócitos durante o envelhecimento.

Alterações na transmissão de sinais nos linfócitos T podem ser responsáveis pela deficiência na reatividade imunológica observada em idosos. Células T de animais e humanos idosos mostram defeitos na mobilização de cálcio (Miller, 1987, Lerner *et al*, 1988, Grossman, Ledbetter *and* Rabinovitch, 1990) e na fosforilação de proteínas (Patel *and* Miller, 1992) nos primeiros 5 minutos depois do contato com as células apresentadoras. O envelhecimento leva ao declínio na fosforilação promovida tanto por tirosina-quinases quanto por serina-treonina-quinases em resposta ao mitógeno ConA, aos anticorpos anti-CD3 e anti-TCR (Patel *and* Miller, 1992; Shi *and* Miller 1992) e a própria distribuição dessas quinases dentro da célula parece estar também bastante alterada (Grosh *and* Miller, 1995). Além disso, muitos autores também demonstraram uma diminuição na atividade das MAP-quinases que são essenciais para o crescimento e diferenciação celular, tanto em linfócitos T humanos quanto em murinos (Whisler *et al*, 1996, Gorgas *et al*, 1997). Assim, os próprios mecanismos moleculares de ativação dos linfócitos T, tanto através de seu receptor clonal quanto através da molécula de CD4, apresentam alterações marcantes no envelhecimento (Shi *and* Miller, 1992).

Uma série de trabalhos tem relatado também modificações na resposta humoral associadas ao envelhecimento. O efeito da idade na resposta proliferativa das células B, no entanto, ocorre em proporções mais limitadas. Alguns atribuem o declínio na atividade mitogênica das células B a uma redução no número de células reativas ao estímulo e não a alterações na capacidade de divisão destas (Abraham, Tal *and* Gershon, 1977). Em contraste, existem autores que acreditam que a redução da resposta proliferativa das células B estaria relacionada a um defeito intrínseco às células B específicas e não ao seu número reduzido (Averill *and* Wolf, 1985).

Souvannavong e colaboradores, adeptos da ideia de que a resposta humoral estaria relacionada a uma redução no número de células reativas ao estímulo, observaram que populações de células totais do baço de animais idosos apresentaram uma diminuição na resposta proliferativa quando comparados com os animais jovens, embora a cinética da resposta de ambos os grupos tenha sido semelhante. Entretanto, ao comparar linfócitos B purificados de animais jovens e idosos, esta diferença não foi observada. Além disso, eles também mostraram uma resposta proliferativa reduzida das células totais esplênicas em animais idosos quando estimuladas com o mitógeno lipopolissacáride (LPS). Tal diminuição não foi observada na população de linfócitos B purificados mostrando, novamente, que a redução da capacidade de proliferação das células B associada à senescência seria mediada por outras células presentes no baço e não por defeitos da própria célula B (Souvannavong *et al.*, 1998).

A literatura também aponta uma forte associação entre resistência a infecções e reinfecções por parasitos helmínticos *Schistosoma sp.* e senescência. Foi demonstrado que a prevalência e a intensidade de infecção, observada pela presença e quantificação dos ovos nas fezes ou urina dos indivíduos infectados, aumentam progressivamente com a idade alcançando um pico máximo entre dez e vinte anos. Nas subseqüentes décadas de vida, tanto a prevalência quanto à intensidade de infecção diminuem progressivamente (Gryseels, 1994; Fulford *et al.*, 1998; Ouma *et al.*, 1998; Naus *et al.*, 1999). Na esquistossomose humana, por exemplo, a intensidade de infecção geralmente aumenta muito nas duas primeiras décadas de vida, como resultado do contato com águas contaminadas pelos indivíduos vivendo em áreas endêmicas. A partir dos 30 anos de idade, esses mesmos indivíduos apresentam um declínio progressivo na intensidade da infecção que poderia ser devido à presença de imunidade protetora adquirida.

Diante dessas evidências, fica clara a necessidade de estabelecermos correlações entre o processo de senescência e a resposta imunológica ligada à proteção e morbidade da esquistossomose em áreas endêmicas.

1.2. A Esquistossomose mansônica

Aspectos Gerais

A Esquistossomose é uma doença parasitária endêmica crônica, debilitante e, em muitos casos, fatal. A parasitose acomete indivíduos principalmente em áreas rurais e é endêmica em vários países tropicais. No homem a doença é causada por cinco espécies do gênero *Schistosoma*: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma haematobium*, sendo que somente a espécie *Schistosoma mansoni* é endêmica nas Américas, ocorrendo principalmente no Brasil, Suriname, Venezuela e ilhas do Caribe (Savioli *et al.*; 1997). Sua introdução no país se deu, provavelmente, a partir de meados do século XVI, com o ingresso de populações africanas, ocupadas em regime de escravidão com a cultura da cana-de-açúcar na região Nordeste. Condições ecológicas favoráveis e a presença do hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*) propiciaram a instalação da esquistossomose no Brasil (Pessoa *et al.*, 1987).

Atualmente, a esquistossomose é a segunda principal doença parasitária e afeta acima de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, causando em torno de 500 mil mortes anualmente (Capron *et al.*, 1995; Waine and MC Manus, 1997). No Brasil existe uma vasta área endêmica que se estende do norte do Estado do Pará até o Rio Grande do Sul, sendo o litoral do Nordeste e o Estado de Minas Gerais os mais atingidos (Pessoa, 1987).

Esta parasitose é causada por um helminto pertencente à classe *Trematoda* e família *Shistosomatidae*. Sua transmissão ocorre pelo contato com água contaminada com a forma infectante do parasito, a cercaria, sendo o homem o grande responsável pela dispersão e manutenção da doença no meio ambiente e pela sua vasta distribuição geográfica (Pessoa, 1987). No Brasil, a infecção pelo *Shistosoma* é transmitida pelo parasito *Schistosoma mansoni* onde é popularmente conhecida como "xistose", "barriga-d'água ou "mal-do-caramujo".

***Shistosoma mansoni* (ciclo de vida)**

Esse parasito possui um complexo ciclo biológico envolvendo um hospedeiro vertebrado definitivo (homem) e um hospedeiro intermediário invertebrado (caramujo do gênero *Biomphalaria*) onde ocorrem a sua reprodução sexuada e sua reprodução assexuada respectivamente (Pessoa 1987).

A infecção tem início quando o indivíduo se expõe à água contaminada onde existem cercarias que são liberadas pelo hospedeiro invertebrado (caramujo). As cercarias, após penetrarem ativamente a pele ou mucosas, perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos que, então, caem na circulação sanguínea ou linfática e seguem para os pulmões. Posteriormente, os esquistossômulos migram para o sistema porta intra-hepático onde se desenvolvem e se transformam em vermes adultos 30 dias após a infecção. Logo depois, os vermes adultos machos e fêmeas migram acasalados, até a veia mesentérica inferior onde farão a oviposição. Cada fêmea põe aproximadamente 400 ovos por dia na parede de capilares e vênulas, sendo que a maioria chega à luz intestinal (esse período dura aproximadamente 6 dias) onde são eliminados junto com o bolo fecal. Outra parte dos ovos pode ficar alojada na mucosa intestinal ou no fígado. Os ovos presentes nas fezes eclodem ao entrarem em contato com a água liberando os miracídios que penetram no hospedeiro invertebrado (caramujo *Biomphalaria*) se transformando em esporocistos primários. Por reprodução assexuada, esses esporocistos primários dão origem a esporocistos secundários, que migram para as glândulas digestivas do caramujo. Nesse local, também por reprodução assexuada, cada esporocisto dá origem a numerosas larvas denominadas cercarias que são posteriormente liberadas na água reiniciando o ciclo (Pessoa, 1987).

Patogenia da doença

A evolução do processo patológico da esquistossomose humana se inicia com a deposição de ovos pelo parasito nos tecidos do hospedeiro. Estes são os principais responsáveis pela patologia da esquistossomose devido à sua localização em tecidos onde podem levar a formação de granulomas. Os principais sítios de depósito são o

intestino e o fígado. (Rey, 1991; Pessoa, 1987). O granuloma é uma reação granulomatosa (inflamatória) crônica resultante da reatividade do hospedeiro aos antígenos solúveis do ovo e é caracterizado pela presença de macrófagos, eosinófilos e linfócitos.

A esquistossomose é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A primeira apresenta uma fase pré-postural que ocorre cerca de 10-30 dias após a infecção e, algumas horas após a penetração das cercarias, observa-se um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos. A fase aguda propriamente dita aparece em torno de 50 dias e dura até cerca de 120 dias após a infecção. Ela é caracterizada pela disseminação dos ovos, principalmente na parede do intestino e no fígado provocando, então, a formação de granulomas cujo volume pode chegar até 100 vezes o volume do ovo. Os sintomas característicos desta fase são febre acompanhada de sudorese, calafrios, emagrecimento, diarreia, cólicas e alterações nas funções hepáticas. Também são observadas lesões hepatoesplênicas devidas principalmente a uma reação de hipersensibilidade do hospedeiro aos antígenos solúveis secretados pelos ovos presentes no fígado. Essa reação que é mais intensa no início da infecção decresce espontaneamente na fase crônica da doença.

A fase crônica, que se inicia por volta do 6º mês após a infecção, é caracterizada pela redução do tamanho dos granulomas em torno dos ovos que aparecem de maneira mais esparsa no fígado e também no intestino (mucosa e submucosa). Ela apresenta variações clínicas variando da forma intestinal benigna até as mais graves como a hepatoesplênica e hepatointestinal. Na fase crônica ocorre uma modulação da reatividade imunológica inflamatória que resulta na redução dos granulomas e da sintomatologia. As manifestações clínicas variam dependendo principalmente da localização e intensidade do parasitismo e da capacidade de reação imunológica do hospedeiro à infecção. Mas, de uma forma geral, pode ser caracterizada por diarreia com dor, desconforto abdominal. Nos casos mais graves ocorre ascite e varizes esofageanas e circulação colateral ocorrendo frequentemente desnutrição, o que afeta dramaticamente o estado geral do paciente.

1.3. Importância do sistema imune na esquistossomose

Diversos estudos, nos últimos anos, evidenciaram que o sistema imune desempenha um papel extremamente importante na esquistossomose humana e experimental, uma vez que a doença decorre da reatividade imunológica inflamatória aos antígenos solúveis liberados pelo ovo do parasito (Pessoa, 1987).

Normalmente, as infecções helmínticas estão associadas a reatividades distintas com relação ao perfil de citocinas predominante produzido dependendo da fase do desenvolvimento da doença. A descrição, em 1986, por Mosman e Coffman, da existência de dois padrões diferentes de citocinas secretados por linfócitos T CD4⁺ chamados de Th1 e Th2 (Mosman *and* Coffman, 1989a) trouxe um novo enfoque no estudo das doenças parasitárias. As citocinas secretadas por linfócitos Th1 são principalmente IL-2, IFN- γ e TNF enquanto que as citocinas características do padrão de linfócitos Th2 são IL-4, IL-5 e IL-10. Como IFN- γ e IL-4/IL-10 apresentam ações inibitórias para o padrão oposto, esses perfis não são mutuamente excludentes e apresentam efeitos inflamatórios opostos (Mosman *et al.*, 1986). Diferentemente de IL-4 e IL-5 que apresentam efeitos inflamatórios importantes, IL-10 é uma citocina essencialmente anti-inflamatória. Ela é capaz de inibir a diferenciação dos linfócitos Th1, suprimir a síntese de IFN- γ e modular a atividade de células dendríticas (Fiorentino, *et al.*, 1991; Sher, *et al.*, 1991). Além disto, IL-10 está associada a fenômenos reguladores importantes como a tolerância oral (Chen *et al.*, 1994, Rizzo *et al.*, 1999) e a modulação de reações inflamatórias como os granulomas hepáticos típicos da infecção por *S. mansoni*. Normalmente, a IL-10 é descrita como pertencendo ao padrão Th2, porém trabalhos mais recentes mostraram a existência de outros padrões de linfócitos T CD4⁺, chamados de Tr1 e Th3, que se caracterizam pela produção exclusiva de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Faria *and* Weiner, 1999). Outras células podem ainda secretar quantidades significativas de IL-10, como linfócitos B1 e mesmo células dendríticas (Sher *et al.*, 1991; Groux *et al.*, 1998). A descrição por Mosman de padrões de citocinas do tipo 1 e 2 em linfócitos T CD8⁺ (Tc1 e Tc2) também deve ser lembrada como outra contribuição importante no estabelecimento

desses padrões de reatividade criados pela produção de citocinas diferentes pelas mesmas populações celulares (Mosmann *and* Sad, 1986).

No início da infecção por *S. mansoni*, os vermes adultos se alojam nas veias mesentéricas do hospedeiro onde ocorre a liberação, em compartimentos intravasculares, de antígenos excretados do intestino e do tegumento do parasito. Tais antígenos provocam uma reatividade inflamatória caracterizada pelas citocinas do tipo 1, IL-2 e IFN- γ . Com o desenvolvimento da esquistossomose, ocorre a oviposição nos tecidos do hospedeiro com o aparecimento da reatividade inflamatória local aos ovos. Principalmente os ovos maduros excretam antígenos solúveis através dos microporos existentes na parede do ovo e induzem uma reação inflamatória granulomatosa pelo recrutamento de células inflamatórias. O surgimento e exacerbação da reação granulomatosa marca o início da fase aguda. Antígenos liberados dos ovos do parasito são processados e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC) tais como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas que estão também presentes no granuloma. A ativação de células T por APCs requer a participação de moléculas de adesão, de sinais provenientes de moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II, apresentando o antígeno processado, e de sinais coestimuladores, através de moléculas da família B7, as quais se associam à célula T via ligação com CD28 (Linsley *et al.*, 1990). Linfócitos T CD4⁺ específicos ativados secretam citocinas que promovem tanto a formação quanto a regulação do granuloma (Weinstock *and* Blum 1987). Com a deposição dos ovos, ocorre uma mudança importante no padrão de resposta imunológica para um perfil do tipo 2 com predomínio de citocinas como IL-4 e IL-5 embora a participação de TNF- α e INF- γ sejam de grande importância para o processo de recrutamento primário de células (Pearce *et al.*, 1991; Boros, 1994). O desenvolvimento do granuloma nesse estágio é predominantemente celular, principalmente, formado por eosinófilos, macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos (Weinstock, 1992). Na segunda fase de formação do granuloma, onde o seu diâmetro apresenta-se maior, há um predomínio das citocinas IL-4 e IL-5. Chensue e colaboradores utilizando modelos murinos, mostraram que, durante o curso da formação do granuloma, ocorre a produção local sequencial de INF- γ , IL-2 e IL-4. Os autores verificaram que o início da reação inflamatória contra os antígenos do ovo do parasito é

caracterizado pela produção de INF- γ enquanto que, no pico da reação granulomatosa, ocorre a produção expressiva de IL-4 (Chensue *et al.*, 1993).

Trabalhos utilizando análises, por citometria de fluxo, de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes que apresentavam a forma aguda da doença, demonstraram um aumento de células TCD4⁺ HLA-DR⁺ e células NK sugerindo assim a ocorrência de uma grande ativação celular durante essa fase. Essa ativação parece envolver um aumento na produção de IFN- γ por células NK que é importante para a ativação de macrófagos e diferenciação de linfócitos T (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998). Recentemente, Falcão e colaboradores, utilizando um modelo de granuloma *in vitro*, também demonstraram que a adição de anticorpos anti-IL-4 em culturas de PBMC de paciente com forma aguda ou hepatoesplênica diminuiu significativamente o tamanho do granuloma induzido *in vitro* com o antígeno SEA. Esses resultados apontam um importante papel dessa citocina na formação do granuloma e na manutenção da reatividade celular na forma grave da doença (Falcão *et al.*, 1998).

Após a fase aguda da doença, ocorre a diminuição espontânea da reação inflamatória ao redor dos ovos com redução do tamanho do granuloma, o acúmulo de fibrose, a diminuição da resposta proliferativa aos antígenos do parasito e da produção de citocinas do tipo 1. Esse processo é denominado “imunomodulação” (Andrade and Warren 1964). A base imunológica do fenômeno da imunomodulação ainda não está clara, mas vários mecanismos têm sido propostos ao longo dos anos. Alguns autores sugerem que a modulação da resposta imune e a hipossensibilidade aos antígenos do ovo seja devido a indução da anergia de linfócitos Th1 (Stadecker, 1992), ocorrendo como uma consequência da sua interação com APC tais como os macrófagos presentes no granuloma hepático. Outros autores, utilizando modelos murinos demonstraram que a interleucina 10 (IL-10) desempenha um papel importantíssimo nessa modulação (Flores-Villanueva, *et al.*, 1994). Falcão e colaboradores também demonstraram claramente que a IL-10 é uma citocina importante na regulação *in vitro* da reatividade granulomatosa de PBMC de indivíduos com forma intestinal da esquistossomose mansônica. O bloqueio dessa citocina no ensaio de formação *in vitro* do granuloma com células de indivíduos apresentando a forma intestinal resultou no aumento significativo do tamanho do granuloma. O mesmo não ocorreu com células de indivíduos na fase

aguda ou com a forma hepatosplênica da esquistossomose onde não ocorre imunomodulação (Falcão *et al.*, 1998). O papel da IL-10 no fenômeno é controverso. Alguns autores sugeriram que a IL-10 seria a principal causa da anergia das células apresentadoras de antígenos (APCs). A IL-10 exerceria função moduladora induzindo a diminuição da expressão da molécula do MHC de classe II nessas células, bem como a diminuição dos sinais co-estimuladores secundários tais como B7-2 e B7-1, afetando desta maneira a resposta de células Th antígeno específicas e, conseqüentemente, modulando a inflamação (De waal, *et al.*, 1993; Flores-Villanueva, *et al.*, 1993). Por outro lado, IL-10 pode ter ação direta na diferenciação e proliferação de linfócitos Th1 assim como na modulação negativa da atividade de macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1991).

Outros diferentes mecanismos estão envolvidos na regulação da reatividade ao ovo do *S. mansoni*. Há relatos do envolvimento dos linfócitos T com atividade supressora no processo de formação do granuloma hepático e fibrose na esquistossomose. Fidel e Boros detectaram, por exemplo, a presença de linfócitos T capazes de suprimir a proliferação celular e a produção de IL-2 por células do baço em camundongos infectados pelo parasito *S. mansoni* durante as fases aguda e crônica da doença (Fidel *and* Boros, 1990).

O papel das células B na resposta T CD4-dependente do hospedeiro é bem menos entendido e estudos realizados em camundongos depletados de linfócitos B sugerem o envolvimento dessas células na infecção por *S. mansoni* (Cheever *et al.*, 1985; Kitamura *et al.*, 1991; Ferru, *et al.*, 1998; Jankovic *et al.*, 1998). Jankovic e colaboradores relataram que camundongos deficientes em células B (μ MT) expostos ao parasito *S. mansoni* desenvolvem uma patologia tecidual aumentada (forma exacerbada do granuloma hepático e fibrose) durante a infecção aguda e, mais importante, esses animais não são capazes de modular a reação inflamatória durante o estágio mais avançado da infecção (fase crônica). Esses resultados sugerem que a modulação na fase tardia da reação celular granulomatosa pode envolver a participação dos linfócitos B.

Dados recentes de Carneiro-Santos e colaboradores sugerem que a apoptose de linfócitos no fígado pode ser um mecanismo importante na imunorregulação da fase crônica da esquistossomose (Carneiro-Santos *et al.*, 2000).

Vários trabalhos na literatura demonstram que o granuloma funciona como um sítio de ativação e imunopatogênese, uma vez que os antígenos solúveis liberados pelo ovo do parasito são capazes de induzir uma reação granulomatosa em locais distintos como o intestino e fígado. Tal reação é caracterizada pelo recrutamento de células potencialmente imunopatogênicas como linfócitos T. Essas células, ao serem ativadas através da interação entre o seu receptor de célula T (TCR) e o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) juntamente com peptídeos derivados dos antígenos do parasito presentes nas APCs produzem citocinas capazes de aumentar ou modular a inflamação tecidual. Esse papel duplo da reatividade ao ovo é um dos fenômenos mais intrigantes na doença. Ele pode estar relacionado tanto a particularidades antigênicas dos componentes do ovo quanto aos microambientes particulares onde o granuloma ocorre, ou seja, o fígado e a mucosa intestinal. O processo de mudança do perfil da inflamação, inicialmente do tipo 1, com o surgimento de citocinas inflamatórias como IL-4 e IL-5, afeta a formação do granuloma de forma marcante. Essas citocinas podem ser produzidas por linfócitos Th2 abundantes na mucosa intestinal (Iwasaki *and* Kelsall, 1999) ou por linfócitos TNK presentes em grande número no fígado e importantes produtores de IL-4 (Doherty *et al.*, 1999). Os próprios eosinófilos recrutados e ativados dentro do granuloma na fase aguda da doença podem participar como amplificadores do padrão Th2 típico da fase crônica. Por outro lado, tanto o intestino quanto o fígado podem ser considerados locais de imunorregulação, uma vez que células com atividade reguladora são frequentemente descritas nesses órgãos e sua participação em fenômenos de tolerância também está amplamente documentada (Crispe *and* Mehal, 1996). O mecanismo de ação de tais células reguladoras é ainda pouco claro, mas elas são capazes de secretar citocinas imunossupressoras como a IL-10 envolvidas na modulação da inflamação tecidual (Flores Villanueva *et al.*, 1993). A inativação de células imunopatogênicas também já foi postulada a partir de evidências do aumento na susceptibilidade dos linfócitos T sofrerem apoptose dentro do granuloma. Desta maneira, o granuloma parece apresentar um papel inflamatório patogênico e um papel imunorregulador no qual há o recrutamento e supressão de linfócitos específicos para os antígenos do ovo parasito (Rumbley *et al.*, 1998).

Se a reatividade inflamatória aos antígenos do parasito parece ser importante na imunidade adquirida e na proteção a reinfecção, o fenômeno da imunomodulação tem um papel fundamental na diminuição do dano tecidual e sua ausência está associada ao desenvolvimento das formas mais graves da doença em humanos e camundongos.

1.4. Senescência e esquistossomose

Como já mencionamos, o envelhecimento está associado a várias modificações funcionais do sistema imune. Tais alterações podem estar relacionadas à involução tímica, bem com as alterações no fenótipo, perfil de citocinas e no repertório de linfócitos. De um modo geral, animais e humanos idosos apresentam uma reatividade imunológica comprometida e uma diminuição na sua capacidade de reagir a antígenos novos. Está bem documentado na literatura a dificuldade em vacinar indivíduos idosos assim como sua maior suscetibilidade a infecções (Miller, 1996).

Existem algumas evidências na literatura mostrando modificações no desenvolvimento de doenças parasitárias ao longo do processo de envelhecimento no que diz respeito a sua gravidade e intensidade (Ndhlovu *et al.*, 1996; Ouma *et al.*, 1998; Naus *et al.*, 1999). Na esquistossomose humana, em particular, a intensidade de infecção, medida por número de ovos nas fezes, geralmente aumenta muito nas duas primeiras décadas de vida como resultado do contato com águas contaminadas pelos indivíduos vivendo em áreas endêmicas. A partir de 30-40 anos de idade, esses mesmos indivíduos apresentam um declínio progressivo na intensidade de infecção que aparentemente é concomitante à aquisição de mecanismos de imunoproteção e ao desenvolvimento da fase crônica da doença (Naus *et al.*, 1999). Em estudos realizados em uma comunidade rural localizada no Zimbábue (África), mostrou-se que indivíduos jovens entre 10 e 14 anos de idade apresentaram um pico máximo na intensidade da infecção pelo parasito *S. haematobium* (30,4 ovos/ml de urina) acompanhado pela diminuição gradual da intensidade da infecção em indivíduos acima de 44 anos de idade (5,3 ovos/ml de urina) (Ndhlovu *et al.*, 1996). Existem trabalhos documentando o fenômeno da resistência à reinfecção em indivíduos de meia-idade vivendo em áreas endêmicas no Brasil e na África (Butterworth, 1988).

A ênfase dos estudos relacionando a idade e infecção pelo *Schistosoma sp.* tem sido nesse perfil: um aumento na intensidade de infecção nas duas primeiras décadas de vida e o declínio subsequente. Há alguns relatos mostrando que, em indivíduos depois dos 60 anos, ocorre também um súbito aumento na intensidade de infecção (Fulford, 1998). No entanto, a ausência de estudos sistemáticos da reatividade imunológica de indivíduos idosos à infecção por *S. mansoni* tem impedido o entendimento dessa aparente perda da imunidade adquirida em indivíduos vivendo em áreas endêmicas por toda a sua vida.

Um estudo importante realizado em populações africanas sugere uma relação entre idade, intensidade da infecção e duração da infecção (Naus *et al.*, 1999). Nesse estudo, os autores foram capazes de se aproveitar de uma situação rara: analisar os índices de infecção entre indivíduos de diversas idades de uma população recentemente assentada em uma área endêmica. O fato de que os indivíduos infectados vivem na área desde a infância geralmente impede uma correlação direta entre infecção e idade, pois os dados obtidos pela contagem de ovos nas fezes normalmente se referem a reinfecção. Nos estudos relatados por Naus e colaboradores, duas populações foram avaliadas: um “grupo estabelecido” que era exposto durante anos ao parasito e um “grupo imigrante” vindo de uma área não endêmica. No “grupo estabelecido”, observou-se um pico máximo da infecção nos indivíduos jovens (15-20 anos) acompanhada de uma drástica diminuição a partir dos 30 anos que se manteve constante até os 55 anos de idade. Já no “grupo imigrante”, o padrão da intensidade da infecção foi bem mais baixo. Além disto, esse grupo apresentou um pico na intensidade da infecção mais tardiamente (indivíduos adultos de 30 anos). Similarmente ao “grupo estabelecido”, a partir dos 30 anos ocorria um declínio nessa intensidade que se mantinha constante até os 55 anos de idade. Um ano após a chegada do “grupo imigrante”, os estudos mostraram um aumento acentuado na intensidade da infecção nos indivíduos jovens (10 anos) desse grupo em relação aos primeiros estudos, com uma diminuição dessa intensidade a partir dos 20 anos de idade. Esses resultados sugerem que os indivíduos jovens do “grupo imigrante” apresentaram possivelmente um padrão de resposta aguda para a infecção pelo *S. mansoni*.

Alguns trabalhos também demonstraram que a reatividade imunológica do indivíduo frente aos antígenos liberados pelo parasito também pode ser influenciada pelo envelhecimento. Webster e colaboradores, estudando populações de áreas endêmicas,

mostraram alterações nos níveis de anticorpos em indivíduos jovens e idosos infectados pelo parasito *S. mansoni*. Foi observado um aumento significativo nos níveis de IgE nos indivíduos idosos (50 anos) quando comparado àqueles apresentados por indivíduos jovens (10-20 anos). Entretanto, esse aumento foi evidenciado somente para os antígenos do verme adulto (SWAP) já os níveis de IgE produzido por indivíduos idosos (50 anos) frente aos antígenos do ovo (SEA), apresentaram-se mais baixos quando comparados com aqueles produzidos pelos indivíduos jovens. Com relação aos níveis de IgG4, houve um aumento significativo na produção desse isotipo para ambos os antígenos em indivíduos idosos (50 anos). Esses resultados, além de mostrarem a influência do envelhecimento na produção de anticorpos durante a esquistossomose, também sugerem um possível papel protetor da IgE enquanto que a produção preferencial de IgG4 estaria associada à susceptibilidade (Webster *et al.*, 1997). Provavelmente ocorreria competição pelo sítio de ligação entre IgE e IgG4.

Bethony e colaboradores também obtiveram resultados interessantes em relação à intensidade de infecção por *S. mansoni* em indivíduos idosos na região endêmica de Melquíades, Minas Gerais. Os autores estudaram uma população de 634 indivíduos distribuídos em intervalos de 10 anos. Eles observaram, em acordo com a literatura, um aumento na intensidade da infecção, medida pela contagem de ovos nas fezes, em indivíduos jovens (10-20 anos), seguida de um declínio em indivíduos adultos (30-49 anos) e idosos (50-59 anos) sugerindo novamente a aquisição de imunidade adquirida na idade adulta. Surpreendentemente, eles também observaram que indivíduos acima de 60 anos de idade apresentaram um novo pico da intensidade de infecção, sugerindo uma possível perda dessa imunidade com o envelhecimento (Bethony *et al.*, 2001).

Uma hipótese plausível para explicar esse aumento súbito poderia ser um maior contato com águas contaminadas por parte dos indivíduos mais idosos. No entanto, dados na literatura mostram, ao contrário, uma diminuição drástica no contato com águas contaminadas em indivíduos acima de 60 anos (Ouma *et al.*, 1998).

Alternativamente, alterações imunológicas típicas da senescência podem estar envolvidas uma vez que a imunidade adquirida envolve interações entre linfócitos T, B e outras células do sistema imune. É possível que modificações no fenótipo, perfil de citocinas e no repertório dos linfócitos durante o envelhecimento contribuam para a

diminuição de proteção observada nos idosos (Todd *et al.*, 1979; Dunne *et al.*, 1992; Butterworth, 1998; Rumbley *et al.*, 1999).

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito do envelhecimento na resposta imune ligada à esquistossomose mansoni em áreas endêmicas. Como é um estudo transversal, ele não pretende extrair conclusões sobre a resistência e susceptibilidade à infecção. No entanto, a esquistossomose é uma doença crônica cujo desenvolvimento se sobrepõe ao processo também progressivo do envelhecimento. Assim, o estudo de parâmetros imunológicos apresentados por indivíduos infectados e negativos para a presença de ovos de *S. mansoni* no exame de fezes de diversas faixas etárias, nos permite traçar associações mais claras entre envelhecimento e o desenvolvimento da infecção.

2. Objetivo Geral

Estudar a influência do envelhecimento na reatividade imune celular durante a fase crônica da esquistossomose humana.

2.1 Objetivos específicos

1. Estudar a relação entre envelhecimento e o perfil de citocinas sintetizadas por leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni*. Foram analisados os seguintes parâmetros:
 - Perfil de citocinas intracelulares sintetizadas por leucócitos totais do sangue periférico de indivíduos negativos e infectados pelo parasito *S. mansoni*, após cultura *in vitro* sem estimulação;
 - Fenótipo e perfil de citocinas intracelulares sintetizadas por subpopulações de leucócitos do sangue periférico (células NK, linfócitos B, TCD4⁺ e TCD8⁺) de indivíduos negativos e infectados pelo parasito *S. mansoni*, após cultura *in vitro* sem estimulação;
2. Estudar o efeito da estimulação curta antígeno-específica *in vitro* sobre o perfil de citocinas sintetizadas por leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da infecção crônica pelo *S. mansoni*, em diferentes faixas etárias. Foram analisados os seguintes parâmetros:
 - Fenótipo e perfil de citocinas intracelulares sintetizadas por células NK, linfócitos B, TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico de indivíduos negativos e infectados pelo parasito *S. mansoni*, após a estimulação curta *in vitro* pelos antígenos do parasito (SEA ou SWAP).

3. Materiais e Métodos

3.1 Caracterização da população avaliada

Neste estudo, indivíduos jovens (10-24 anos), idade intermediária (25-49 anos) e idosos (50-69 e 70-94 anos) de área endêmica em Minas Gerais foram examinados e selecionados baseados nos exames parasitológico de fezes e clínico para a presença de ovos de *S. mansoni*. Foram separados também quanto à intensidade de infecção (negativos para ovos de *S. mansoni* nas fezes e >100 ovos/grama de fezes). Os estudos foram realizados com amostras de sangue de indivíduos portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose. A pesquisa de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos indivíduos foi realizada através do método descrito por Katz e colaboradores (Katz *et al.*, 1972) anteriormente à coleta do sangue.

Os estudos também foram realizados em indivíduos com exame negativo para ovos de *S. mansoni* nas fezes também moradores da área endêmica, como grupo controle. Esses indivíduos foram separados na mesma faixa etária do grupo de indivíduos infectados moradores da área endêmica.

Os indivíduos participantes deste estudo são residentes em Virgem das Graças e Córrego do Onça, áreas endêmicas para esquistossomose próxima ao vale do Jequitinhonha e Governador Valadares respectivamente. As características da população avaliada estão representadas na tabela 1.

É importante salientar que todo o estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.2 Tabela 1: Característica da população avaliada

Idade (anos)	Negativos	>100 ovos/g fezes
	Número de indivíduos	
10-24	12	06
25-49	09	09
50-69	19	05
70-95	07	06

3.3 Obtenção do antígeno solúvel do ovo do parasito (SEA)

Os ovos de *S.mansoni* são obtidos do fígado de camundongos suíços com 7 a 8 semanas de infecção com o parasito pertencente à cepa LE de *S. mansoni*. Após trituração do fígado em triturador, são ressuspensos em salina a 1,7% a 4° C. Essa suspensão é homogeneizada cerca de cinco vezes em homogeneizador de tecidos (30 segundos de homogeneização com intervalos de 60 segundos). Este procedimento é repetido até que não se detecte mais ovo, inteiro, na suspensão, o que pode ser confirmado, através da análise de parte do material numa lâmina ao microscópio ótico. Posteriormente o material obtido é centrifugado à 50000 g, durante 1 hora, a 4° C. O sobrenadante é coletado e deslizado contra PBS 0,015M pH 7,4 durante 24h. O conteúdo proteico presente no material é determinado pelo método descrito por Lowry *et al.*, 1951.

3.4 Obtenção do antígeno solúvel de verme adulto (SWAP)

O antígeno é preparado utilizando-se a técnica descrita por Colley e Freeman (1982) como descrito a seguir. Vermes adultos, machos e fêmeas, perfundidos de camundongos SWISS serão estocados a -70° C até o momento do processamento. Os vermes são submetidos à trituração em PBS 0,015M, pH 7.4, a 4° C até a obtenção de um homogenato. Em seguida, o homogenato é submetido à centrifugação a 45700x g durante 1 hora a 4° C. O sobrenadante será dialisado contra PBS 0,015M, pH 7.4, durante 48 horas, a 4° C e

esterelizado. A concentração de proteínas do extrato antigênico é determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.5 Análise de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico, após estimulação de curto prazo *in vitro*

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico são realizados seguindo o protocolo descrito a seguir.

Alíquotas de 500µl de sangue periférico coletado à vácuo em tubos de 10 ml contendo Heparina sódica, são pipetadas em 4 tubos de polipropileno de 5 ml (Falcon/BD), contendo 500 µl de RPMI-1640. Ao tubo 1 é adicionado apenas meio de cultura, sendo denominado de cultura-controle. Aos tubos 2 e 3 são adicionados respectivamente os antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (SEA), apresentando uma concentração final de 25 ug/ml e antígenos solúveis dos vermes adultos (SWAP), em uma concentração final de 25ug/ml, respectivamente. Ao quarto tubo, é adicionado 25 µl do éster de forbol PMA (phorbol –12 myristate –13 acetate) (SIGMA), a partir de uma solução estoque de 1mg/ml diluída 1/100 em RPMI 1640 (concentração final de 25ng/ml) (dados não apresentados). O PMA é um estimulador inespecífico da resposta imune e é utilizado como controle de produção potencial de citocinas pelas células. A esse tubo, é adicionado também 1 µl de Ionomicina 1mg/ml (concentração final de 1 µl/ml) (SIGMA). A Ionomicina mantém os níveis de cálcio intracelular altos, possibilitando um aumento na sensibilidade de detecção das citocinas. Os tubos contendo os antígenos são incubados por 1 hora em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37^o C. Em seguida, é adicionado em todos os 4 tubos de cultura 10 µl de Brefeldina A (SIGMA) 1mg/ml (concentração final de 10 µl/ml).as amostras são incubadas por mais 4 horas em estufa de CO₂ a 5% de umidade, a 37^o C. A utilização da Brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior da célula, uma vez que essa substância mantém a citocina no complexo de Golgi. Após a incubação, 110 µl de EDTA 20mM (SIGMA), obtido de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM) são adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras são incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados.

Posteriormente, é adicionado PBS-W (solução de lavagem de células) aos tubos contendo amostras do sangue cultivado até completar para 10 ml. Em seguida, os tubos são homogeneizados e centrifugados por 10 minutos, a 1300 RPM. Posteriormente, com o uso de uma bomba de vácuo, o sobrenadante é aspirado deixando apenas 2ml no tubo. São adicionados, então, 400µl de sangue em cada tubo de poliestireno já contendo 5µl do anticorpo de superfície marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para a avaliação das células B é utilizado o marcador CD19, para as subpopulações de células T CD4 e CD8 e para as células NK CD16, todos os anticorpos anti-marcadores de superfície são da marca PharMingen. Os tubos contendo sangue e anticorpos são homogeneizados e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células são lisadas e fixadas em 3ml de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) por 10 minutos à temperatura ambiente. As células são centrifugadas a 1300 RPM, por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante é descartado, as células são, então, lavadas com 500µl de PBS-W (PBS 0,015M pH7,4 contendo 0,5% de albumina sérica bovina-BSA: SIGMA e 0,1% de azida sódica: SIGMA) e permeabilizadas com 2ml de PBS-P (PBS 0,05M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA , 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina: SIGMA) (solução permeabilizante de células) e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, são centrifugadas a 1300 RPM a 18° C por 10 minutos. As células são novamente lavadas com 3ml de PBS-W e centrifugadas por 10 minutos, 1300 RPM a 18° C. O sobrenadante é descartado e as amostras contendo a suspensão celular são transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em U (Falcon/BD) já contendo 20 µl de cada anticorpo anti-citocina marcado com Ficoeritrina (PE) em uma diluição 1:50 anti-IL-2, IL-4, IL10 e INF-γ, todos os anticorpos anti-citocina são da marca PharMingen. Posteriormente, as células são incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, as células são primeiramente lavadas com 150 µl PBS-P centrifugadas e, em seguida, lavadas com 200 µl de PBS-W. No final, são adicionados 200 µl de solução fixadora MFF. As amostras contendo a suspensão celular a ser analisada são transferidas para tubos de 500µl e, posteriormente são submetidas à análise no citômetro de fluxo (FACScan-Becton-Dickinson).

3.6 Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados

As amostras são analisadas em citômetro de fluxo FACScan – Becton Dickinson. A aquisição dos dados e análise dos resultados está sendo realizada utilizando-se o software do equipamento denominado CellQuest. São coletados 30.000 eventos para a análise após estimulação *in vitro*. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares, das citocinas produzidas está sendo feita através de um sistema de computador acoplado ao citômetro. A Figura 1 mostra de forma esquemática a seqüência de procedimentos necessários para a análise dos dados do fenótipo celular e perfil de citocinas após estimulação *in vitro*. O primeiro passo consiste na identificação da população de leucócitos em estudo: os linfócitos (L). Na figura 1A temos um gráfico do tipo pontual (“dot plot”) onde pode-se avaliar o tamanho celular (FSC) versus a granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a mesma é analisada utilizando-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes na região selecionada, em gráficos de fluorescência 1 (FL1- fluorescência verde obtida pela marcação com isotiocianato de fluoresceína – FITC) versus fluorescência 2 (fluorescência laranja obtida pela marcação com ficoeritrina –PE). No exemplo apresentado na Figura 1B temos CD- FITC versus IL- PE.

3.7 Análise estatística

Será realizada utilizando-se testes específicos para comparar os grupos estudados, com o apoio instrumental dos softwares MINITAB FOR WINDOWS; EpiINFO. 6.04. As variáveis quantitativas serão analisadas utilizando a análise de variância. Os resultados serão avaliados utilizando a análise univariada e multivariada. O cálculo da amostra será baseado nos seguintes parâmetros: Limite de confiança: 0.95% (erro α de 0,05) e poder do teste (1- δ): 0,80. Utilizando o software Epi-Info, versão 6.0.

3.8 “Desenho experimental” da população avaliada

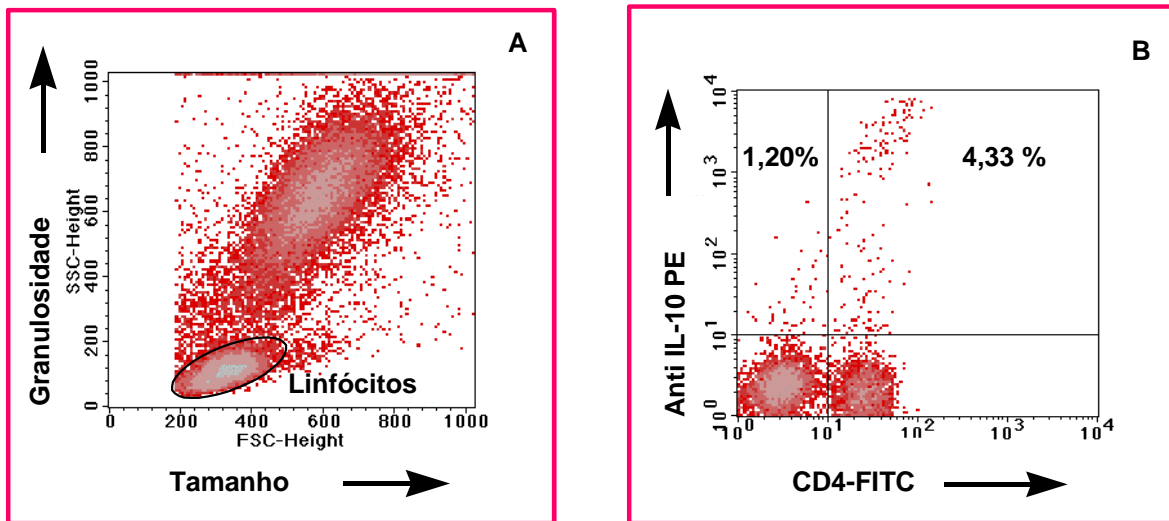
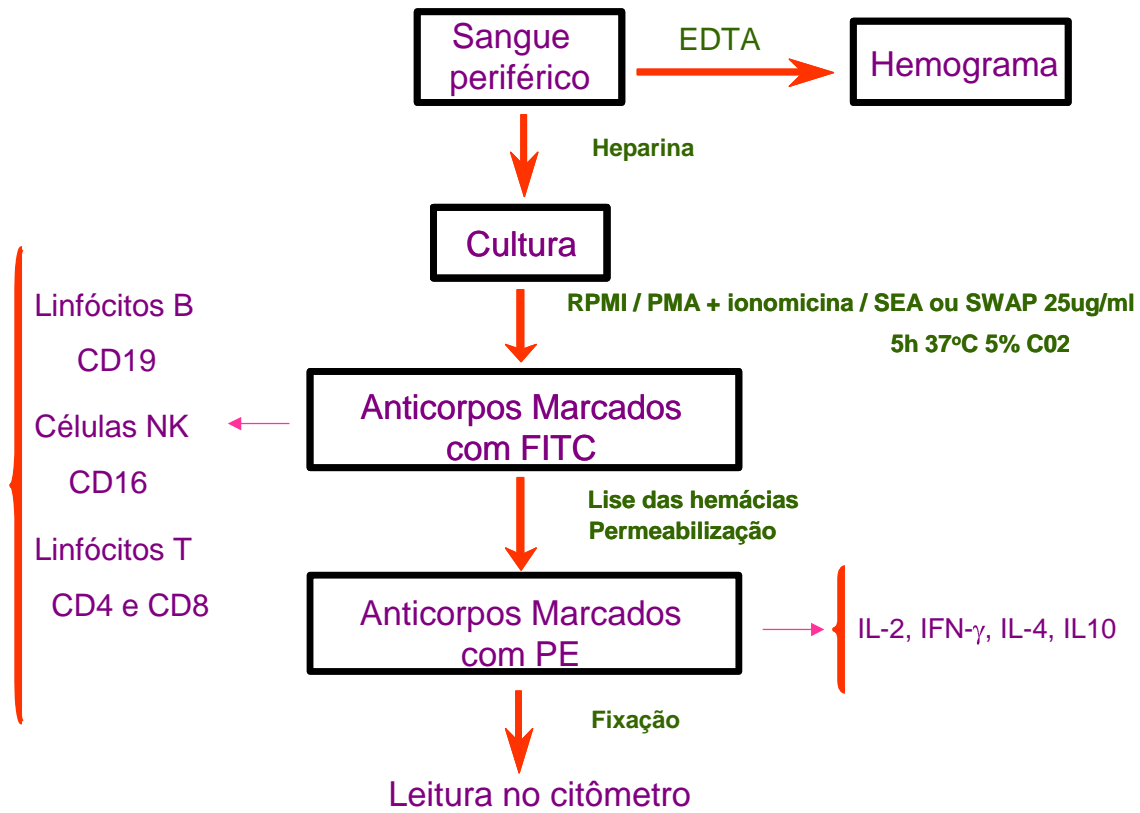


Figura 1: Análise de leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A **Figura 1a** representa um perfil celular de tamanho versus granulosidade, obtido após cultivo celular. A **Figura 2b** representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 1 (CD4-FITC) versus fluorescência 2 (IL-10-PE).

Estratégia Experimental



4 Resultados

A apresentação dos resultados foi realizada em duas partes: a primeira parte se refere aos dados obtidos na análise do perfil de citocinas intracelulares de leucócitos do sangue periférico após cultura *in vitro* sem estímulo, a segunda aos dados obtidos em condições diferentes de estimulação (estimulação com os antígenos obtidos em estágios evolutivos diferentes do parasito: (SEA ou SWAP) também *in vitro* dos leucócitos do sangue periférico.

As análises do perfil de citocinas intracelulares de populações e sub-populações de leucócitos do sangue periférico de indivíduos negativos para ovos de *S. mansoni* no exame de fezes ou infectados (>100 ovos g/fezes) foram realizadas na presença do meio de cultura RPMI, ou com os antígenos SEA e SWAP. Os resultados são expressos sob a forma de média do percentual de células positivas, simultaneamente tanto para o marcador de superfície celular quanto para a citocina de interesse.

Avaliamos as principais populações de leucócitos presentes no sangue periférico; linfócitos B, T e células NK, para traçarmos um perfil geral de citocinas presentes nesses indivíduos moradores em áreas endêmicas que se apresentaram negativos para ovos de *S. mansoni* no exame de fezes ou infectados (>100 ovos g/fezes). Para estudar diferenças no padrão imunológico entre esses dois grupos de indivíduos, analisamos inicialmente o perfil de células positivas para citocinas intracelulares do tipo 1 (IL-2 e IFN- γ) e do tipo 2 (IL-4 e IL-10) utilizando leucócitos em culturas-controle (na presença do meio de cultura RPMI). A segunda avaliação foi da cultura de leucócitos na presença dos antígenos obtidos de formas evolutivas diferentes do parasito, SEA (antígenos do ovo) e SWAP (antígenos do verme adulto). Essa análise teve como objetivo estudar o perfil de citocinas dos indivíduos mediante as estimulações específicas.

A abordagem empregada neste trabalho, utilizando amostras de sangue total permite traçar rapidamente um perfil da reatividade imunológica dos indivíduos infectados pela análise simultânea de todas as populações de leucócitos presentes no sangue periférico e a identificação das populações celulares produtoras das citocinas. Diferentemente dos métodos convencionais onde se utilizam células mononucleares

isoladas em gradiente de ficoll, a utilização do sangue total, incluindo o plasma, permite a avaliação da reatividade imunológica na presença de componentes autólogos solúveis que podem ser relevantes fisiologicamente, tais como anticorpos, receptores solúveis, citocinas e outros elementos. Dessa forma, trabalhando-se num sistema com características mais próximas àquelas presentes *in vivo*, podem-se obter informações mais detalhadas no que se refere à avaliação da resposta imune frente a uma infecção (Carrock-Sewell *et al.*, 1997; Suni *et al.*, 1998). A metodologia de estimulação de curto prazo *in vitro* foi padronizada no laboratório de Imunologia Celular e Molecular e Laboratório de Doença de Chagas do Instituto René Rachou com o objetivo de visualizar a síntese de citocinas em leucócitos do sangue periférico tais como neutrófilos e eosinófilos que não sobrevivem em cultura por um período muito longo. No nosso estudo, examinamos principalmente linfócitos e células NK. Como o tempo para a ativação *in vitro* de linfócitos T e B virgens é muito mais longo que 5 horas, acreditamos que os resultados que obtivemos após a adição dos antígenos se referem à estimulação de linfócitos já ativados *in vivo* e, principalmente, a estimulação dessas células assim como das células NK via receptores não clonais, tais como *Toll-like receptors*, por exemplo. Acreditamos que esse tipo de estimulação foi importante nos nossos resultados, pois nos forneceu alguns dados (principalmente com relação às células NK) relativos ao estado da imunidade inata nos indivíduos estudados.

Com relação ao efeito do envelhecimento na esquistossomose, a metodologia empregada na amostragem dos grupos separou os indivíduos pelas categorias idade e intensidade de infecção de tal forma que pudéssemos avaliar cada variável isoladamente. Para isso, os grupos foram divididos da seguinte forma: indivíduos jovens (10-24 anos), adultos (25-49 anos) e idosos (50- 69 e 70-95 anos) infectados com a mesma carga parasitária (>100 ovos g/fezes) ou indivíduos pertencentes às mesmas faixas etárias descritas acima que se mostraram negativos para ovos de *S. mansoni* no exame de fezes. A idade foi dividida nessas 4 faixas etárias específicas de acordo com a intensidade da infecção em função dessa categoria, segundo vários trabalhos na literatura (Ndhlovu *et al.*, 1996; Ouma *et al.*, 1998; Naus *et al.*, 1999). As fases mais importantes para a esquistossomose correspondem às primeiras e segundas décadas de vida do indivíduo na qual ele se infecta mais intensamente e a partir dos 30 anos até o

envelhecimento (até mais ou menos 60 anos) quando a infecção mostra-se modulada (Gryseels *et al.*, 1994). Com relação a essa última fase, para que obtivéssemos amostras em intervalos iguais resolvemos dividi-la em dois grupos os indivíduos adultos (25-49 e 50-69). O grupo de indivíduos mais idosos (70-95 anos) surgiu porque queríamos justamente analisar os possíveis fatores imunológicos envolvidos nas mudanças repentinas no padrão de resistência à infecção (modulação da infecção) por *S. mansoni* moradores de áreas endêmicas que apresentaram um aumento na intensidade da infecção depois dos 60 anos de idade. Esses dados foram obtidos em indivíduos também idosos (>70 anos) moradores da área endêmica de Melquíades - MG (Bethony *et al.*, 2001). Outro motivo para a inclusão de indivíduos mais idosos no nosso estudo foi a presença mais marcante dessa população nas áreas endêmicas recentemente e a oportunidade, portanto, de estudar o desenvolvimento da doença em uma população de idade bem avançada.

4.1 Análise do perfil total de citocinas intracelulares em células NK e linfócitos de indivíduos negativos e infectados jovens, adultos e idosos após cultura *in vitro* sem estimulação.

Os resultados a seguir se referem ao perfil total de citocinas (quadrantes 1 e 2 do gráfico de fluorescência 1 versus fluorescência 2: anticorpos marcados com FITC e PE respectivamente, representado na **figura 1b**) expresso por linfócitos totais (B e T) e células NK em indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes). Essa análise foi realizada através da média das subpopulações (NK+ B + TCD4 +TCD8/4) de cada indivíduo dentro de cada faixa etária e, posteriormente a média do grupo.

Nosso objetivo foi verificar se a idade dos indivíduos, de alguma maneira, influenciaria esse perfil. Para isso, separamos os indivíduos negativos e infectados nas quatro faixas etárias já descritas anteriormente (10-24; 25-49; 50-69 e 70-95 anos de idade) e analisamos, então, o perfil total de citocinas expresso por linfócitos e células NK em diferentes idades. As diferenças encontradas entre as faixas etárias e dentro dos grupos negativos ou infectados foram representadas pelas cruces e as diferenças entre os grupos negativos e infectados foram representadas pelos asteriscos.

A) IL-2 total

A **figura 2** mostra, em gráfico de dispersão, o percentual total de linfócitos e células NK do sangue periférico positivos para a citocina IL-2 por indivíduo e a média do valor percentual de células positivas também para IL-2 representada pelas barras, em indivíduos negativos e infectados jovens (10-24 anos), adultos (25-49 anos) e idosos (50-69; 70-95 anos).

Com relação à média do valor percentual de linfócitos positivos para essa citocina, foi possível observar no grupo negativo um aumento ($p < 0,05$) no percentual total de células positivas para IL-2 na faixa etária mais jovem (10-24 1,12%; 25-49 0,56%; 50-69 0,75%; 70-95 0,70%). Ao analisarmos o grupo infectado, observamos um

aumento ($p < 0,05$) na média do valor percentual total de células positivas para IL-2 nos indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos (1,5%).

Além disso, podemos observar que a presença da infecção está associada a um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual total de células positivas para IL-2 nos indivíduos idosos entre 70 e 95 anos de idade (de 0,70% para 1,5%).

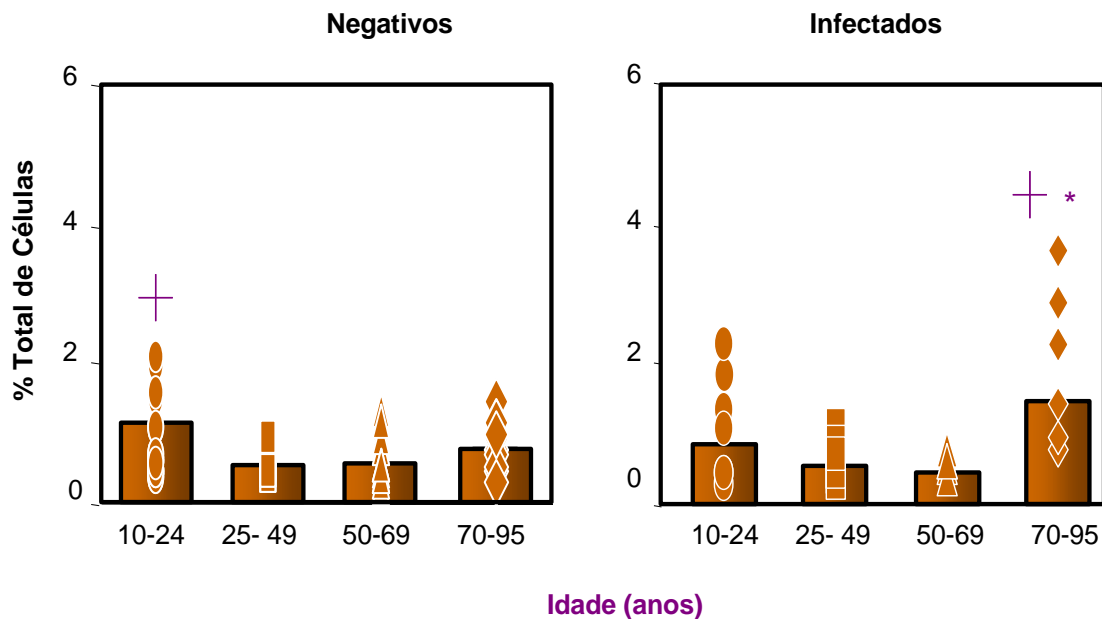


Figura 2: Perfil total de síntese de IL-2 por leucócitos do sangue periférico (células NK, linfócitos B, TCD4 e TCD8) não estimulados (cultura-controle), de indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes) pertencentes a faixas etárias diferentes. Os resultados estão representados sob a forma do valor do percentual de linfócitos totais positivos para essa citocina, por indivíduo (gráfico de dispersão) e, a média do valor percentual de células positivas (barras). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre a média do valor percentual entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam a diferença significativa ($p < 0,05$) dentro dos grupos.

B) IFN- γ total

De acordo com os resultados da **figura 3**, não observamos diferenças significativas entre os grupos de indivíduos negativos quando analisamos a média do valor percentual total de células positivas para IFN- γ . Com relação ao grupo infectado, observamos uma leve diminuição na média do valor percentual total para as células positivas para IFN- γ nos indivíduos jovens entre 10 e 24 anos (1,0%) e, 25 e 49 anos (1,13%) quando comparado com os demais indivíduos idosos (1,63% e 1,67%).

Nosso resultado também demonstra que a presença da infecção resultou na redução do percentual de células positivas para essa citocina nos indivíduos adultos entre 25 e 49 anos (de 1,64% para 1,13%).

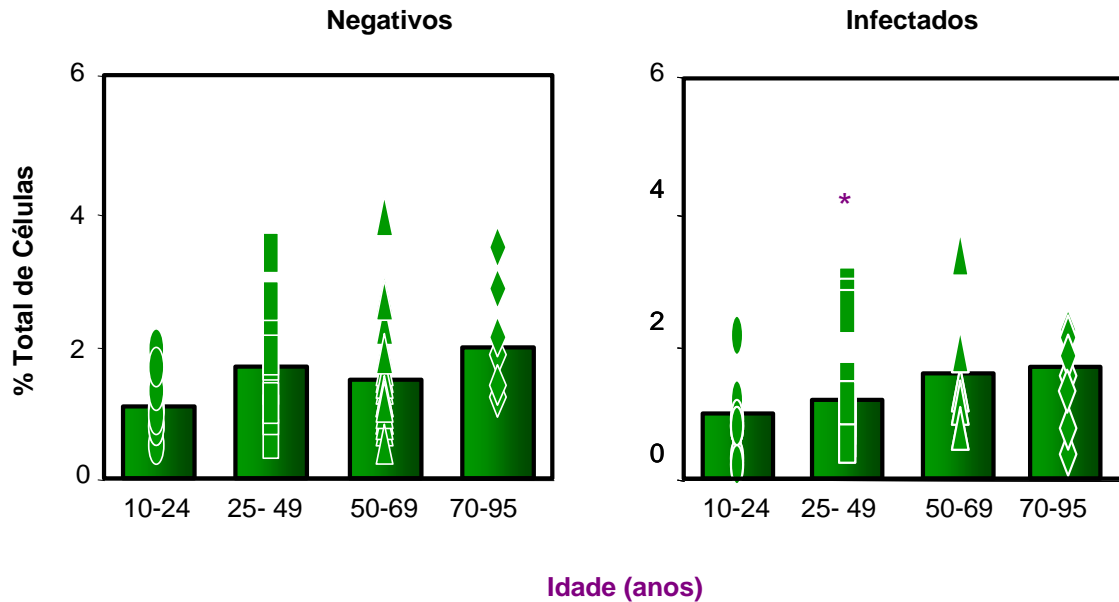


Figura 3: Perfil total de síntese de IFN- γ por leucócitos do sangue periférico (linfócitos B, TCD4, TCD8 e células NK) não estimulados (cultura-controle), de indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes) pertencentes a faixas etárias diferentes. Os resultados estão representados sob a forma do valor do percentual de linfócitos totais positivos para essa citocina, por indivíduo (gráfico de dispersão) e, a média do valor percentual de células positivas (barras). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre a média do valor percentual entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos.

C) IL-4 total

A **figura 4** mostra o perfil total de células positivas para IL-4 em indivíduos negativos e infectados jovens, adultos e idosos. Podemos observar que os indivíduos negativos adultos entre 25 e 49 anos e os mais idosos entre 70 e 95 anos apresentam um percentual total dessas células um pouco mais baixo (1,66% e 1,90% respectivamente) quando comparado ao percentual dos indivíduos mais jovens entre 10 e 24 anos (2,25%) e com os idosos entre 50 e 69 anos (2,27%) embora não tenhamos observado nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Nos indivíduos infectados, observamos apenas uma diminuição ($p < 0,05$) no percentual nos indivíduos entre 25 e 49 anos (1,16%) quando comparados aos demais grupos. No entanto, a presença da infecção resultou em alterações no percentual dessas células. Houve uma diminuição ($p < 0,05$) na média do valor percentual do grupo entre 25-49 (de 1,66% para 1,16%). Já nos idosos entre 50-69 anos (2,27% para 2,77%) e entre 70-95 anos, houve o aumento ($p < 0,05$) na média do valor percentual total nesses indivíduos (1,90% para 3,14%).

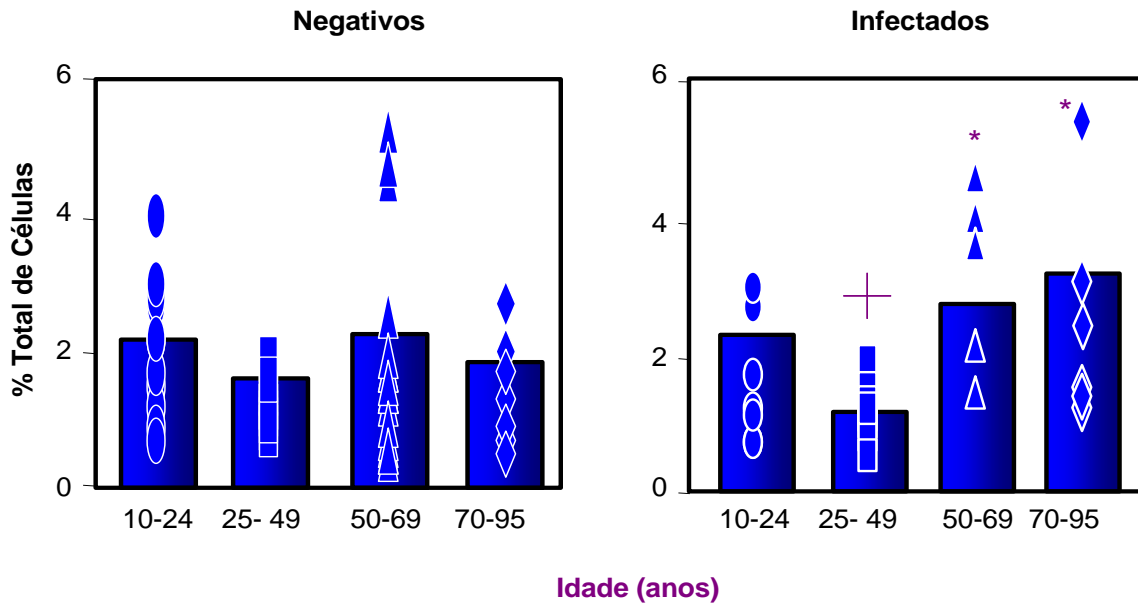


Figura 4: Perfil total de síntese de IL-4 por leucócitos do sangue periférico (células NK, linfócitos B, TCD4 e TCD8) não estimulados (cultura-controle), de indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes) pertencentes a faixas etárias diferentes. Os resultados estão representados sob a forma do valor do percentual de linfócitos totais positivos para essa citocina, por indivíduo (gráfico de dispersão) e, a média do valor percentual de células positivas (barras). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre a média do valor percentual entre os grupos negativos e infectados e, as cruzes representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos.

D) IL-10 total

De acordo com o resultado da **figura 5**, podemos observar o perfil total de síntese de IL-10 por linfócitos e células NK de indivíduos de diferentes idades, negativos e infectados.

Em relação aos resultados encontrados, observamos um aumento acentuado ($p < 0,05$) no percentual total dessa população celular nos indivíduos negativos mais idosos entre 70 e 95 anos (3,17%) quando comparado ao percentual dos indivíduos mais jovens entre 10 e 24 anos (2,45%), adultos entre 25 e 49 anos (2,52%) e idosos entre 50 e 69 anos (2,22%).

A infecção, por sua vez, resultou no aumento na média do valor percentual das células positivas para IL-10 nos indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos (4,02%) quando comparado com os valores nos demais grupos de indivíduos infectados (2,49%, 2,23% e 2,49% respectivamente).

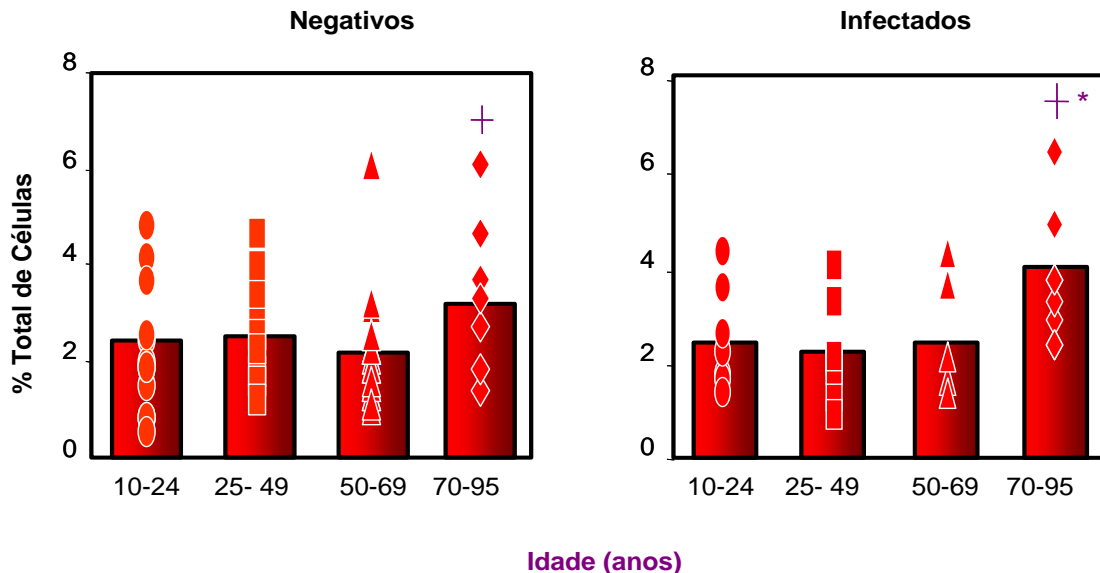


Figura 5: Perfil total de síntese de IL-10 por linfócitos do sangue periférico (células NK, linfócitos B, TCD4 e TCD8), não estimulados (cultura-controle), de indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes) pertencentes a faixas etárias diferentes. Os resultados estão representados sob a forma do valor do percentual de linfócitos totais positivos para essa citocina, por indivíduo (gráfico de dispersão) e, a média do valor percentual de células positivas (barras). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre a média do valor percentual entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos.

4.1.1 Análise da frequência de sub-populações de células NK e linfócitos (B, TCD4 e TCD8) do sangue periférico positivos para as citocinas intracelulares do tipo 1 (IL-2 e IFN- γ) e do tipo 2 (IL-4 e IL-10) de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades, em culturas não estimuladas.

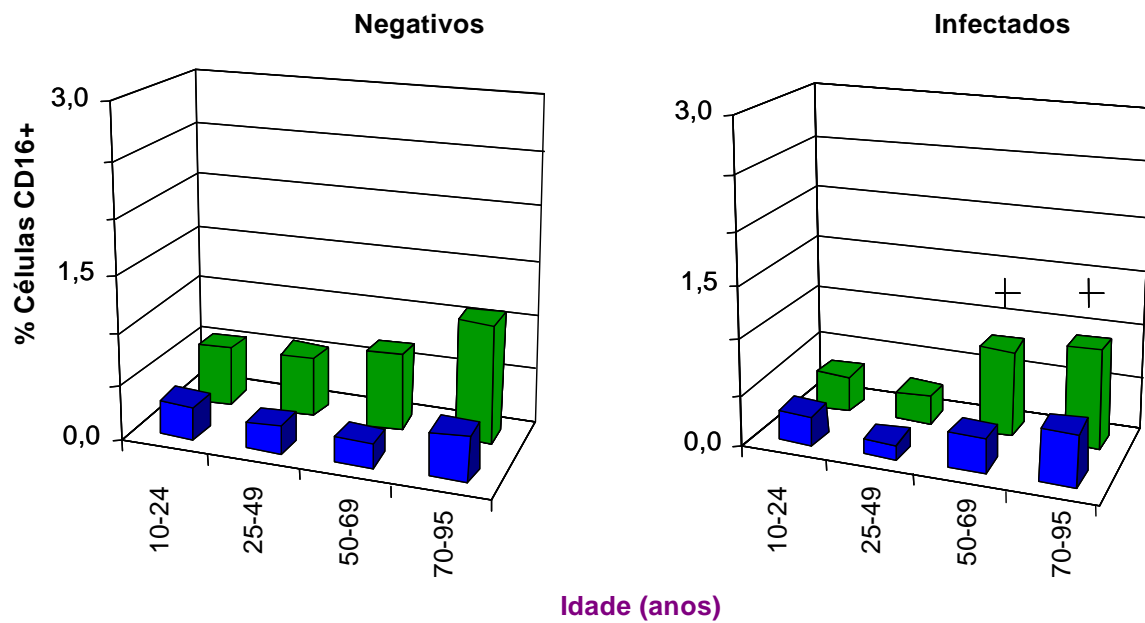
Nos dados anteriores, analisamos o percentual total de células NK e linfócitos de indivíduos negativos e infectados moradores de áreas endêmicas, com o objetivo de saber se a idade poderia influenciar, de alguma maneira, no perfil geral da produção dessas citocinas. Nosso próximo passo foi verificar se as diferenças encontradas no perfil imunológico dos indivíduos negativos e infectados jovens, adultos e idosos estariam refletidas em diferentes sub-populações de linfócitos positivos para as citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 e, o mais importante, verificarmos qual a contribuição dessas diferentes sub-populações para o perfil imunológico do indivíduo.

Para tal, analisamos a frequência de células duplo-positivas. Os resultados a seguir se referem, então, ao perfil de expressão intracelular de citocinas por linfócitos B, NK, T CD4⁺ e T CD8⁺ (quadrante 2 do gráfico de fluorescência 1 versus fluorescência 2: anticorpos marcados com FITC e PE respectivamente, representado na **figura 1b**) em indivíduos negativos e infectados (>100 ovos g/fezes).

A) Células NK

De acordo com a **figura 6**, podemos observar, dentro do grupo de indivíduos negativos, um aumento no percentual de células CD16⁺ positivas para IFN- γ a partir dos 70 anos (**1,08%**) quando comparados com os indivíduos jovens (**0,54%**) adultos (**0,56%**) e idosos entre 50 e 69 anos (**0,69%**), embora esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo.

Além disso, a presença da infecção levou a um aumento ($p < 0,05$) no percentual dessas células positivas para IFN- γ nos indivíduos idosos entre 50 e 69 anos (0,80%) e entre os mais idosos 70-95 anos (0,91%) em relação aos indivíduos mais jovens (**0,34%**) e adultos entre 25-49 anos (**0,25%**). Não observamos grandes alterações na frequência de linfócitos CD16⁺ IL-4⁺.

A**B**

Erro Padrão								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IFN- γ	0,14	0,13	0,18	0,17	0,10	0,04	0,28	0,04
IL-4	0,04	0,04	0,03	0,08	0,09	0,03	0,08	0,15

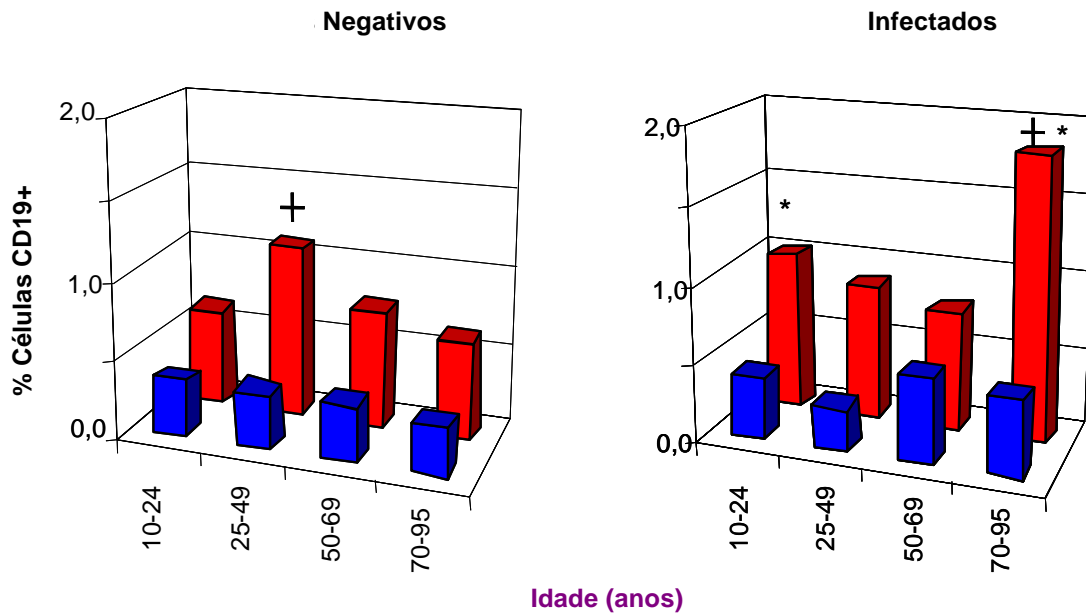
Figura 6: Frequência de células NK (CD16) positivas para as citocinas intracelulares IL-4 (■) e IFN- γ (■) não estimuladas (cultura-controle), em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor percentual de linfócitos B positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células CD16 positivas para IFN- γ e IL-4 apresentados nas barras.

B) Linfócitos B

A **figura 7** mostra o perfil de linfócitos B (células CD19⁺) positivos para IL-4 e IL-10 de indivíduos negativos e infectados. Observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células CD19⁺IL-10⁺ no grupo de indivíduos adultos entre 25-49 anos (**1,19%**) quando comparado ao percentual de células CD19⁺ IL-10⁺ nos outros três grupos (**0,62%** 10-24 anos; **0,70%** 50-69 anos e **0,61%** 70-95 anos).

Com relação aos indivíduos infectados, observamos que os indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos de idade apresentaram um percentual significativamente mais elevado ($p < 0,05$) de linfócitos B CD19⁺ IL-10⁺ (1,82%) quando comparados aos indivíduos dos demais grupos (**1,03%** 10-24 anos; **0,86%** 25-49 anos; **0,77%** 50-69 anos). A infecção induziu um aumento ($p < 0,05$) no percentual dessas células nos indivíduos entre 10 e 24 anos (de 0,62% para 1,03%) e um drástico aumento ($p < 0,05$) no percentual de células CD19⁺ IL10⁺ dos indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos (de 0,61% para 1,82%).

A



B

Erro Padrão								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-4	0,04	0,09	0,06	0,08	0,11	0,03	0,14	0,12
IL-10	0,11	0,18	0,10	0,12	0,35	0,15	0,22	0,09

Figura 7: Frequência de linfócitos B (CD19) positivos para as citocinas intracelulares IL-4 (■) e IL-10 (■) não estimulados (cultura-controle) em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor do percentual de linfócitos B positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruzes representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células CD19 positivas para IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

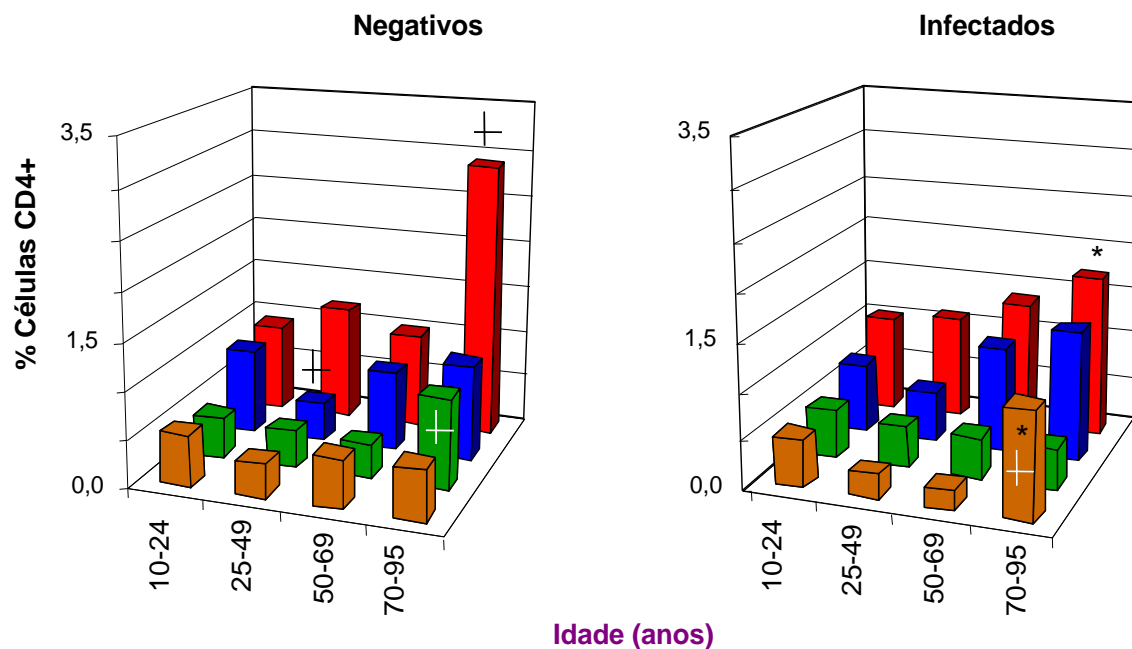
C) Linfócitos T CD4⁺

A **figura 8** mostra o percentual de células T CD4⁺ positivas para citocinas do tipo 1 (IL-2 e IFN- γ) e do tipo 2 (IL-4 e IL-10) em indivíduos negativos e infectados. Podemos observar a ocorrência de grandes mudanças a partir de 70 anos de idade nos indivíduos negativos. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ (**2,89%**) e de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺. A proporção de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ é menor ($p < 0,05$) apenas nos indivíduos adultos entre 25 e 49 anos de idade.

A infecção, por sua vez, contribuiu para o aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD4⁺ positivos para IL-10 a partir de 70 anos de idade (**1,71%**). Esse aumento, no entanto, é significativamente menor ($p < 0,05$) do que aquele observado em indivíduos negativos na mesma faixa etária (**2,89%** para **1,71%**). Nos indivíduos infectados, o percentual das células CD4⁺ IL-10⁺ parece apresentar um aumento progressivo com a idade sem a variação brusca apresentada nos indivíduos negativos a partir de 70 anos de idade.

Com relação às células T CD4⁺IL-4⁺, observamos um perfil semelhante àquele apresentado pelos indivíduos negativos: essas células diminuem apenas na faixa etária entre 25 e 49 anos de idade. Com relação ao perfil de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺, diferentemente do que observamos nos indivíduos negativos, não houve diferença entre os grupos. O resultado mais surpreendente foi com relação às células T CD4⁺IL-2⁺ que apresentaram um drástico aumento ($p < 0,05$) nos indivíduos mais idosos entre 70-95 anos (**1,12%**).

A



B

Erro Padrão								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,05	0,09	0,09	0,20	0,18	0,04	0,05	0,21
IFN- γ	0,11	0,07	0,07	0,15	0,10	0,12	0,09	0,11
IL-4	0,13	0,05	0,11	0,20	0,28	0,18	0,21	0,23
IL-10	0,18	0,22	0,16	0,73	0,18	0,24	0,46	0,20

Figura 8: Frequência de linfócitos T CD4 positivos para as citocinas intracelulares

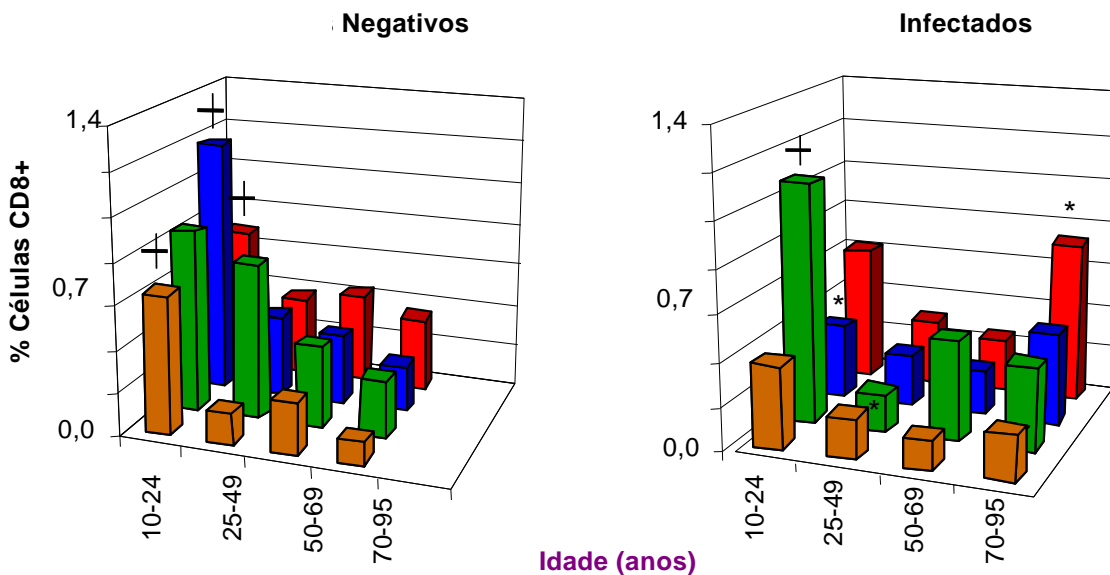
IL-2 (■), IFN- γ (■), IL-4 (■) e IL-10 (■), não estimulados (cultura-controle), em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor percentual de linfócitos TCD4 positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruzes representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de linfócitos TCD4 positivos para IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

D) Linfócitos T CD8⁺

Ao analisarmos a sub-população de linfócitos T CD8⁺ (**Figura 9**) dos indivíduos negativos, percebemos que o grupo de indivíduos jovens (10-24 anos) apresentou um percentual positivo para IL-4 (**1,18%**), IL-10 (**0,68%**), IL-2 (**0,64%**), significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o percentual de células dos indivíduos adultos (25-49 anos) e idosos (50-69 e 70-95 anos). Em relação aos resultados encontrados para INF- γ , observamos uma diminuição drástica ($p < 0,05$) no percentual dessas células a partir de 50 anos (**0,38%** e **0,26%** respectivamente).

Essa sub-população de linfócitos T, no grupo de indivíduos infectados, apresentou diferenças importantes com relação ao perfil dos indivíduos negativos. Nos indivíduos jovens (10-24 anos), a presença da infecção está associada a um leve aumento no percentual de células IFN- γ^+ (de **0,84%** para **1,08%**) e a uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de células IL-4⁺ (de **1,18%** para **0,34%**). A redução nas células T CD8⁺ IFN- γ^+ apenas nos indivíduos de 24-49 anos é curiosa já que a produção dessa citocina volta a se elevar na faixa etária de 70-95 anos. Entre 70-95 anos de idade, ocorre um fenômeno oposto, um aumento no percentual de linfócitos T CD8⁺ positivos para IL-4 e IL-10 (**0,42%** e **0,73%** respectivamente) indicando claramente um desvio para um padrão do tipo 2. Também observamos um leve aumento no percentual de células T CD8⁺IL-2⁺ nos indivíduos mais jovens (**0,37%**) quando comparado ao percentual dos indivíduos das demais faixas etárias.

A



B

Erro Padrão								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,10	0,04	0,02	0,02	0,09	0,03	0,04	0,05
IFN- γ	0,19	0,10	0,05	0,07	0,13	0,03	0,07	0,11
IL-4	0,14	0,06	0,05	0,06	0,10	0,04	0,08	0,05
IL-10	0,14	0,09	0,07	0,09	0,16	0,09	0,07	0,12

Figura 9: Frequência de linfócitos T CD8 positivos para as citocinas intracelulares

IL-2 (orange), IFN- γ (green), IL-4 (blue) e IL-10 (red) não estimulados (cultura-controle), em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor percentual de linfócitos TCD8 positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de linfócitos TCD8 positivos para IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

4. 2 Análise da frequência de sub-populações de células NK, linfócitos B, T CD4⁺, T CD8⁺ do sangue periférico positivos para citocinas do tipo 1 e tipo 2 de indivíduos negativos e infectados, após breve estimulação *in vitro* com SEA ou SWAP.

Nosso próximo objetivo foi examinar o perfil de citocinas produzido por células desses mesmos indivíduos estimuladas em cultura por dois importantes antígenos obtidos de formas evolutivas diferentes do *S. mansoni*: a) antígenos de ovos do parasito (SEA) capazes de induzir uma resposta predominantemente do tipo 2 evocando eventos inflamatórios mediados por IL-4 e IL-5, bem como eventos imuno-moduladores mediados por IL-10; b) outro complexo de antígenos proveniente de vermes adultos (SWAP) capazes de induzir uma resposta predominantemente do tipo 1 induzindo eventos inflamatórios através da produção de IL-2 e IFN- γ . Avaliamos, dessa maneira, o impacto desses antígenos na reatividade imunológica dos indivíduos.

Como descrito anteriormente, durante a infecção, vários antígenos são excretados ou desprendidos do parasito durante o seu ciclo de vida no hospedeiro vertebrado. A principal consequência patológica dessa estimulação antigênica é o desenvolvimento de uma reação granulomatosa caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias para sítios de deposição dos ovos, principalmente o intestino e o fígado. Essas células são ativadas através da interação entre o seu receptor de célula T (TCR) e o complexo principal de histocompatibilidade de classe dois (MHC-II) juntamente com peptídeos derivados dos antígenos do verme adulto presentes nas veias mesentéricas e também dos antígenos do ovo do parasito presentes no fígado ou intestino. Nesse contexto, podemos presumir que, ao longo do processo inflamatório que caracteriza a esquistossomose, as células do sistema imune do hospedeiro interagem, ao mesmo tempo, com peptídeos derivados das duas formas evolutivas do parasito. O desenvolvimento da doença de uma fase aguda para a fase crônica está associado a eventos inflamatórios (a presença de IL-2 e TNF- α capazes de exacerbar a resposta granulomatosa) (Wahl *et al.*, 1997) e eventos imuno-reguladores (com a participação de IL-10 e de TGF- β na regulação da inflamação e no processo fibrótico) e existe a necessidade de esclarecer melhor a participação dos antígenos do parasito nesses eventos. Nosso objetivo foi estudar, em indivíduos que apresentam a

infecção crônica, o papel de dois extratos brutos antigênicos de formas evolutivas diferentes do parasito na tentativa de estabelecer os padrões de reatividade a cada uma delas.

Os resultados a seguir se referem ao perfil de citocinas expresso por linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺ e células NK (quadrante 2 do gráfico de fluorescência 1 versus fluorescência 2: anticorpos marcados com FITC e PE respectivamente, representado na **figura 1b**).

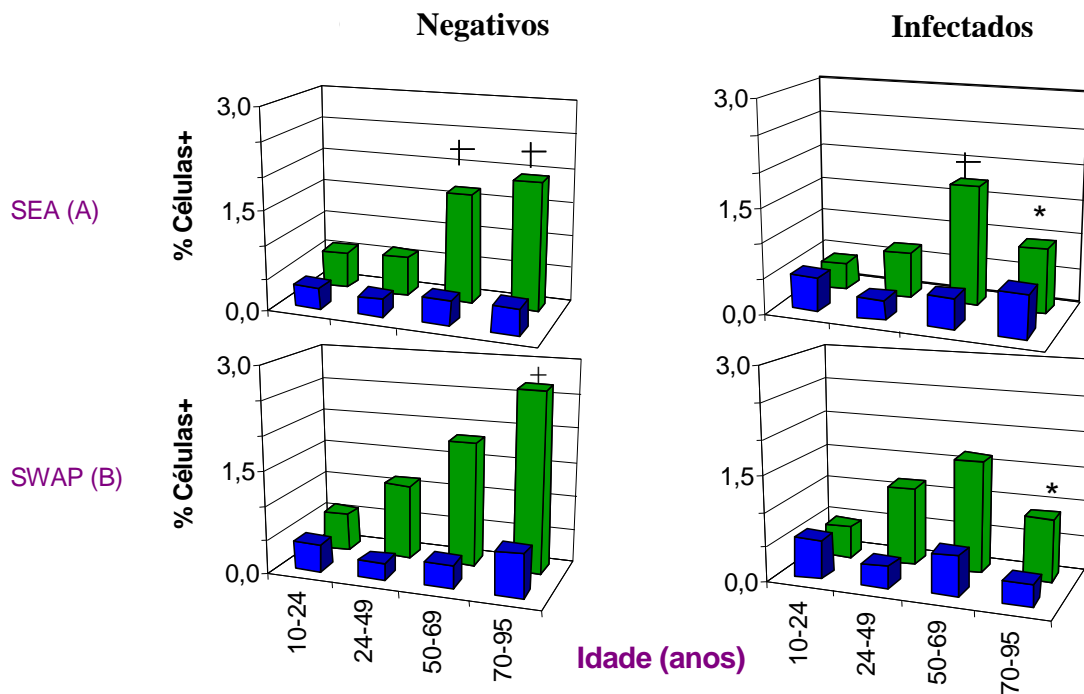
A) Células NK

A **figura 10** mostra o perfil de células CD16⁺ positivas para IL-4 e IFN- γ estimuladas com SEA (**A**) ou com SWAP (**B**) de indivíduos negativos ou infectados. Dentro do grupo de indivíduos negativos, podemos observar algumas alterações ocorridas entre os indivíduos jovens e idosos. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células CD16⁺ positivas para IFN- γ estimuladas com SEA (**A**) nos indivíduos idosos entre 50-69 anos (**1,63%**) e entre 70-95 anos (**1,91%**) quando comparado com o percentual de células também estimuladas dos indivíduos jovens (10-24 anos) (**0,56%**) e nos adultos (**0,59%**). Também observamos um aumento do percentual de células NK positivas para IFN- γ estimuladas com SEA a partir de 50 anos (**1,63%** e **1,91%** respectivamente) quando comparamos com a cultura de células não estimuladas de indivíduos das mesmas faixas etárias (**0,69%** e **1,08%** respectivamente). Com relação ao grupo de indivíduos infectados, notamos um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual dessas células estimuladas com o antígeno nos indivíduos idosos entre 50-69 (**1,72%**) anos quando comparado com o percentual das demais faixas etárias. Um dado interessante é a queda súbita no percentual de CD16⁺IFN- γ ⁺ nos indivíduos mais idosos entre 70-95 anos (**0,94%**), embora ainda seja um percentual mais elevado do que o dos indivíduos jovens, quando comparado com os indivíduos entre 50-69 anos de idade (**1,72%**).

Nas culturas expostas ao antígeno SWAP (**B**) observamos as mesmas alterações ocorridas com a adição de SEA (**A**). No grupo negativo, houve um aumento gradativo no percentual de IFN- γ e, nos indivíduos mais idosos 70 a 95 anos ele foi

significativo($p < 0,05$) em relação às demais faixas etárias. Nos indivíduos infectados, houve uma diminuição acentuada no percentual de células $CD16^+$ positivas para $IFN-\gamma$ dos indivíduos idosos entre 70-95 anos (**0,89%**) quando comparado com percentual dos indivíduos idosos entre 70-95 anos negativos (**2,65%**). Além disso, notamos que tanto na cultura estimulada com SEA quanto estimulada com SWAP, a IL-4 não se altera com a idade

A



B

Erro Padrão (SEA)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-4	0,06	0,04	0,06	0,04	0,14	0,05	0,02	0,04
IFN-γ	0,13	0,15	0,11	0,23	0,16	0,20	0,27	0,23

Erro Padrão (SWAP)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-4	0,08	0,04	0,05	0,18	0,21	0,05	0,11	0,10
IFN-γ	0,11	0,13	0,25	0,36	0,16	0,22	0,60	0,17

Figura 10: Frequência de células NK (CD16) positivos para as citocinas intracelulares

IL-4 (■) e IFN- γ (■) estimulados com SEA (A) ou com SWAP (B) em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor do percentual de células NK positivas para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruzeiras representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células CD16 positivas para IFN- γ e apresentados nas barras.

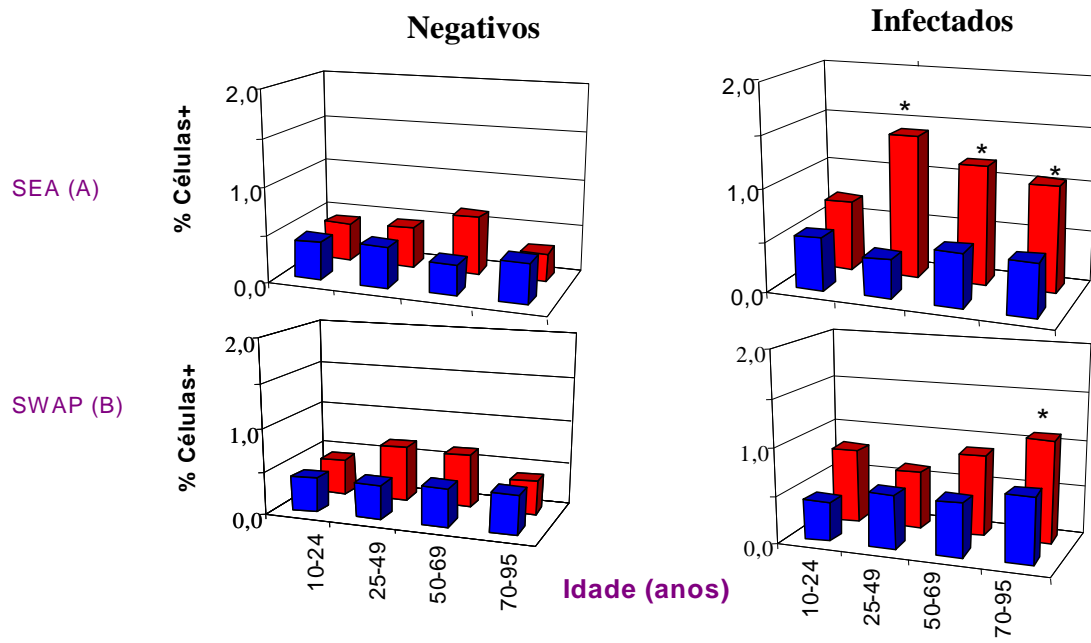
B) Linfócitos B

A **figura 11** mostra o perfil de células CD19⁺ de indivíduos negativos e infectados, estimuladas com os antígenos brutos **SEA** ou **SWAP**. Algumas diferenças podem ser observadas no perfil de células estimuladas com SEA dos indivíduos infectados quando comparados com o perfil de células de indivíduos negativos. No grupo de indivíduos negativos, a estimulação com SEA (**A**) alterou o padrão de produção de citocinas, diminuindo o percentual de linfócitos CD19⁺ IL-10⁺ em todas as faixas etárias. Essa diminuição é mais acentuada ($p < 0,05$) nos indivíduos entre 25 e 29 anos (de **1,19%** para **0,44%**). Nas culturas de células dos indivíduos infectados, a adição de SEA desencadeou uma inversão interessante no perfil dos linfócitos B. Na cultura de células não estimuladas, os indivíduos mais idosos entre 70 e 69 anos apresentaram um percentual significativamente mais alto ($p < 0,05$) de CD19⁺IL-10⁺ (**1,82%**) quando comparados aos demais grupos e, quando adicionamos SEA à cultura, observamos uma diminuição ($p < 0,05$) no percentual de células CD19⁺IL-10⁺ nos indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos (de **1,82%** para **1,03%**). Ao mesmo tempo, a estimulação com SEA induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) de células CD19⁺IL-10⁺ nos indivíduos adultos entre 25 e 49 anos (de **0,88%** para **1,40%**). Observamos também diferenças significativas ($p < 0,05$) na frequência dessas células a partir de 25 anos nos indivíduos infectados quando comparamos com indivíduos negativos pertencentes às mesmas faixas etárias.

A adição de SWAP (**B**) à cultura de células dos indivíduos negativos induziu um efeito semelhante ao observado com a adição de SEA. Houve uma leve diminuição no percentual de CD19⁺ IL-10⁺ em todas as faixas etárias, principalmente nos indivíduos entre 25 e 49 anos (de **1,19%** para **0,64%**).

Com relação à cultura de linfócitos B dos indivíduos infectados, a adição de SWAP desencadeou uma leve diminuição no percentual dessas células nos indivíduos mais jovens entre 10 e 24 anos (de **1,03%** para **0,79%**) e nos mais idosos ela foi bem mais acentuada ($p < 0,05$) entre 70 e 95 anos (de **1,82%** para **1,08%**). Observamos também uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos indivíduos infectados mais idosos entre 70 e 95 anos (**1,08%**) quando comparamos com indivíduos negativos pertencentes à mesma faixa etária (**0,38%**).

A



B

Erro Padrão (SEA)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-4	0,08	0,06	0,06	0,07	0,14	0,04	0,15	0,09
IL-10	0,05	0,08	0,04	0,03	0,08	0,20	0,13	0,16

Erro Padrão (SWAP)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-4	0,05	0,04	0,05	0,17	0,08	0,08	0,12	0,10
IL-10	0,06	0,21	0,04	0,09	0,17	0,16	0,19	0,29

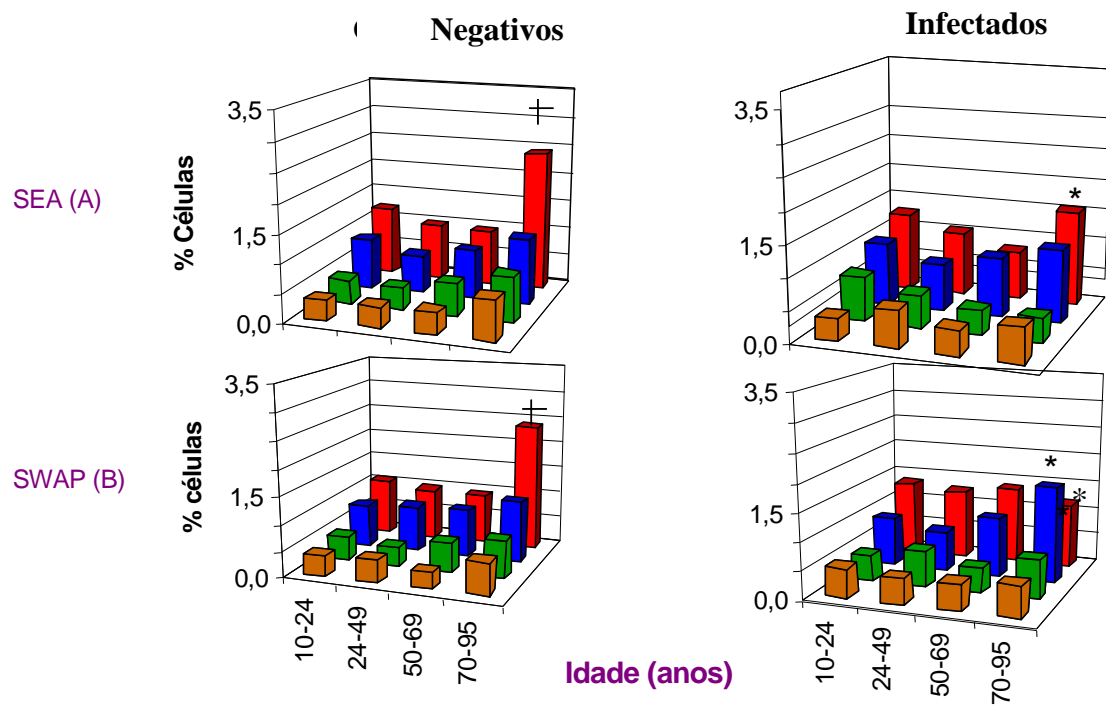
Figura 11: Frequência de linfócitos B (CD19) positivos para as citocinas intracelulares IL-4 (■) e IL-10 (■) estimulados com SEA (A) ou com SWAP (B) em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor do percentual de linfócitos B positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruzes representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células CD19 positivas para IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

C) Linfócitos T CD4⁺

Podemos observar na **figura 12** o perfil de células T CD4⁺ de indivíduos infectados e negativos estimuladas com SEA ou com SWAP. Algumas diferenças podem ser observadas no perfil de células dos indivíduos infectados estimuladas com SEA quando comparados com o perfil de células de indivíduos negativos (**A**). No grupo de indivíduos negativos, a estimulação com SEA não alterou muito o padrão de citocinas. Nas culturas de células de indivíduos infectados, a adição de SEA desencadeou algumas modificações: houve uma diminuição nos percentuais de células CD4⁺IL-2⁺ (de **1,12%** para **0,57%**) nos indivíduos entre 70 e 95 anos quando comparados com a cultura controle. A redução no percentual de células CD4⁺IL-10⁺ ocorreu entre 50-69 anos (de **1,35%** para **0,79%**). Observamos também que a adição de SEA na cultura de células dos indivíduos infectados induziu uma diminuição acentuada ($p < 0,05$) no percentual de células CD4⁺IL-10⁺ nos indivíduos mais idosos quando com relação ao percentual dos indivíduos negativos da mesma faixa etária.

A estimulação das células com extrato de verme adulto (SWAP) também afeta a produção de citocinas em indivíduos idosos (**B**). Observamos uma diminuição no percentual de células estimuladas positivas para IL-10 ($p < 0,05$) e IL-2 nos indivíduos mais idosos infectados (**1,15%** e **0,57%** respectivamente) quando comparamos com a cultura controle nessa mesma faixa etária (**1,71%** e **1,12%** respectivamente). Por outro lado, ocorre um aumento no percentual de células T CD4⁺IL-4⁺ nos indivíduos idosos infectados (70-95 anos) (**1,70%**) quando comparados com a cultura também estimulada com SWAP dos indivíduos negativos ($p < 0,05$). Observamos também que a adição de SWAP na cultura de células dos indivíduos infectados induziu uma diminuição acentuada ($p < 0,05$) no percentual de CD4⁺IL-10⁺ nos indivíduos mais idosos quando comparados com os indivíduos negativos da mesma faixa etária.

B



B

Erro Padrão (SEA)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,04	0,06	0,05	0,24	0,06	0,09	0,12	0,04
IFN- γ	0,07	0,07	0,08	0,04	0,32	0,08	0,07	0,16
IL-4	0,09	0,13	0,11	0,22	0,48	0,14	0,11	0,12
IL-10	0,16	0,17	0,18	0,50	0,16	0,20	0,13	0,15

Erro Padrão (SWAP)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,06	0,10	0,04	0,07	0,09	0,08	0,10	0,06
IFN- γ	0,07	0,05	0,10	0,09	0,04	0,17	0,13	0,15
IL-4	0,12	0,16	0,12	0,17	0,22	0,08	0,17	0,20
IL-10	0,13	0,09	0,06	0,64	0,29	0,19	0,30	0,16

Figura 12a: Frequência de linfócitos T CD4 positivos para as citocinas intracelulares

IL-2 (■), IFN- γ (■), IL-4 (■), IL-10 (■) estimulados com SEA (A) ou com SWAP (B) em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor percentual de linfócitos T CD4 positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células TCD4 positivas para IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

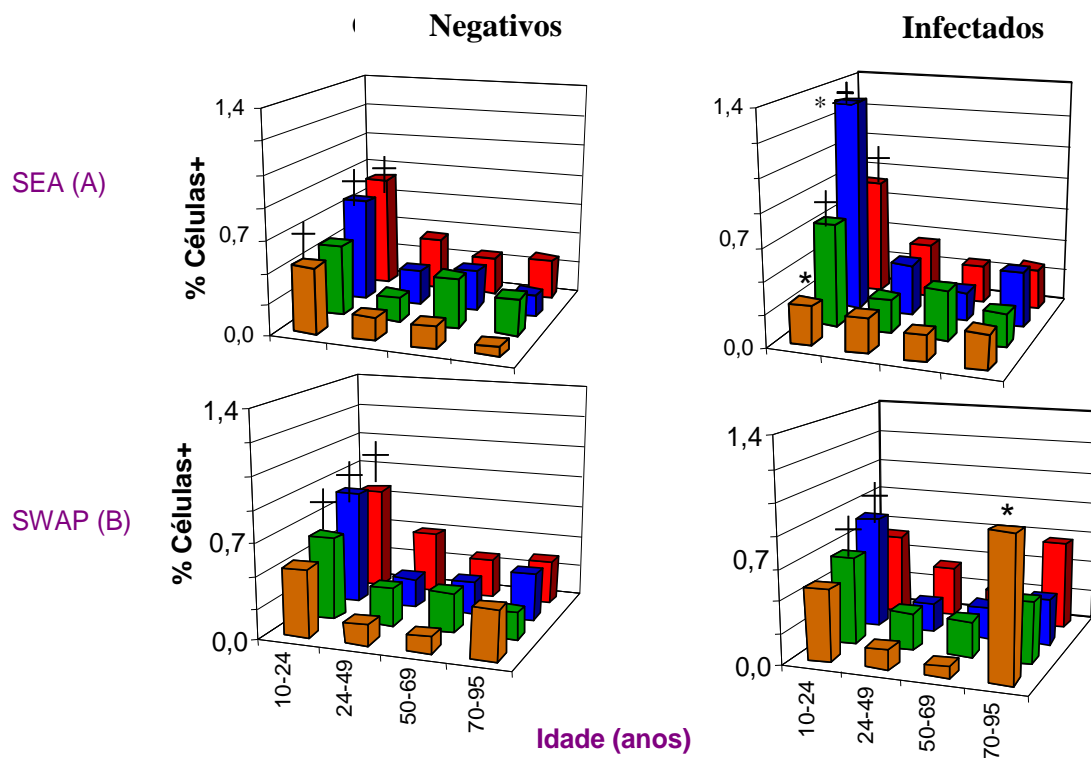
D) Linfócitos T CD8⁺

A **figura 13** mostra o perfil de células T CD8⁺ de indivíduos infectados e negativos estimuladas com **SEA (A)** ou com **SWAP (B)**. Podemos observar, dentro do grupo de indivíduos negativos, que a adição de SEA desencadeou duas alterações importantes no perfil de expressão de citocinas (**A**). Nos indivíduos jovens (10-24 anos), ocorre uma diminuição significativa no percentual de células IL-4⁺ ($p < 0,05$) (de **1,18%** para **0,66%**) e IFN- γ (**0,84%** para **0,45%**). Na cultura estimulada de células de indivíduos de 25 a 49 anos, a expressão de IFN- γ encontra-se também reduzida ($p < 0,05$) (**0,16%**) quando comparada com aquela apresentada por células não estimuladas (**0,72%**). No grupo de indivíduos infectados, observamos também algumas alterações significativas ($p < 0,05$) quando adicionamos o antígeno SEA. Os indivíduos jovens (10-24 anos) apresentam um drástico aumento ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD8⁺ positivos para IL-4 (de 0,35% para 1,30%) e uma diminuição no percentual de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ (de **1,08%** para **0,64%**). Também notamos a diminuição (de **0,61%** para **0,26%**) da produção de IL-10 nos indivíduos mais idosos infectados (70-95 anos) depois da estimulação com SEA.

Assim, no grupo de indivíduos negativos, os jovens apresentaram um maior percentual de células T CD8⁺ positivos para IL-2, IL-4 e IL-10, já os jovens infectados apresentaram frequências mais altas de células positivas para IFN- γ , IL-4 e IL-10. Entretanto, houve um aumento significativo no percentual de células T CD8⁺IL-4⁺ nos indivíduos jovens entre 10 e 24 anos infectados (**1,30%**) quando comparado com o percentual de células T CD8⁺IL-4⁺ dos jovens negativos (**0,66%**). Uma alteração comum entre os grupos de indivíduos negativos e infectados após a estimulação *in vitro* com SEA foi a redução no percentual de IFN- γ a partir de 49 anos.

Podemos observar que a adição do antígeno SWAP à cultura de células CD8⁺ produziu efeitos muito semelhantes àqueles observados após a estimulação com SEA no grupo de indivíduos negativos (**B**). Nos indivíduos infectados da mesma faixa etária, observamos um aumento acentuado ($p < 0,05$) no percentual de células IL-2⁺ nos indivíduos entre 70 e 95 anos quando comparado com o percentual do grupo negativo da mesma faixa etária e com a cultura controle dos indivíduos entre 70 e 95 anos.

A



B

Erro Padrão (SEA)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,06	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,07
IFN- γ	0,09	0,05	0,05	0,03	0,06	0,08	0,10	0,09
IL-4	0,14	0,04	0,06	0,04	0,20	0,09	0,06	0,09
IL-10	0,09	0,03	0,02	0,12	0,06	0,11	0,07	0,13

Erro Padrão (SWAP)								
Citocinas	Grupos							
	Negativos				Infectados			
	10-24	25-49	50-69	70-95	10-24	25-49	50-69	70-95
IL-2	0,06	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,07
IFN- γ	0,09	0,05	0,05	0,03	0,06	0,08	0,10	0,09
IL-4	0,14	0,04	0,06	0,04	0,20	0,09	0,06	0,09
IL-10	0,09	0,03	0,02	0,12	0,06	0,11	0,07	0,13

Figura 13: Frequência de linfócitos T CD8 positivos para as citocinas intracelulares

IL-2 (■), IFN- γ (■), IL-4 (■), IL-10 (■) estimulados com SEA (A) ou com SWAP (B) em indivíduos negativos e infectados pertencentes a faixas etárias diferentes. (A) Os resultados estão representados sob a forma da média do valor percentual de linfócitos T CD4 positivos para essas citocinas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos negativos e infectados e, as cruces representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro dos grupos. (B) A tabela representa os erros padrão referentes aos valores do percentual de células TCD8 positivas para IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 apresentados nas barras.

4.3 Contribuição dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o perfil de síntese de citocinas de indivíduos negativos e infectados em faixas etárias diferentes.

Dois fenômenos chamaram a nossa atenção na análise global dos padrões de citocinas nas diferentes faixas etárias. Em primeiro lugar, a produção de citocinas pelas células CD4⁺ sofre mudanças drásticas nos indivíduos mais idosos (> 70 anos). Ocorre um aumento significativo no percentual de células CD4⁺ IL-10⁺ e de células CD4⁺ IFN- γ ⁺ nesses indivíduos. Também observamos que, após os 25 anos, ocorre uma queda pronunciada no percentual das células CD8⁺ produtoras de IL-10 e IFN- γ . Assim, as faixas etárias extremas (10-24 anos e 70-95 anos) apresentam um número elevado de células T produtoras de IL-10 e IFN- γ quando comparados com indivíduos de faixas etárias intermediárias. Nos jovens, essas citocinas são produzidas pelas células CD8⁺ e nos idosos pelas células CD4⁺.

Para examinar com mais detalhe as diferenças nessas faixas etárias, utilizamos a estratégia de separar o grupo de 70-95 anos e agrupar todos os indivíduos das demais faixas para compará-los no padrão das células CD4⁺ (**Figura 14**). Por outro lado, separamos o grupo de 10-24 anos e agrupamos os demais para comparar o padrão das células CD8⁺ (**Figuras 15 e 16**).

Na **Figura 14**, podemos observar que o percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺ nos indivíduos com mais de 70 anos de idade negativos é significativamente maior que aquele apresentado pelos indivíduos dos demais grupos etários em conjunto ($p < 0,05$). Nos indivíduos infectados, observamos que essa drástica diferença diminui na população de linfócitos T CD4⁺ IL-10⁺. A estimulação com os antígenos do parasito não alteram os padrões de citocinas produzidas pelas células CD4⁺, exceto as células T CD4⁺IL-4⁺ estimuladas com SWAP. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual das células positivas para IL-4 no grupo infectado entre 70 e 95 anos.

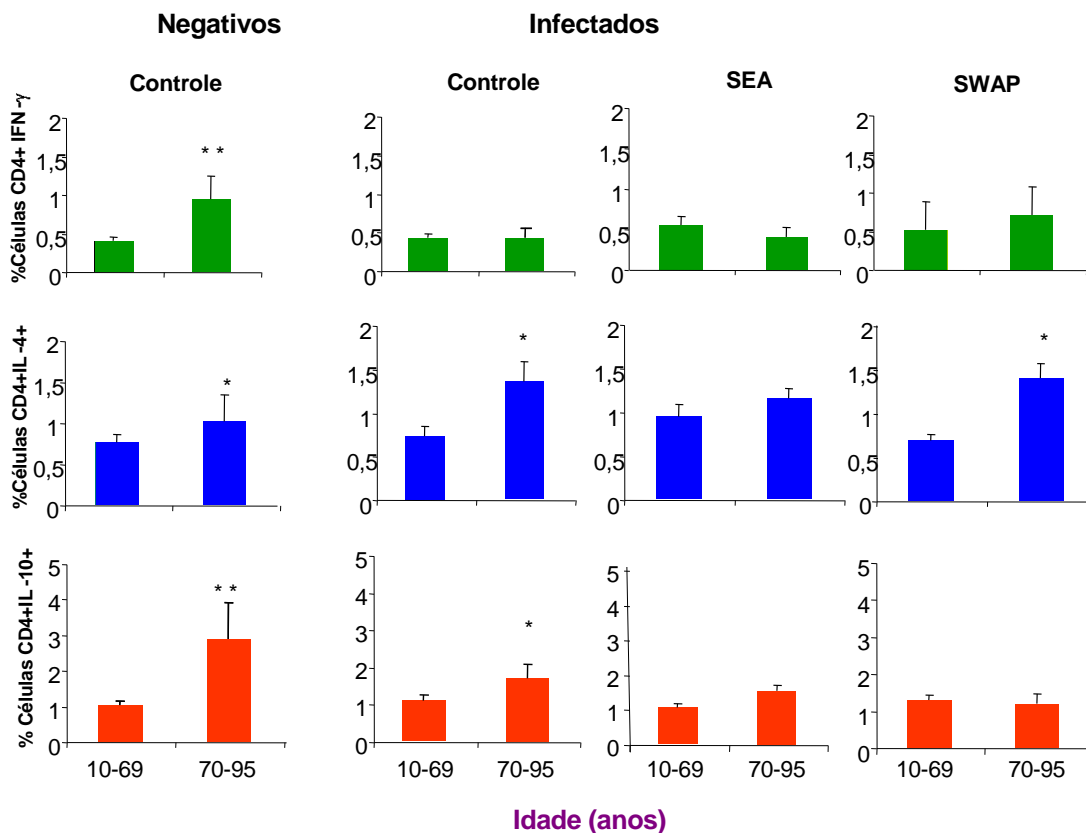


Figura 14: Perfil de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (■), IL-4⁺ (■) e IL-10⁺ (■) de indivíduos do grupos entre 10 a 69 anos e, entre 70 a 95 anos estimuladas ou não com os antígenos do parasito (SEA ou SWAP). Os resultados estão expressos sob a forma da média do valor percentual de células positivas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,005) existentes entre os grupos.

Nas **figura 15 e 16**, observamos que ocorre um fenômeno semelhante com relação ao percentual de células $CD8^+IL-10^+$ e $CD8^+IFN-\gamma^+$: após os 25 anos, detectamos uma queda nessas duas sub-populações sendo que esse percentual permanece homogeneamente estável depois dessa idade. A presença da infecção não altera esses perfis tampouco a estimulação *in vitro* com SEA ou SWAP. O percentual de células $IL-4^+$ está aumentado nas culturas controle e mediante a estimulação *in vitro* com SEA ou SWAP nos indivíduos negativos; nos indivíduos infectados, esse aumento ocorre apenas mediante estimulação com os antígenos.

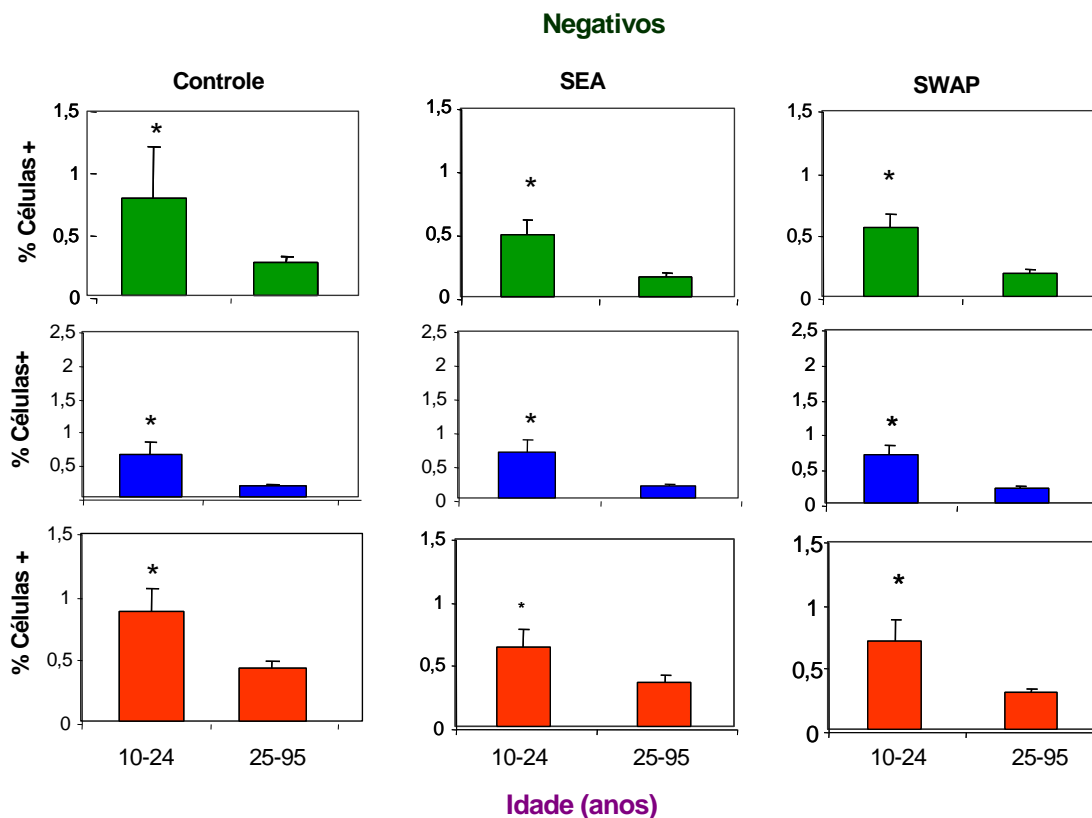


Figura 15: Perfil de células $CD8^+IFN-\gamma^+$ (■), $IL-4^+$ (■) e $IL-10^+$ (■), de indivíduos dos grupos entre 10-24 anos e, entre 25-95 anos negativos estimuladas ou não com antígenos do parasito (SEA ou SWAP). Os resultados estão expressos sob a forma de média do percentual de células positivas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) existentes entre os grupos.

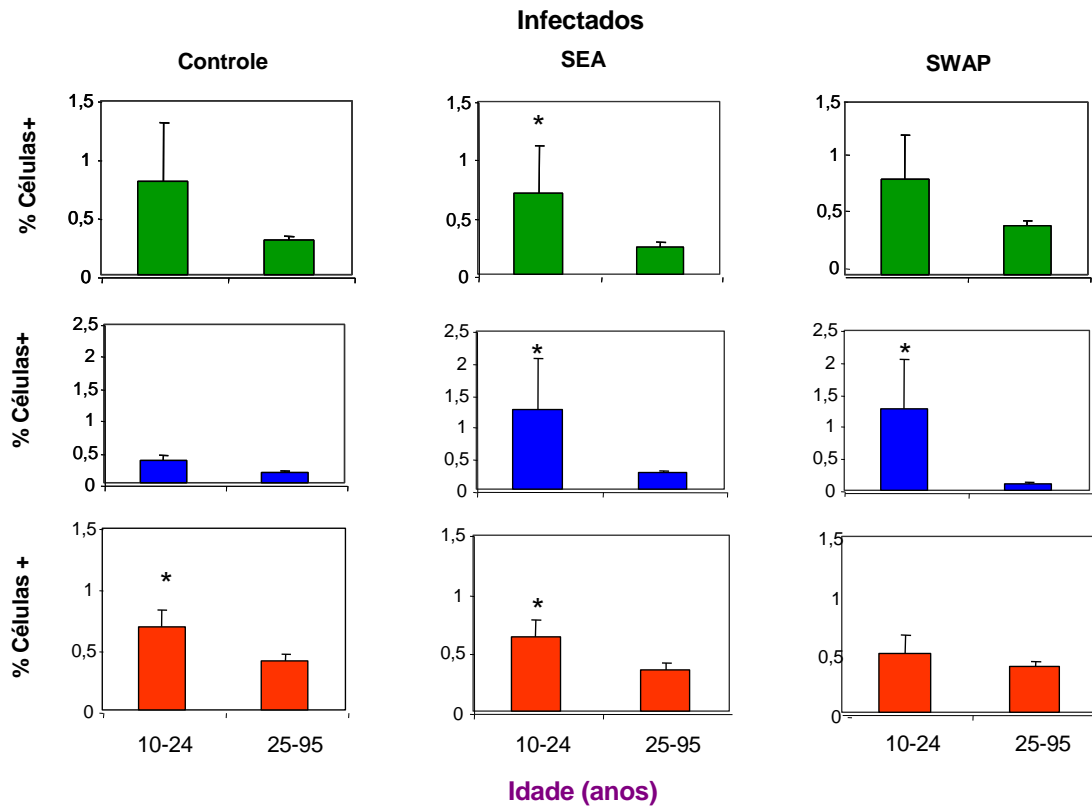


Figura 16: Perfil de células CD8⁺IFN- γ ⁺ (■), IL-4⁺ (■) e IL-10⁺ (■), de indivíduos dos grupos entre 10-24 anos e, entre (25-95 anos) infectados estimuladas ou não com antígenos do parasito (SEA ou SWAP). Os resultados estão expressos sob a forma de média do percentual de células positivas. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) existentes entre os grupos.

Como observamos nos resultados anteriores, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contribuem diferentemente para o perfil imunológico de indivíduos muito jovens e muito idosos, principalmente com relação à frequência de células positivas para IL-10. Nosso próximo objetivo foi analisar a participação dessas sub-populações de linfócitos positivos para IL-10 em indivíduos jovens entre 10 e 24 anos, idade intermediária entre 25 e 69 anos e nos muito idosos entre 70 e 95 anos de idade.

Os resultados da **figura 17** mostraram um claro aumento no percentual de células positivas para IL-10 nas faixas etárias entre 10 e 24 anos e 70 e 95 anos em ambos os grupos, negativos e infectados. Podemos notar que a fonte, mas não o percentual de IL-10, é a principal alteração nos indivíduos infectados mais idosos. Nos indivíduos negativos, a IL-10 é principalmente produzida por células T CD4⁺. Já nos indivíduos infectados acima de 70 anos, a IL-10 é produzida por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

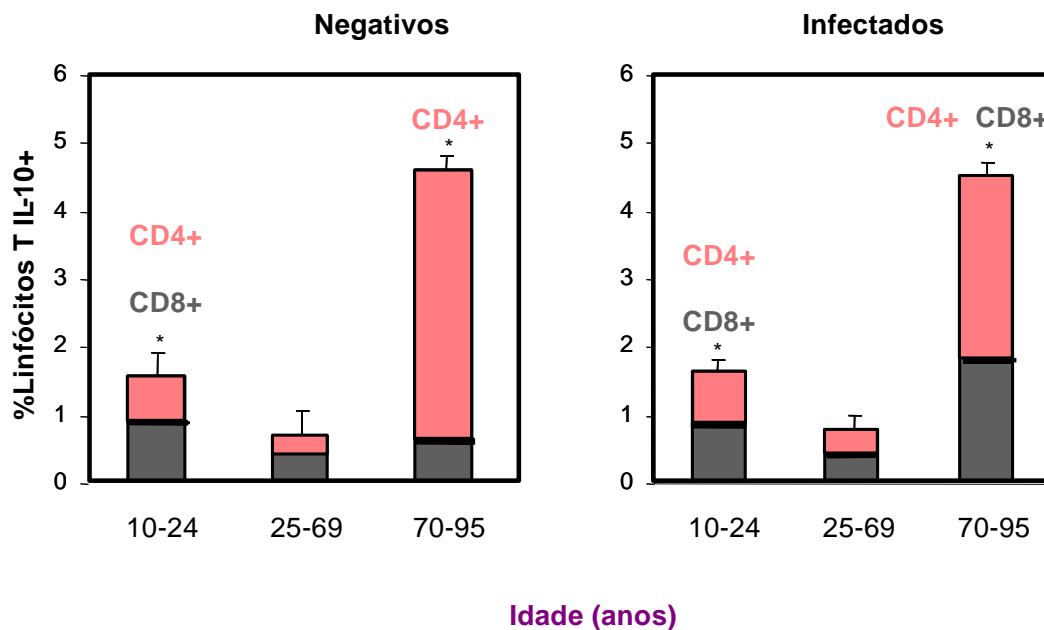


Figure 17: Perfil de síntese de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades. A porção superior das barras representa o percentual de células T CD4⁺ (■) e a porção inferior representa o percentual de células T CD8⁺(■).

De maneira semelhante à produção de IL-10, analisamos também a expressão de IL-2 por células T CD4⁺ e CD8⁺ (**figura 18**). Podemos observar que os indivíduos jovens (10 a 24 anos) negativos apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ positivos para IL-2 quando comparados aos indivíduos dos demais grupos. Já com relação ao grupo infectado, observamos uma alteração nesse perfil: houve um aumento significativo ($p < 0,05$) apenas de linfócitos T CD4⁺ IL-2⁺ nos indivíduos idosos.

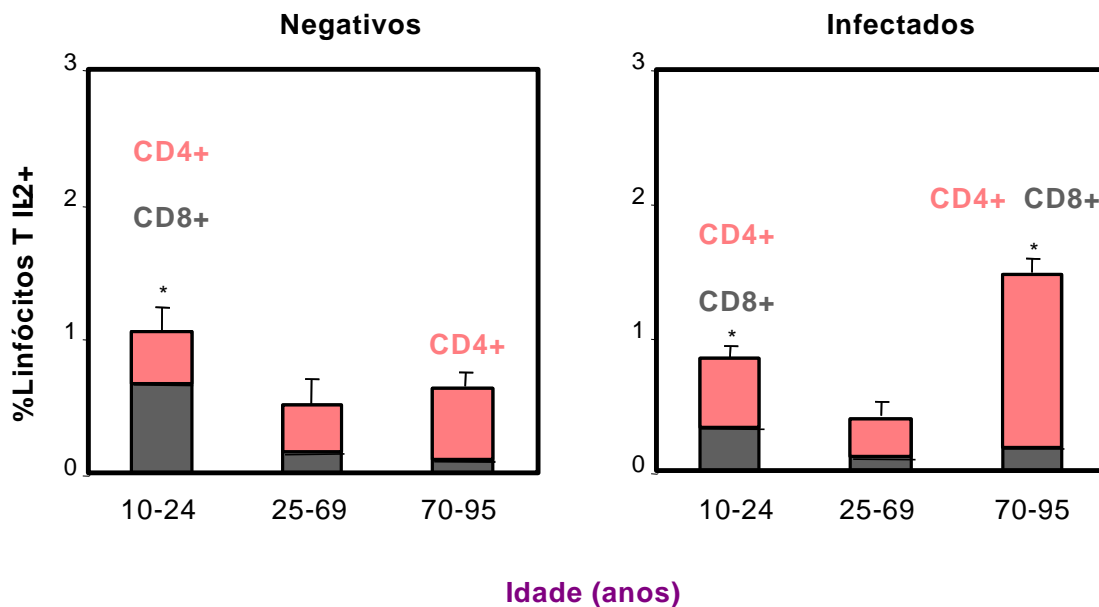


Figure 18: Perfil de síntese de IL-2 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos negativos e infectados de diferentes idades. A porção superior das barras representa o percentual de células T CD4⁺ (■) e a porção inferior representa o percentual de células T CD8⁺ (■).

A **figura 19** é uma representação gráfica resumida das alterações mais importantes encontradas em indivíduos jovens e idosos em relação às diferentes citocinas e populações celulares. Numa análise mais geral, evidenciamos que, na idade jovem, há uma grande participação dos linfócitos T CD8⁺ caracterizado pelo aumento IL2⁺,IFN- γ ⁺,IL-4⁺. Com a infecção, esse perfil muda, levando à diminuição dessas células positivas para IL-2 e IL-4 mas mantendo alto o percentual de células positivas para IL-10 e IFN- γ .

Com o envelhecimento, observamos um perfil diferente. Existe uma grande contribuição de células T CD4⁺ caracterizado pelo aumento de células IL-10⁺ e IFN- γ ⁺. Com a infecção, evidenciamos uma forte contribuição de ambas as sub-populações de linfócitos. Ocorre a diminuição de células T CD4⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ e o aumento de células CD4⁺IL-2⁺. Com relação aos linfócitos T CD8⁺, ocorre uma leve diminuição de células IL-4⁺ e IFN- γ ⁺ e um aumento de células CD8⁺ IL-10⁺ nessa faixa etária.

Jovens negativos	células CD8 ⁺			
	IL-10	↑		
	IFN- γ	↑		
	IL-4	↑		
Jovens infectados com <i>S. mansoni</i>	células CD4 ⁺			
	IL-10	↑		
	IFN- γ	↑		
	IL-4	↓		
<hr/> <hr/>				
Idosos negativos	células CD4 ⁺			
	IL-10	↑		
	IFN- γ	↑		
	IL-2	↓		
Idosos infectados com <i>S. mansoni</i>	células CD4 ⁺		células CD8 ⁺	
	IL-10	↓	IL-10	↓
	IFN- γ	estável	IFN- γ	estável
	IL-4	estável	IL-4	estável
		IL-2		↑

Figura 19: Representação gráfica resumida das alterações mais importantes encontradas em indivíduos jovens e idosos com relação à síntese de diferentes citocinas por populações e sub-populações de leucócitos do sangue periférico.

5. Discussão

A esquistossomose é uma doença parasitária responsável pela grande morbidez e mortalidade em países em desenvolvimento. As manifestações da doença envolvem a interação entre as células do sistema imune e produtos antigênicos liberados de diferentes estágios evolutivos do parasito. Tais interações induzem uma resposta celular e humoral no hospedeiro frente aos antígenos do parasito capaz de levar a um estado de ativação crônica do seu sistema imune (Wiest, 1996; Mckerrow, 1997).

A infecção se inicia pelo contato com a larva aquática, a cercaria, que após penetrar a pele, passa por inúmeras transformações e por um processo de maturação dando origem aos esquistossômulos. Estes, por sua vez, entram na circulação e migram para o sistema porta intra-hepático, onde se transformarão em vermes adultos. Nesse local ocorre o acasalamento e posterior migração para as veias mesentéricas, onde, após alcançar a maturidade sexual, a fêmea inicia a postura de ovos (Boros, 1994; El-Garem, 1998). Estes podem seguir dois caminhos distintos: a) uma parte desses ovos fica detida nas paredes do intestino por não conseguirem alcançar o lumen do intestino ou são arrastados até o fígado onde serão responsáveis pela formação da reação granulomatosa, a qual, juntamente com o ovo, é chamada de granuloma, b) outra parte migra através da parede dos vasos sanguíneos até a luz intestinal e o exterior onde saem junto com o material fecal.

Os ovos de *S.mansoni* liberados nas fezes apresentam um papel muito importante na epidemiologia da doença. Sabe-se que a prevalência e a intensidade da infecção são dadas pela presença e quantificação dos ovos nas fezes (*S. mansoni*) ou urina (*S. haematobium*) dos indivíduos infectados e o aumento do número de ovos nas fezes estaria associado a infecções mais intensas. Indivíduos com alta prevalência de infecção apresentariam mais de 100 ovos/g de fezes e indivíduos com baixa prevalência apresentariam menos de 100 ovos/g fezes (Gryseels *et al.*, 1994; Kongs *et al.*, 1996; Mohamed-Ali *et al.*, 1999). Diante desses dados apontados pela literatura, podemos dizer que indivíduos capazes de excretar ovos de *S. mansoni* nas fezes podem ser considerados infectados por esse parasito.

Nesse contexto, após a análise inicial dos nossos resultados, um aspecto importante nos chamou a atenção: o fato de alguns indivíduos que moram numa área endêmica para esquistossomose durante toda a vida em contato contínuo com parasitos e, mesmo assim,

mostraram-se negativos para ovos de *S.mansoni* no exame de fezes. Algumas hipóteses explicativas desse fenômeno incluem a possibilidade de que esses indivíduos apresentem um número muito reduzido de ovos nas fezes e o método utilizado (Kato-Katz) não seja sensível o bastante para detectá-los. Essa possibilidade nos parece remota já que contamos com um grupo de indivíduos com número intermediário de ovos nas fezes (entre 1 e 99 ovos/g fezes, dados não apresentados) que indicam que o método utilizado é capaz de detectar poucos ovos com precisão adequada. Não utilizamos esse grupo de indivíduos em nosso trabalho porque queríamos analisar o perfil de síntese de citocinas daqueles indivíduos que se apresentassem muito infectados caracterizados pela presença de mais de 100 ovos g/fezes e outro grupo que apresentasse um perfil oposto, ou seja, àqueles que não apresentaram ovos de *S. mansoni* nas fezes. Outra provável explicação é a de que esses indivíduos podem ter sido previamente infectados e posteriormente tratados. No entanto, a atividade dos linfócitos T apresentada por esses indivíduos negativos difere muito daquela relatada em indivíduos infectados que foram tratados (Barsoum *et al.*, 1982; Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Grogan *et al.*, 1996; Caldas *et al.*, 2000). Em indivíduos infectados entre 5 e 48 anos de idade com *Schistosoma haematobium* verifica-se uma alta resposta proliferativa para antígenos do verme adulto após o tratamento com praziquantel (Grogan *et al.*, 1996). Iramaya e colaboradores também observaram que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos entre 3 e 88 anos de idade tratados com *oxamniquine* apresentaram uma alta capacidade proliferativa para os diferentes antígenos do parasito *S. mansoni*, tais como antígenos do ovo (SEA), verme adulto (SWAP) e cercaria (CERC) do parasito (Caldas *et al.*, 2000). Em nossos resultados, o parâmetro que utilizamos para avaliar a capacidade proliferativa dos linfócitos T foi o percentual de células positivas para a citocina IL-2, considerada fundamental para essa atividade. Somente observamos aumento de linfócitos T CD8⁺IL-2⁺ não estimulados (cultura-controle) e estimulados com SEA em indivíduos negativos jovens entre 10 e 24 anos de idade (**figuras 9 e 13A** respectivamente). Em linfócitos estimulados *in vitro* com SWAP, apenas nos indivíduos entre 10-24 e 70-95 anos de idade o número de células T CD8⁺IL-2⁺ encontrava-se aumentado (**figura 13B**). Assim, a discrepância entre nossos resultados e os dados encontrados por outros autores sugerem que os indivíduos negativos para o exame de fezes avaliados em nosso estudo não receberam nenhum tipo de tratamento. O fato de outros

autores encontrarem um aumento na atividade proliferativa dos linfócitos poderia ser devido à alta heterogeneidade das populações estudadas uma vez que elas incluíam indivíduos de faixas etárias distintas colocadas em um único grupo. Em nosso estudo, por outro lado, avaliamos a atividade dos linfócitos em grupos menores, separando indivíduos jovens, adultos e idosos (50 a 69 e 70 a 95 anos). Essa separação era crucial no nosso caso, pois nosso objetivo era relacionar a infecção crônica com os efeitos do envelhecimento. Esse processo biológico natural é acompanhado de alterações marcantes no sistema imune tais como involução tímica, diminuição do tecido hematopoético da medula óssea, bem como alterações no fenótipo, perfil de citocinas e no repertório de linfócitos.

Não podemos classificar os indivíduos negativos como “normais endêmicos” pois esses últimos apresentam uma produção aumentada de IFN- γ geralmente associada à resistência a infecção (Correa-Oliveira *et al.*, 1998). Somente observamos aumento no percentual de linfócitos TCD4⁺IFN- γ ⁺ nos indivíduos entre 70-95 anos (**figura 8**) e um aumento no percentual de células T CD8⁺ positivas para essa citocina em indivíduos entre 10 e 49 anos de idade (**figura 15**). Novamente, as diferenças entre os nossos resultados e aqueles relatados por Corrêa-Oliveira e colaboradores podem ser explicados pela heterogeneidade etária da população analisada nos estudos prévios ao nosso.

Existem outras hipóteses explicativas para o fato de indivíduos moradores de áreas endêmicas não apresentarem ovos de *S. mansoni* no exame de fezes. Uma delas seria a ausência de contato contínuo com águas em locais de transmissão ativa. Essa hipótese não se aplica em nosso caso. Um estudo epidemiológico sistemático da população estudada envolvendo a observação do cotidiano da comunidade constatou que indivíduos das diversas faixas etárias (jovens, adultos e idosos) apresentaram índices semelhantes de contato com águas contaminadas (Gazzinelli *et al.*, 2001). Outra possibilidade seria que esses indivíduos apresentavam-se com infecção unissexual. Acreditamos que essa hipótese seria improvável uma vez que se observou a presença de ovos nas fezes de uma grande parte dos indivíduos e, durante o estudo epidemiológico realizado com a comunidade, todos os indivíduos entraram em contato freqüente com o mesmo local de transmissão ativa da infecção.

Na verdade, as hipóteses citadas acima tentam explicar a resistência de alguns indivíduos moradores de áreas endêmicas à infecção por *S. mansoni*. Uma possibilidade alternativa a

todas elas, a qual nossos dados sugerem, é que o padrão de reatividade imunológica desenvolvido pelos indivíduos negativos seria diferente do padrão de indivíduos infectados. Essa hipótese constitui o cerne do nosso argumento ao longo da análise que faremos dos nossos resultados. Ainda assim, não eliminamos a possibilidade de que alguns dos fatores citados acima possam estar envolvidos no *status* desses indivíduos frente ao risco de contaminação de forma não excludente.

Nesse trabalho pretendemos, então, comparar os perfis de síntese de citocinas por diversas populações de leucócitos do sangue periférico de indivíduos negativos para ovos de *S. mansoni* no exame de fezes e infectados em diversas faixas etárias. Como todos os indivíduos examinados vivem em condições semelhantes de contato com o parasito, a ausência de ovos em determinados indivíduos nos permite estudar o padrão normal de variação na síntese de citocinas ao longo da vida de indivíduos não infectados. As alterações encontradas em indivíduos infectados quando comparados com os indivíduos negativos, por outro lado, pode representar tanto a presença, nos indivíduos negativos, de fatores importantes na resistência à infecção quanto o surgimento, nos indivíduos infectados, de modificações induzidas pela própria presença da infecção. Um estudo longitudinal da população examinando a re-infecção em indivíduos previamente tratados poderia ser mais conclusivo nesse aspecto.

Do ponto de vista da resposta imune celular, a reação imune em resposta aos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro é o evento inicial dentre as alterações patológicas da esquistossomose. Esses ovos são responsáveis pela formação da reação granulomatosa caracterizada por uma reação inflamatória mista com infiltrado celular composto de células mononucleares, polimorfonucleares, células epitelióides e fibroblastos (Boros, 1994; Wahl *et al.*, 1997) que saem da circulação e se acumulam no local do sítio inflamatório atraídas por estímulos quimiotáticos. Essa reação inflamatória acontece logo após a maturação e reprodução sexuada do verme adulto. O próprio ovo do parasito é capaz de liberar fatores quimiotáticos, bem como as células inflamatórias são capazes de liberar citocinas com atividade quimiotática e quimiocinas (MCP-1 e MIP1 α) responsáveis pelo intenso recrutamento de leucócitos (Owhasi *et al.*, 1983; Chensue *et al.*, 1995; Lukacs *et al.*, 1993). O estágio inicial de formação do granuloma também envolve a participação de moléculas de adesão necessárias para interação célula-célula e desenvolvimento da inflamação (Secor

et al., 1994; Jacobs and Marck 1998). A interação predominante observada é entre ICAM-I (*intercellular adhesion molecule-I*) e o seu receptor LFA-1 (*leucocyte functional antigen -1*) (Secor *et al.*, 1994). Normalmente, o tipo de citocinas produzidas por diferentes subpopulações celulares, consideradas importantes para a manutenção e modulação da inflamação, depende da fase de desenvolvimento da doença. Durante a fase inicial, anterior à postura dos ovos pelo parasito, os vermes adultos induzem um perfil de citocinas do tipo 1 com níveis elevados de IFN- γ (Montenegro *et al.*, 1999) e IL-2 e IL-4 (Yamashita and Boros, 1992) e, após o depósito dos ovos nos tecidos esse padrão é drasticamente alterado, ocorrendo o predomínio de citocinas do tipo 2, tais como IL-4 e IL-5 (Chensue *et al.*, 1993). Existem trabalhos na literatura mostrando a importância da IL-4 no tamanho do granuloma (Falcão *et al.*, 1998) e da IL-5 no aumento no processo de recrutamento de eosinófilos e de diferenciação de linfócitos B (Sher *et al.*, 1990; Weinstock, 1992).

Após esses estágios iniciais, ocorre diminuição do tamanho dos granulomas com redução da inflamação ao redor dos ovos, processo denominado “imunomodulação” (Andrade and Warren, 1964). Durante essa fase, há o predomínio de citocinas consideradas imunomoduladoras, como IL-10, capazes de suprimir a expressão de moléculas co-estimuladoras, tais como B7-1 e B7-2 e moléculas do complexo principal II (MHC-II), nas células apresentadoras de antígenos (APC) comprometendo as interações células-célula e, conseqüentemente, modulando a inflamação (Buelens *et al.*, 1995). O quadro acima apresenta uma evolução típica da resposta imune celular em indivíduos susceptíveis infectados pelo *S. mansoni* e o papel de diferentes populações celulares na modulação da doença. Os linfócitos têm participação intensa e vital em todo o processo de produção de citocinas capazes de induzir ou regular a inflamação. No entanto, as diferenças entre esses indivíduos e aqueles que moram em áreas de transmissão ativa da esquistossomose e que não secretam ovos do parasito nas fezes ainda não está claro. Nesse sentido, avaliamos primeiramente o padrão de resposta imune de indivíduos moradores de área endêmica que apresentaram ou não ovos no exame de fezes (denominados de “negativos” e “infectados”) pertencentes a diferentes faixas etárias.

Observamos grandes alterações no percentual total de células positivas para diferentes citocinas entre indivíduos negativos e infectados de idades diferentes. Interessantemente, essas diferenças se localizam nos pólos extremos da vida. Os indivíduos

adultos entre 25 e 69 anos apresentam padrões relativamente estáveis de expressão de citocinas. Como a faixa etária de 10-24 anos coincide com o período normalmente associado aos primeiros contatos com o parasito e à aquisição da infecção, as diferenças entre células expressando citocinas intracelulares (**linfócitos CD8⁺**- **figura 9**, a seguir) de indivíduos positivos e negativos nesse período podem estar relacionadas exatamente a esse processo inicial da doença. No entanto, diferenças marcantes nos padrões de citocinas positivas principalmente para células CD4⁺ e CD16⁺ foram observadas em indivíduos negativos e infectados acima de 70 anos de idade (**linfócitos CD4⁺**- **figura 8**, a seguir). Esses dados sugerem fortemente que alterações imunológicas relacionadas ao processo do envelhecimento (Eren *et al.*, 1988; Ernst *et al.*, 1993; Sindermann *et al.*, 1993; Takeoka *et al.*, 1996; Pawalec and Solana, 1997; Ogawa *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2001; Schindowski *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2002) podem atuar na resposta imune ao parasito durante a esquistossomose crônica.

O envelhecimento é considerado um fenômeno complexo acompanhado por alterações quantitativas, qualitativas e estruturais no organismo. Tais alterações contribuíram para o surgimento do termo “imunosenescência” que está associado a uma diminuição fisiológica na função imune paralela ao processo de envelhecimento (Pawalec and Solana, 1997). Muitos trabalhos demonstraram que o envelhecimento antes de tudo é um processo celular durante o qual a própria célula envelhece sendo esse fenômeno conhecido como senescência celular ou senescência replicativa (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick, 1965). Trabalhos na literatura demonstraram que células eucarióticas tais como fibroblastos, linfócitos T, queratinócitos, células adrenais, células do músculo liso e células β pancreáticas de indivíduos idosos apresentam uma capacidade limitada para se dividir (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick, 1965; Smith and Pereira-Smith, 1996). Embora essas células apresentem um comprometimento no processo mitótico, elas não morrem em cultura, podendo ficar viáveis (metabolicamente ativas) por um longo período de tempo na fase G0/G1 do ciclo celular. Elas são maiores e achatadas e apresentam fenótipo característico com várias alterações morfológicas e moleculares, telômeros mais curtos, diminuição da expressão do gene c-fos, resistência ao estímulo apoptótico e incapacidade de sintetizar DNA (Seshadri and Campise, 1990; Goletz *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1994).

Existem relatos na literatura mostrando que a senescência também seria responsável pelo declínio na proporção de linfócitos T (CD3⁺), acúmulo de linfócitos T apresentando fenótipo ativado (CD45RO⁺) (Schindowski *et al.*, 2002), diminuição de linfócitos TCD8⁺ tanto no sangue periférico quanto no baço, diminuição do número de linfócitos B (Franceschi *et al.*, 1995; Crisi *et al.*, 1998; Pawalec and Solana, 2001). Ocorre também alteração no perfil de citocinas produzidos pelas células do sistema imune sendo observada mudança para a produção de citocinas efetoras tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IFN- γ (Hobbs, 1993, 1994).

O envelhecimento é um processo que afeta órgãos linfóides como o timo e medula óssea que sofrem alterações durante esse período. Ocorre, em indivíduos idosos, uma atrofia tímica caracterizada pela perda da sua região cortical acarretando, desta maneira, a perda de tímócitos imaturos (Takeota *et al.*, 1996), a diminuição do espaço epitelial tímico, o aumento do espaço perivascular tímico (Flores *et al.*, 1999) e, uma diminuição do tecido hematopoético da medula óssea (Ogawa *et al.*, 2000). A partir dos 20 anos de idade o número de células da linhagem macrófágica diminui e após os 60 anos, ocorre uma redução do percentual de linfócitos T CD4⁺ e de linfócitos B (Ogawa *et al.*, 2000).

A literatura também aponta uma forte associação entre senescência e resistência a infecções por parasitos helmínticos como *Schistosoma sp.* Foi demonstrado que a prevalência e a intensidade de infecção, dada pela presença e quantificação dos ovos nas fezes ou urina dos indivíduos infectados, aumentam progressivamente com a idade alcançando um pico máximo entre dez e vinte anos. Nas subseqüentes décadas de vida, tanto a prevalência quanto a intensidade de infecção diminuem progressivamente (Gryseels, 1994; Fulford *et al.*, 1998; Ouma *et al.*, 1998; Naus *et al.*, 1999). A explicação para essa variação epidemiológica na esquistossomose ainda é controversa. Alguns investigadores consideram que essa diminuição reflete o desenvolvimento de uma imunidade adquirida no indivíduo adulto (Butterworth *et al.*, 1985). Outros acreditam que a diferença observada entre crianças, adultos e idosos na prevalência e na intensidade de infecção pode ser atribuída a mudanças no comportamento, ou seja, uma redução nos níveis de exposição dos indivíduos mais velhos a águas contaminadas (Dalton and Pole, 1978). Entretanto, há relatos mostrando um aumento na intensidade de infecção por *S. mansoni* em indivíduos

idosos acima de 70 anos de idade moradores da área endêmica de Melquíades MG. (Bethony *et al.*, 2001).

Para estudar a possibilidade da influência do envelhecimento na reatividade imunológica durante o curso da esquistossomose, analisamos inicialmente o perfil total de síntese de citocinas por populações de linfócitos T e suas subpopulações do sangue periférico dos indivíduos portadores da infecção crônica pelo *S. mansoni*. Com relação à síntese de IL-2 (**figura 2**), nossos resultados mostraram diferenças entre as 4 faixas etárias no percentual de linfócitos T positivos para essa citocina nos indivíduos do grupo negativo. Observamos um percentual maior de linfócitos T positivo para IL-2 nos indivíduos jovens entre 10 e 24 anos. Essa citocina está associada à proliferação celular e a capacidade de proliferação declina progressivamente com o envelhecimento. As células de indivíduos jovens de várias espécies animais possuem uma maior capacidade proliferativa do que as células de indivíduos idosos (Gillis *et al.*, 1981; Murasko *et al.*, 1986; Whisler *et al.*, 1996a refs Whisler 1999). Com relação ao grupo infectado, observamos que a infecção foi capaz de mudar o perfil de síntese de citocinas uma vez que os indivíduos infectados mais jovens, entre 10 e 24 anos, e os mais idosos, entre 70 e 95 anos, apresentaram um aumento no percentual dessas células quando comparados com indivíduos das faixas etárias intermediárias, entre 25 e 49 anos e entre 50 e 69 anos de idade, embora o aumento estatisticamente significativo tenha sido observado somente no grupo mais idoso. Esse resultado sugere um aumento na capacidade proliferativa dos linfócitos T nos indivíduos jovens infectados. Entretanto, em indivíduos idosos, onde as células T apresentam um fenótipo preferencialmente ativado, a presença de IL-2 pode resultar em apoptose, atuando mais como um mecanismo imunomodulador do que um mecanismo de ativação celular. Outra possibilidade seria que a infecção tem um papel fundamental na mudança desse perfil e o aumento no percentual de células IL-2⁺ poderia estar associado ao aumento na reatividade celular nesses indivíduos mais idosos (70 a 95 anos). Com relação à síntese de IFN- γ (**figura 3**), a diminuição no percentual de linfócitos T positivos para essa citocina em indivíduos infectados entre 25 a 49 anos poderia estar associada a uma susceptibilidade maior a infecção pelo parasito. A produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ tem sido associada à imunidade adquirida em indivíduos adultos moradores de regiões endêmicas para a infecção (Brito *et al.*, 2000). Como, na nossa amostra, essa faixa etária compreende

os indivíduos que normalmente já entraram em contato com o parasito, a frequência reduzida de células positivas para essa citocina nos indivíduos infectados pode estar relacionada exatamente a ausência da imunidade adquirida e, portanto, de proteção nesses indivíduos. Por outro lado, essa diferença pode resultar da estimulação, pelo parasito, de células produtoras de outras citocinas inibidoras da produção de IFN- γ , tais como IL-4 e IL-10, nos indivíduos infectados. Observamos que a infecção também contribuiu para o aumento no percentual médio de células produtoras de IFN- γ a partir dos 50 anos de idade sugerindo que, nesses indivíduos, o aumento poderia estar relacionado ao envelhecimento, já que a produção de citocinas efetoras estão aumentadas durante o envelhecimento (Hobbes, 1993, 1994).

Ao analisarmos o percentual médio de linfócitos positivos para IL-4 (**figura 4**) observamos que a infecção induziu algumas alterações como, por exemplo, o aumento no percentual médio dessas células em indivíduos a partir de 50 anos sugerindo que essa alteração pode estar relacionada a ambos os processos: mecanismos patológicos associados à infecção e à senescência. Falcão e colaboradores demonstraram que a IL-4 seria importante para o aumento do granuloma *in vitro* (Falcão *et al.*, 1998). Novamente, o processo de envelhecimento também contribui para o aumento de citocinas efetoras, como IL-4 (Hobbes, 1993, 1994).

Ao analisarmos o percentual de células positivas para IL-10 (**figura 5**), observamos que, independentemente da infecção, os indivíduos mais idosos (entre 70 e 95 anos) apresentam uma frequência maior de linfócitos T positivos para essa citocina quando comparado com os demais grupos. Esses dados sugerem que essa alteração estaria associada ao processo de envelhecimento. Novamente observamos que a infecção foi capaz de acentuar esse aumento nos indivíduos entre 70 e 95 anos quando os comparamos com o grupo negativo pertencente à mesma faixa etária. Esse resultado nos sugere que o aumento de IL-10 estaria associado ao processo de senescência, o que está de acordo com dados da literatura que mostram o aumento da produção de IL-10 total produzida por células de indivíduos idosos estimuladas em cultura (Castle *et al.*, 1999). Por outro lado, o percentual alto de IL-10 encontrado nas diferentes faixas etárias do grupo infectado também está de acordo com dados anteriores do nosso laboratório que evidenciam a produção aumentada

de IL-10 em indivíduos cronicamente infectados que apresentam a forma clínica intestinal (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998).

Com esses primeiros resultados, podemos fazer algumas observações. As duas mais importantes seriam: a) o aumento no percentual de IL-10 nos indivíduos entre 70 e 95 anos negativos para ovos no exame de fezes e infectados e b) o aumento de ambas as citocinas, IL-2 e IL-10, em indivíduos infectados pertencente à mesma faixa etária (**figuras 2 e 5**). Com relação a IL-10, seu aumento poderia estar associado tanto à infecção ou ao envelhecimento e, como ela está associada à modulação da reação granulomatosa na fase crônica da infecção, podemos sugerir que os indivíduos idosos entre 70 e 95 anos provavelmente apresentariam uma capacidade reguladora maior que os jovens, uma vez que eles apresentaram um percentual maior. Por outro lado, como o aumento na produção dessa citocina é constitutivo nos idosos, o aumento da IL-10 pode também estar associado à redução de processos inflamatórios importantes na proteção anti-infecciosa.

No entanto, ao mesmo tempo em que observamos o aumento de IL-10 nos mais idosos infectados também observamos o aumento de IL-2 nesses indivíduos. Dois mecanismos mediados pela IL-2 podem estar associados a isto: a) aumento da reatividade celular ou b) apoptose celular.

Diante do exposto, fica evidente que o processo do envelhecimento pode influenciar a resposta imune desenvolvida pelo indivíduo frente a uma infecção. Em nosso caso, esse fato pode ser observado pelas diferenças no perfil de síntese de diferentes citocinas por células de indivíduos infectados ou negativos consideradas importantes para a modulação ou não da infecção pelo *S. mansoni*.

Como verificamos algumas modificações com relação ao perfil imunológico apresentadas por indivíduos negativos e infectados jovens, adultos e idosos, nosso interesse foi verificar se essas alterações encontradas estariam refletidas em diferentes populações e sub-populações de leucócitos positivos para as citocinas intracelulares analisadas anteriormente e, o mais importante, gostaríamos de verificar qual a contribuição desses diferentes tipos celulares para o perfil imunológico do indivíduo.

No que diz respeito à imunidade inata, curiosamente, ela é mais resistente às alterações associadas ao envelhecimento e as células NK estão especialmente bem preservadas em indivíduos idosos saudáveis e com mais de 100 anos (Solana *and* Mariani,

2000). Alguns trabalhos têm demonstrado um aumento associado ao envelhecimento de células $CD16^+CD57^-$ com uma alta capacidade citotóxica (Sansoni *et al.*, 1993). Células com esse fenótipo estão aumentadas não somente na senescência, mas também em situações clínicas de ativação crônica do sistema imune. Em indivíduos centenários, há um aumento de células $CD3^+CD8^+$ co-expressando receptores NK sendo que a maioria é $CD28^-$ e possui telômeros curtos, fato consistente com a hipótese de que essas células são citotóxicas e passam pelo processo de senescência replicativa (Tarazona *et al.*, 2000).

As células NK apresentam um papel importante na resposta imediata do organismo frente a infecções. Mas o seu papel na esquistossomose ainda não é claro. Em animais experimentais, como camundongos, o tratamento com anticorpos anti-NK1.1 foi capaz de aumentar a fibrose hepática e diminuir a produção de IL-12 durante a fase crônica sugerindo que as células T NK1.1 do fígado podem apresentar um papel imunomodulador nesse estágio da infecção (Asseman *et al.*, 1996).

Nossos dados (**figura 6**) são coerentes com estudos anteriores que demonstraram um aumento na frequência de células NK em indivíduos idosos (Alés-Martine *et al.*, 1988; Abo *et al.*, 2000; Solana and Mariani, 2000). Observamos que indivíduos entre 70 e 95 anos de idade negativos ou infectados apresentaram um aumento no percentual de células CD16 positivas para IFN- γ no sangue periférico (**figura 6**), sendo que, em indivíduos infectados, esse aumento foi observado também na faixa etária anterior, entre 50 a 69 anos de idade. Esse aumento pode estar associado ao aumento, com o envelhecimento, da subpopulação de células NK assim como da produção de citocinas efetoras, como é o caso de IFN- γ .

Não podemos esquecer também que o envelhecimento é acompanhado de um estado progressivo de ativação global do sistema imune e que essas células estão associadas a situações de ativação crônica. Estudos anteriores mostraram que indivíduos normais de área endêmica apresentam um aumento na produção de IFN- γ , geralmente por linfócitos T $CD4^+$, em relação aos indivíduos infectados apresentando as formas clínicas intestinal e hepatoesplênica (Brito *et al.*, 2000). O aumento na frequência de células NK IFN- γ^+ sugere um papel importante dessas células na resistência e proteção à infecção e pode significar um mecanismo compensatório em indivíduos onde a função de linfócitos T está comprometida.

Ao adicionarmos às culturas de células dos dois grupos de indivíduos dois importantes antígenos obtidos de diferentes formas evolutivas do parasito *S. mansoni* (SEA) (**figura 10A**) e (SWAP) (**figura 10B**) percebemos que o estímulo com esses dois antígenos desencadeou o aumento na frequência de células $CD16^+IFN-\gamma^+$ nos indivíduos negativos com idade a partir de 50 e 24 anos respectivamente. Isto sugere uma contribuição das células NK na síntese de $IFN-\gamma$ que pode estar relacionada à ausência de infecção nesses indivíduos. (Seki *et al.*, 2000).

Curiosamente, a adição desses mesmos antígenos à cultura de células dos indivíduos infectados de 70 a 95 anos induziu uma diminuição no percentual dessas células. Aparentemente, nesses indivíduos, as células $CD16^+IFN-\gamma^+$ já estariam muito ativadas *in vivo* e, portanto, refratárias à estimulação (direta ou indireta) *in vitro*. A exposição aos antígenos do parasito, já presentes *in vivo* nesses indivíduos infectados, pode estar induzindo apoptose dessas células. Isso poderia explicar a diminuição no seu percentual. Outra explicação (ou talvez uma consequência) do número reduzido de células positivas para $IFN-\gamma$ nesses indivíduos seria a diminuição na imunidade protetora nesses indivíduos.

CD16 é o receptor $Fc\gamma RI$ e está expresso nas células NK, mas também em macrófagos e linfócitos T ativados. Como as células NK expressam uma concentração alta desse receptor, ele é frequentemente utilizado como marcador de células NK embora a presença de CD56 seja um marcador mais específico para essas células. Não utilizamos esse marcador em nossas culturas devido a problemas técnicos uma vez que a utilização do anticorpo anti-CD56 FITC não marcou nenhuma célula. Mas, assumindo que a maior parte das células $CD16^+$ nas nossas culturas é efetivamente células NK, resta saber se tais células pertencem à população de células NK $CD3^-$ ou à população de linfócitos NKT. Essa questão levantada é de grande importância para o desenvolvimento da resposta imune do indivíduo, uma vez que as células NK e os macrófagos apresentam um papel importante no início da infecção sendo importantes na imunidade inata, pois são inespecíficas. Já as células NKT produzem IL-4 e $IFN-\gamma$ ao serem ligadas por antígenos apresentados pela molécula CD1 apresentando, dessa forma, alguma especificidade para a infecção.

Com relação aos linfócitos B, relatos na literatura mostram que a senescência está associada a alterações no compartimento dessas células como, por exemplo, no seu processo de maturação (Klinman *and* Kline, 1997). Alguns pesquisadores, utilizando o

modelo experimental murino, demonstraram que entre os 12 e os 24 meses de idade, há uma dramática diminuição na geração de linfócitos pré-B. Utilizando-se de marcadores de superfície celular, tais como B220, eles demonstraram que ocorre uma diminuição das células pré B na medula óssea entre 1 a 4 meses de idade. Esse efeito é ainda mais acentuado em camundongos de 12 a 24 meses de idade, pois essa população se encontra até 4 vezes menor em relação aos animais jovens (Stephan *et al.*, 1996, Klinman *and* Kline, 1997).

Também se observam alterações nas atividades globais do sistema imune caracterizadas pelo declínio na imunidade humoral sendo que animais experimentais e humanos idosos apresentam uma redução na produção de anticorpos específicos para novos antígenos. Essa observação foi feita pela primeira vez em 1932 por Paul e colaboradores que relataram uma redução da resposta de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) em idosos quando comparados com jovens humanos (Paul *and* Bunnell, 1932). Posteriormente, em 1968, outros pesquisadores também observaram o mesmo efeito na resposta humoral em idosos. Robert e colaboradores relataram uma diminuição na produção de imunoglobulinas anti-*Salmonella flagelin* ao mesmo tempo em que os anticorpos específicos para DNA estavam aumentados (Roberts-Thomson, *et al.*, 1968).

O papel dos linfócitos B na patologia de doenças parasitárias como a esquistossomose não é muito claro ainda. Em modelos experimentais foi observado que camundongos deficientes em células B expostos ao parasito *S. Mansoni* desenvolvem uma patologia tecidual aumentada (formação exacerbada do granuloma hepático e fibrose) durante a infecção aguda e, o mais importante, não são capazes de modular a doença durante o estágio mais avançado da infecção (fase crônica) sugerindo que a modulação na fase tardia da reação celular granulomatosa pode envolver a participação dessas células (Jankovic *et al.*, 1998).

Em nosso trabalho, também avaliamos a participação e contribuição dos linfócitos B para o perfil imunológico de indivíduos jovens, adultos e idosos infectados e negativos para ovos no exame de fezes que moram em áreas de transmissão ativa para esquistossomose (**figura 7**). Observamos um aumento no percentual de células CD19⁺IL-10⁺ apenas nos indivíduos negativos adultos entre 24 e 49 anos de idade. Com a infecção, notamos que indivíduos jovens entre 10 a 24 e 70 a 95 anos de idade apresentaram um

aumento significativo no percentual dessas células. A participação dos linfócitos B na síntese de IL-10 pode estar relacionada aos linfócitos B apresentando o fenótipo CD5⁺, uma vez que a expressão da molécula CD5 marca uma sub-população de linfócitos B, chamada de B1, considerada a principal fonte de IL-10 (Velupillai *et al.*, 1997). Os linfócitos B1 são responsáveis pela produção da maioria dos anticorpos naturais polirreativos tais como anticorpos anti-DNA e anti-idiotípicos em humanos e em animais (Roberts-Thomson *et al.*, 1968; Stall *et al.*, 1996). Eles também se encontram expandidos em algumas doenças autoimunes (Jarvis *et al.*, 1992; Vernino *et al.*, 1992). Durante a fase crônica da infecção por *S. Mansoni*, o sistema imune do hospedeiro está constantemente exposto a vários estímulos antigênicos que poderiam levar direta ou indiretamente a um estado de ativação policlonal. Nos indivíduos infectados, os linfócitos B1, expandidos pela exposição aos antígenos do parasito, poderiam estar contribuindo como uma possível fonte de IL-10, citocina capaz de inibir diretamente a diferenciação e proliferação de linfócitos Th1 (produtores de citocinas inflamatórias) (Fiorentino *et al.*, 1991) e importante para a modulação da resposta granulomatosa (Falcão *et al.*, 1998). Os efeitos reguladores da IL-10 estão associados à redução da capacidade de apresentar antígenos por células apresentadoras de antígenos (APC) pela inibição de moléculas co-estimuladoras importantes para a ativação celular (De Waal Malefyt *et al.*, 1991; Willems *et al.*, 1994). O granuloma esquistossomótico está relacionado principalmente a uma reação de hipersensibilidade mediada principalmente por linfócitos T. No entanto, não podemos excluir a possibilidade da existência de mecanismos paralelos que determinariam a ativação de B. Desse modo, a resposta imune granulomatosa poderia ser um somatório de eventos celulares e humorais. De fato, a produção de IgE e IgG4 específicas em pacientes e animais infectados é uma evidencia dessa participação de linfócitos B no processo (Viana *et al.*, 1995; Van Dam, *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1997). Alguns autores, utilizando modelos experimentais, demonstraram o aumento de células B1 em camundongos infectados com *S. mansoni* que apresentavam diferentes níveis de susceptibilidade para a doença (Velupilai *et al.*, 1997). Esses autores sugeriram que os linfócitos B1 CD5⁺ seriam a principal fonte de IL-10 produzida nesses animais. Não podemos dizer que a principal fonte de IL-10 nos perfis apresentados pelos indivíduos infectados no nosso estudo seja apenas os linfócitos B CD5⁺ mas, de alguma maneira, eles poderiam estar contribuindo para a modulação da

resposta granulomatosa nos indivíduos infectados jovens e idosos. Especialmente nos idosos (70 e 95 anos), esse aumento poderia estar associado a um efeito de sobreposição do envelhecimento com a infecção. Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que o envelhecimento está associado ao aumento de células CD5⁺(LeMaout *et al.*, 1999). Não podemos afirmar que o aumento de células CD19⁺ IL-10⁺ nos idosos seja devido somente às células CD5⁺ uma vez que não sabemos o seu fenótipo.

Os linfócitos CD19⁺ de indivíduos negativos e infectados foram estimulados com o antígeno SEA (**figura 11A**) ou SWAP (**figura 11B**) que são importantes antígenos obtidos de diferentes formas evolutivas do parasito *S. mansoni* (SEA) e, teve o objetivo de avaliar a influência desses antígenos no percentual das citocinas por diferentes populações de leucócitos. Um dos antígenos é proveniente de ovos do parasito (SEA) e é capaz de induzir uma resposta predominantemente de tipo 2 ativando eventos inflamatórios mediados por IL-4 e IL-5, bem como eventos imunomoduladores mediados por IL-10. O outro antígeno utilizado foi obtido de vermes adultos (SWAP) sendo capaz de induzir uma resposta predominantemente do tipo 1 com a produção de IL-2 e IFN- γ . Ao longo do processo inflamatório que caracteriza a esquistossomose, as células do sistema imune do hospedeiro interagem, ao mesmo tempo, com peptídeos derivados das duas formas do parasito. A estimulação com esses antígenos induziu uma diminuição no percentual de células CD19⁺IL-10⁺ em todas as faixas etárias. Pode ser que o estímulo com esses extratos de antígenos do parasito produza uma ativação policlonal em linfócitos B2 convencionais pela ligação de receptores clonais ou não clonais (do tipo receptores *Toll*) e, ao ativar e expandir esses linfócitos, o numero de linfócitos B1 positivos para IL-10 diminua proporcionalmente na população geral de células CD16⁺ em relação às células com outro tipo de atividade. Outra explicação seria que essa subpopulação não seria importante como fonte de IL-10 nos indivíduos negativos de área endêmica. Diferentemente dos indivíduos negativos, a adição de SEA ou SWAP à cultura de células dos indivíduos infectados não induziu o mesmo efeito. Observamos que o percentual de células CD19⁺IL-10⁺ continuou alto, principalmente a partir de 49 anos de idade para a cultura de células estimuladas com SEA e a partir de 50 anos para o estímulo com SWAP. Uma hipótese plausível para essa estabilidade no percentual de IL-10 por células CD19⁺ mesmo após a estimulação *in vitro* seria exatamente a presença de infecção nesses indivíduos. Em condições de ativação

crônica, como no caso dos indivíduos infectados, a diferenciação e ativação de células positivas para IL-10, sejam elas linfócitos T ou B, já ocorreu *in vivo* e o estímulo *in vitro* deve apenas manter esse padrão de ativação. A frequência de células CD19⁺IL-10⁺ nos indivíduos infectados mais idosos (70 a 95 anos) diminuiu após o estímulo com SEA ou SWAP quando comparamos com a cultura não estimulada. Pode ser que essa subpopulação não seja tão importante para a manutenção dos efeitos moduladores da infecção nessa faixa etária quanto parece ser na faixa etária anterior.

Com relação à população de linfócitos T, alguns trabalhos têm demonstrado uma redução na proporção de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, (Schindowski *et al.*, 2002), assim como um aumento na proporção de células T CD4⁺ apresentando um fenótipo de memória associado ao envelhecimento. Além disso, também foi observado um aumento de linfócitos T CD8⁺CD28⁻ em indivíduos idosos após estimulação *in vitro* (Pawalec and Solana, 2001; Pawalec *et al.*, 2001).

Há vários anos já foi evidenciada alterações na atividade dos linfócitos T associadas à senescência. Foi observado um declínio tanto na proliferação celular, atividade citotóxica quanto no auxílio aos linfócitos B (Konen *et al.*, 1973; Gottesman *et al.*, 1981). O fenótipo dessas células também está alterado; existe uma maior proporção de linfócitos apresentando o fenótipo ativado (CD45RO⁺) em relação à proporção de células virgens (CD45RA⁺) (Karanfilov *et al.*, 1999). Além da presença desses marcadores, os linfócitos T de indivíduos idosos também secretam um padrão de citocinas de células ativadas. Ocorre um aumento na produção de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 (Daynes *et al.*, 1990; Hobbes *et al.*, 1993, 1994). O predomínio de linfócitos T efetores nos idosos poderia explicar o declínio na capacidade do indivíduo em responder a novos desafios.

Como descrito anteriormente, a esquistossomose é caracterizada pela fase aguda inflamatória acompanhada da fase crônica onde a resposta inflamatória e os vários mecanismos moduladores desenvolvidos para atenuar essa inflamação estão presentes. A diminuição da resposta granulomatosa contra os ovos presentes no fígado juntamente com a mudança no padrão de citocinas produzidas por populações distintas de células efetoras são considerados fatores importantes para controlar os danos teciduais causados pelo parasito e o desenvolvimento de sub-populações de linfócitos T efetores capazes de produzir diferentes citocinas podem ser considerados fundamentais na determinação da resposta

imune contra a infecção. Trabalhos na literatura têm evidenciado, ao longo dos anos, que a formação do granuloma é um evento dependente de células T. Um alto índice de morbidez está associado com a resposta proliferativa de linfócitos T *in vitro* para o antígeno do ovo de *S. mansoni* (Fallon *et al.*, 1998; Ottesen *et al.*, 1978) e essa resposta pode sofrer alterações durante o desenvolvimento da doença. Foi demonstrado, por exemplo, que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos na fase aguda apresentam uma resposta proliferativa *in vitro* aumentada tanto para os antígenos do ovo (SEA) quanto para os antígenos do verme adulto (SWAP). Já a resposta para SEA de PBMC de indivíduos na fase crônica apresentando a forma clínica intestinal se apresenta significativamente reduzida (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998).

Uma série de estudos tem demonstrado que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na imunomodulação da reatividade granulomatosa da infecção por *S. mansoni*. Dentre eles, o envolvimento de linfócitos T supressores capazes de inibir uma resposta induzida por mitógenos ou pelos antígenos SEA e SWAP do parasito (Colley *et al.*, 1978; Ellner *et al.*, 1980). Ellner e colaboradores, por exemplo, demonstraram que o baço de indivíduos apresentando a forma clínica hepatoesplênica, considerada a mais severa da doença, apresentava células capazes de suprimir a proliferação de células tanto do baço quanto do sangue periférico. Outros estudos também têm abordado o papel de diferentes citocinas produzidas por diferentes sub-populações de linfócitos T na evolução da esquistossomose. Foi demonstrado, por exemplo, um desequilíbrio na relação IL-4/IFN- γ em cultura estimulada de linfócitos de pacientes infectados crônicos, com ausência da produção de IFN- γ em níveis detectáveis e elevação considerável de IL-4 (Zwingenberger *et al.*, 1991). Mais recentemente foi demonstrado que a produção de INF- γ por linfócitos T é importante na resposta imune protetora durante a infecção (Brito *et al.*, 2000).

Com relação aos linfócitos T CD4⁺, trabalhos na literatura têm demonstrado a participação dessas células durante o desenvolvimento da esquistossomose. O estudo de Martins-Filho e colaboradores mostra, por exemplo, uma relação direta entre ativação de células T CD4⁺ e baixo padrão de reatividade imunológica *in vitro* em indivíduos que apresentavam a forma clínica intestinal da esquistossomose sugerindo que o estabelecimento da fase crônica intestinal poderia estar associado a uma diminuição de células ativadas (Martins - Filho *et al.*, 1997). Brito e colaboradores demonstraram que as

células T CD4⁺ do sangue periférico de indivíduos normais endêmicos eram as responsáveis pela alta produção de IFN- γ e TNF- α após estimulação *in vitro*, sugerindo que esses linfócitos Th1 poderiam estar associados à resistência a infecção (Brito *et al.*, 2000). Em nossos resultados, também observamos uma forte contribuição de linfócitos T CD4⁺ para o perfil de resposta imune desenvolvido por indivíduos negativos e infectados moradores de áreas de infecção ativa para o *S. mansoni* (**figura 8**). Foi observado que indivíduos negativos entre 70 e 95 anos de idade apresentaram um perfil de citocinas distinto do perfil encontrado nos indivíduos jovens também negativos. Ocorre, com o envelhecimento, um aumento na frequência de linfócitos produtores de citocinas efetoras como IL-4, IL-10 e IFN- γ . Nossos dados estão de acordo com outros relatos na literatura que evidenciam alterações no perfil de citocinas semelhantes associadas ao envelhecimento (Hobbess *et al.*, 1993; Born *et al.*, 1995; Sakata-Kaneko *et al.*, 2000). A predominância de citocinas efetoras (secretadas tardiamente durante a ativação linfocitária) pode ser consequência de um aumento do estado geral de ativação do sistema imune na senescência. O aumento no número de linfócitos apresentando um fenótipo típico de células cronicamente ativadas, bem como o aumento de suas atividades efetoras, a diminuição de células com fenótipo virgem e também a diminuição de citocinas relacionadas a linfopoiéses tais como IL-2, IL-3 e GM-CSF são características do sistema imune do idoso (Miller, 1996). O grupo de indivíduos idosos negativos, no nosso estudo, pode ser considerado resistente à infecção por *S. mansoni* uma vez que eles estão sempre em contato com áreas de transmissão ativa para a esquistossomose e não apresentam ovos nas fezes.

Observamos que a infecção introduziu algumas alterações no perfil celular dos indivíduos positivos. Por um lado, ocorre uma diminuição na proporção de linfócitos T CD4⁺ IL-10⁺ nos indivíduos mais idosos entre 70 e 95 anos de idade quando comparados com os indivíduos negativos e, por outro lado, há um aumento drástico e surpreendente no percentual de células T CD4⁺ IL-2⁺ nesses indivíduos. A IL-2 é uma citocina fundamental para a atividade dos linfócitos T como, por exemplo, a atividade proliferativa. Com relação a IL-10, sabe-se que muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a imunomodulação observada em indivíduos infectados por *S. mansoni*, dentre eles o envolvimento de citocinas imunomoduladoras como a IL-10 (Flores-Villanueva *et al.*, 1996; Falcão *et al.*, 1998). Essa interleucina, produzida por diversas populações celulares,

apresenta um importante papel anti-inflamatório e imunossupressor em várias patologias. A IL-10 inibe a ativação antígeno-específica da proliferação de células T do sangue periférico em humanos (Yessel *et al.*, 1992) e é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-4 (De Waal *et al.*, 1991). Em doenças parasitárias como a esquistossomose, alguns autores demonstraram a importância da IL-10 na modulação da resposta inflamatória e na fase crônica (Falcão *et al.*, 1998). A diminuição da resposta de células Th1 antígeno-específica associada à supressão da expressão de moléculas do MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras (como B7 nas células acessórias) estão relacionadas à produção de IL-10 (Groux *et al.*, 1998).

Muitos estudos, ao longo dos anos, demonstraram que a presença de células reguladoras é um importante mecanismo para a indução de fenômenos imunológicos considerados importantes para a homeostase do sistema imune tais como tolerância imunológica aos autocomponentes. Alguns autores, utilizando modelos experimentais, demonstraram, por exemplo, a importância de células emigrantes do timo na constante manutenção dessa homeostase em vários órgãos. Quando animais *nude* (atímicos) recebem transplantes de timo de animais tratados com ciclosporina, um potente imunossupressor com efeitos específicos em linfócitos T, eles desenvolveram doenças autoimunes órgão-específicas tais como gastrite, ooforite, tireoidite. Também foi observado nesses animais um aumento na produção de anticorpos para vários autocomponentes, como por exemplo, para células parietais gástricas (Sakaguchi *et al.*, 1988). Outros experimentos demonstraram que o timo está envolvido na produção contínua de clones de linfócitos potencialmente auto-reativos e de linfócitos supressores que, em condições normais, seriam capazes de controlar a auto-reatividade dos primeiros. Ou seja, a seleção da população de células reguladoras parece ser um evento intratímico, embora a sua atuação ocorra na periferia tanto no controle da auto-reatividade como no recrutamento de novas células para um padrão regulador (Sakaguchi *et al.*, 1985; Bouguniewicz *et al.*, 1989; Coutinho *et al.* 1993; Qin *et al.*, 1993; Bonomo *et al.*, 1995). Recentemente, foi caracterizada a participação de sub-populações de células T reguladoras de tipos variados, tais como CD4⁺CD25⁺, Th3 e Tr1 em processos inflamatórios crônicos tais como doenças auto-imunes (Sakaguchi *et al.*, 1995; Thornton *and* Shevach, 1998, 2000; Faria *and* Weiner, 1999). Uma parte dessas células, como as células CD4⁺CD25⁺, é de fato gerada no timo enquanto que outras sub-

populações reguladoras, como as células Tr1 e Th3, são induzidas na periferia. As células T CD4⁺CD25⁺ desempenham seu papel regulador via contato celular (Itoh *et al.*, 1999) enquanto que as células Tr1 e Th3 medeiam seu efeito através de citocinas como IL-10 e TGF- β respectivamente (Groux *et al.*, 1997; Faria *and* Weiner, 1999).

No nosso caso, podemos sugerir uma diminuição na capacidade imunomoduladora por parte das células CD4⁺IL-10⁺ nos indivíduos mais idosos infectados em relação aos indivíduos negativos para o exame de fezes da mesma faixa etária já que a frequência dessas células está diminuída nesses indivíduos. É possível que outras células reguladoras também participem na modulação do processo inflamatório na infecção pelo *S. mansoni*. Recentemente alguns autores demonstraram que a modulação durante a infecção com o helminto *Onchocerciasis volvulus* e mediada por células T que secretam IL-10 e TGF- β capazes de suprimir a resposta Th2 predominante nessa infecção (Doetze *et al.*, 2000).

Ao estimularmos as células de ambos os grupos, negativos e infectados, com SEA (**figura 12A**) ou SWAP (**figura 12B**) observamos que a adição desses antígenos às culturas de células dos indivíduos negativos não produziu nenhum efeito adicional àqueles já observados na cultura sem estimulação sugerindo que as alterações ocorridas no perfil celular desses indivíduos estão associadas ao envelhecimento propriamente dito.

Ao mesmo tempo, observamos algumas alterações na estimulação com SEA (**figura 12A**) em indivíduos infectados sugerindo que estas estão relacionadas à infecção pelo *S. mansoni*. Interessantemente, a diminuição no percentual de IL-2 pelos linfócitos dos indivíduos mais idosos (70-95 anos) após a estimulação com SEA faz com que esses indivíduos se aproximem, no percentual de células CD4⁺IL-2⁺, dos indivíduos das demais faixas etárias. A IL-2 estimula a proliferação de linfócitos T. Esse dado é interessante porque provavelmente indica que o aumento no percentual de linfócitos positivos para IL-2 nos idosos não se relaciona a antígenos importantes na infecção (ver adiante os dados relativos à estimulação com SWAP também), mas é um efeito inespecífico provavelmente relacionado à expansão de células T que ocorre naturalmente no envelhecimento. A adição de SEA às culturas de células diminuiu o percentual de linfócitos TCD4⁺IL-10⁺ nos indivíduos idosos (50-69 anos) infectados quando comparados com as células estimuladas dos indivíduos negativos, sugerindo novamente uma participação menor das células CD4⁺

em eventos potencialmente importantes em modular a reação inflamatória nesses indivíduos.

A estimulação das células com extrato de verme adulto (SWAP) afeta, principalmente, o percentual de citocinas em indivíduos infectados idosos (**figura 12B**). Houve uma diminuição no percentual de IL-10 e IL-2 nos mais idosos (70-95 anos) quando comparadas com as culturas sem estímulo nessa mesma faixa etária. Por outro lado, ocorre um aumento no percentual de células T CD4⁺ positivas para IL-4 nos indivíduos mais idosos infectados (70-95 anos) quando comparado com a cultura controle e estimuladas também estimuladas com SWAP em indivíduos da mesma faixa etária.

Comparando os resultados de células B (CD19⁺) e T (CD4⁺) (**figuras 7 e 8** respectivamente), observamos que os indivíduos entre 70 e 95 anos negativos e infectados apresentaram um perfil oposto em relação à síntese de IL-10. A presença de infecção está associada à redução do percentual de células T CD4⁺ e a um aumento, talvez compensatório, do percentual de linfócitos B CD19⁺ nos sugerindo que embora o envelhecimento apresente mudanças drásticas e marcantes, algumas atividades imunológicas fundamentais tais como eventos imunomoduladores mediados por IL-10, permanecem ainda que mediados por diferentes populações celulares. Provavelmente, na ausência desses eventos, indivíduos infectados nessa faixa etária, seriam mais propensos ao desenvolvimento de formas graves da doença ao invés da forma intestinal.

Como discutimos anteriormente, a adição de SEA ou SWAP reduz o percentual de IL-2 aos níveis apresentados nas demais faixas etárias sugerindo que seu aumento após os 70 anos de idade não se relaciona a exposição a antígenos do parasito. As alterações apresentadas pela adição de SEA ou SWAP nas culturas de células CD4⁺ se concentraram nos indivíduos idosos (acima de 70 anos). Como a estimulação com os antígenos utilizados no nosso protocolo é de 5 horas, esses dados sugerem que as alterações na síntese de citocinas devem ocorrer em células já em ciclo através da ligação de receptores não clonais. Os idosos apresentam um percentual muito mais elevado de linfócitos T ativados que os indivíduos jovens. O fato de não encontrarmos grandes alterações no perfil de síntese de citocinas após o estímulo com dois importantes antígenos obtidos de formas evolutivas distintas em células que já entraram em contato com esses antígenos *in vivo* sugere que o

tempo de estimulação não foi suficiente ou que as alterações encontradas estão associadas ao envelhecimento.

Ao analisarmos o perfil de síntese de citocinas por linfócitos TCD8⁺ em indivíduos negativos e infectados (**figura 9**), observamos algumas diferenças importantes entre as faixas etárias. O grupo de indivíduos negativos apresenta um padrão de resposta imune do tipo Tc0 tanto nos indivíduos jovens (10-24 anos) quanto nos indivíduos mais idosos (70-95 anos) representado por um percentual elevado de linfócitos T CD8⁺IL-2⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺. Nos indivíduos jovens (entre 10 e 24 anos), esse percentual é muito maior sugerindo que há uma grande contribuição dessa subpopulação para o perfil de citocinas desses indivíduos. O aumento dessas três citocinas indica que existe uma intensa ativação celular com a presença de citocinas extremamente inflamatórias (IL-4) e moduladoras (IL-10) nos indivíduos jovens, a qual não foi observada nos indivíduos mais idosos (70-95 anos) embora o perfil tenha sido semelhante nas duas faixas etárias (Tc0). Nossos resultados sugerem que o aumento de células ativadas no envelhecimento com o aumento de citocinas efetoras demonstrado ocorre principalmente dos linfócitos T CD4⁺ e menos dos linfócitos T CD8⁺, nesses indivíduos.

Por outro lado, a infecção desencadeou algumas mudanças no perfil de síntese de citocinas por linfócitos T CD8⁺. Com relação a IFN- γ , observamos que a infecção induziu um ligeiro aumento no percentual de células produtoras dessa citocina e uma acentuada redução na frequência de células produtoras de IL-4 nos indivíduos infectados jovens (10-24 anos) quando comparados ao percentual dos indivíduos jovens negativos pertencentes a mesma faixa etária. Como o *S. mansoni* é um parasito extra-celular, não esperaríamos uma forte contribuição dessa sub-população para o padrão de resposta imune, mesmo nos jovens onde provavelmente elas estão mais ativas. No entanto, a ativação dos linfócitos T CD8⁺ pode ser devida a uma ativação *bystander* induzida por citocinas provenientes de outras células. Como os linfócitos T CD8⁺ necessitam de linfócitos T CD4⁺ para sua ativação, células apresentadoras de antígenos podem estar ativando linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ concomitantemente. Pode estar ocorrendo ainda uma apresentação cruzada de antígenos do parasito em produtos de classe I do MHC de células dendríticas, por exemplo. Vários trabalhos apontam para esses dois mecanismos como importantes na ativação de linfócitos T CD8⁺ (Jung *et al.*, 2002). Outra possibilidade que nos parece mais provável pelo tempo

de estimulação utilizado (5 horas) seria que a ativação desses linfócitos ocorreria via a ligação de receptores não clonais (do tipo *Toll-like receptors* - TLR, por exemplo) num evento que dispensaria o processamento e a apresentação de antígenos.

Os linfócitos T supressores são considerados um mecanismo importante na modulação da resposta ao *S. mansoni* (Ellner *et al.*, 1980; Doughty *et al.*, 1987). Doughty e colaboradores demonstraram, no modelo de formação de granuloma *in vitro* utilizando pérolas de poliacrilamida conjugadas a SEA, que a remoção dos linfócitos T CD8⁺ da população de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados apresentando a forma crônico-intestinal, resultava em um granuloma aumentado (Doughty *et al.*, 1987). Esses dados sugerem um papel para os linfócitos T CD8⁺ na modulação da reação inflamatória granulomatosa induzida pelos antígenos do ovo do parasito. Nesse sentido, o resultado que nos chamou mais a atenção foi o percentual elevado de células CD8⁺IL-10⁺ em indivíduos infectados entre 70 e 95 anos de idade. Assim, podemos explicar porque, nesses indivíduos, o percentual total de células positivas para IL-10 é mais alto que aquele apresentado pelos indivíduos negativos pertencente à mesma faixa etária (**figura 5**) apesar da queda na frequência das células CD4⁺IL-10⁺. Aparentemente, o percentual de IL-10 está preservado nos indivíduos infectados idosos por outras populações de linfócitos, os linfócitos CD19⁺ (**figura 7**) e os CD8⁺ (**figura 9**). Assim, o aumento dos linfócitos CD19⁺IL-10⁺ e CD8⁺IL-10⁺ nos idosos sugere a existência de um possível mecanismo regulador compensatório relacionado ao envelhecimento importante para a modulação da fase crônica da doença.

A adição de SEA (**figura 13A**) ou SWAP (**figura 13B**) às culturas de células CD8⁺ desencadeou algumas alterações. A estimulação das células dos indivíduos jovens (10-24 anos) negativos com SEA induziu uma diminuição no percentual de células positivas para IL-4 e IFN- γ . Com a infecção, SEA induziu um drástico aumento na síntese de IL-4, uma diminuição na síntese de IFN- γ nos jovens (10-24 anos) e de IL-10 nos mais idosos (70-95 anos) embora tanto os indivíduos negativos quanto os infectados tenham apresentado maiores percentuais de células positivas para IL-4, IL-10 e IFN- γ . O aumento de IL-4 e a redução de IFN- γ com a adição de SEA na cultura de células dos indivíduos infectados jovens (10-24 anos) podem ser correlacionados com a patogenia da infecção onde a IL-4 tem um papel importante na manutenção da reatividade celular na fase crônica da doença

(Falcão *et al.*, 1998) e o IFN- γ está mais relacionado a resistência e proteção (Correa-Oliveira *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2000). Isto também confirma dados da literatura com relação à tendência desse antígeno a estimular a produção de citocinas do tipo 2. O fato dos indivíduos negativos apresentarem um percentual de células positivas para IL-4 bem menor do que o percentual apresentado pelos indivíduos infectados poderia estar, em parte, relacionado a ausência de infecção nos primeiros ainda que eles estejam em contato contínuo com águas contaminadas. É interessante notar que a estimulação com esse antígeno, capaz de induzir a produção de citocinas do tipo 2, inibiu a síntese de IL-10 por linfócitos T CD8⁺ nos indivíduos mais idosos (70-95 anos). Após a estimulação com SEA, a frequência de células CD8⁺IL-10⁺ retorna a um nível semelhante àquele apresentado por indivíduos negativos.

A adição de SWAP à cultura de células CD8⁺ (**figura 13B**) produziu efeitos muito semelhantes àqueles observados após a estimulação com SEA em ambos os grupos de indivíduos. Observamos a diminuição de IL-4 e IFN- γ no grupo negativo jovem (10-24 anos) e o aumento de IL-4 e diminuição de IFN- γ no grupo infectado da mesma faixa etária. Seria de se esperar que esse antígeno (capaz de estimular citocinas do tipo 1) estimulasse a síntese de IFN- γ e IL-2. Mas só observamos o aumento dessa última nos indivíduos mais idosos (70-95 anos). Como as células dos indivíduos idosos estão naturalmente mais ativadas, a IL-2 poderia induzir tanto um aumento na proliferação dos linfócitos T quanto um processo de apoptose.

SEA e SWAP são antígenos solúveis que provavelmente são apresentados no contexto do MHC de classe II. É interessante notar que esses antígenos são capazes de induzir alterações na produção de citocinas por células CD8⁺, normalmente estimuladas por antígenos apresentados no contexto de moléculas do MHC I. No entanto, como as alterações apresentadas pelos dois antígenos são muito semelhantes, elas podem ser devido a um mecanismo indireto mediado pelas células CD4⁺ presentes na mesma cultura possivelmente através da sua produção de citocinas, como já discutido anteriormente. Por outro lado, como já mencionado, pode ser que a estimulação *in vitro* com SEA por apenas 5 horas esteja ativando as células CD8⁺ através de outros receptores típicos da imunidade inata (tais como TLR) e que este tipo de estimulação seja inadequado para desencadear a produção de IL-10.

Após a análise dos nossos resultados, principalmente com relação aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, um aspecto importante nos chamou a atenção. As células T CD4⁺ apresentaram variações mais acentuadas na população de indivíduos idosos, entre 70 e 95 anos enquanto que, nos linfócitos T CD8⁺, as principais alterações foram encontradas na população de indivíduos mais jovens, entre 10-24 anos. Para estudar melhor a contribuição dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o perfil de síntese de citocinas de indivíduos dessas duas faixas etárias extremas, separarmos os indivíduos negativos e positivos em apenas dois grupos: a) para estudar o padrão das células CD4⁺, comparamos um grupo dos idosos (70-95 anos) com os indivíduos entre 10 a 69 anos agregados em um único grupo (**figura 14**); b) para estudar o padrão das células CD8⁺, comparamos os jovens (10-24 anos) com os indivíduos entre 25 a 95 anos separados em um outro grande grupo (**figuras 15 e 16**).

Essa separação nos permitiu observar algumas alterações importantes no percentual de citocinas por linfócitos T relacionadas com as duas faixas etárias examinadas.

Em primeiro lugar, a frequência de células CD4⁺ positivas para IL-10 e IFN- γ sofre um aumento significativo e brusco em indivíduos muito idosos (70-95 anos) negativos sugerindo que esse período do envelhecimento é crítico para o percentual das citocinas examinadas. A presença de modificações tão dramáticas em indivíduos acima de 70 anos é bastante curiosa. Dados na literatura mostram que a senescência é acompanhada de mudanças progressivas no sistema endócrino (Roshan *et al.*, 1999) e que essas alterações encontradas podem influenciar as atividades do sistema imune durante o envelhecimento. Alterações importantes no eixo hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) de indivíduos idosos, por exemplo, foram relatadas em vários estudos. A diminuição, com o envelhecimento, dos hormônios androstenediona (ASD) e, principalmente, dehidroepiandrosterona (DHEA) (Parker *et al.*, 2000; Martinez-Taboada, *et al.*, 2002) têm um efeito modulador no sistema imune (Daynes *et al.*, 1993; Khorram *et al.*, 1997; Sollerte *et al.*, 1999). O tratamento com DHEA, por exemplo, é capaz de induzir o aumento de linfócitos T e de células NK expressando marcadores de ativação tais como CD25 e CD56 respectivamente bem como de acentuar a citotoxicidade das células NK em indivíduos idosos (Khorram *et al.*, 1997). Além disso, dados na literatura mostram que camundongos que recebem esse mesmo hormônio por via oral voltam a produzir citocinas em níveis semelhantes aqueles produzidos na idade jovem (Daynes *et al.*, 1993). É possível que alterações hormonais

típicas do envelhecimento estejam envolvidas nas diferenças que observamos no percentual de citocinas nos indivíduos idosos negativos. Para confirmar essa hipótese, seria importante analisar os níveis de hormônios tais como DHEA ou somatostatina sabidamente importantes para a atividade imunológica. Por outro lado, as mudanças no padrão das citocinas ocorreram numa faixa etária bastante tardia (acima de 70 anos) e de forma súbita enquanto que as mudanças associadas ao sistema endócrino são graduais e contínuas. Uma exceção notável à progressividade das alterações hormonais relacionadas ao envelhecimento seriam as mulheres, mas numa faixa etária bem anterior que corresponde ao climatério e a menopausa (Lamberts *et al.*, 1997). Uma explicação provável para as alterações tardias e súbitas observadas nos indivíduos do nosso estudo seria um efeito que poderíamos nomear de ultrapassagem do “limite de compensação”. Pode ser que mudanças em menor escala aconteçam progressivamente durante a vida adulta até a senescência. No entanto, mecanismos variados de compensação muito comuns no sistema imune (citocinas pleiotrópicas, por exemplo) sejam capazes de manter a homeostase na produção das citocinas mais importantes durante um período longo da vida. No entanto, com o avançar da idade e o acúmulo de alterações, o sistema atingiria um limite no qual os mecanismos de compensação não seriam mais capazes de manter o padrão anterior. Assim, o efeito repentino que observamos nos indivíduos acima de 70 anos, ao invés do esperado efeito progressivo linear, seria um reflexo desse “limite de compensação” ultrapassado. Em segundo lugar, nos indivíduos infectados, não observamos o mesmo aumento na população de linfócitos T $CD4^+IFN-\gamma^+$. Apenas as células $CD4^+ IL-10^+$, $IL-4^+$ e $IL-2^+$ estão aumentadas. Sabe-se que $IFN-\gamma$ é uma citocina na resistência e proteção frente a infecção por *S. mansoni* e que as células T $CD4^+$ seriam as principais envolvidas no processo em indivíduos adultos. O fato da frequência das células $CD4^+$ positivas para $IFN-\gamma$ encontrar-se diminuída nos indivíduos infectados entre 70-95 anos é compatível com essas observações já relatadas. Examinando as mudanças no perfil de citocinas nos indivíduos negativos e infectados durante o envelhecimento (**Figura 19**) observamos claramente que os indivíduos negativos apresentam um perfil do tipo Th0 com percentual aumentado de $IFN-\gamma$ e $IL-4$ e também com aumento da citocina $IL-10$. Os indivíduos infectados, no entanto, apresentam um perfil Th2 com baixa frequência de células $CD4^+ IFN-\gamma^+$ e frequência aumentada de células $IL-4^+$. Além disto, mostramos anteriormente que os indivíduos infectados também

apresentam frequências mais baixas de células $CD16^+ IFN-\gamma^+$ após estimulação *in vitro* com antígenos do parasito. Novamente, esse perfil dos indivíduos infectados pode ser uma consequência da infecção e não se relacionar com a susceptibilidade desses indivíduos a ela. Para estabelecer uma ligação conclusiva entre a presença de células T $CD4^+$ e células NK positivas para $IFN-\gamma$ e a resistência a infecção por *S. mansoni* em idosos residentes de áreas endêmicas, um estudo longitudinal é necessário. No entanto, nossos dados nesse estudo transversal apontam para essa hipótese.

Com relação aos linfócitos T $CD8^+$, observamos uma forte contribuição desses linfócitos no percentual de citocinas em indivíduos negativos e infectados na faixa etária entre 10-24 anos. Observamos uma frequência alta de células $CD8^+$ positivas para IL-4, IL-10 e $IFN-\gamma$ nesses indivíduos e uma queda brusca nessa frequência a partir dos 25 anos de idade. O percentual dessas células se mantém estavelmente baixo até os 95 anos (**figuras 15 e 16**). Esses dados estão de acordo com dados da literatura que mostram uma diminuição na proporção de células T $CD8^+$ durante o envelhecimento (Fagnoni *et al.*, 2000; Schindowski *et al.*, 2001). A idade jovem é normalmente a época em que os indivíduos de áreas endêmicas adquirem a infecção por *S. mansoni* e podemos notar algumas diferenças importantes no grupo de indivíduos infectados quando comparados com os do grupo negativo. Ocorre, com a infecção, uma redução significativa na expressão de IL-4 por células $CD8^+$. Nossos dados sugerem que a alta expressão de IL-4 por células $CD8^+$ nos jovens está associada à ausência de infecção. A exposição *in vitro* a ambos os antígenos do parasito aumenta a frequência de células positivas para IL-4. O estímulo com SEA é particularmente eficiente no aumento da expressão de IL-4 por linfócitos $CD8^+$. Uma alta frequência de células $CD8^+ IFN-\gamma^+$ é observada em todos os indivíduos jovens (entre 10-24 anos) do nosso estudo, independente da presença ou não de infecção. No próximo grupo etário (25-49 anos) ocorre uma diminuição drástica dessa frequência nos indivíduos infectados mas não nos indivíduos negativos sugerindo que $IFN-\gamma$ também pode ser uma citocina relevante nesse grupo para a proteção. Novamente, como o tempo de cultura, é muito curto, é possível que a estimulação dessas células ocorra por receptores não clonais do tipo envolvidos na imunidade inata. É possível que citocinas do tipo 1, como $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$, e anticorpos da classe IgE estejam envolvidos na proteção anti-infecciosa nesse período da vida. Alguns autores sugerem um papel protetor para a IgE em modelos

experimentais de infecção por *S. mansoni* (King *et al.*, 1997; Cutts *and* Wilson, 1997) e na esquistossomose humana (van der Kleij *et al.*, 1999). A IL-4 é uma citocina crucial para a produção de IgE em humanos e camundongos (Delphin *and* Stavnever, 1995) e alguns estudos apontam uma relação entre a produção elevada de IL-4 e a proteção à infecção por *S. mansoni* em humanos (Couissinier *et al.*, 1995). Outros não encontraram nenhuma correlação entre a produção de IgE específica e resistência à infecção (Webster *et al.*, 1997). Por outro lado, a produção de IFN- γ e TNF- α por células T tem sido implicada na proteção contra a re-infecção por *S. mansoni* em humanos (Brito *et al.*, 2000).

A IL-10 é uma citocina que foi classificada como citocina do tipo Th2 porque ela é produzida por células T CD4⁺. Entretanto, diferentemente da IL-4 e IL-5 que são citocinas Th2 típicas e tem propriedades inflamatórias sendo importantes, por exemplo, na síntese de IgE e nas inflamações eosinofílicas (Akdis *et al.*, 2003), a IL-10 é a principal citocina reguladora em muitas condições inflamatórias tais como a colite e várias doenças autoimunes (Faria *and* Weiner, 1999). IL-10 está também envolvida em mecanismos imunomoduladores observados na esquistossomose crônica (Malaquias *et al.*, 1997). Assim, como essa citocina tem um importante papel na imunomodulação e está particularmente aumentada na senescência, analisamos separadamente a contribuição de células T CD4⁺ e CD8⁺ na produção de IL-10 em indivíduos agrupados em três grupos de idade: jovem (10-24 anos), idade intermediária (25-69 anos) e idosos (70-95 anos) (**figura 17**). Interessantemente, nós observamos um nítido aumento na síntese de IL-10 por células T de indivíduos jovens e idosos em ambos os grupos, negativos e infectados. Observamos que, embora a síntese de outras citocinas, tais como IFN- γ e IL-4, por linfócitos T em indivíduos jovens e idosos estejam alteradas com a infecção, a síntese de IL-10 está muito bem preservada nas idades extremas em ambos os grupos de indivíduos, negativos e infectados. Curiosamente, a fonte da produção de IL-10 é a principal alteração nos indivíduos mais idosos. Enquanto que nos indivíduos idosos negativos a principal fonte são os linfócitos TCD4⁺, nos indivíduos infectados os principais responsáveis pela produção aumentada de IL-10 são os linfócitos CD8⁺ e CD19⁺.

Também avaliamos a contribuição de células T CD4⁺ e CD8⁺ para a produção de IL-2 nas diferentes faixas etárias (**figura 18**), uma vez que essa citocina estaria associada à proliferação celular. Observamos que os indivíduos mais idosos negativos apresentaram

uma diminuição no percentual de células positivas para IL-2 enquanto que os indivíduos idosos infectados apresentaram um aumento no percentual dessas células. A fonte importante para o percentual dessa citocina foi a mesma: linfócitos T CD4⁺. Esse resultado sugere a possível existência de um processo apoptótico, uma vez que já foi evidenciado que linfócitos do sangue periférico de indivíduos idosos apresentaram um percentual de células apoptóticas mais acentuado quando comparado com o percentual de células de indivíduos jovens e que, linfócitos T virgens CD3⁺CD45RO⁻ estimulados com *phytohemagglutinin* (PHA) são mais sensíveis a apoptose quando comparado com as células T de memória CD3⁺CD45RO⁺ em cultura de seis dias (morte celular induzida pela ativação - AICD). Além disso, esse processo apoptótico também é acompanhado pela expressão aumentada da molécula Fas (CD95) nos linfócitos ativados (Mountz *et al.*, 1997; Potestio *et al.*, 1998). Outra explicação para os resultados encontrados seria um possível aumento da reatividade celular nessa faixa etária. Uma análise mais detalhada desses dois processos seria necessária para correlacionar os efeitos do aumento na frequência de células CD4⁺ IL-2⁺ nos indivíduos idosos infectados.

Nossos resultados indicam que o envelhecimento tem um forte efeito no percentual de citocinas e na imunidade a infecção pelo *S. mansoni*. As alterações mais significativas na frequência de células positivas das citocinas analisadas ocorrem em indivíduos jovens (entre 10-24 anos) e, com relação ao processo do envelhecimento, nos indivíduos mais idosos (entre 70 a 95 anos). É interessante notar que a presença da infecção está relacionada, com relação aos linfócitos T CD4⁺, a um padrão predominantemente do tipo Th2 nesses indivíduos idosos em oposição ao padrão Th0 apresentado pelos indivíduos negativos. Uma contribuição importante para a resistência a infecção, nos indivíduos idosos, parece ser a produção de INF- γ por células NK já que observamos uma diferença marcante nas culturas estimuladas por antígenos do parasito na frequência de células CD16⁺ IFN- γ ⁺ entre indivíduos negativos e infectados acima de 70 anos de idade. Diferentemente dos idosos, nos indivíduos jovens, ambas as citocinas IL-4 e IFN- γ , estão relacionadas a ausência de infecção. Nos mais idosos, o percentual total de IL-10 está aumentado. Interessantemente, embora a frequência de células CD4⁺ IL-10⁺ nos indivíduos infectados seja mais baixa que nos indivíduos negativos, esses primeiros preservam a produção de IL-10 sendo que a fonte principal dessa citocina passa a ser células CD8⁺ e

CD19⁺. Provavelmente essa manutenção, na presença da infecção, está diretamente relacionada à indução de mecanismos imunomoduladores típicos da fase crônica da infecção (**Figura 19**).

Obviamente, todas as nossas especulações com relação à resistência a infecção se baseiam na comparação entre perfis de indivíduos negativos para ovos de *S. mansoni* no exame de fezes e indivíduos infectados. Os dados do estudo longitudinal com esses indivíduos, já realizado, mas cujos resultados não foram analisados ainda, serão fundamentais para confirmação das hipóteses levantadas no presente trabalho.

6. Conclusões

- As alterações marcantes no perfil de síntese de citocinas são observadas tanto antes como após a estimulação antígeno-específica em indivíduos negativos e infectados acima de 70 anos moradores de área endêmica demarcando essa faixa etária como especialmente afetada no processo de envelhecimento;

- O aumento de linfócitos T positivos para IL-2 e IL-4 em indivíduos idosos infectados, acima de 70 anos, poderia estar associado a uma diminuição na regulação por células CD4 positivas para IL-10, uma vez que eles estão associados à proliferação celular e patogênica da doença;

- Nos indivíduos idosos (acima de 70 anos) infectados, a frequência de células CD8⁺IL-10⁺ está aumentada e este aumento é concomitante com a diminuição na frequência de células CD4⁺IL-10⁺ nessa mesma faixa etária. Esses dados sugerem que, em indivíduos infectados, processos de compensação atuam na preservação dos mecanismos reguladores típicos da fase crônica da infecção;

- As células CD8⁺ são significativamente mais ativas em indivíduos jovens (10-24 anos) independente da infecção;

- A diminuição no percentual de CD4⁺IL-10⁺, CD19⁺ IL-10⁺ e CD16⁺IFN-g⁺ nos indivíduos idosos entre 70 e 95 anos após o estímulo com antígenos do *S. mansoni* sugere uma possível diminuição de mecanismos moduladores bem como da imunidade protetora referentes à infecção, nessa faixa etária;

- O entendimento das alterações imunológicas nessa população (acima de 70 anos) tem consequências importantes não só para a pesquisa básica e clínica como para os estudos epidemiológicos relacionados à dinâmica de transmissão da doença em áreas endêmicas.

7. Bibliografia (Senescência)

Abo, T.; Kawamura, T. and Watanabe, H. Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. **Immunol. Rev.**, 174: 135-149; 2000.

Abraham, C., Tal, Y., & Gershon, H.. Reduced in vitro response to concanavalin A and lipopolysaccharide in senescent mice. **Eur. J. Immunology**, 7: 301-304; 1977

Alés-Martine, J. E.; Alvarez-Mon.; Merino, M. et al. **Eur. J. Immunol.**, 18: 1827-1830, 1988.

Al-Rayes, H., Pachas, W., Mirza, N., Ahern, D.J., Geha, R.S., Vercelli, D. IgE regulation and lymphokine patterns in aging. **J. Allergy Clin. Immunol.** 90: 630-636;1992.

Andrade, Z.A. and Warren, K.S. Mild prolonged Schistosomiasis in mice: Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 58: 53-57; 1964.

Aspinall, R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. **J. Immunology**, 158, 3037-3045; 1997.

Averill, L. E., & Wolf, N. S.. The decline in murine splenic PHA and LPS responsiveness with age is primarily due to an intrinsic mechanism. **J. Immunology**, 134: 3859-3863; 1985.

Barrat, F., Haegel, H., Louise, A., Naulleau, V. S., Boulouis, H. J., Neway, T., Ceredig, R., & Pilet, C. Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL/6 mice during aging. **Res. Immunology**, 146: 23-34; 1995.

Born, J., Uthgenannt, D., Dodt, C., Nunninghoff, D., Ringvold, E., Wagner, T., Fehm, H.L. Cytokine production and lymphocyte subpopulations in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. **Mech. Ageing Dev**, 48: 113-126, 1995.

Candore, G., Di Lorenzo, G., Melluso, M., Cigna, D., Colluse, A.T., Modica, M.A., Caruso, C. Gamma-interferon, interleukin-4 and interleukin-6 in vitro production in old subjects. **Autoimmunity**, 16: 275-280;1993.

Caruso, C., Candore, G., Cigna, D., DiLorenzo, G., Sireci, G., Dieli, F., Salerno, A. Cytokine production pathway in elderly. **Immunol. Res**, 15:84-90;1996.

Castle, S.C.; Uyemura, K.; Crawford, W.; Wong, W.; Klaustermeier, W.B and Makinodan, T. Age- related impaired proliferation of peripheral blood mononuclear cells is associated with an increased in both IL-10 and IL-12. **Exp. Gerontol**, 34(2): 243-252; 1999.

Crisi, G. M.; Chen, L.Z.; Huang, C. and Thorbecke, G. J. Age-related loss of immunoregulatory function in peripheral blood CD8 T cells. **Mech. Ageing and Development**, 103: 235-254; 1998.

Crispe, N. And Mehal, W. Strange breed: T cells in the liver. **Immunol. Today**, 17: 522-525; 1996.

Daynes, R. A., Araneo, B. A., Dowell, T. D., Huang, K., & Dudley, D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. **J. Exp. Med.**, 171: 979-983; 1990.

Daynes, R. A., Araneo, B. A., Ershler, W. B., maloney, C., Li, G-Z and Ryu, S-Y. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. **J. Immunol.**, 150: 5219-5230; 1993.

Doetze, A; Satoguina, J.; Burchard, G.; Rau, T.; Loliger, C.; Fleischer, B.; Hoerauf, A. **Int. Immunol.**, 12: 623-630; 2000.

Eren, R., Zharhary, D., Abel, L., & Globerson, A. Age-Related changes in the capacity of Bone Marrow cells to Differentiate in thymic organ cultures. **Cell. Immunology**, 112: 449-455;1988.

Eren, R., Globerson, A., Abel, L., Zharhary, D. Quantitative analysis of Marrow Tyymic Progenitors in Young and Aged Mice. **Cell. Immunol**, 127: 238-246, 1990.

Ernst, D. N., Weigle, W. O., Noonan, D. J., McQuitty, D. N., & Hoobs, M. V.. The Age-Associated increase in INF-gama synthesis by Mouse CD8+ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 Expression. **J. Immunology**, 151: 575-587;1993.

Fagnoni, F. F.; Vescovini, R.; et al. Shortage of circulating naive CD8+ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. **Blood**, 95: 2860-2868; 2000.

Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv. Immunol.**, 73: 153-264; 1999.

Franceschi, C.; Monti, D.; Sansoni, P. and Coosarizza, A . The immunology of exceptional individuals: The lesson of centenarians. **Immunol. Today**, 16: 12-16; 1996.

Flores, K. G., Li, J., Sempowski, G. D., Haynes, B. F and Hale, L. P. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. **J. Clin. Invest**, 104: 1031-1039; 1999

Gillis, S.; Kosak, R.; Durante, M.; Weksler, M. E. Immunologic studies of aging. Decreased production and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. **J. Clin. Invest**, 67: 937-942; 1981.

Goletz, T. J.; Smith, J. R. and Pereira-Smith, O. M. Molecular genetic approaches to the study of cellular senescence. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, 59: 59-66; 1994.

Gorgas, G., Butch, E.R., Guan, K.L., Miller, R.A. Diminished activation of the MAP Kinase pathway in CD3-stimulated T lymphocytes from old mice. **Mech. Ageing Dev**, 94: 71-83; 1997.

Gottesman, S. R. S., Kristie, J. A., & Walford, R. L. Proliferative and cytotoxic immune functions in ageing. I. Sequence of decline of reactivities measured under optimal and suboptimal sensitization conditions. **Immunology**, 44: 607; 1981.

Grosh, I., & Miller, R. A. Rapid Tyrosine phosphorylation of Grb2 and Shc in T cells exposed to anti-CD3, anti-CD4 and anti- CD45 stimuli: differential effects of aging. **Mech. aging and Develop.**, 80: 171-187; 1995.

Grossman, A., Ledbetter, J. A., & Rabinovitch, P. S. Aging-related deficiency in intracellular calcium response to anti-CD3 or concanavalin A in murine T cell subsets. **J.Gerontology**, 45: B81-86;1990.

Hartwing, M and Steinmann, G. On a casual mechanism of the thymic involution in man. **Mech. Ageing Dev**, 75: 151; 1994.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cells strains. **Exp. Cell. Res.**, 25: 585-621; 1961.

Hayflick, L. The limited in vitro life time of human diploid cell strains. **Exp. Cell. Res.**, 37: 614-636; 1965.

Hobbes, M. V., Weigle, W. O., Noonan, D. J., Torbett, B. E., McEvelly, R. J., Koch, R. J., Cardenas, G. J., & Ernst, D. N. Patterns of cytokine Gene Expression by CD44⁺ T cells from Young and Old mice. **J. Immunology**, 150: 3602-3614;1993.

Hobbes, M. V., Weigle, W. O., & Ernst, D. N. Interleukin-10 production by splenic CD4⁺ cells and cell subsets from young and old mice. **Cell. Immunology**, 154: 264-272; 1994.

Itoh, M.; Takahashi, T.; Sakaguchi, N.; Kuniyasu, Y.; Shimizu, J.; Otsuka, F.; Sakaguchi, S. **J. Immunol.**, 162: 5317-5322; 1999.

Karanfilov, C.I., Liu, B., Fox, C. C., Lakshmanan, R. R & Whisler, R.L. Aged-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be dissociated from altered frequencies of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ t cells subsets. **Mech. of Aging and Development**, 109: 97-112; 1999.

Khorran, o.; Vu, L. and Yen, S. S. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced man. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.**, 52: M1-M7; 1997.

Klinman, N.R and Kline, G.H. The B-cell biology of aging. **Immunol. Rev**, 160: 103-114; 1997.

Konen, T. G., Smith, G. S., & Walford, R. L. Decline in mixed lymphocyte reactivity of cells from aged mice of a long-lived strain. **J. Immunol.**, 110: 1216; 1973.

Kurashima, C., & Utsuyama, M. Age-related changes of cytokine production by murine helper T cell subpopulations. **Pathobiology**, 65: 155-162; 1997.

Lamberts, S.W.; van den Beld, A.W and van der Lely, A.J. The endocrinology of aging. **Science**, 278(5337): 305-306; 1997.

LeMaoult, J., Manavalan, J. S., Dyall, R., Szabo, P., Nikolic, Z. J., & Weksler, M. E. Cellular Basis of B cell Clonal populations in old Mice. **J. Immunology**, 162: 6384-6391; 1999.

Lerner, A., Philosophe, B., Miller, R.A. Defective calcium influx and preserved inositol phosphate generation in T cells from old mice. **Aging Immunol. Infect. Dis**, 1: 149-158;1988.

Lerner, A., Yamada, T., & Miller, R. A. Pg-hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. **Eur. J. Immunol.**, 19: 977-982;1989.

Martínez-Taboada, V.; Bartolomé, M. J.; Amado, J. A.; Blanco, R.; garcía-Unzueta, M. T.; rodriguez- Valverde, V. and López-Hoyos, M. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Mech. ageing of Development.**, 123: 1477-1486; 2002.

Miller, R. A. Calcium and the aging system. **Neurobiol of aging**, 8: 368-370;1987.

Miller, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. **Science**, 273: 70-79; 1996.

Mountz, J. D., Wu, J., Zhou, T and Hsu, H-C. Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence. **Immunol. Rev**, 160: 19-30; 1997.

Mu, X. Y., & Thoman, M. L. The age-dependent cytokine production by murine CD8⁺ T cells as determined by four-color flow cytometry. **J. Gerontol. Biol. Sci Med Sci**, 54: 116-123;1999.

Murasko, D. M.; Nelson, B. J.; Silver, R.; Matour, D. and Kaye, D. Iologic response in an elderly population with a mean age of 85. **Am. J. Med.**, 81: 612-618; 1986.

Noda, A.; Ning, Y.; venable, S. F.; Pereira-Smith, O. M. and Smith, J. R. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. **Exp. Cell. Res.**, 211: 90-98; 1994.

Ogawa, T.; Kitagawa, M, and Hirokawa, K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. **Mech. ageing of Development**, 117: 57-68; 2000.

Parker, C. R.; Scott, M. S.; Azziz, R.; Crabbe, S. L.; Hines, G. A. Boots, L. R. and Bae, S. Effects of aging on adrenal function in the human: responsiveness and sensitivity of adrenal androgens and cortisol to adrenocorticotropin in premenopausal and postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 85: 48-54; 2000.

Patel H. R & Miller, R. A. Age-associated changes in phosphorylation in murine T lymphocyte. **Eur. J. Immunol.**, 22: 253-260; 1992.

Paul, J. R. and Bunnell, W.W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. **Am. J. Med. Sci.**, 183- 190; 1932.

Pawelec, G., & Solana, R. Immunosenescence. **Immunology today**, 18: 514-516; 1997.

Pawalec,G., Hirokava, K & Fulop, T. Altered T cell signalling in aging. **Mech. of Aging and Develop**, 122:1613-1637; 2001.

Pawalec,G. and Solana, R. “Immunoageing – the cause or effect of morbidity”. **Trends immunol.**, 22(7): 348-349; 2001

Potestio, M., Caruso, C., Gervasi, F., Scialabba, G., D’Anna, C., Di Lorenzo, G., Balistreri, C. R., Candore and Romano, G. C. Apoptosis and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, 102: 221-237; 1998.

Roberts-Thomson, I. C., Whittinghom, S., Youngchaiyud, U., & Mackay, I. R. Aging, immune response and mortality. **Lancet II**, 24-28;1968.

Roshan, S.; Nader, S. and Horlander, P. Review: ageing and hormones. **Eur. J. Clin. Invest.**, 29: 210-213; 1999.

Sakata-Kaneko, S.; Wakatsuki, Y.; Matsunaga, Y.; Usui, T. and Kita, T. altered Th1/Th2 commitment in human CD4⁺ T cells with ageing. **Clin. Exp. Immunol.**, 120: 267-273; 2000.

Sasaki, M.; Kumazaki, T.; Takano, H.; Nishiyama, M. And Mitsui, Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. **Mech. ageing of Development**, 122: 1695-1706; 2001.

Sansoni, P.; Cossariza, A . et al. "Lymphocyte subsets and natural Killer cell activity in healthy old people and centenarians." **Blood**, 80: 2767-2773; 1993.

Schindowski, K.; Fohlich, L.; Maurer, K.; Müller, W. E. and Eckert, A. Age-related impairment of human T lymphocyte's activation: specific differences between CD4⁺ and CD8⁺ subsets. **Mech. ageing of Development**, 123: 375-390; 2002.

Seki, S.; Habu, Y.; kawamura, T.; takeda, K.; Dobashi, H.; Ohkawa, T. and Hiraide, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag⁺ t cells in T helper 1 immune responses. **Immunol. Rev.**, 174: 35-46; 2000.

Seshadri, T. and Campisi, J. Repression of *c-fos* transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblast. **Science** (Washington DC) 247: 205-209; 1990.

Shi, J., & Miller, R. A. Tyrosine-Specific protein phosphorylation in response to anti-CD3 antibody is diminished in old mice. **J. Gerontology**, 47: 147-153; 1992.

Sindermann, J.; Kruse, A .; Frercks, H-J.; schutz, R. M. And Kirchner, H. Investigations of the lymphokine system in elderly individuals. **Mech. ageing of Development**, 70: 149-159; 1993.

Smith, J. R. And Pereira-Smith, O. M. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. **Science**, 273: 63-67; 1996.

Solana, R. and Mariani, E. NK and NK/T cells in human senescence. **Vaccine**, 18: 1613-1620; 2000.

Solerte, S.B.; Fioravanti, M.; Vignati, G.; Giustina, A . Cravello, L. and Ferrari, E. Dehydroepiandrosterone sulfate enhances natural Killer cytotoxicity in humans via locally generated immunoreactive insulin-like growth factor I. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 84: 3260-3267; 1999.

Souvannavong, V., Lemaire, C., Andreau, K., Brown, S., & Adam, A. Age-associated modulation of apoptosis and activation in murine B lymphocytes. **Mech. ageing of Development**, 103: 285-299; 1998.

Stall, A. M.; Wells, S. M. and Lam, K. P. B-1 cells:unique origins and functions. **Semin. Immunol**, 8(1): 45-59; 1996.

Stephan, R.P., Sanders, V.M., Witte P.L. Stage specific alterations in murine B-lymphopoiesis with age. **Int. Immunol**, 8: 509-518, 1996.

Takeoka, Y., S-Y, C., Yago, H., Boyd, R. L., Suehiro, S., Shultz, L. D., Ansari, A. A., & Gershwin, M. E. The murine thymic microenvironment:changes with age. **Int. Arch. of Allergy and Immunology**, 111: 5-12;1996.

Tarazona, R.; DelaRosa, O.; Alonso, C.; Ostos, B.; espejo, J.; Peña, J. and Solana, R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic

activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cell. **Mech. ageing of Development.**, 121: 77-88; 2000.

Thoman, M.L. Early Steps in T cell development are affected by aging. **Cell Immunol**, 178:117-123, 1997.

Timm, J., & Thoman, M. L.). Maturation of CD4⁺ Lymphocytes in the Aged Microenvironment Results in a Memory-Enriched population. **J. Immunology**, 168: 711-716;1999.

Tominaga, K.; Olgun, A . Smith, J. R. and Pereira-Smith, O. M. Genetics of cellular senescence. **Mech. ageing of Development**, 123: 927-936; 2002.

Tyan, M.L. Age-related decreased in Mouse T cell progenitors. **J. Immunol**, 118(3):846-851, 1977.

Wakikawa, A., Utsuyama, M., Hirokawa, K. Altered expression of various receptors on T cell in young and old mice after mitogenic stimulation: a flow cytometric analysis. **Mech. Ageing and Development**, 94: 113-122, 1997.

Whisler, R.L., Newhouse, Y. G., Bagenstone, S.E. Age-related reductions in the activation of mitogen-activated protein Kinases p44mapk/ERK1 and p42mapk/ERK2 in human T cells stimulated via ligation of the T cell receptor complex. **Cell. Immunol**, 168: 201-210; 1996.

Whisler, R.L., Liu, B. Q.; Chen, M. Age-related decreases in IL-2 production by human T cells are associated with impaired activation of nuclear transcriptional factors AP-1 and NF-AT. **Cell. Immunol.**, 169: 185-195; 1996a.

Bibliografia esquistossomose

Akdis, C. A; Kussevi, F.; dran, B.; Akdis, M.; Lauener, R.P.; Schmidt-Weber, C.B.; Klunker, S.; Isitmangil, G.; Hansju, N.; Wynn, T.A.; Dillon, S.; Baschang, G.; Blase, K. and Alkan, S.S. Inhibition of T helper 2 type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. **Eur. J. Immunol**, 33(10): 2717-2726, 2003.

Amento, E.P.; Bhan, A .K.; McCullagh, M.K and Krane, S. M. Influences of γ -interferon on synovial fibroblast-like cells. In induction and inhibitin of collagen synthesis. **J. Clin. Invest.**, 76: 837; 1985.

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

Araujo, M. I.; Ribeiro de Jesus, A; Bacellar, O; Sabin, E., Pearce, E.; Carvalho, E. M. evidence of a t helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.** 26: 1399-1403; 1996.

Asseman, C.; Pancre, V.; et al. “*Schistosoma mansoni*-infected mice show augmented hepatic fibrosis and selective inhibition of liver cytokine production after treatment with anti-NK1.1 antibodies”. **Immunol. Lett.**, 54(1): 11-20;1996.

Bahia-oliveira, L. M. G. et al. Differencial cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiais mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 86: 57-61; 1992.

Barsoun, I.; Gamil, F.M.; Al-khafif, M. A .; Ramzy, R. M.; El Alamy, M. A .; and Colley, D.G. immune responses and immunoregulation in relation to human schistosomiasis in Egypt. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 31(6): 1181-1187; 1982.

Bethony, J; Gazzinelli, A; Lopes, A; Pereira, W; Alves-Oliveira, L. F; Willans-Blangero, S; Blangero, J; LoVerde, P.T and Corrêa- Oliveira, R. genetic epidemiology of fecal egg ex during *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Men. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 96: 49-55; 2001.

Boguniewicz, M.; Sunchine, G.H and Borel, Y. Role of the thymus in natural tolerance to an autologous protein antigen. **J. Exp. Med.**, 169: 285-290; 1989.

Bonomo, A.; Kehn, P. J. and Schevach. Post-thymectomy autoimmunity abnormal T cell homeostasis. **Immunol. Today**, 16: 61-67; 1995.

Boros, D.L. The role of cytokines in the formation of the Schistosome egg granuloma. **Immunobiol** , 191: 441-450; 1994.

Brito, C. F. A .; Caldas, I. R.; Coura Filho, P.; Corrêa-Oliveira, R. and Oliveira, S. C. CD4⁺ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in na endemic area produce Interferon-g and Tumor Necrosis Factor-a in response to the Recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein. **Scand. J. Immunol.**, 51: 595-601; 2000.

Buelens, C.; Willens, F.; Delvaux, A.; Piérard, G.; Delville, J.; Velu, T. And Goldman, M. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2668-2672; 1995.

Butterworth, A .E.; Capron, M.; Cordingley, J. S.; Dalton, P. R.; Dunne, D. W.; Kariui, H. C. Kimani, G.; Koech, D.; Mugambi, M.; Ouma, J. H.; Prentice, M. A .Richardison, B. A .; Arap Siongok, T. K.; sturrock, R. F. and Taylor, D. W. immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. **Trans. The Royal Soc. Trop. Hyg.** 79: 393-408; 1985.

Butterworth, A. E.; Dune, D. W.; Fulford, A. J. C.; Capron, M.; Khalife, J.; Capron, A.; Koech, D.; Ouma, J. H.; Sturrock, R. F. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross reactive IgM and IgG2 and anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochimie**, 70: 1053-1063; 1988.

Butterworth, A.E. Immunological aspects of human schistosomiasis. **British Medical Bulletin**, 54: 357-368; 1998.

Caldas, I. R.; Correa-Oliveira, R.; Colosimo, E.; Carvalho, O. S.; Massara, C. L.; Colley, D. G. and Gazzinelli, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am. Trop. Med. Hyg.** 62: 57-64; 2000.

Capron, A., Riveau, G., Grzych, J. M., Boulanger, D., Capron, M., Pierce, R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90: 235-240; 1995.

Carneiro-Santos, P.; Martins-Filho, O.; Alves-Oliveira, L.; Silveira, A.M.S.; Coura-Filho, P.; Viana, I.R.C.; Wilson, R.A.; Correa-Oliveira, R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol.**, 22: 267-277; 2000.

Carrock-Sewell, W. A., North, M. E., Webster, D. B. And Farrant, J. Determination of intracellular cytokines by flow-cytometry following whole-blood culture. **J. Immunol Meth.**, 209: 67-74; 1997.

Cheever, A. W., Byram, J. E., Hieny, S., von Lichtenberg, F., Lunde, M. N., Sher, A. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* infection in B cell depleted mice. **Parasite Immunol**, 7: 399-413, 1985.

Chensue, S. W., Warmington, K.S., Hershey, S. D., Tebuh, P.D., Othman, M., Kunkel, S.L. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells in vivo. **J. Immunol** , 151:1391-1400; 1993.

Chensue, S. W.; Warmington, K.S.; Lukacs, N. W.; Lincon, P. M.; Burdick, M. D.; Strieter, R. M.; Kunnel, S.L. Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. **Am. J. Pathol.**, 146: 130-138; 1995.

Colley, D.G.; Lewis, F. A . and Goodgame, r. W. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. IV. Induction of suppressor cell activity by schistosome antigen preparations and concanavalin A. **J. Immunol.**, 120: 1225-1232; 1978.

Corrêa-Oliveira, R.; Malaquias, L.C.C.; Falcão, P.L.; Viana, I.R.C.; Bahia-Oliveira, L.M.G.; Silveira, A.M.S.; Fraga, L.A.O.; Prata, A. Co, R.L.; Lambertucci, J.R.; Cunha-Melo, J.R.; Martins-Filho, O.A.; Wilso, R.A. and Gazzinelli, G. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. Braz, **J. Med. and Biol. Research**, 31(1): 171-176; 1998.

Coutinho, A.; Salaun, J.; Corbel.; Bandeira, A. and Le Douarin, N. The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, 133: 225-240; 1993.

Couissinier-Paris, P. and Dessein, A. J. *Schistosoma* specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are TH0/2. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2295-2302, 1995.

Crispe, N. and Mehal, W. Strange brew: T cells in the liver. **Immunol. Today**, 17: 522-525; 1996.

Cuts, L. and Wilson, R.A. Elimination of a primary Schistosome infection from rats coincides with elevated IgE titres and mast cell degranulation. **Parasite Immunol**, 19: 91-102, 1997.

Dalton, P. R. and Pole, D. Water contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. **Bulletin of the World Health Organization**, 56: 417-426; 1978.

Delphin, S. and Stavnever, J. Regulation of antibody class switching to IgE: characterization of an IL-4 responsive region in the immunoglobulin heavy-chain germline epsilon promoter. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 764: 123-135, 1995.

De Waal, M.R.; Abrams, J.B.; Fridgor, C.G.; De Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med**, 1991; 174: 1209-1220.

Doherty, D.G. et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3⁺CD56⁺ Natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns. **J. Immunol.**, 163: 2314-2321; 1999.

De Waal, M.R.; Abrams, J.B.; Fridgor, C.G.; De Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med**, 174: 1209-1220; 1991.

De Waal, M.R.; Haanen, J.; Spits, H., et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, 174:915-924; 1991.

Doherty, D.G. et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3⁺CD56⁺ Natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns. **J. Immunol.**, 163: 2314-2321; 1999.

Doughty, B. L.; Goes, A. M.; Parra, J.C.; Rocha, R. S.; Katz, N.; Colley, D. and Gazzinelli, G. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigen in human schistosomiasis. I. Granuloma formation and modulation around polyacrylamide antigen-conjugated beads. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, 82(4): 47-54; 1987.

Duncan, M.R and Berman, B. G- interferon is the lymphokine and b-interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **J. Exp. Med.**, 162: 516; 1985.

Dunne,D.W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistense to reinfection. **Eur. J. Immunol**, 22: 1483-1494; 1992.

El Garem, A. A. Schistosomiasis. **Digestion**, 59: 589-605; 1998.

Ellner,J.J.; Olds, R.; Kamel, R.; Osman, G. S.; El Kholy, A .; Mahmoud, A . A .F. Suppressor splenic T lymphocytes in human hepatosplenic Schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, 125: 308-312; 1980.

Falcão, P. L., Malaquias, L.C., Martins-Filho, O. A., Silveira, A. M., Passos, V. M., Prata,A., Gazzinelli, G., Coffmann, R. L. and Correa-Oliveira, R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulate the *in vitro* granuloma formation. **Parasite Immunol**, 20: 447-454, 1998.

Fallon, P. G., Smith, P., Dunne, D.W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol**, 28: 1408-1416, 1998.

Faria, A. M. C. and Weiner, H. L. Oral tolerance: mechanisms and the therapeutic applications. **Adv. Immunol.**, 173: 151-164; 1999.

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

Fidel Jr, P.L., Boros, D.L. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. IV. Antigen-induced suppressor T cells down-regulate proliferation and IL-2 production. **J. Immunol**, 145(4): 1257-1264; 1990.

Florentino, D. F.; Zlotnik, A. Vieira, P.; Mosman, T. R.; Howard, M.; Moore, K. W.; O'Garra, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol**, 146: 3444-3451; 1991.

Flores Villanueva, P.O.; Chikango S.M.; Harris, T.S.; Stadecker, M.J. IL-10 inhibits macrophage co-stimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **Immunology**, 151: 1224-1243; 1993.

Flores-Villanueva, P. O., Reiser, H., Stadecker, M. J. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. **J. Immunol**, 153: 5190-5199, 1994b.

Flores-Villanueva, P.O.; Zheng, X.X.; Strom, T.; Stadecker, M.J. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed-hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in Schistosomiasis. **J. Immunol.**, 156: 3315-3320; 1996.

Fulford, A.J.; Webster, M.; Ouma, J.H.; Kimani, G.; Dunne, D.W. Puberty and age-related changes in susceptibility to Schistosome infection. **Parasitology Today**, 14: 23-26; 1998.

Gazzinelli, A.; Bethony, J.; Fraga, L.A.; Lo Verde, P.T.; Correa-Oliveira, R. and Kloos, H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brasil. I: water contact. **Trop. Med. Int. Health**, 6(2): 126-135, 2001).

Groux,H.; de Vies, J.E.; Roncarolo, M.G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. **J. Immunol**, 160: 3188-3193; 1998,

Grogan, J. L.; Kremsner, P. G.; deelder, A .M. and Yazdanbakhsh, M. Elevated proliferation and interleucin-4 release from CD4⁺ cells after chemotherapy in human *Schistosoma haematobium* infection. **Eur. J. Immunol.**, 26:1365-1370; 1996.

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

Iwasaki and Kelsal. Distinct T cell priming by freshly isolated Dendriect cells from Peyer's patch and spleen. **FASEB J.**, 13 (4): A606; 1999.

Jacobs, W and Marck, E. V. Adhesion and co-stimulatory molecules in the pathogenesis of hepatic and intestinal *Schistosomiasis mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 93(4): 523-529; 1998.

Jankovic, D, *et al.* CD4⁺ T cell-mediated Granulomatous pathology in Schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **J. Exp. Med**, 187(4): 619-629; 1998.

Jarvis, J. N.; Kaplan, J. and Fine, N. Increase in CD5⁺ B cells in juvenile reumathoid arthrits. Relationship to IgM rheumatic factor expression factor expression and disease activity. **Arthr. Rheum.**, 35: 204-207; 1992.

Jung, S.; Unutmaz, D.; Wong, P.; Sano, G.; De los Santos, K.; Sparwasser, T.; Wu,S.; Vuthoori, S.; Vo, K.; Zavala, F.; Pamer, E.G.; Lang, R.A. In Vivo depletion od CD11c(+) cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, 17(2): 211-220, 2002.

Katz N, Chaves A and Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 14(6):397-400, 1972

King, C.L.; Xianli, J.; Malhotra, I.; Liu, S.; Mahmoud, A.A. and Oettgen, H.C. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol**, 158(1): 294-300, 1997.

Kitamura, D., Roes, J., Kuhn., Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene. **Nature**, 350: 423-426; 1991.

Kongs, A.; Verlé, P.; Talla, I. and Rouquet, Ph. Clinical investigation of a population recently infected with *Schistosoma mansoni* (Richard-Toll, Senegal). **Trop. Med. Inter. Health.**, 1(2):191-198; 1996.

Linsley, P.S.; Clark, E. A.; Ledbetter, J. A. Cell antigen, CD28, mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB-1. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 87: 5031-5035; 1990.

Lorrry, D. A., Rosemburg, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 193: 265, 1951.

Lukacs, N. W.; kunnel. S. L.; Strieter, R. M. Warmington, K.; Chensue, S. W. The role of macrophage inflammatory protein 1 α in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **J. Exp. Med.**, 177: 1551-1559; 1993.

Malaquias, L.C.C.; Falcão, P.L.; Silveira, A .M.S.; Gazzinelli, G.; Pratas, A . Coffman, R. L.; Pizziolo, V.; Souza, C. P. Colley, D. G. And Correa-Oliveira. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*. Analysis of the role of IL-

4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand. J. Immunol.**, 46: 393-398; 1997.

Martins-Filho, O. A .; Dutra, W. O .; Freeman, G. L.; Silveira, A . M. S.; Rabello, A.; Colley, D. G.; Prata, A .; Gazzinelli, G. and Correa-Oliveira, R. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human Schistosomiasis. **Scand. J. immunol.**, 46:304-311; 1997.

Mckerrrow, J. H. Cytokine induction and exploitation in schistosome infections. **Parasitology**, 115: S107-S112; 1997.

Medzhitov and Janeway, C. A Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, 296 (5566): 298-300.

Mohamed-Ali, Q.; Nasr-Eldin, M. A .E.; Ahmed, A .A .; Mergani, A .; Rahoud, S. Elagib, K .E.; Saeed, O . K.; Abel, L.; Magzoub, M. M. A and Dessen, A J. Susceptibility to periportal (symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: Evidence that intensity and duration of infection, gender and inherited factors are critical in disease progression. **J. Inf. Dis.** 180:1298-1306; 1999.

Montenegro, S. M. L.; Miranda, P.; Mahanty, S.; Abath, F. G. C.; Teixeira, K. M.; Coutinho, E.M.; Brinkman, J.; Gonçalves I.; Domingues, L. A .W. Domingues, A .L.C. Sher, A . Wynn, T. A . Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross- regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J. Infect. Dis.**, 179: 1502-1514; 1999.

Mosman, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Gioldilin, M. A.; Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol**, 136: 2348-23-57; 1986.

Mosmann, T. R and Coffman, R.L. Th1 and Th2: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** 7:145-173, 1989a.

Mosmann, T. R and Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, 17: 138-146; 1996.

Naus, C.W.A.; Kimani, G.; Ouma, J.H.; Fulford, A.J.C.; Webster, M.; van DAM, G.J.; Deelder, A.M.; Butterworth, A.E. and Dunne, D.W. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naive immigrant population: influence of infection duration, infection intensity and host age. **Infection and Immunity**, 3444-3451; 1999.

Ndhlovu, P.; Cadman, H.; Vennervald, B.J.; Christensen, N. O.; Chidimu, M.; Chandiwana, S.K. Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community Zimbabwe. **Parasite Immunol.**, 18: 181-191;1996.

Oin, S.; Cobbold, S. P.; Pope, H.; Elliot, J.; Kioussis, D.; Davies, J. and Waldmann, H. "Infectious" transplantation tolerance. **Science**, 259: 974-977; 1993.

Ottesen, E. A .; Hiatt, R. A.; Cheever, A. W.; Sotomayor, Z. R. and Neva, F. A. The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. **Clin. Exp. Immunol.**, 33: 37-47; 1978.

Ouma, J.H.; Fulford, A .J.C.; Kariuki, H.C.; Kimani, G.; Sturrock, R.F.; Michemi, G., Butterworth, A.E. Dunne, D.W. The development of schistosomiasis mansoni in an immunologically naive immigrant population in Masongaleni, Kenya. **Parasitology**, 117: 123-132;1998.

Owhasi, M.; Horii, Y.; Ishii, A . Eosinophil chemotactic factor in schistosoma eggs: A comparative study of eosinophil chemotactic factor in the eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 32: 359-366; 1983.

Pearce, E. J., Caspar, P., Grych, J. M., Lewis, F. A., Sher, A. Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses a parasite helminth *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med**, 173: 159-166; 1991.

Pessoa, S. M., Martins, A. V. Parasitologia Médica. 10 Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. SA, 399-421; 1987.

Qin, S., Cobbold, S. P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davis, J. and Waldmann, H. "Infectious" transplantation tolerance. **Science**, 259:974-977.

Rey, L. Parasitologia Médica, 2^a ED. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. SA:351-378; 1991.

Rizzo, L.V.; Morawetz, R.A.; Miller,-Rivero, N.E.; Choi, R.; Wiggert, B.; Chan, C.C.; Morse, H.C 3rd.; Nussenblatt, R.B.and Caspi, R.R. IL-4 and IL-10 are both required for the induction of Oral Tolerance. **J. Immunol**, 162(5): 2613-2622, 1999.

Rumbley, C. A., Zekavat, S.A., Sugaya, H., Perrin, J.P., Ramadan, M. A., Phillips, S. M. J. The Schistosoma Granuloma: characterization of Lymphocyte migration, activation, and cytokine production. **J. Immunol**, 161:4129-4137;1998.

Rumbley, C. A., Sugaya, H., Zekavat, S. A., Refaei, M. E., Perrin, P. J., Phillips, S. M. J. Activated Eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the Schistosome Granuloma. **J.Immunol**, 162: 1003-1009. 1999.

Sakaguchi, S.; Fukuma, K.; Kuribayashi, K. and Masuda, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of the T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. **J. Exp. Med**. 161: 72-87; 1985.

Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N. Thymus and autoimmunity. Transplantation of the thymus from cyclosporin A-treated mice causes organ-specific autoimmune disease in athymic nude mice. **J. Exp. Med.** 167: 1479-1485; 1988

Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. and Toda, M. immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, 155: 1151-1157; 1995.

Savioli, L. *et al.* Control of Schistosomiasis - A global Picture. **Parasitology Today**, 13: 444-448; 1997.

Secor, W. E.; Reis, M.G.; Ramos, E. A . G.; Peixoto Matos, E.; Reis, E. A .G.; Carmo, T. M. A . and Harn, Soluble Intercellular Adhesion Molecules in human Schistosomiasis: correlations with disease severity and decreased responsiveness to egg antigens. **Infection and Immunity**. 7: 2695-2701; 1994.

Sher, A.; Coffman, R. L.; Heiny, S.; Scott, P.; Cheever, A .W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 61-65; 1990.

Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, D., Pearce, E., Mosmann, T. R. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J. Immunol**, 147: 2713, 1991.

Stadecker, M.J. The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. **Parasitol Today**, 8: 199-204; 1992.

Suni, M. A ., Picker, L.J. and Maino, V. C. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. **J. Immunol. Meth**, 212: 89-98; 1998.

Todd, C.D., Goodgame, W., Colley, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. V. Suppression of schistosome antigen-specific lymphocyte-blastogenesis by adherent phagocytic cell. **J. Immunol**, ,122: 1440-1446; 1979.

Thornton, A . M and Shevach, E. M. CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production. **J. Exp. Med.**, 188(2): 287-296; 1998.

Thornton, A . M and Shevach, E. M. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J. Immunol.**, 164: 183-190; 2000.

Va Dam, G. J., Stelma, F. F., Gryseels, B., Ferreira, S. T. M. F., Niang, T.M., Rotmans, J. P. and Deelder, A. M. Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal. **J. Infect. Dis**, 173: 1232-1241; 1996.

Van Der Klij, D.; Tillens, A. G. D Yazdanbakhsh, M. Recognition of Schistosome glycolipids by immunoglobulin E: possible role in immunity. **Infect Immun**, 67: 5946-5950, 1999.

Velupillai, P.; Secor, W. E.; Harouf, A. M.; Harn, D. A. B-1 cell (CD5⁺B220⁺) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. **J. Immunol.**, 138: 338-344; 1997.

Vernino, L.A. Pisetsky, D. S. and Lipsky, P. E. Analysis of the expression of CD5 by human B cells and correlation with functional activity. **Cell Immunol.**, 139: 185-197; 1992.

Viana, I. R. C., Correa-Oliveira, R., Carvalho, O .S., Massara, C. L., Colossimo, E., Colley, D. G. and Gazzinelli, G. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol**, 17: 297-304; 1995.

Waine, G. J., MC Manus, D. P. Schistosomiasis vaccine development - the current picture. **BioEssay**, 19: 435-443; 1997.

Wahl, S.; Frazier-Jessen, M.; Jin, W.W.; Kopp, J. B. Sher, A . Cheever, A .W. Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosis. **Kidney Internal**, 51: 1370-1375; 1997.

Webster, M. et al. The influence of Sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines. **Parasitology**, 114: 383-393; 1997.

Webster, M., Correa-Oliveira, R., Gazzinelli, G., Viana, I. R. C., Fraga, L. A. O ., Silveira, A. M. S. d Dunne, D. W. Factors affecting high and low human IgE responses to Schistosome worm antigens in an area of Brazil endemic for *Schistosoma mansoni* and hookworm. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 57(4): 487-494; 1997.

Weinstock, J.V.and Blum, A.M. Modulation of granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosoma ova: In vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cell Immunol**, , 108: 452-459, 1987.

Weinstock, J.V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: Interactions between the schistosoma ova and the host. **Immunol Invest**, 21: 455-475; 1992.

Wiest, P.M. The epidemiology of Morbidity of Schistosomiasis. **Parasitology Today**, 12 (6):215-220; 1996.

Williams, M.E., Montenegro,S., Domingues, A .L. Wynn, T.A ., Teixeira, K., Mahanty, S., Coutinho, A ., Sher, A . Leucocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to Mitogen or Eggs antigens but with a Th0 pattern to Worm antigens. **J. Infect. Dis**, 170: 946-954;1994.

Willens, F.; Marchant,A.; Delville, J-P. et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intracellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. **Eur. J. Immunol.**, 24: 1007-1009: 1994.

Yamashita, T and Boros, D. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, 149: 3659; 1992.

Yessel, H. R.; malefyt, W.; Roncarolo, M. G.; Abrams, J. S.; Lahesmaa.; Spits, H. and Vries, J. E. IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood T cells. **J. Immunol.**, 149: 2378; 1992.

Zwingenberger, K,; Hohmann, A.; Cardoso de Brito, M. and Ritter, M. Impaired balance of Interleukin-4 and Interferon- γ production in infections with *Schistosoma mansoni* and intestinal Nematodes. **Scand. J. Immunol.**, 34: 243-251; 1991.

