

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

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E PRÓ-APOPTÓTICA  
DE ANTÍGENOS DE *Ancylostoma ceylanicum*:  
IMPLICAÇÕES NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA  
ANCILOSTOMÍASE**

Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

Belo Horizonte  
Outubro/2010

Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E PRÓ-APOPTÓTICA  
DE ANTÍGENOS DE *Ancylostoma ceylanicum*:  
IMPLICAÇÕES NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA  
ANCILOSTOMÍASE**

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

Área de Concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

Outubro/2010

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

### **COLABORADORES**

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniella C. Bartholomeu

Dr. Rodrigo R. de Cambraia Miranda

Msc. Natasha Delacqua Ricci

Msc. Lilian Lacerda Bueno

Msc. Sílvia Regina Costa Dias

Virgillio Gandra Martins

Lucas de Carvalho Dhom Lemos

Guilherme Grossi Caçado

Departamento de Biofísica e Fisiologia – ICB/UFMG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine de Souza Fagundes

Escola de Enfermagem – ICB/UFMG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Gazzinelli

Msc. Leonardo Matoso

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Dra. Ana Tereza Chaves

Msc. Jacqueline Araújo Fiúza

**ÓRGÃOS FINANCIADORES:** CNPq, FAPEMIG, PAPES/FIOCRUZ

**Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus padrinhos, aos meus irmãos e a Carol, que sempre acreditaram no meu potencial e na minha vitória. Obrigado pelo amor e pelos ensinamentos que foram fundamentais para que eu chegasse a esta conquista.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar sempre meu caminho e meus atos.

Aos meus pais pelo imenso amor, confiança, por sempre acreditarem no meu futuro, por investirem sem receio algum na minha carreira profissional e por terem tornado esse sonho, real.

Aos meus avós pela excelente criação, pelo amor eterno e por tudo o que vocês representam para mim.

Aos meus padrinhos pelo tratamento tão carinhoso e amoroso, pelos conselhos e incentivos essenciais para que eu chegasse até aqui e também por acreditarem e investirem incondicionalmente no meu futuro.

Aos meus irmãos, que sempre se fizeram presente em minha vida e compartilharam dos momentos de vitória e angústia. Agradeço pela torcida e principalmente por tornar nossa família tão unida e amada.

À Carol pela cumplicidade, pelo companheirismo e pela nossa sintonia inigualável. Obrigado pela TAMANHA paciência durante todos esses anos e por sempre colocar o nosso amor acima de tudo. Você é um exemplo de vida para mim.

A toda minha família: tios/tias, primos/primas por ser a melhor família do mundo. Mesmo que alguns me chamem de doido por dizer isso. (RISOS...)

Aos meus amigos de infância e amigos da faculdade, por fazerem tanta questão da minha companhia e da minha amizade, mesmo eu sendo muito enrolado; e por poder contar com vocês todos os dias da minha vida.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara. Obrigado por ter me recebido como seu aluno de mestrado e principalmente como seu amigo. Foi um prazer imensurável trabalhar neste projeto ao teu lado. Você representa muito para mim. Obrigado pelos ensinamentos, pela confiança, e por acreditar no meu potencial. Espero que a nossa parceria dure muito tempo. É um privilégio tê-lo como orientador.

A todos os colaboradores deste projeto, em especial a Prof. Elaine de Souza Fagundes, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelas sugestões que certamente contribuíram muito para o sucesso do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), pelo agradável convívio, carinho e amizade.

Aos colegas e amigos do Departamento de Parasitologia, por terem me recebido de forma tão carinhosa e amistosa na UFMG.

À turma 9.8; melhor turma de mestrado de todos os tempos. Obrigado pela amizade e por tornarem a difícil passagem pelos infinitos créditos da Pós-Graduação, prazerosa e divertida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial à Coordenação e à Sumara, pela oportunidade, pelo apoio e pelo carinho.

Aos Drs. Rodrigo Corrêa Oliveira, Giovanni Gazzinelli, Andréa Teixeira e Denise Lemos pela amizade e pelos excelentes ensinamentos durante a iniciação científica no René Rachou. Vocês foram fundamentais para a minha formação. Obrigado!

A Clari pela imensa disponibilidade, ajuda e pelo carinho especial.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do CPqRR, pelo agradável convívio durante a iniciação científica.

Às agências financiadoras, CNPq e FAPEMIG por tornarem este projeto viável.

Aos pacientes e animais estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

## SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i> .....	<i>iii</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	<i>v</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i> .....	<i>xi</i>
<i>RESUMO</i> .....	<i>xii</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>xiii</i>
<i>1. INTRODUÇÃO</i> .....	<i>1</i>
1.1. A ancilostomíase .....	<i>2</i>
1.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial .....	<i>2</i>
1.1.2. Epidemiologia .....	<i>3</i>
1.1.3. Ciclo Biológico e Transmissão .....	<i>4</i>
1.1.4. Fisiopatologia .....	<i>5</i>
1.1.5. Resposta imunológica na ancilostomíase .....	<i>5</i>
1.2. Apoptose Celular .....	<i>7</i>
1.2.1. Histórico .....	<i>7</i>
1.2.2. Marcadores morfológicos e função dos genes associados .....	<i>8</i>
1.2.3. Fisiologia da ligação de Anexina V com a molécula de fosfatidilserina e do Iodeto de Propídeo com DNA .....	<i>11</i>
1.2.4. Apoptose em doenças parasitárias .....	<i>13</i>
<i>2. JUSTIFICATIVA</i> .....	<i>14</i>
<i>3. OBJETIVOS</i> .....	<i>16</i>
3.1. Objetivo Geral .....	<i>17</i>
3.2. Objetivos específicos .....	<i>17</i>
<i>4. METODOLOGIA</i> .....	<i>18</i>
4.1. Manutenção da cepa de <i>A. ceylanicum</i> .....	<i>19</i>
4.2. Produção de antígenos: excretados/secretados de verme adulto (ES) e extrato bruto de verme adulto (HEX) .....	<i>19</i>
4.3. População de estudo .....	<i>20</i>
4.4. Tipos celulares .....	<i>21</i>
4.5. Separação de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados por ancilostomídeos e negativos .....	<i>22</i>
4.6. Obtenção de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e do grupo controle .....	<i>22</i>
4.7. Ensaio de viabilidade celular .....	<i>23</i>

4.8. Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo.....	23
4.8.1. Determinação do conteúdo de DNA subdiploide .....	23
4.8.2. Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo .....	25
4.9. Determinação da via apoptótica induzida pelos antígenos do parasito .....	26
4.9.1. Extração do RNA e síntese do cDNA .....	27
4.9.2. Reação de PCR em Tempo Real.....	27
4.10. Análise dos Dados .....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 - Análise da viabilidade de células Jurkat após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de <i>A. ceylanicum</i> .....	32
5.2 - Análise da fragmentação do DNA de células Jurkat após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de <i>A. ceylanicum</i> .....	34
5.3- Análise da viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e não infectados, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de <i>A. ceylanicum</i> .....	36
5.4 - Análise da fragmentação do DNA de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e não infectados, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de <i>A. ceylanicum</i> .....	40
5.5 - Análise do perfil apoptótico de células de pacientes portadores da fase crônica da ancilostomíase .....	44
5.5.1 - Caracterização do perfil de leucócitos do sangue periférico de pacientes na fase crônica da ancilostomíase e indivíduos não infectados .....	44
5.5.2 – Análise da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados por ancilostomídeos, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de <i>A. ceylanicum</i> .....	46
5.5.3 - Análise das subpopulações de linfócitos CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e CD19 <sup>+</sup> , marcados com Anexina V e Iodeto de propídeo (PI), em pacientes infectados por ancilostomídeos e indivíduos do grupo controle.....	48
5.5.4 - Análise das subpopulações de linfócitos CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e CD19 <sup>+</sup> , marcados com Anexina V e Iodeto de propídeo (PI), em pacientes infectados por ancilostomídeos, após estímulo com os antígenos ES e HEX de <i>A. ceylanicum</i> .....	50
5.6 – Análise da expressão de genes relacionados a diferentes vias apoptóticas em células Jurkat, após estimulação com os antígenos ES e HEX de <i>A. ceylanicum</i> .....	52
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÃO.....	62
8. ANEXOS .....	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígenos

BCA – “*Bicinchoninic acid*”

CLM – Células de linfonodos mesentéricos

CD – “*Cluster of differentiation*”

CD3 - Marcador de superfície celular da população de linfócitos T

CD4 – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD19 - Marcador de superfície celular da população de linfócitos B

cDNA – DNA complementar

CT - Controle

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

DALYs – “*Disability-adjusted life years*” (Anos de vida ajustados por incapacidade)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima

ES – Excretado/Secretado

FACS – “*Fluorescence Activated Cell Sorter*”

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FL – Fluorescência

FSC – “*Forward Scatter*” (Dispersão frontal relativo a tamanho celular)

HEX – “*Hookworm extract*” (Antígeno bruto de ancilostomídeos)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

L – Linfócitos

LM – Linfonodos mesentéricos

LTCD4<sup>+</sup> - Linfócitos T auxiliares

pb - Pares de base

LTCD8<sup>+</sup> - Linfócitos T citotóxicos

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Fosfato de Sódio

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PerCP – Complexo protéico Clorofila-Peridina

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E2

PI – Iodeto de Propídeo

RPMI – Meio de Cultura (*“Roswell Park Memorial Institute”*)

rpm- Rotação por minuto

SSC – *“Side Scatter”* (Dispersão lateral relativo a granulosidade celular)

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta

Th1 – Células TCD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 – Células TCD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TNFR- Receptor do Fator de Necrose Tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – *“World Health Organization”* (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição mundial da Ancilostomíase em 2005. Fonte: Hotez *et al.*, 2005.....03
- Figura 2:** Marcadores morfológicos da apoptose. (A) redução do tamanho celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. (B) clivagem do DNA internucleossomal. Fonte: Cotter, 2009.....08
- Figura 3:** Células “Jurkat” apoptóticas marcadas com Anexina V-FITC, mostrando a exposição da molécula de fosfatidilserina (verde) na face externa da membrana plasmática. Fonte: Henson *et al.*, 2001.....12
- Figura 4:** Histograma representativo da análise do conteúdo de DNA subdiploide. À esquerda o histograma de uma célula normal e à direita o de uma célula em apoptose. O marcador M1, nos gráficos, representa a região de DNA fragmentado do histograma do ciclo celular.....24
- Figura 5:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos em gráfico de tamanho (FSC) em função da granulosidade (SSC), após cultivo celular. (B) representa o perfil celular da população de linfócitos, selecionados no “gate” R1, positivos para moléculas CD4, CD8 e CD19 em gráfico de fluorescência 3 (linfócitos CD4/CD8/CD19 PerCP) em função da granulosidade. (C) representa o perfil de análise da população de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+, selecionados no gate R2, positivos para iodeto de propídeo (Q1), positivos para anexina V e iodeto de propídeo (Q2), negativos para anexina V e iodeto de propídeo (Q3) e positivos para anexina V (Q4) em gráfico de fluorescência 1 (Anexina V – FITC) em função de fluorescência 2 (Iodeto de propídeo).....26
- Figura 6:** Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, para o gene GAPDH (500 pb) das células Jurkat estimuladas na ausência (CT) e na presença dos antígenos do parasito (ES) e (HEX). As colunas (CT-), (ES-), (HEX-) referem-se aos

respectivos controles negativos da síntese de cDNA de cada grupo. A primeira coluna refere-se ao padrão de peso molecular 1 Kb.....29

**Figura 7.** Mapa da placa de 96 poços fornecido pelo fabricante, mostrando os 84 genes associados a diferentes vias apoptóticas, mais os genes constitutivos e controles da reação. Em cada poço da placa encontra-se iniciadores associados a um gene específico associado a apoptose. Fonte: SABiosciences, EUA.....29

**Figura 8:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células Jurkat ( $2 \times 10^5$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células Jurkat. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....33

**Figura 9:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células Jurkat ( $2 \times 10^5$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células Jurkat. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....33

**Figura 10:** Análise representativa de um de três experimentos independentes, mostrando a fragmentação do DNA de células Jurkat por citometria de fluxo utilizando uma solução hipotônica e fluorocrômica (HFS). Células Jurkat, selecionadas no gate **R1** (A), foram estimuladas na ausência (B) e na presença dos antígenos HEX ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (C) e ES ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (D) do parasito, além do fármaco etoposídeo ( $14,75 \mu\text{M}$ ) (E), durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual de células com DNA subdiploide, situadas na região **M1**.....35

**Figura 11:** Avaliação do percentual de células Jurkat com DNA fragmentado por meio da técnica HFS, após estímulo com antígeno ES (100 µg/mL) e antígeno bruto HEX (100 µg/mL) em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle (sem estímulo).....35

**Figura 12:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters infectados por ancilostomídeos ( $n=9$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....38

**Figura 13:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters infectados por ancilostomídeos ( $n=9$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....38

**Figura 14:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters não infectados ( $n=7$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....39

**Figura 15:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters não infectados ( $n=7$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.....39

**Figura 16:** Análise representativa de um dos experimentos, mostrando a fragmentação do DNA de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos por citometria de fluxo, utilizando uma solução fluorocrômica e hipotônica (HFS). Os linfócitos totais, selecionadas no gate R1 (A) foram estimulados na ausência (B) e na presença dos antígenos HEX ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (C) e ES ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (D) além do reagente DMSO 10% (E) durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual médio de células com DNA subdiplóide, situadas na região M1.....41

**Figura 17:** Avaliação do percentual de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados ( $n=9$ ) com DNA fragmentado por meio da técnica de HFS, após estímulo com antígeno ES ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) e antígeno bruto HEX ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....41

**Figura 18:** Análise representativa de um dos experimentos, mostrando a fragmentação do DNA de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados por citometria de fluxo, utilizando uma solução fluorocrômica e hipotônica (HFS). Os linfócitos, selecionados no gate R1 (A), foram estimulados na ausência (B) e na presença dos antígenos HEX ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (C) e ES ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) (D), além do reagente DMSO 10% (controle positivo) (E) durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual médio de células com DNA subdiplóide, situadas na região M1.....42

**Figura 19:** Avaliação do percentual de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados ( $n=7$ ) com DNA fragmentado, por meio da técnica de HFS, após estímulo com

antígeno bruto HEX (100 µg/mL) e antígeno ES (100 µg/mL) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....42

**Figura 20:** Análise comparativa entre a fragmentação do DNA de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados (HNI) com os linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos (HI). Os resultados estão expressos como percentual médio de células com DNA fragmentado. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo valor de p referente à análise de cada grupo.....43

**Figura 21:** Análise das populações de leucócitos (**A: eosinófilos; B: monócitos; C: neutrófilos; D: linfócitos**) no sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos (n=24), e do grupo controle (n=15). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....45

**Figura 22:** Ensaio de proliferação celular por meio da técnica de MTT. As PBMCs ( $2 \times 10^5$ ) de pacientes infectados por ancilostomídeos (n=5) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES (**A**) e antígeno bruto HEX (**B**) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....47

**Figura 23:** Marcação de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos e de indivíduos do grupo controle com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. As subpopulações de linfócitos,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e  $CD19^+$ , foram marcados com anexina V para caracterização do estágio recente de apoptose (**A, B, C**) e também com anexina V associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (**D, E, F**). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....49

**Figura 24:** Marcação de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos com anexina V e iodeto de propídeo após cultura de 48 horas na ausência (CT) ou presença de antígenos do parasito (ES e HEX) em duas diferentes concentrações

(5µg/mL e 50 µg/m). As subpopulações dos linfócitos, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, foram marcados com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose (**A, B, C**) e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (**D, E, F**). As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....51

**Figura 25:** Análise da expressão dos genes relacionados a diferentes vias apoptóticas em células Jurkat, após estimulação com os antígenos ES (100 µg/mL) e HEX (100 µg/mL) por 48 horas. Os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.....54



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização da população de estudo.....	21
---	----

## RESUMO

A ancilostomíase é uma das doenças parasitárias crônicas de maior prevalência no mundo, com uma estimativa entre 576 e 740 milhões de indivíduos infectados. Estudos da biologia do parasito demonstraram que os ancilostomídeos conseguem sobreviver em seus hospedeiros por vários anos, mesmo diante uma resposta imune robusta, o que representa um forte indicativo da evasão imunológica pelo parasito. Entretanto, devido à escassez de trabalhos voltados para o estudo da resposta celular na ancilostomíase humana e experimental, os mecanismos de evasão desencadeados pelos produtos de excreção/secreção (ES) do parasito, dentre eles a indução de apoptose das células reativas do hospedeiro, não foram ainda completamente elucidados. No presente estudo, avaliou-se, por meio da técnica de MTT e HFS, a viabilidade celular e a fragmentação do DNA respectivamente, de células Jurkat e linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e não infectados, após estímulo com diferentes concentrações do antígeno excretado/secretado (ES) e bruto (HEX) de vermes adultos de *Ancylostoma ceylanicum*. Além disso, avaliamos por citometria de fluxo, através da marcação celular com anexina V e iodeto de propídeo (PI), o perfil apoptótico da população de linfócitos totais e subpopulações CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> de pacientes infectados por ancilostomídeos e indivíduos não infectados. Por fim, avaliamos por meio da técnica de PCR em tempo real, a expressão de diferentes genes associados com as prováveis vias apoptóticas que estariam sendo ativadas ou moduladas nas células Jurkat pelos antígenos do parasito. Nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa no percentual de viabilidade das células Jurkat assim como das células de linfonodos mesentéricos de hamsters controles e infectados, estimuladas com antígenos do parasito, principalmente o antígeno ES, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, quando comparadas com células não estimuladas. Além disso, a análise do ensaio de HFS demonstrou um aumento significativo no percentual de células Jurkat e linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters controles e infectados, com DNA fragmentado, após estímulo com antígenos ES, quando comparado com as células não estimuladas. A análise da marcação celular com Anexina V e PI demonstrou que os pacientes infectados por ancilostomídeos apresentam um aumento do número de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> em processo de apoptose, quando comparados com indivíduos do grupo controle. A regulação negativa da expressão dos receptores de morte celular da superfamília TNF, assim como a regulação positiva dos genes pró-apoptóticos, associados a família BCL-2, e a família P53, observados pela qPCR, sugere que os antígenos de *A. ceylanicum* estariam induzindo apoptose celular pela via intrínseca mitocondrial. A partir destes resultados, podemos inferir que os antígenos de *A. ceylanicum* apresentam um potencial efeito citotóxico e pró-apoptótico para a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, atuando principalmente no controle do número absoluto e na capacidade proliferativa destas células, contribuindo para modulação da resposta imunológica, e conseqüentemente, para a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro.

## ABSTRACT

Hookworm infection is one of the most prevalent parasitic diseases, infecting an estimated 740 million people in tropical and subtropical regions of the world. A robust but ineffective immune response, characterized by the ablation of parasite-specific T cell proliferative response (hyporesponsiveness), is often observed in the hookworm infection resulting in a long term parasite survival in the host lumen. While several mechanisms of modulation have been demonstrated for hookworm and other neglected tropical infections, the influence of apoptosis into the immunomodulation of hookworm infection is still poorly understood. In the current study, MTT assay for cell viability, of Jurkat T cells and mesenteric lymph nodes cells from infected and non-infected hamsters was performed in the presence of different concentrations of adult *Ancylostoma ceylanicum* excreted/secreted products (ES) and crude extract (HEX) (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/mL). Besides that we evaluated the DNA fragmentation, using a hypotonic fluorocromic solution (HFS), in Jurkat T cells and mesenteric lymph nodes cells from infected and non-infected hamsters, after ES and HEX stimulation. Moreover, the phenotypic profile of circulating lymphocytes from *Necator americanus* infected and healthy non-infected donors were evaluated by flow cytometry using Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining. Finally, we evaluated by Real Time PCR, the expression of 84 genes related with different apoptotic pathways, after hookworms antigens stimulation. Our results demonstrated that stimulation of Jurkat T cells with ES and HEX antigen induced a decrease of cell viability in a dose-dependent manner when compared with control non-stimulated cells. Similarly, decrease of cell viability of lymph nodes cells after antigenic stimulation was also observed in both infected and non-infected groups. The analysis of HFS assay showed that the stimulation with hookworm ES antigen induced an increase of DNA fragmentation in Jurkat T cells ( $p=0,0001$ ) as well as in mesenteric lymph nodes cells from infected ( $p=0,0073$ ) and non-infected hamsters ( $p<0.0001$ ), when compared with non-stimulated cells. Flow cytometric analysis demonstrated that hookworm infected patients presented a significant increase of early apoptotic  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , and  $CD19^+$  lymphocytes (Annexin V-FITC<sup>+</sup>) ( $p=0.0052$ ,  $p=0.0269$  and  $p<0.0001$ , respectively) and also in the late apoptotic  $CD8^+$  and  $CD19^+$  lymphocytes (Annexin V-FITC<sup>+</sup> /PI<sup>+</sup>) ( $p=0.0248$  and  $p=0.0065$ , respectively) when compared with non-infected individuals. The down-modulation of the members of the TNF receptor superfamily (death receptors), as well as the up-regulation of the pro-apoptotic genes belonging the BCL-2 and P53 family, observed by qPCR analysis, suggest that hookworms antigens induce apoptosis by intrinsic mitochondrial pathway. In conclusion, this study demonstrated the potential cytotoxic and pro-apoptotic activity of the hookworms` antigens for T and B cells, which contribute to the downmodulation of immune response and the survival of the hookworms in their hosts.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. A ancilostomíase

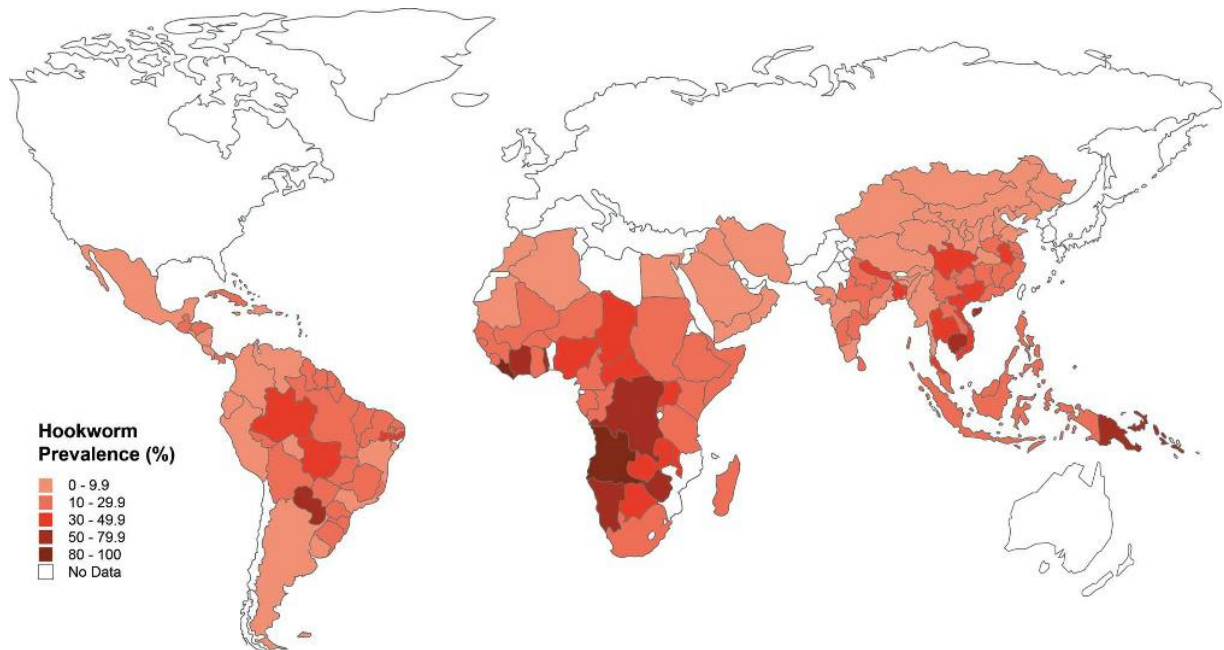
### 1.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial

A ancilostomíase é uma doença parasitária crônica, causada por helmintos nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae (Ordem: Strongylidea, Super família Strongyloidea).

Dentre os dois principais gêneros que infectam os humanos, *Necator* e *Ancylostoma*, destacam-se epidemiologicamente as seguintes espécies: *Necator americanus*, principal agente etiológico da ancilostomíase no mundo e o *Ancylostoma duodenale*, que acomete populações focais e esparsas (Hotez *et al.*, 2005). Por outro lado, as espécies *A. ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliense*, apesar de infectarem os humanos, são espécies zoonóticas e não representam importância em saúde pública, devido às suas distribuições geográficas localizadas (Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004).

Diversos estudos apontam a ancilostomíase com uma das mais prevalentes doenças parasitárias crônicas no mundo, infectando cerca de 740 milhões de pessoas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento da África Subsaariana e Ásia oriental (**Fig. 1**) (Garside *et al.*, 1989; De Silva *et al.*, 2003). A alta transmissão também ocorre em outras áreas tropicais, como sudeste da China (Hotez *et al.*, 2002; Hotez *et al.*, 2005), Índia subcontinental (Yadla *et al.*, 2003; Hotez *et al.*, 2005) e nas Américas (Hotez *et al.*, 2003; Hotez *et al.*, 2005). No nordeste da Austrália a espécie *A. caninum* têm sido relatada com causa de enterite eosinofílica em indivíduos infectados (Prociv e Croese, 1996; Landmann e Prociv, 2003). Já a espécie *A. braziliense* continua sendo o mais importante agente etiológico da Larva Migrans Cutânea (Brooker *et al.*, 2004), uma condição dermatológica auto-limitada e caracterizada pela presença de túneis sinuosos cutâneos característicos, predominantemente nos pés, nádegas e abdome.

A infecção pelos ancilostomídeos apresenta nítida associação com baixos níveis sócio-econômicos, sendo concentrada entre os 2,7 bilhões de pessoas mais pobres no planeta, as quais sobrevivem com menos de dois dólares por dia, em condições sanitárias extremamente precárias; e representa uma perda de 1.825.000 anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”, DALYs), superando todas as outras doenças parasitárias, com exceção da malária, leishmanioses e filariose linfática (Hotez *et al.*, 2005).



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

### 1.1.2. Epidemiologia

A despeito de sua relevância para a saúde pública e desenvolvimento econômico mundial, a ancilostomíase permanece como uma doença negligenciada pela comunidade científica internacional. A epidemiologia e a dinâmica de transmissão da ancilostomíase foram vastamente estudadas por Anderson e May (1991), nos últimos 25 anos por meio do desenvolvimento de modelos matemáticos, os quais revelaram um padrão epidemiológico típico, o qual posteriormente foi também descrito para outras helmintoses: (1) intensidade de infecção associada à idade; (2) grande variação e dispersão na distribuição da carga parasitária por hospedeiro; (3) predisposição de indivíduos a grandes ou baixas infecções; (4) rápida re-infecção após o tratamento.

Estimativas da intensidade de infecção por ancilostomídeos, principal índice epidemiológico utilizado para descrever helmintoses transmitidas pelo solo, são tipicamente obtidas por meio de contagens de ovos nas fezes. A Organização Mundial de Saúde define como infecção moderada aquela em que se observa 2000-3999 ovos por grama (opg) de fezes e infecções de alta intensidade aquelas nas quais se verificam 4000 ou mais ovos por grama de fezes (Stoltzfus *et al.* 1996).

Comparada com outras helmintoses transmitidas pelo solo, nas quais a carga parasitária atinge um pico nas crianças e se reduz nos adultos, a ancilostomíase possui um

padrão único de distribuição por idade. Nessa parasitose, a intensidade de infecção usualmente aumenta gradativamente com a idade e atinge um platô na idade adulta. Diferentemente, as curvas de intensidade de infecção por idade para *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* são convexas, atingindo um pico nos indivíduos com 5-10 anos de idade (Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004).

Outro aspecto peculiar da infecção por ancilostomídeos consiste na heterogeneidade da carga parasitária por pessoa. A frequência da distribuição de ancilostomídeos/pessoa na população é altamente concentrada, ou seja, uma minoria da população está densamente parasitada, enquanto a maioria alberga poucos parasitos (Hotez *et al.*, 2004).

### **1.1.3. Ciclo Biológico e Transmissão**

A infecção em humanos ocorre quando larvas do estágio L3 (filiárioide ou infectante) (*Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus*) penetram ativamente através da pele, conjuntiva e mucosa, ou quando são ingeridas passivamente (*A. duodenale*) (Brooker *et al.*, 2004). Após penetrarem no hospedeiro, as larvas têm seu desenvolvimento estimulado. A penetração é seguida, dentro de aproximadamente 10 dias, pela migração das larvas através da corrente sanguínea e de seu transporte pela circulação aferente ao átrio e ventrículo direitos, a partir dos quais atingem a circulação pulmonar. Através da ruptura de capilares pulmonares, elas penetram no parênquima adjacente, causando uma pneumonite que se assemelha à Síndrome de Löffler devido à sua associação com eosinofilia pulmonar. Geralmente, o quadro de infecção pulmonar não é severo, mas pode ter até um mês de duração, momento em que as larvas deixam os pulmões (Hotez *et al.*, 2005).

Posteriormente, elas ascendem no trato respiratório por penetração progressiva em alvéolos, bronquíolos, brônquios e traquéia. A presença das larvas nessa região induz o reflexo da tosse no hospedeiro, impulsionando-as à laringo-faringe e até mesmo à cavidade oral, aonde são deglutidas e atingem o trato gastrointestinal. No interior do intestino, as larvas L3 sofrem duas mudas e atingem o estágio adulto, diferenciando-se em fêmeas e machos com plena maturidade sexual. Ainda no interior do trato gastrointestinal, esses parasitos se reproduzem, produzindo milhares de ovos por dia, os quais são eliminados junto às fezes do hospedeiro (Hotez *et al.*, 2005). A perda de sangue intestinal inicia-se antes da produção e eliminação de ovos e continua enquanto persistir a infecção. O período pré-patente, isto é, desde o momento da penetração das larvas L3 até a eliminação dos ovos nas fezes, varia entre

35 e 60 dias para *A. duodenale*, de 42 a 60 dias para *N. americanus* e de 21 a 35 dias para *A. ceylanicum*. Quando depositados no solo, com adequadas condições de umidade, temperatura e proteção contra a luz solar, os ovos eclodem dentro de 24-48 horas, eliminando larvas no estágio L1 que, após duas mudas, evoluem para o estágio infectante L3 (Brooker *et al.*, 2004).

#### **1.1.4. Fisiopatologia**

A morbidade da infecção está diretamente associada à perda de sangue no trato gastrointestinal do hospedeiro, resultante tanto da espoliação sanguínea por vermes adultos (Hotez *et al.*, 2004) quanto da hemorragia causada pela ruptura de capilares e arteríolas intestinais seguida da secreção de fatores anticoagulantes do parasito (Brooker *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2005).

O principal achado laboratorial da doença é a anemia ferropriva, resultante de infecções moderadas ou severas. A anemia ferropriva é detectada em quase todos os casos e pode haver hipoalbuminemia nos pacientes em que a perda de sangue intestinal supere a ingestão diária de proteínas e cause depleção de reservas protéicas previamente formadas.

Estudos recentes demonstram que infecções crônicas de alta carga parasitária estão associadas com retardo no crescimento físico e déficits intelectuais e cognitivos em crianças (Sakti *et al.*, 1999; Jardim-Botelho *et al.*, 2008), podendo resultar em maior número de ausências na escola e redução na produtividade econômica futura (Brown, 2005).

#### **1.1.5. Resposta imunológica na ancilostomíase**

Estudos imunoepidemiológicos indicam que, em contraste com a polarização para uma resposta Th2, característica da maioria das infecções helmínticas (Maizels *et al.*, 2004), a infecção por ancilostomídeos resulta em uma resposta imune celular mista Th1/Th2, com uma produção significativa de citocinas típicas de uma resposta do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Pit *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 2004; Quinnell *et al.*, 2004). Há evidências de que uma resposta imune protetora contra ancilostomídeos, assim como descrito para outras helmintoses (Anthony *et al.*, 2007), seja mediada por componentes da resposta inata e adaptativa frente a uma ativação por citocinas do tipo-2. Isso resultaria na ativação e expansão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th2, plasmócitos secretores de IgE, eosinófilos, mastócitos e basófilos,



todos capazes de produzir citocinas do tipo Th2 (Loukas e Prociv, 2001; Fujiwara *et al.*, 2006; Anthony *et al.*, 2007).

Em humanos, o contato com o *N. americanus* ou *A. duodenale* resulta na produção de altos níveis séricos de IgE (policlonal e parasito-específico), eosinofilia e modulação da secreção de citocinas Th1 (Loukas e Prociv, 2001; Fujiwara *et al.*, 2006), resultando em uma infecção crônica e na sobrevivência do parasito por período prolongado (5 a 7 anos) (Loukas e Prociv, 2001). Apesar da produção de anticorpos e eosinofilia apresentar uma correlação negativa com carga parasitária e fecundidade do parasito (Pritchard *et al.*, 1995; Pritchard e Walsh, 1995; Quinnell *et al.*, 1995), ainda não é claro se esses eventos possuem um papel na proteção do hospedeiro ou se sinalizam meramente uma mudança para um perfil de resposta Th2 (Fujiwara *et al.*, 2006).

#### **1.1.5.1. Modulação da resposta imune em indivíduos infectados por ancilostomídeos**

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

Apesar da evasão da resposta imune ser extensivamente relatada na literatura (Brooker *et al.*, 2004; Geiger *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2004; Hotez *et al.*, 2005; Loukas *et al.*, 2005; Mendez *et al.*, 2005; Bethony *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2006; Loukas *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2007), os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados. As primeiras evidências que demonstraram a evasão da resposta imune pelo parasito vieram da observação de que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam uma redução da resposta proliferativa de linfócitos frente a antígenos do parasito (Geiger *et*

*al.*, 2004). Atualmente, sabe-se que, os ancilostomídeos, excretam e secretam diversos produtos com potencial efeito imunomodulatório. Estudos têm demonstrado que o desafio somente com os produtos de excreção/secreção (ES), induz a uma resposta imune similar a observada durante a infecção por nematódeos em modelos experimentais, a qual é caracterizada pela regulação negativa da proliferação celular (Loukas *et al.*, 2005). Loukas *et al.*, (2001) avaliaram a composição destes produtos ES e demonstraram a presença de diferentes tipos de proteínas, incluindo proteases, inibidores de proteases, lectinas do tipo C, além de proteínas anti-oxidantes e anti-inflamatórias, que poderiam estar associadas com a diminuição da resposta imunológica durante a fase crônica da infecção.

Neste contexto, uma hipótese que explicaria a modulação da reatividade celular por ancilostomídeos seria a de que o parasito não alteraria diretamente a capacidade proliferativa de células mononucleares, porém induziria a apoptose de células reativas. Além disso, sabe-se que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam uma redução significativa da frequência de células T CD3<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> circulantes (Onyemelukwe e Musa, 2001), entretanto, ainda não está claro qual subpopulações de linfócitos (ou mesmo outros leucócitos) seria alvo de apoptose causada pelo parasito.

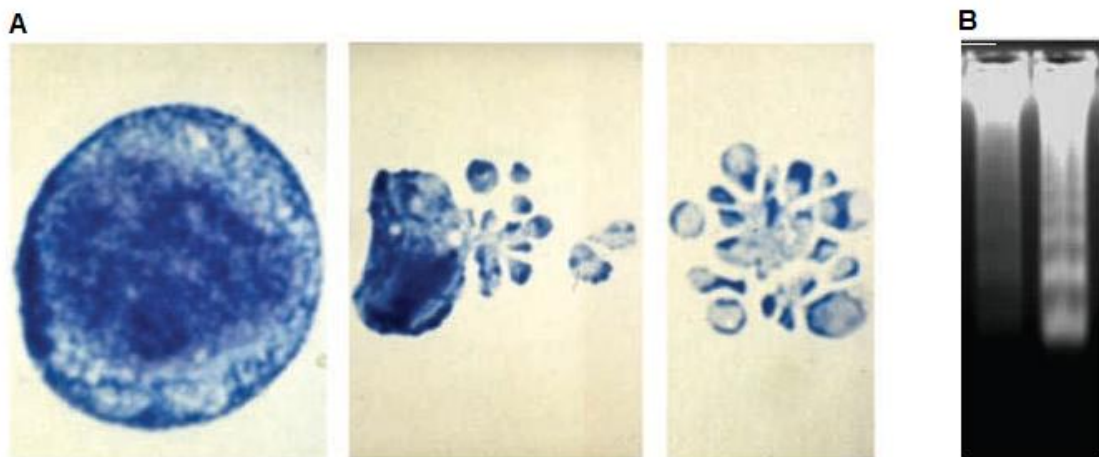
## **1.2. Apoptose Celular**

### **1.2.1. Histórico**

O conceito de morte natural das células foi originalmente mencionado por Carl Vogt (1842) a partir de estudos baseados em morte celular de modelos experimentais. Este estudo proporcionou uma notável contribuição para ciência, principalmente para a Teoria Celular elaborada três anos mais tarde por Lorenz Oken, Matthias Schleiden, Theodor Schwann and Rudolf Virchow (revisto por Misslin, 2003). Dessa forma, este conceito, conhecido atualmente por Apoptose, é considerado como uma das teorias mais antigas da Biologia Celular, uma vez que a primeira descrição morfológica foi proposta em 1885 por Walther Flemming (revisto por Cotter, 2009), que através de desenhos esquemáticos demonstrou a redução do tamanho celular, além da fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos; todos estes, considerados atualmente como marcadores específicos de Apoptose.

### 1.2.2. Marcadores morfológicos e função dos genes associados

Segundo Cotter (2009), a apoptose é uma poderosa e complexa via de regulação, responsável pela morte celular, que ocorre durante o desenvolvimento embriogênico, assim como durante a homeostasia tecidual. Diferente da necrose, o processo de apoptose visa à remoção de células indesejadas, sem causar nenhum tipo de dano ao hospedeiro, como por exemplo, sem promover a liberação de substâncias intracelulares tóxicas e sem induzir uma resposta inflamatória localizada (Blankenberg, 2007). Este processo atua controlando parcialmente o número absoluto de células e caracteriza-se morfológicamente pela redução do tamanho celular, fragmentação nuclear através da clivagem do DNA internucleossomal, além da condensação da cromatina. Essas características resultam na formação de corpos apoptóticos que são então eliminados por células fagocíticas, tais como, macrófagos e monócitos. (**Fig. 2A**). A clivagem do DNA internucleossomal propicia um padrão de bandas eletroforéticas característico, que também é considerado como um marcador de apoptose (**Fig. 2B**) (Cotter, 2009).



**Fig. 2.** Marcadores morfológicos da apoptose. (A) redução do tamanho celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. (B) clivagem do DNA internucleossomal. Fonte: Cotter, 2009.

Outro importante marcador de apoptose é a alteração morfológica da membrana plasmática, caracterizada pela exteriorização da molécula de fosfatidilserina presente na bicamada lipídica, que uma vez em contato com meio extracelular, propicia o reconhecimento de células fagocíticas para eliminação de células em apoptose.

Em células vivas, os fosfolípidos estão assimetricamente distribuídos na membrana plasmática com a molécula de fosfatidilserina voltada para o citoplasma. Entretanto, essa distribuição assimétrica pode ser alterada tanto de forma reversível quanto irreversível, por uma série de estados fisiopatológicos; sendo mais notável durante a apoptose, cuja desenvolve papel crucial para a remoção das células apoptóticas por células fagocíticas (Munoz *et al.*, 2007; Tait, 2008).

A molécula de fosfatidilserina é reconhecida por receptores específicos que são expressos em uma ampla diversidade de células, inclusive em fagócitos profissionais. Além disso, foi demonstrado por Hanayama *et al.* (2002), que os macrófagos ativados secretam a glicoproteína EGF-fator 8, que também se liga à fosfatidilserina, facilitando o reconhecimento de células apoptóticas pelo receptor  $\alpha_v\beta_3$  presente nos fagócitos, e conseqüentemente, facilitando sua remoção. A fagocitose de células em apoptose previne a liberação de componentes intracelulares imunogênicos ou tóxicos para o tecido além de ativar a liberação de mediadores antiinflamatórios, tais como, TGF- $\beta$ , IL-10, e PGE<sub>2</sub> (Henson, *et al.*, 2001; Munoz *et al.*, 2007). Entretanto, os mecanismos que levam à alteração morfológica da membrana plasmática são ainda desconhecidos, e geralmente assume-se que a exposição da fosfatidilserina é conseqüência da ativação de caspase, outro importante marcador de apoptose (Blankenberg 2008).

As caspases são proteases do grupo das cisteínas, altamente conservadas ao longo da evolução, que apresentam especificidade absoluta pelo ácido aspártico e desempenham papel central no processo de morte celular (Tait, 2008). São comumente agrupadas de acordo com suas funções; sendo aquelas que iniciam as reações (Caspase 8, 9 e 10) e àquelas que executam e ativam vias apoptóticas (Caspase 3,6 e 7) (Huerta *et al.*, 2007) . A ativação das caspases ocorre tanto pela via intrínseca quanto a extrínseca. A via extrínseca é mediada por receptores específicos de morte celular (Fas, FADD, TNFRSF, TRAF, CD40) que se ligam a diferentes ligantes, como TNF (fator de necrose tumoral), TRAIL, FasL, CD40L (Blankenberg 2008). A associação do ligante com seu receptor ativa as caspases 8 e 10, que por sua vez clivam e ativam as caspases 3, 6 e 7. Por outro lado, a via intrínseca ou mitocondrial é iniciada pela liberação de citocromo C pela mitocôndria para o citosol, iniciando uma cascata de eventos que culminam na formação de estruturas conhecidas por apoptossomos. Estas estruturas clivam e ativam Caspase-9, que leva a ativação novamente das Caspases 3,6 e 7, induzindo a célula à apoptose (Blankenberg 2008).

Cada caspase é associada a um inibidor específico, permitindo este sistema ser estritamente regulado por diversos mecanismos de regulação negativa ou positiva (Blankenberg 2008).

Existem evidências demonstrando que a exposição da molécula de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática também pode ocorrer independentemente da ativação das caspases, e que este mecanismo seria regulado por outras vias, como por exemplo, pela mitocôndria, através de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (Zhang *et al.*, 2004). Ferraro-Peyret *et al.* (2002) demonstraram a exposição da molécula de fosfatidilserina, em células T primárias após o tratamento com inibidores de caspase, durante a apoptose induzida por estímulos que não ativam os receptores de morte celular. Além disso, Brown *et al.* (2000), sugere que o fenômeno de morte celular independente da ativação das caspases, também ocorre em situações fisiológicas; caracterizado pela apoptose de plaquetas velhas, onde novamente observa-se a exposição da molécula de fosfatidilserina, o que garante o rápido reconhecimento e eliminação das células mortas.

Em contraste às ativações das inúmeras vias induzindo as alterações morfológicas e moleculares nas células apoptóticas, existem importantes vias responsáveis pela regulação do processo de apoptose, como é o caso do gene BCL-2, originalmente identificado em um linfoma de células B por Yoshida Tsujimoto *et al.* (1984). Foi demonstrado por Tsujimoto *et al.* (1989) que a proteína BCL-2 possui um importante papel no controle da apoptose, protegendo vários tipos celulares contra diferentes compostos indutores de morte celular. Hockenbery *et al.* (1990) mostraram que a BCL-2 têm a capacidade de suprimir a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria, sugerindo que seu efeito anti-apoptótico seria mediado a nível mitocondrial. Somado a isso, Yang *et al.* (1997) demonstraram a supressão da liberação de citocromo c por essa proteína, com conseqüente prevenção da ativação das caspases 9 e 3, consideradas cruciais para a execução da apoptose.

Nos anos 90, novos membros da família BCL-2 foram descobertos e alocados em três diferentes subfamílias baseadas no número de domínios homólogos à BCL-2, chamados de domínios BH (“*BCL-2 homology*”) (Lomonosova e Chinnadurai, 2008). A primeira subfamília é composta pelas proteínas BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W e MCL-1, as quais possuem quatro domínios homólogos à BCL-2 e são reconhecidas por suas funções anti-apoptóticas, por meio da regulação de mediadores pró-apoptóticos conhecidos como DIABLO (Verhagen *et al.*, 2000). A segunda subfamília inclui membros que possuem três domínios BH, representadas

pelas proteínas BAX, BAK e BOK. Essas proteínas apresentam funções pró-apoptóticas, e atuam formando poros ou interagindo com proteínas formadoras de poros na membrana mitocondrial (Cotter, 2009). Entretanto, a ação destas proteínas é suprimida pela interação com a BCL-2. Por fim, a terceira subfamília, também conhecida por sua função pró-apoptótica, é composta por proteínas que possuem somente um pequeno domínio BH3, tais como BIM (BCL-2L11), BID (FP497), BAD (BCL-2L8), BIK, EGI-1, BMF, NOXA e BNIP3 (Chinnadurai *et al.*, 2008). Estas proteínas atuam principalmente antagonizando a interação reguladora da BCL-2 com a BAX, induzindo a apoptose nas células através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Yip e Reed, 2008).

### **1.2.3. Fisiologia da ligação de Anexina V com a molécula de fosfatidilserina e do Iodeto de Propídeo com DNA**

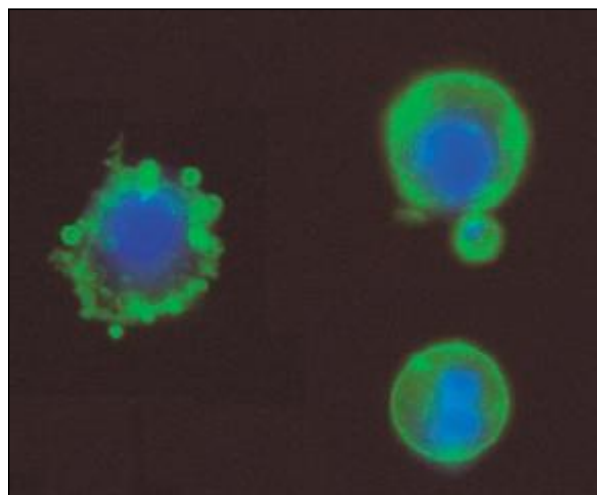
A anexina V é uma proteína endógena que está amplamente distribuída no meio intracelular, com elevadas concentrações na placenta, e baixas concentrações em células do endotélio, rins, miocárdio, músculo esquelético, epiderme, eritrócitos, plaquetas e monócitos (Boersma *et al.*, 2005). Embora a principal função fisiológica da anexina seja desconhecida, está claro na literatura que esta proteína desenvolve diversas funções importantes como inibição da coagulação através do seqüestro de cálcio, inibição de fosfolipase A2, enzima responsável pela liberação de ácido aracdônico pela membrana celular, e por fim, inibição da proteína kinase C, responsável pela sinalização intracelular (Blankenberg, 2008).

Além disso, Munoz *et al.* (2007) demonstraram a importante participação da anexina V no processo de imunomodulação por apoptose e necrose de células. As células apoptóticas expressam em sua superfície celular a molécula de fosfatidilserina que são reconhecidas por células fagocíticas profissionais que eliminam estas células sem induzir uma resposta inflamatória localizada e conseqüentemente sem causar nenhum tipo de dano no hospedeiro. Entretanto, a ligação da anexina V na superfície de células apoptóticas diminui a quantidade de fosfatidilserina disponível para o reconhecimento de células fagocíticas. Essa redução provoca um aumento do perfil de citocinas inflamatórias e promove a liberação de componentes intracelulares imunogênicos ou tóxicos, com conseqüente perda da integridade da membrana celular e indução de microambiente pró-inflamatório.

Essas novas evidências sugerem que a anexina V, se liga naturalmente e especificamente às moléculas de fosfatidilserina, interferindo no processo de

imunomodulação por apoptose (Blankenberg, 2008). Esta teoria somada a novos estudos envolvendo marcadores de diferentes estágios de apoptose possibilitou a conjugação da Anexina V com fluorocromos, como por exemplo, FITC (**Fig. 3**). A Anexina V conjugada ao FITC mantém a alta afinidade pela molécula de fosfatidilserina e se torna uma ferramenta fundamental para visualizações de células apoptóticas por citometria de fluxo. Uma vez que a exteriorização da molécula de fosfatidilserina é um dos primeiros eventos que ocorre durante o processo de apoptose, a marcação de células com Anexina V/FITC pode indicar apoptose em um estágio recente (Vermes, *et al.*, 1995).

Além disso, a Anexina V/FITC é usualmente utilizada com um marcador vital de células, como por exemplo, Iodeto de Propídeo (PI). Células viáveis apresentam a membrana plasmática íntegra, e dessa forma, conseguem excluir o corante vital PI, enquanto as membranas de células mortas são permeáveis ao corante, que se incorpora no DNA. Com isso, a partir destes marcadores é possível identificar células viáveis (Anexina V/FITC e PI negativas), células em um estágio recente de apoptose (Anexina V/FITC positivas e PI negativas) e células que estão em um estágio tardio de apoptose ou mesmo mortas (Anexina V/FITC e PI positivas) (Koopman *et al.*, 1994).



**Fig.3.** Células JURKATs apoptóticas marcadas com Anexina V-FITC, mostrando a exposição da molécula de fosfatidilserina (verde) na face externa da membrana plasmática. Fonte: Henson *et al.*, 2001.

#### 1.2.4. Apoptose em doenças parasitárias

A importância da apoptose na modulação da resposta imune em doenças parasitárias está extensivamente relatada na literatura, demonstrando que parasitos como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Entamoeba histolytica*, são capazes de induzir a apoptose em células do hospedeiro (Kemp *et al.*, 2001; Rodrigues-Jr *et al.*, 2007; Bannai *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2010). A indução de apoptose de células T, B e APCs por protozoários, tem sido demonstrada como um eficiente mecanismo pelos quais esses organismos evadem a resposta imune do hospedeiro (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2006).

Em infecções helmínticas, como a esquistossomose, foi demonstrado por Tristão *et al.* (2000) que a frequência da apoptose nos granulomas esquistossomóticos, aumenta significativamente com a evolução temporal da doença, indicando sua importante participação no processo de modulação da reação inflamatória que se forma devido à presença dos antígenos de *S. mansoni* nos tecidos. Estes dados corroboram com estudos realizados por Rutitzky *et al.* (2003) que demonstraram um aumento significativo de apoptose em células T CD4<sup>+</sup> tanto nos granulomas hepáticos quanto em células de linfonodos mesentéricos de camundongos C57BL/6 infectados (baixa patologia), quando comparados com camundongos CBA infectados (alta patologia). Esses achados indicam que a magnitude da imunopatologia mediada por células T CD4<sup>+</sup> correlaciona inversamente com a extensão de células T CD4<sup>+</sup> apoptóticas. Com relação aos filarídeos, foi demonstrado por Jenson *et al.*, (2002) e Semnani *et al.*, (2008) que os antígenos de microfilárias de *Brugia malayi*, induz a apoptose de células T CD4<sup>+</sup> de camundongos e de células dendríticas derivadas de monócitos de humanos, respectivamente, e que esses mecanismos estão associados diretamente com a regulação negativa da resposta imune durante a filariose.

Em relação à ancilostomíase, já foi demonstrado *in vitro* que produtos excretados-secretados de *N. americanus* induzem apoptose em células tumorais de origem linfóide (Chow *et al.*, 2000). No entanto, uma vez que esse estudo não foi conduzido com amostras de modelos experimentais, nem de pacientes infectados residentes em área endêmica para a infecção, a real contribuição desse mecanismo de modulação merece ainda ser elucidada.



## **2. JUSTIFICATIVA**

A ancilostomíase é uma das doenças parasitárias crônicas de maior prevalência no mundo, com uma estimativa entre 576 e 740 milhões de indivíduos infectados. É considerada um problema de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento situados em áreas tropicais e subtropicais como na África subsaariana, Ásia e América do Sul, sendo que o maior número de casos atinge a população rural e de baixa renda (Silva *et al.*, 2003).

A ocorrência da ancilostomíase em áreas de pobreza e de baixas condições sanitárias dificulta sua erradicação. Além disso, o controle da infecção preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), que é o tratamento em massa de populações afetadas, se mostrou limitante em função da baixa taxa de cura após tratamento com anti-helmíntico, além da elevada taxa de reinfecções em áreas de alta prevalência, levando a busca de novas alternativas para o controle da doença. Somado a estes fatores epidemiológicos, estudos da biologia do parasito demonstraram que os ancilostomídeos conseguem sobreviver em seus hospedeiros por vários anos (Loukas e Prociv, 2001), mesmo diante uma resposta imune robusta, o que representa um forte indicativo da evasão imunológica pelo parasito (Loukas *et al.*, 2005). Por outro lado, mesmo relatada extensivamente na literatura, os mecanismos pelo qual ocorre a evasão do sistema imunológico, ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que produtos excretados/secretados pelo parasito, apresentam um potencial efeito modulador da defesa do hospedeiro.

A modulação da resposta imune do hospedeiro por ancilostomídeos seria extremamente benéfica ao parasito, permitindo a continuidade de seu desenvolvimento, alimentação e reprodução (Maizels *et al.*, 2004). Além de garantir sua sobrevivência, a modulação da resposta imunológica poderia ter uma importante implicação em processos vacinais contra a ancilostomíase ou mesmo contra outras infecções. Devido à escassez de trabalhos voltados para o estudo da resposta celular na infecção por ancilostomídeos, os mecanismos de evasão desencadeados pelo parasito, dentre eles o processo de apoptose de células T, não foram ainda completamente elucidados. Dessa forma, este estudo poderia contribuir diretamente para o entendimento da biologia da infecção por ancilostomídeos determinando a real contribuição desse mecanismo na regulação negativa da resposta imune de indivíduos infectados por ancilostomídeos.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica e pró-apoptótica dos antígenos excretados- secretados (ES) e bruto (HEX) de vermes adultos de *A. ceylanicum* e correlacioná-las com o processo de modulação da resposta imunológica na ancilostomíase.

### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar a viabilidade de células JURKAT após estímulo com antígenos ES e HEX de vermes adultos de *A. ceylanicum*.

3.2.2. Avaliar a viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e hamsters controles, após estímulo com antígenos ES e HEX de vermes adultos *A. ceylanicum*.

3.2.3. Avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos circulantes de pacientes infectados por ancilostomídeos, após estímulo com antígenos ES e HEX de vermes adultos de *A. ceylanicum*.

3.2.4. Avaliar a atividade pró-apoptótica dos antígenos ES e HEX de vermes adultos de *A. ceylanicum* em células JURKAT e em linfócitos circulantes de pacientes e hamsters controles e infectados por ancilostomídeos.

3.2.5. Determinar as vias apoptóticas induzidas pelos antígenos ES e HEX de vermes adultos de *A. ceylanicum* em células JURKAT.

## **4. METODOLOGIA**

#### 4.1. Manutenção da cepa de *A. ceylanicum*

Para manutenção da cepa de *A. ceylanicum*, cedida gentilmente pelo Dr. Peter Hotez e Dr. John Hawdon (George Washington University), foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas ou machos, de 4 a 6 semanas de idade, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em gaiolas plásticas, em grupos de cinco animais. A limpeza das gaiolas foi feita duas vezes por semana, com água, detergente e hipoclorito de sódio 1%. Além disso, foram fornecidas ração granulada balanceada (Labina, Cargill Nutrição Animal, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os animais foram submetidos previamente ao tratamento oral com 4 mg/kg de Ivermectina (Chemitec Agro, Brasil) por 7 dias consecutivos (Klement *et al.*, 1996).

Larvas de terceiro estágio (L3) de *A. ceylanicum* foram isoladas 28 dias após inóculo por via oral de 100 larvas infectantes com o auxílio de uma agulha de gavagem. Resumidamente, após contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) pela técnica de McMaster, as fezes foram misturadas em vermiculita e levadas à coprocultura. Esta foi realizada sob incubação a 26°C durante sete dias, quando então, foi realizada a técnica de Baermann Moraes modificado (Barcante *et al.*, 2003), por 24 horas, para recuperação das larvas infectantes.

#### 4.2. Produção de antígenos: excretados/secretados de verme adulto (ES) e extrato bruto de verme adulto (HEX)

Para produção de antígenos ES e HEX, os vermes adultos de *A. ceylanicum* foram recuperados na mucosa intestinal de hamsters eutanasiados por dose letal de anestésico (Quetamina 150mg/Kg + Xilazina 10mg/kg) via intraperitoneal, após vinte dias de infecção. Inicialmente, para produção de antígenos ES, os vermes recuperados foram depositados em placa de Petri contendo solução tamponada de fosfato de sódio (PBS). Em seguida, os parasitos foram lavados por duas vezes com o próprio PBS e mais duas vezes com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), com finalidade de remover todas as partículas indesejadas e impurezas, que poderiam contaminar a cultura. Após o processo de lavagem, os vermes adultos foram transferidos para tubos FALCON 15 mL, aproximadamente 100 parasitos por

---

tubo, os quais foram completados com aproximadamente 4 mL de meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Estados Unidos). Em seguida, os tubos foram colocados em cultura por um tempo total de 96 horas em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que a cada 12 horas, o sobrenadante contendo o meio de cultura e os produtos excretados/secretados dos parasitos foram retirados e armazenados, completando o tubo novamente com 4 mL de meio suplementado. Após o período total de incubação, todos os sobrenadantes foram agrupados em tubos FALCON 50 mL, concentrados em alta centrifugação em tubos *Centricon 10kDa* (Millipore, EUA) e filtrados em filtros 0,22 µm para seringas. Uma vez estéreis, os produtos ES foram armazenados a -86°C até o seu uso.

Os vermes adultos remanescentes do cultivo de antígenos ES foram utilizados para obtenção de seus respectivos extratos brutos (HEX). A produção do antígeno bruto foi obtida inicialmente pela maceração mecânica do parasito em solução PBS por macerador de tecidos (Tissue Grinder, Fisher Scientific, EUA) e em seguida, intensificada pelo uso de um sonificador. O produto bruto mantido sob resfriamento em gelo foi sonicado a 40 Wats durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos para cada ciclo, totalizando três ciclos. Em seguida, o produto bruto solúvel foi obtido por centrifugação a 1400 rpm durante 3 minutos. O sedimento foi então descartado e os sobrenadantes armazenados a -86°C até o seu uso. A quantidade de proteínas em todas as duas preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

### 4.3. População de estudo

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes monoinfectados com ancilostomídeos residentes em área endêmica e de indivíduos não infectados, residentes em área não endêmica para *N. americanus* (**Tabela 1**).

Os pacientes portadores da ancilostomíase são residentes do distrito de Virgem das Graças, município pertencente a Ponto dos Volantes, área rural e endêmica para a doença, situada na região do Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. Esse grupo de pacientes foi composto por treze indivíduos. Os pacientes foram positivos para ovos de ancilostomídeos nas fezes, após exame desse material, empregando-se a metodologia de Katz *et al.*, (1972). É importante ressaltar que o exame parasitológico foi realizado anteriormente à coleta sanguínea e que esses pacientes não receberam qualquer medicação imunossupressora nesse período.

Após realização da coleta, todos pacientes, foram submetidos ao tratamento, independente da participação nesse estudo.

Outros quinze indivíduos sadios, residentes em Belo Horizonte, área não endêmica para a doença, foram selecionados para compor o grupo de indivíduos não infectados denominados de grupo controle (CT). Esses indivíduos não apresentaram relatos de infecção prévia para ancilostomídeos, sendo negativos para pesquisa de ovos de ancilostomídeos nas fezes, empregando-se o método descrito por Katz *et al.* (1972).

Além das amostras dos pacientes infectados residentes em área endêmica e indivíduos não infectados, foram utilizadas neste estudo, células de linfonodos mesentéricos de hamsters (*Mesocricetus auratus*) com vinte dias de infecção experimental por *A. ceylanicum* e de hamsters não infectados, machos, com um mês e meio de idade, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos conforme citado acima.

É importante ressaltar que todo o estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal - CETEA (066/2008) e de Ética em Pesquisa - COEP (ETIC-0449.0.203.000-09) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

**Tabela 1.** Caracterização da população de estudo

<b>Indivíduos</b>	<b>Total de indivíduos<sup>§</sup></b>	<b>Idade*</b>	<b>Carga Parasitária(opg)*</b>
Não infectados	15 (9M/6F)	38 (21-55)	-
Infectados	13 (9M/4F)	34 (07-58)	110 (4-648)

opg - ovos por grama de fezes

\* média (variação)

§ sexo

#### **4.4. Tipos celulares**

Neste estudo avaliamos o processo de apoptose induzido pelos antígenos do parasito em diferentes populações celulares; são elas: linhagem tumoral de célula humana de origem linfóide denominada Jurkat, que foi cedida em colaboração com a Dra. Elaine Souza-Fagundes do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Minas Gerais; células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos infectados por ancilostomídeos



de área endêmica e indivíduos saudáveis, e células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por *A. ceylanicum* e não infectados.

#### **4.5. Separação de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados por ancilostomídeos e negativos**

Para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), aproximadamente 35 mL de sangue periférico humano, coletados em tubos heparinizados, foram aplicados lentamente sobre 10 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e foram centrifugados a 400 g por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e eritrócitos, foi coletado e lavado por duas vezes a 400 g por 10 minutos com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA). Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL, com a contagem das mesmas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Turcs (Sigma, EUA).

#### **4.6. Obtenção de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e do grupo controle**

Os linfonodos mesentéricos foram removidos de hamsters infectados por ancilostomídeos com vinte e cinco dias de infecção e de hamsters não infectados, e colocados imediatamente em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico, 1,6% de L-Glutamina (Synth, BRASIL) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, BRASIL). Para obtenção das células, foi feita a maceração mecânica do órgão e em seguida o produto da maceração foi purificado com o auxílio de um filtro de nylon 70µm (BD Falcon, EUA), para a exclusão de tecidos conjuntivos, gorduras e etc. Durante o processo, as células foram lavadas constantemente com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), sendo centrifugadas a 1400 rpm durante 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL, para a contagem das mesmas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Trypan 0,4% (Sigma, EUA), para se avaliar o número de células viáveis.

#### 4.7. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Sigma, EUA) como previamente descrito (CHOW *et al.*, 1995), utilizando células Jurkat, e células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por *A. ceylanicum* e de hamsters não infectados.

Resumidamente, alíquotas de 180 µL da suspensão celular ( $2 \times 10^5$  Jurkat e  $1 \times 10^6$  células de linfonodos mesentéricos), em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico (Invitrogen, EUA), 1,6% de L-Glutamina (Synth, BRASIL) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, BRASIL) foram incubadas durante 48 horas com 20 µL dos antígenos ES e HEX, ambos em diferentes concentrações (3,125, 6,25, 12,5, 25,0, 50,0 e 100 µg/mL), em placas de cultura de fundo chato de 96 poços. Após a incubação, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada por mais 4 horas em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de reação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e substituído por 100 µL de DMSO 10% (Merk, ALEMANHA), seguida de agitação intensa com pipeta multicanal.

A densidade óptica para cada variável foi determinada a 570 nm no leitor de placas de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA), e a viabilidade celular foi expressa em relação à porcentagem da absorbância de culturas controles, obtida por células não tratadas, após subtração da absorbância dos poços utilizados como branco.

#### 4.8. Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo

A presença de apoptose celular induzida pelos antígenos de *A. ceylanicum* foi determinada por citometria de fluxo, onde se avaliou diferentes marcadores de apoptose; entre eles: a fragmentação do DNA por meio de uma solução hipotônica fluorocrômica (HFS) e a marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo, para caracterizar os diferentes estágios de apoptose em que as células se encontram.

##### 4.8.1. Determinação do conteúdo de DNA subdiplóide

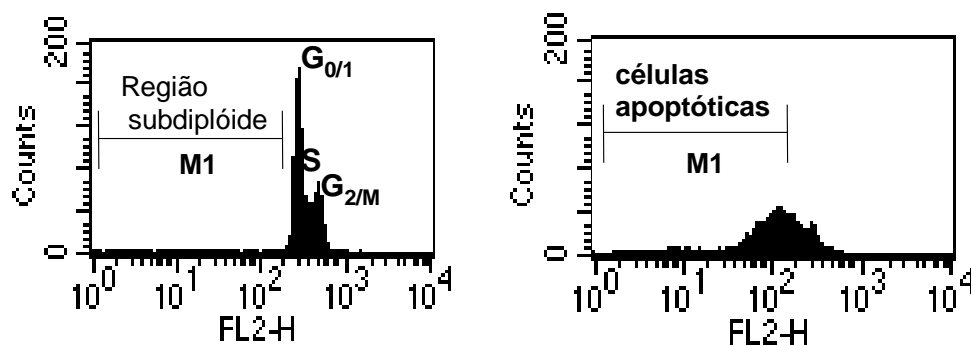
O conteúdo de DNA subdiplóide foi determinado para a quantificação da apoptose em células Jurkat e em linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters sadios e infectados por ancilostomídeos, após a estimulação com os antígenos ES e HEX de verme adulto.

Para este estudo, foi utilizado o método descrito por Nicoletti e colaboradores (1991) em que 100 µl da suspensão celular ( $1 \times 10^6$  células/mL) tratada ou não com os antígenos do parasito, foram transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 200 g por 5

minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o sedimento lisado com 250 µl de solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 µg/ml de Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma, Saint Louis, Missouri EUA) e 0,1% de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri EUA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri EUA). As amostras foram transferidas para um microtubo, homogeneizadas e incubadas por 4 horas na temperatura de 2 a 8° C. Após incubação as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

A incubação das células com a solução fluorocrômica hipotônica (HFS) leva à fragilização da membrana celular pela ação do Triton-X100 e o choque hipotônico provoca a lise da mesma. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no DNA nuclear. As células normais apresentam o conteúdo de DNA igual a 2n ou 4n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Já as células em apoptose apresentarão este conteúdo menor que 2n, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo, sendo esta a fase de subdiploidia (à esquerda da fase G<sub>0</sub>, representada no histograma).

Após delimitação da população celular de interesse em gráficos pontuais de tamanho versus granulosidade, a fragmentação do DNA foi analisada em histogramas, como representado na **Figura 4**. A análise do conteúdo de DNA subdiploide foi realizada utilizando o programa CellQuest Pro (Becton Dickinson, EUA).



**Figura 4:** Histograma representativo da análise do conteúdo de DNA subdiploide. À esquerda o histograma de uma célula normal e à direita o de uma célula em apoptose. O marcador **M1**, nos gráficos, representa a região de DNA fragmentado do histograma do ciclo celular.

#### 4.8.2. Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo

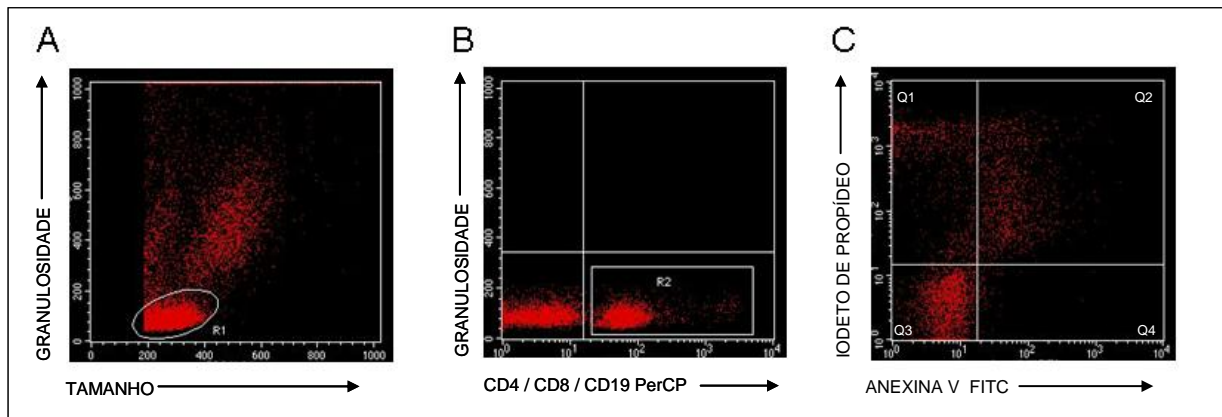
A detecção de apoptose em indivíduos infectados por ancilostomídeos e sadios foi realizada pela marcação celular, com uma combinação de Anexina V conjugada com FITC e Iodeto de Propídeo (PI) (**Fig. 5**).

O sangue periférico dos pacientes infectados e indivíduos negativos foi coletado em tubos de heparina e diluídos na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico (Gibco, Invitrogen, EUA), e 1% de L-Glutamina (Sigma, EUA).

Posteriormente, foi avaliado o perfil apoptótico da população de estudo, sem qualquer estímulo externo, sendo esta análise, *ex vivo*, considerada como perfil fenotípico dos pacientes infectados e sadios. Além disso, as amostras foram colocadas em cultura com diferentes estímulos externos, durante 48 horas. As culturas foram realizadas em placas de 24 poços, e os estímulos utilizados foram: Estaurosporina 1mM (Sigma, EUA) (controle positivo) e os antígenos ES e HEX, ambos em duas concentrações: 5ug/mL e 50ug/mL.

Para a marcação celular foi utilizado o kit contendo Annexin V/FITC e Iodeto de Propídeo (BD Biosciences, EUA). Em cada amostra, os eritrócitos foram previamente lisados com Cloreto de Amônio (150mM) e lavados com PBS. Após a lise dos eritrócitos, antes da marcação com Anexina V/FITC e Iodeto de Propídeo, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-receptores de superfície celular anti-CD4/PerCP, anti-CD8/PerCP e anti-CD19/PerCP (Becton Dickinson, EUA). Por meio desta marcação prévia com os anticorpos monoclonais, foi possível avaliar o perfil apoptótico em cada subpopulação de linfócitos T e dos linfócitos B e compará-los entre os grupos avaliados.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA), utilizando-se o software Cell Quest Pro<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, EUA).



**Figura 5:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos por citometria de fluxo. (A) perfil celular da população de linfócitos em gráfico de dispersão pontual relativo a tamanho (FSC) em função da granulidade (SSC), após cultivo celular. (B) perfil celular da população de linfócitos, selecionados no “gate” **R1**, positivos para moléculas CD4, CD8 e CD19 em gráfico de fluorescência tipo 3 (linfócitos CD4/CD8/CD19 PerCP) em função da granulidade. (C) perfil de análise da população de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, selecionados no gate **R2**, positivos para iodeto de propídeo (**Q1**), positivos para anexina V e iodeto de propídeo (**Q2**), negativos para anexina V e iodeto de propídeo (**Q3**) e positivos para anexina V (**Q4**) em gráfico de fluorescência 1 (Anexina V – FITC) em função de fluorescência 2 (Iodeto de propídeo).

#### 4.9. Determinação da via apoptótica induzida pelos antígenos do parasito

Para a determinação das vias apoptóticas induzidas pelos antígenos do parasito, foi realizada a reação de PCR quantitativa em tempo real, por meio do kit comercial *Human Apoptosis RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array* (SABiosciences, EUA), conforme instruções do fabricante. As prováveis vias de indução de apoptose foram determinadas avaliando-se a expressão do RNA mensageiro (RNAm) codificante para 84 proteínas relacionadas com a morte celular programada. Foram utilizadas células Jurkat na ausência de estímulo externo (controle – CT), e após estimulação *in vitro* com os antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum* (100 µg/mL).

#### 4.9.1. Extração do RNA e síntese do cDNA

Após 48 horas de incubação das células Jurkat na ausência de estímulo (CT) e na presença dos antígenos ES e HEX do parasito, foi extraído o RNA de cada grupo (CT, ES e HEX) por meio do kit de extração de RNA NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, ALEMANHA). Após a extração, o RNA foi eluído em 60 µL de Água RNase-free e quantificado em espectrofotômetro na absorvância 260 nm (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA), conforme Sambrook *et al.* (1989). Para verificar a integridade e qualidade do mesmo, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, onde se avaliou as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal.

Após a certificação da qualidade do RNA, 120 ng do mesmo foram utilizados para a síntese de cDNA utilizando 1 µL de iniciadores (0,5 µg/µL) e o sistema da transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, USA) em um volume final de 20 µL. A reação foi realizada conforme as instruções do fabricante.

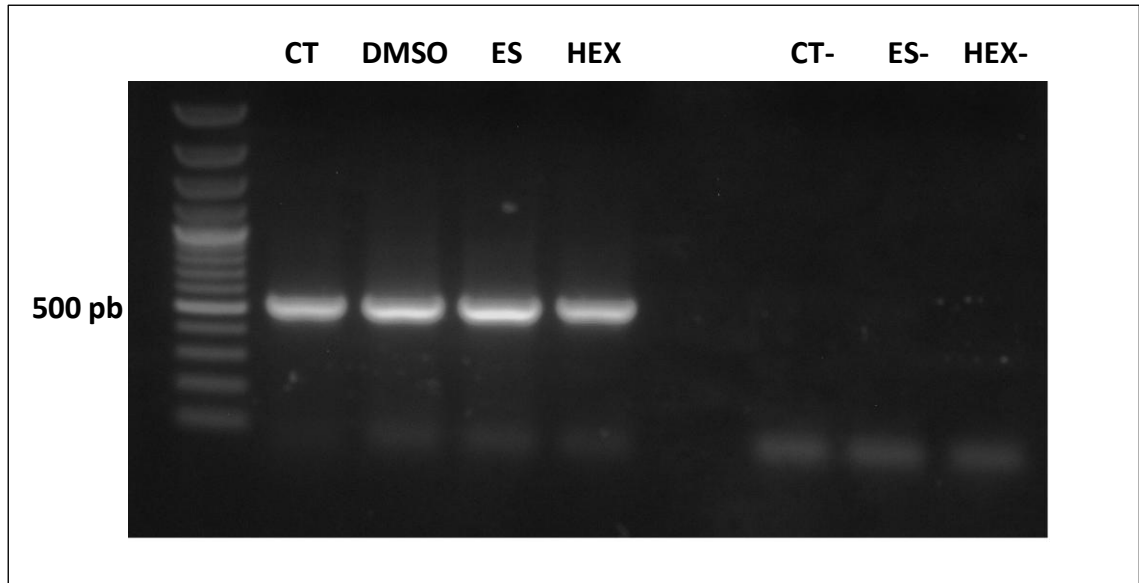
Após a reação, para comprovar a ação da transcriptase reversa foi realizada uma RT-PCR para o gene constitutivo humano Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), utilizando 1 µL de cDNA, 50mM dos iniciadores direto (5' CTTCGCTCTCTGCTCCTCCT 3') e reverso (3' GCTGATGATCTTGAGGCTGTTG 5'), 10mM DNTPs, Tampão GoTaq 5X (Promega) e 5 U/µL de Taq polimerase (Phoneutria), em um volume final de 30 µL. Os produtos da RT-PCR foram analisados em gel de agarose 1 %, corado em solução de brometo de etídeo a 0,25 µg/ml, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado (**Fig. 6**). No gel, foi aplicado, além dos 30 µL de produtos da PCR, 6 µL do padrão de peso molecular de 1 Kb. É importante ressaltar que durante a síntese de cDNA, para cada par de iniciadores utilizados, foi feito um controle negativo (branco), onde a transcriptase reversa foi substituída por água Milli-Q impossibilitando a síntese de cDNA. Essa estratégia teve como objetivo descartar a presença de contaminação por DNA genômico nos iniciadores ou em qualquer outro reagente da PCR.

#### 4.9.2. Reação de PCR em Tempo Real

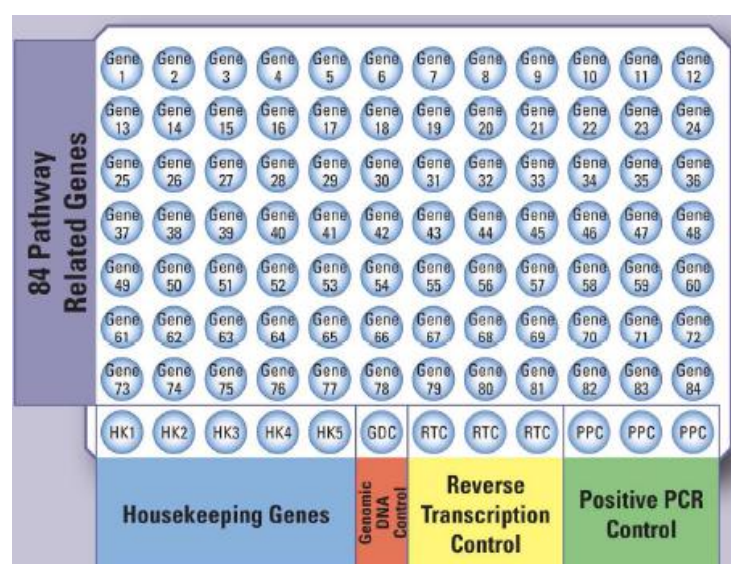
Depois de comprovada ausência de contaminação com DNA genômico e eficiente transformação do mRNA em cDNA, realizou-se então, a PCR quantitativa (qPCR) para determinação das vias apoptóticas nas células Jurkat não estimuladas – controle e estimuladas

com os antígenos ES e HEX do parasito, conforme as instruções do fabricante. A detecção dos resultados foi realizada pelo ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). As placas de 96 poços fornecidas pelo fabricante, já apresentavam em cada poço os iniciadores (direto e reverso) específicos para um gene associado a uma via apoptótica (**Fig. 7**). Dessa forma, foi feito um master mix para toda a placa, com volume final de 2700  $\mu\text{L}$ , sendo 102  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído e 1350  $\mu\text{L}$  de 2X Power Sybr®-Green ABI. Em seguida, foi adicionado em cada poço, 25 $\mu\text{L}$  do master mix da reação.

Por fim, a análise da qPCR foi realizada pelo software *PCR Array Data Analysis Web Portal* (SABiosciences, EUA), e os resultados foram determinados usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001), que representa o número de vezes que o gene de interesse está mais ou menos expresso nas células estimuladas com os antígenos do parasito quando comparado com as células não estimuladas. É importante ressaltar que o valor do  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{grupo}2) - \Delta\text{Ct} (\text{grupo} 1)$ , sendo o grupo 2, os grupos experimentais (ES e HEX), e o grupo 1, o grupo controle (CT). A lista com os nomes e descrição dos genes avaliados foi anexada ao final deste documento (**ANEXO 1**).



**Figura 6.** Análise da reação de PCR, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, para o gene GAPDH (500 pb) das células Jurkat estimuladas na ausência (CT) e na presença dos antígenos do parasito (ES) e (HEX). As colunas (CT-), (ES-), (HEX-) referem-se aos respectivos controles negativos da síntese de cDNA de cada grupo. A primeira coluna refere-se ao padrão de peso molecular 1 Kb.



**Figura 7.** Mapa da placa de 96 poços fornecido pelo fabricante, mostrando os 84 genes associados a diferentes vias apoptóticas, mais os genes constitutivos e controles da reação. Em cada poço da placa encontra-se iniciadores associados a um gene específico associado a apoptose. Fonte: SABiosciences, EUA.



#### 4.10. Análise dos Dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk.

Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Além disso, foram utilizados para determinar diferença significativa entre as médias de pelo menos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do de Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do de Dunns (dados não-paramétricos). Para a análise de correlação foram utilizados os testes de Pearson (dados paramétricos) e Spearman (dados não paramétricos).

Além destes, o teste de Grubb foi utilizado para detectar a presença de possíveis *outliers* nas amostras. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $P \leq 0,05$ .

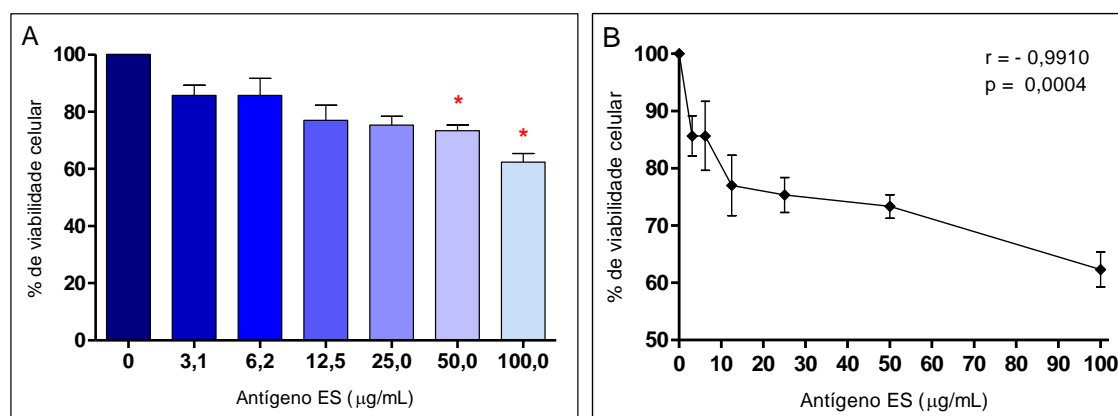
## **5. RESULTADOS**

### 5.1 - Análise da viabilidade de células Jurkat após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de A. ceylanicum

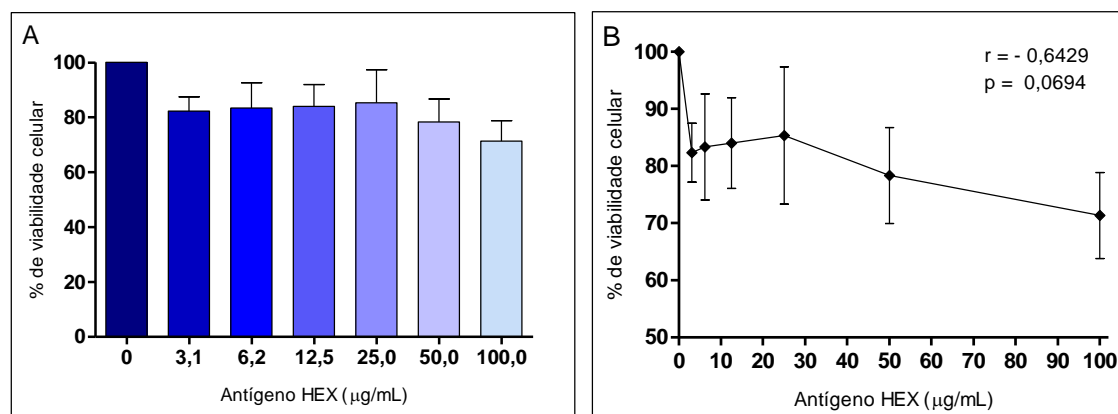
Diante da necessidade de se entender a contribuição do processo de apoptose na modulação da resposta imunológica causada pelos ancilostomídeos, neste estudo, avaliamos por meio do ensaio colorimétrico MTT, o efeito citotóxico de diferentes concentrações de antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum* em células Jurkat, após estimulação *in vitro*.

Com relação às análises dos dados referentes ao antígeno ES (**Fig 8.A**), observamos uma diminuição estatisticamente significativa ( $p=0,0074$ ) no percentual de viabilidade celular para 73,3% e 62,3% nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, quando comparadas com o grupo controle (0,0  $\mu\text{g/mL}=100\%$ ). Apesar da redução da viabilidade celular, as culturas contendo as concentrações 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  de antígeno ES não apresentaram diferenças significativas em relação a culturas controle. Entretanto, quando avaliado a correlação entre as concentrações do antígeno ES e o percentual de viabilidade celular, verificou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa ( $p= 0,0004$ ) ( $r= -0,9910$ ), indicando um perfil de dose-resposta em relação ao aumento da concentração do antígeno ES correlacionado à diminuição da viabilidade de células Jurkat (**Fig. 8.B**).

Por outro lado, as análises dos dados referentes às diferentes concentrações de antígeno HEX (**Fig. 9.A**), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p= 0,0903$ ) em relação ao percentual de viabilidade celular, (3,125  $\mu\text{g/mL}=82,3\%$ ; 6,25  $\mu\text{g/mL}=83,3\%$ ; 12,5  $\mu\text{g/mL}=84,0\%$ ; 25  $\mu\text{g/mL}=85,3\%$ ; 50  $\mu\text{g/mL}=78,3\%$ ; e 100  $\mu\text{g/mL}=71,3\%$ ) quando comparadas com o grupo controle (0,0  $\mu\text{g/mL}=100\%$ ). Além disso, não foi evidenciada uma correlação estatisticamente significativa ( $p= 0,0694$ ) ( $r= -0,6429$ ) entre as concentrações do antígeno HEX e o percentual de viabilidade de células Jurkat (**Fig. 9.B**). Neste ensaio utilizamos o fármaco etoposídeo (14,75  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo do teste, o que representou uma diminuição da viabilidade celular para 19%, quando comparado com o grupo controle (dados não mostrados).



**Figura 8:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células Jurkat ( $2 \times 10^5$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células Jurkat. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.

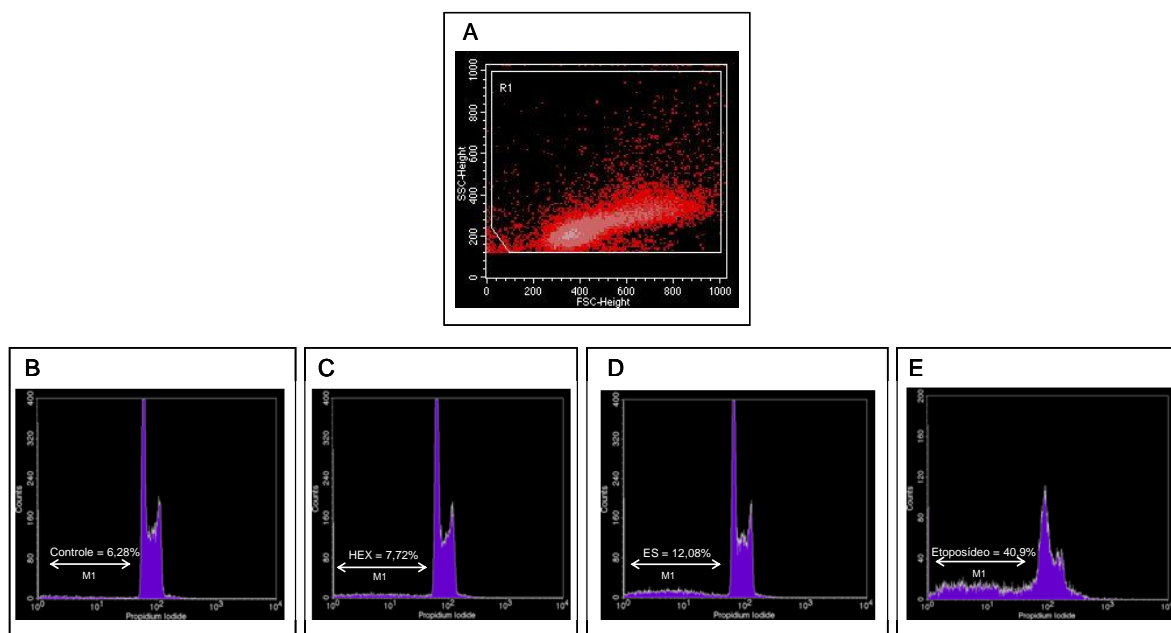


**Figura 9:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células Jurkat ( $2 \times 10^5$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células Jurkat. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.

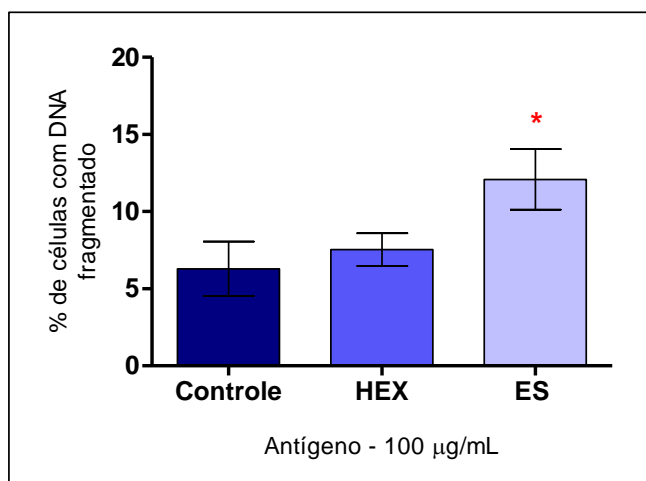
## 5.2 - Análise da fragmentação do DNA de células Jurkat após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de A. ceylanicum

Depois de observado uma diminuição significativa na viabilidade de células Jurkat frente aos antígenos de *A. ceylanicum*, o próximo passo foi avaliar, *in vitro*, o fenômeno de fragmentação do DNA (marcador de apoptose) nestas células, após estimulação com antígenos ES (100 µg/mL) e HEX (100 µg/mL), em cultura de 48 horas, por citometria de fluxo, utilizando uma solução hipotônica fluorocrômica (HFS). Como mencionado anteriormente, nesta metodologia o iodeto de propídeo se intercala com o DNA celular, permitindo a quantificação do conteúdo de DNA sub-diplóide (fragmentado) e de células em diferentes fases do ciclo celular. Para análise da fragmentação do DNA foram construídos histogramas no programa Cell Quest Pro (**Fig. 10**).

A análise dos dados referente ao perfil das células estimuladas com antígeno ES demonstrou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) do percentual de células com DNA fragmentado, quando comparado com as células controle (sem estímulo). Já a análise dos dados referente ao perfil de células estimuladas com antígeno HEX, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1679$ ) em relação ao percentual de células Jurkat com DNA fragmentado, quando comparado com o grupo controle (**Fig. 11**) (Controle = 6,28%; HEX = 7,53%; ES = 12,08%). Nesta análise utilizamos o fármaco etoposídeo (14,75 µM), como controle positivo do teste, que representou um percentual de 40,9% de células com DNA fragmentado.



**Figura 10:** Análise representativa de um de três experimentos independentes, mostrando a fragmentação do DNA de células Jurkat por citometria de fluxo utilizando uma solução hipotônica e fluorocrômica (HFS). Células Jurkat, selecionadas no gate **R1** (**A**), foram estimuladas na ausência (**B**) e na presença dos antígenos HEX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (**C**) e ES (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (**D**) do parasito, além do fármaco etoposídeo (14,75 $\mu\text{M}$ ) (**E**), durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual de células com DNA subdiploide, situadas na região **M1**.



**Figura 11:** Avaliação do percentual de células Jurkat com DNA fragmentado por meio da técnica HFS, após estímulo com antígeno ES (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e antígeno bruto HEX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em cultura de 48 horas. Os dados apresentados foram obtidos a partir da média e desvio-padrão de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle (sem estímulo).

### ***5.3- Análise da viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e não infectados, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de A. ceylanicum***

Uma vez demonstrado em células tumorais humanas de origem linfóide (Jurkat) uma diminuição significativa na viabilidade celular, e um aumento significativo de células com DNA fragmentado, após estimulação com os antígenos do parasito, o próximo passo foi avaliar o efeito dos antígenos ES e HEX nas células de modelos experimentais para a infecção do *A. ceylanicum*. Neste contexto, a análise do perfil apoptótico das células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados e não infectados, foi importante para que fosse avaliado o efeito imunomodulatório dos antígenos de *A. ceylanicum* no local da infecção, e conseqüentemente, compará-lo com seu efeito sistêmico.

A análise dos dados de hamsters infectados por ancilostomídeos referente ao antígeno ES (**Fig. 12.A**) demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ), no percentual de viabilidade das células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados, nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$  (80,01%) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (73,01%), quando comparadas com o grupo controle (0  $\mu\text{g/mL}$  = 100%). Como observado anteriormente, as concentrações 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, quando avaliado a correlação entre as concentrações do antígeno ES e o percentual de viabilidade celular, verificou-se novamente uma correlação negativa estatisticamente significativa ( $p = 0,0019$ ) ( $r = -0,9153$ ), indicando um elevado grau de relação entre o aumento da concentração do antígeno ES e a diminuição da viabilidade das células de linfonodos mesentéricos dos hamsters infectados (**Fig. 12.B**).

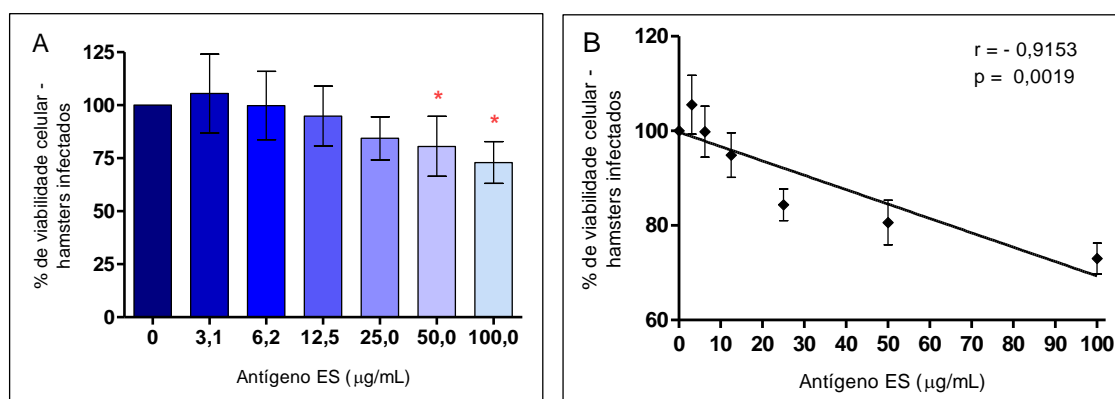
Por outro lado, as análises dos dados referentes às diferentes concentrações de antígeno HEX (**Fig. 13.A**), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,8872$ ) relativas ao percentual médio de viabilidade celular, (3.125  $\mu\text{g/mL}$ =109,8%; 6.25  $\mu\text{g/mL}$ =107,5%; 12.5  $\mu\text{g/mL}$ =109,8,0%; 25  $\mu\text{g/mL}$ =105,7%; 50  $\mu\text{g/mL}$ =102,0%; e 100  $\mu\text{g/mL}$ =103,4%) quando comparadas com o grupo controle (0  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, não foi evidenciada uma correlação estatisticamente significativa ( $p = 0,2192$ ) ( $r = -0,3522$ ) entre as concentrações do antígeno HEX e o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados (**Fig. 13.B**).

Quando avaliado a viabilidade das células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados, observamos de forma similar, uma evidente atividade citotóxica dos antígenos ES

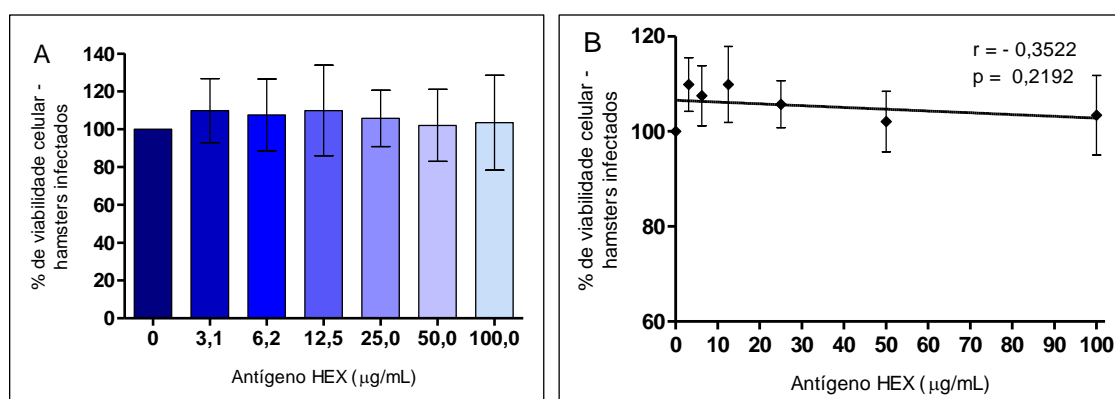
e HEX do parasito. A análise dos dados referente ao antígeno ES (**Fig. 14.A**), demonstrou uma diminuição significativa ( $p < 0.0001$ ), no percentual de viabilidade das células de linfonodos mesentéricos, nas concentrações de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (68,05%); 25  $\mu\text{g/mL}$  (60,29%); 50  $\mu\text{g/mL}$  (57,55%) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (44,40%), quando comparadas com o grupo controle (0  $\mu\text{g/mL}$  = 100%). As concentrações 3,125  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram diferença significativa. Quando avaliado a correlação entre as concentrações do antígeno ES e o percentual de viabilidade celular, verificou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa ( $p = 0,0109$ ) ( $r = - 0,8267$ ), indicando um elevado grau de relação entre o aumento da concentração do antígeno ES e a diminuição da viabilidade das células de linfonodos mesentéricos dos hamsters não infectados (**Fig. 14.B**).

Diferente do que observado até o momento, a análise dos dados referente ao antígeno HEX (**Fig. 15.A**), demonstrou uma diminuição significativa ( $p = 0,0127$ ) no percentual de viabilidade das células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados, nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$  (81,04%) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (75,25%), quando comparadas com o grupo controle (0  $\mu\text{g/mL}$  = 100%). As concentrações 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram diferenças significativas. Assim como para o antígeno ES, foi evidenciado para o antígeno HEX, uma correlação negativa estatisticamente significativa ( $p = 0,0119$ ) ( $r = - 0,8571$ ), indicando um elevado grau de relação entre o aumento da concentração do antígeno HEX e a diminuição da viabilidade das células de linfonodos mesentéricos dos hamsters não infectados (**Fig. 15.B**).

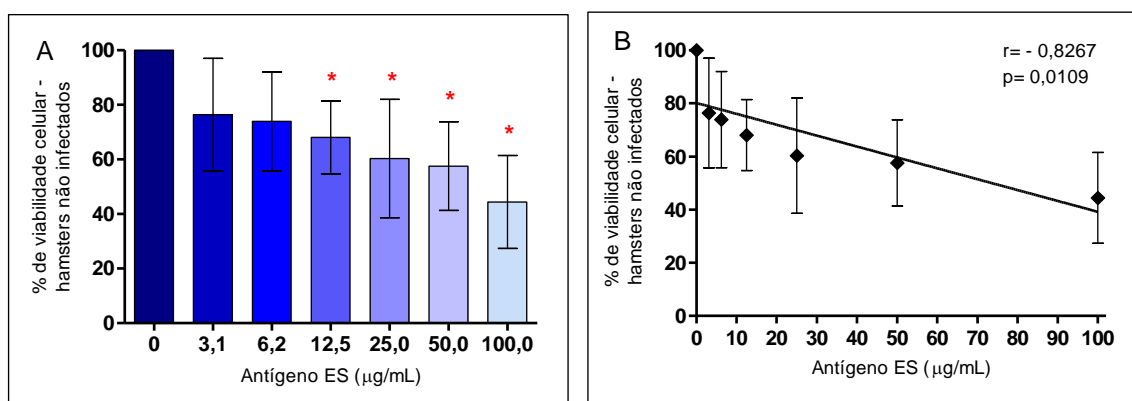




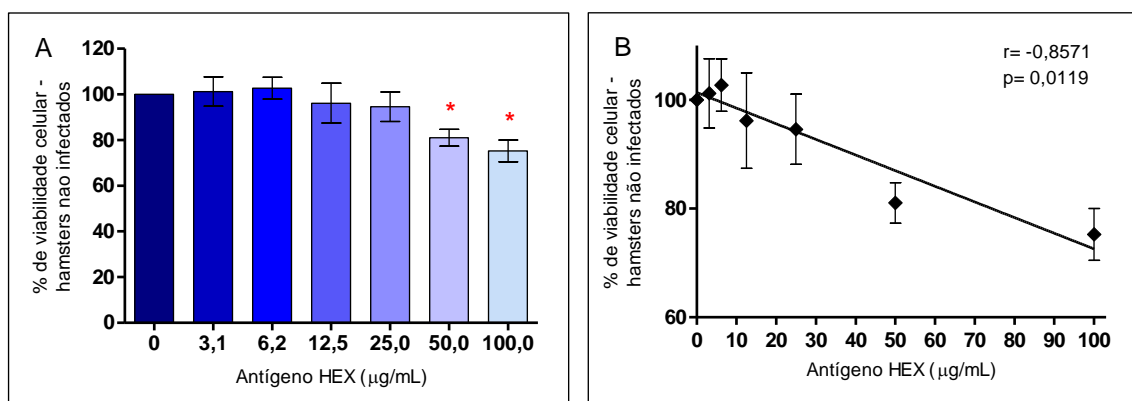
**Figura 12:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters infectados por ancilostomídeos ( $n=9$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de  $p$  no gráfico.



**Figura 13:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters infectados por ancilostomídeos ( $n=9$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de  $p$  no gráfico.



**Figura 14:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters não infectados ( $n=7$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno ES com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.



**Figura 15:** (A) Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT. Células de linfonodos mesentéricos ( $1 \times 10^6$ ) de hamsters não infectados ( $n=7$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno HEX em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as células não estimuladas ( $0 \mu\text{g/mL} = 100\%$ ). (B) Correlação entre as diferentes concentrações de antígeno HEX com o percentual de viabilidade de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo valor de p no gráfico.

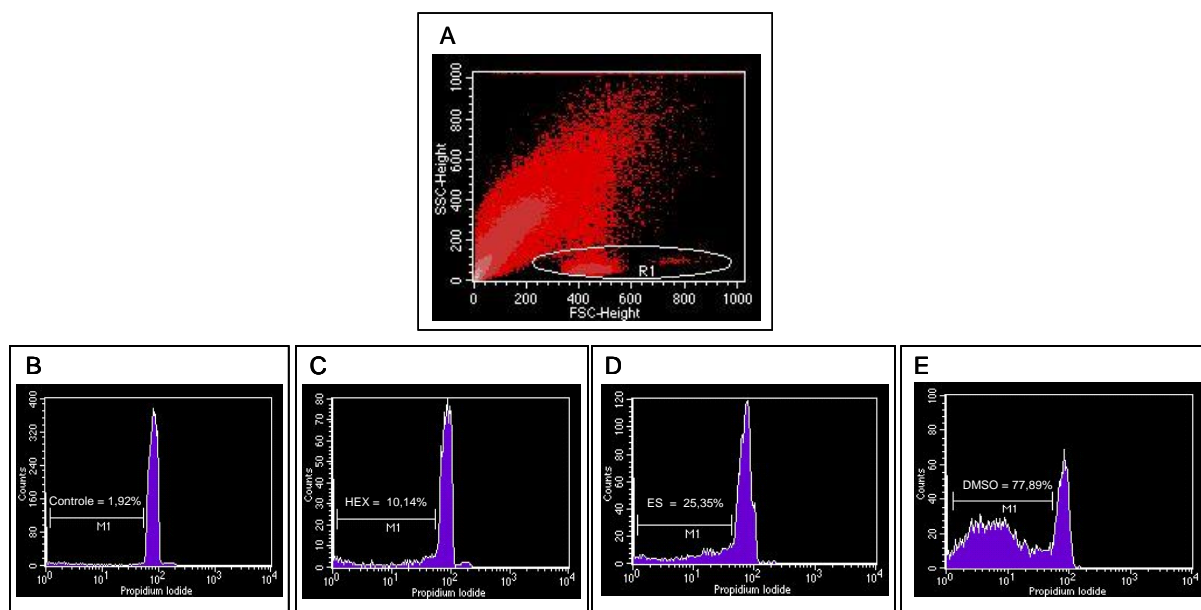
---

#### ***5.4 - Análise da fragmentação do DNA de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos e não infectados, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de A. ceylanicum***

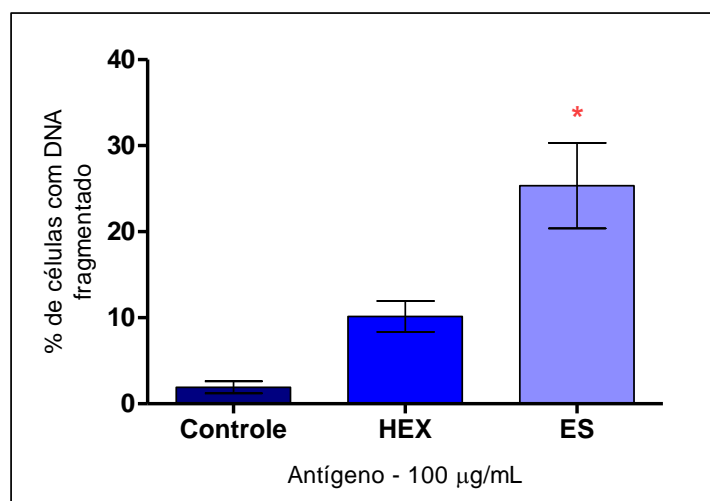
A análise dos dados referente ao perfil de células de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos, estimuladas com antígeno ES demonstrou um aumento estatisticamente significativo ( $p=0,0073$ ) do percentual de células com DNA fragmentado, quando comparado com as células controle (sem estímulo). Já a análise dos dados referente ao perfil de células estimuladas com antígeno HEX, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo controle (**Fig. 16 e Fig.17**) (Controle = 1,93%; HEX = 10,1%; ES = 25,35%).

Similarmente, a análise dos dados referente ao perfil de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados, estimuladas com antígeno ES demonstrou novamente um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) no percentual médio das células com DNA fragmentado, quando comparado com as células não estimuladas. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para o antígeno HEX quando comparado com o grupo controle (**Fig. 18 e Fig. 19**) (Controle = 2,67%; HEX = 2,71%; ES = 9,60%). Nestas análises utilizamos o reagente DMSO 10%, como controle positivo do teste, que representou um percentual de 77,89% e 60,89% de células com DNA fragmentado nos hamsters infectados e controles respectivamente.

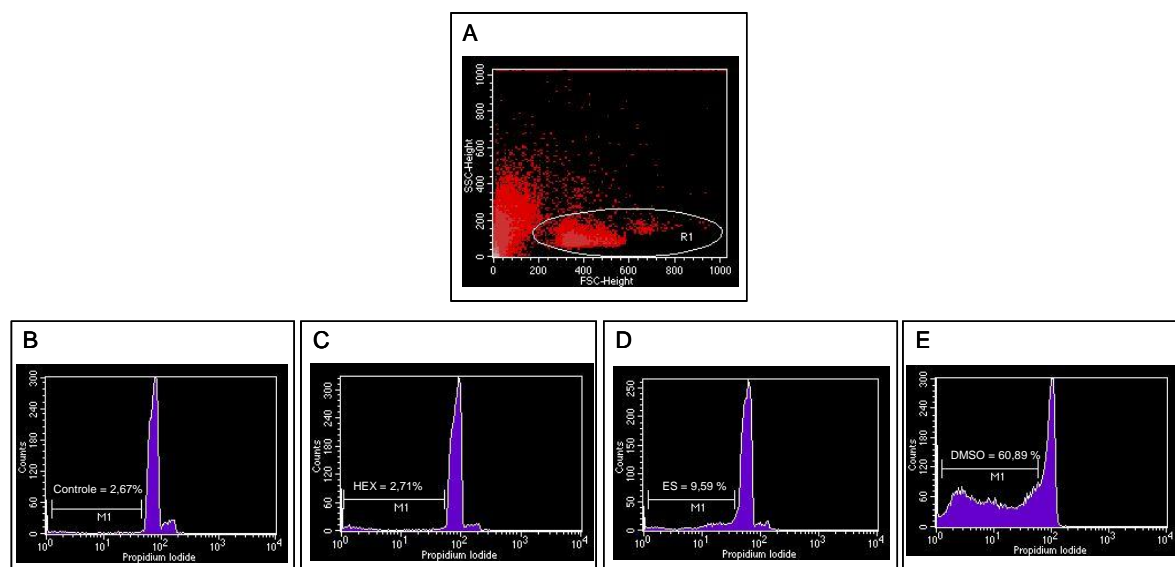
Entretanto, quando comparado o percentual de linfócitos com DNA fragmentado entre os hamsters não infectados (HNI) e os infectados por ancilostomídeos (HI), observou-se um aumento estatisticamente significativo no percentual de células apoptóticas dos hamsters infectados, após estimulação, *in vitro*, com os antígenos HEX ( $p=0,0139$ ) e ES ( $p=0,0061$ ), quando comparado com hamsters não infectados. Não foram observadas diferenças quando comparados os controles de cada grupo (**Fig. 20**).



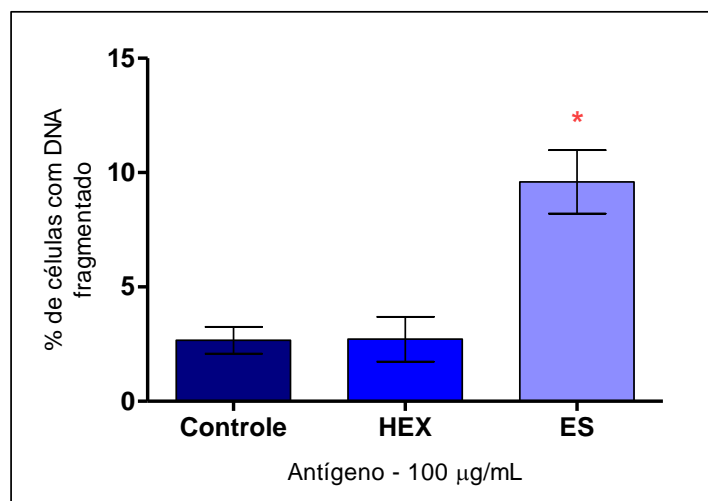
**Figura 16:** Análise representativa de um dos experimentos, mostrando a fragmentação do DNA de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos por citometria de fluxo, utilizando uma solução fluorocrômica e hipotônica (HFS). Os linfócitos totais, selecionadas no gate R1 (A) foram estimulados na ausência (B) e na presença dos antígenos HEX (100 µg/mL) (C) e ES (100 µg/mL) (D) além do reagente DMSO 10% (E) durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual médio de células com DNA subdiploide, situadas na região M1.



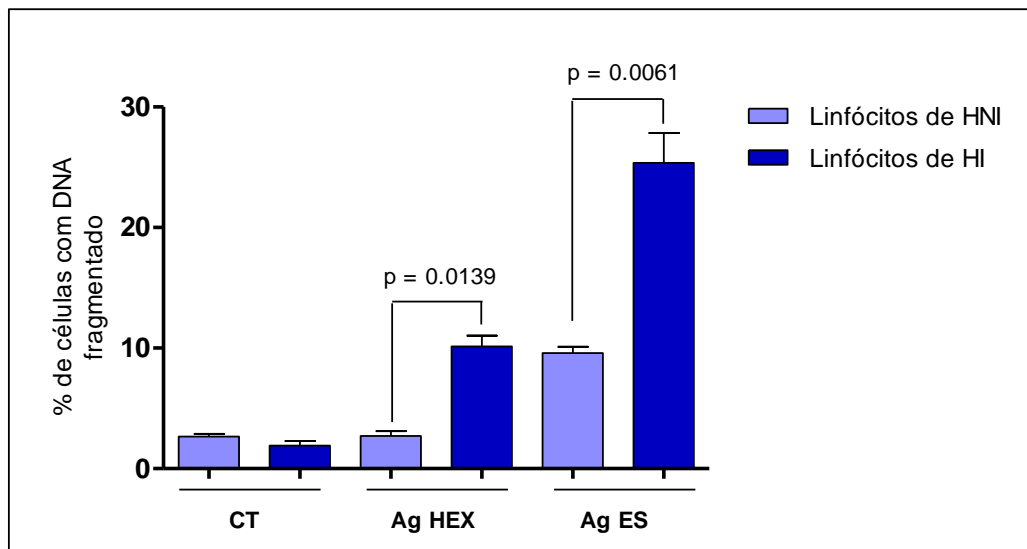
**Figura 17:** Avaliação do percentual de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados (n=9) com DNA fragmentado por meio da técnica de HFS, após estímulo com antígeno ES (100 µg/mL) e antígeno bruto HEX (100 µg/mL) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.



**Figura 18:** Análise representativa de um dos experimentos, mostrando a fragmentação do DNA de células de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados por citometria de fluxo, utilizando uma solução fluorocrômica e hipotônica (HFS). Os linfócitos, selecionados no gate R1 (A), foram estimulados na ausência (B) e na presença dos antígenos HEX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C) e ES (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (D), além do reagente DMSO 10% (controle positivo) (E) durante 48 horas. Os resultados estão expressos sob o percentual médio de células com DNA subdiploide, situadas na região M1.



**Figura 19:** Avaliação do percentual de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados ( $n=7$ ) com DNA fragmentado, por meio da técnica de HFS, após estímulo com antígeno bruto HEX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e antígeno ES (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.



**Figura 20:** Análise comparativa entre a fragmentação do DNA de linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters não infectados (HNI) com os linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos (HI). Os resultados estão expressos como percentual médio de células com DNA fragmentado. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo valor de p referente à análise de cada grupo.

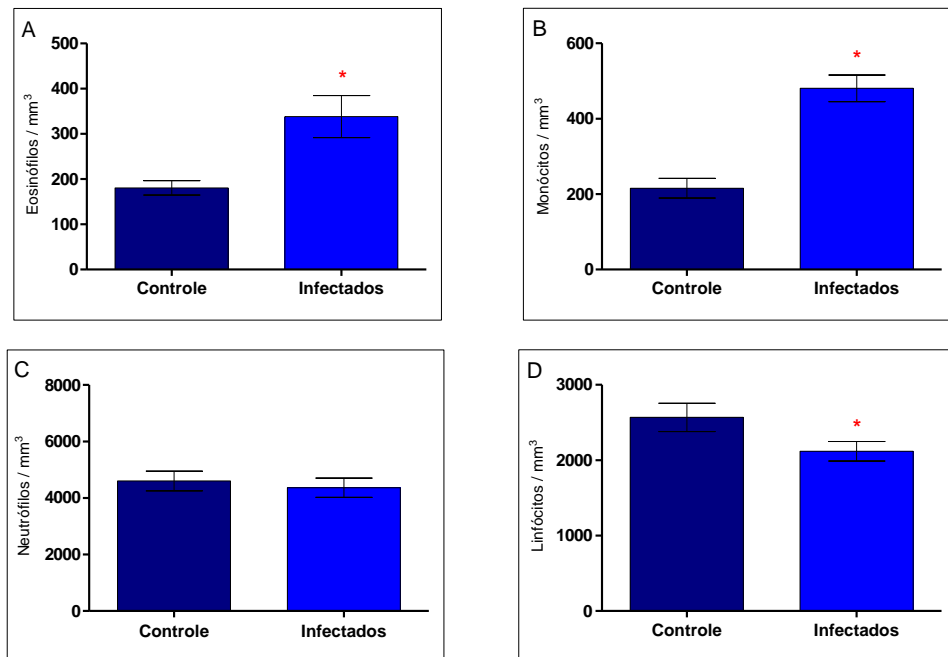
### ***5.5 - Análise do perfil apoptótico de células de pacientes portadores da fase crônica da ancilostomíase***

Após ter demonstrado a indução do processo de apoptose pelos antígenos do verme adulto de *A. ceylanicum* em células Jurkat, e em linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters sadios e infectados por ancilostomídeos, avaliamos o perfil das células de pacientes infectados por ancilostomídeos, levando em consideração a cronicidade da infecção e conseqüentemente outros mecanismos imunomodulatórios presentes.

Para isso, inicialmente caracterizamos o perfil de leucócitos do sangue periférico de pacientes na fase crônica da infecção e avaliamos a capacidade proliferativa das células mononucleares destes indivíduos após estimulação com os antígenos ES e HEX do parasito. Em seguida, através de marcadores de apoptose, caracterizamos o perfil apoptótico, no contexto *ex vivo* e *in vivo*, da população de linfócitos totais e suas subpopulações CD4, CD8 e CD19<sup>+</sup> destes mesmos indivíduos e comparamos com indivíduos do grupo controle.

#### ***5.5.1 - Caracterização do perfil de leucócitos do sangue periférico de pacientes na fase crônica da ancilostomíase e indivíduos não infectados***

A análise referente à contagem do número absoluto/mm<sup>3</sup> das populações de leucócitos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes infectados por ancilostomídeos (**Fig. 21**), demonstrou que os pacientes infectados apresentaram um aumento significativo do número absoluto de eosinófilos (Controle = 180,7/mm<sup>3</sup>; Infectados = 338,4/mm<sup>3</sup>) ( $p = 0,0292$ ) (**Fig. 21.A**) e monócitos (Controle = 215,8/mm<sup>3</sup>; Infectados = 480,7/mm<sup>3</sup>) ( $p < 0,0001$ ) (**Fig. 21.B**), quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença entre os grupos para a população de neutrófilos (Controle = 4605,8/mm<sup>3</sup>; Infectados = 4362,1/mm<sup>3</sup>) (**Fig. 21.C**), entretanto quando avaliado a população de linfócitos, observou-se de forma interessante, uma diminuição significativa no número absoluto/mm<sup>3</sup> nos pacientes infectados ( $p=0,0499$ ) (**Fig. 21.D**), quando comparados com o grupo controle (Controle = 2568,2/mm<sup>3</sup>; Infectados = 2119,8/mm<sup>3</sup>).



**Figura 21:** Análise das populações de leucócitos (**A: eosinófilos; B: monócitos; C: neutrófilos; D: linfócitos**) no sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos (n=24), e do grupo controle (n=15). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.

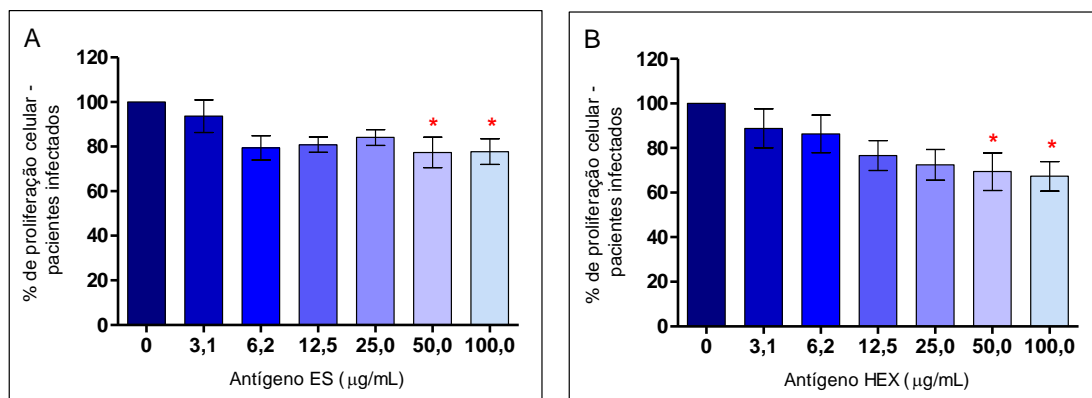


### 5.5.2 – Análise da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados por ancilostomídeos, após estímulo com antígenos excretados-secretados (ES) e bruto (HEX) de A. ceylanicum

Ainda com o objetivo de caracterizar o perfil das células de pacientes infectados por ancilostomídeos, avaliamos neste estudo a capacidade proliferativa das PBMCs destes indivíduos, após estimulação, *in vitro*, com diferentes concentrações dos antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum*, por 48 horas (**Fig. 22**).

Com relação às análises dos dados referente às diferentes concentrações de antígeno ES (**Fig. 22.A**), observou-se uma redução estatisticamente significativa na capacidade proliferativa das PBMCs de pacientes infectados, 77,39% e 77,78%, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL respectivamente, quando comparadas com o grupo controle (sem estímulo). Esse mesmo perfil, também foi observado para as células estimuladas com antígeno HEX, onde apresentaram uma diminuição significativa para 69,43% e 67,30% nas concentrações de 50 e 100 µg/mL respectivamente, quando novamente comparadas com o grupo controle (**Fig. 22.B**). Para ambos os antígenos, as concentrações de 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL não apresentaram diferenças significativas.

Estes dados sugerem que a diminuição do número absoluto de linfócitos totais (**Fig. 21**), assim como a redução da capacidade proliferativa dos mesmos, observada nos pacientes infectados por ancilostomídeos (**Fig. 22**), poderiam estar relacionados com a indução de apoptose nestas células pelos antígenos do parasito durante a infecção. Dessa forma o próximo passo foi avaliar, no contexto *ex vivo*, o perfil apoptótico, através da marcação com Anexina V e PI, dos linfócitos totais e suas subpopulações CD4, CD8 e CD19+ de pacientes infectados por ancilostomídeos e compará-lo com os indivíduos não infectados.



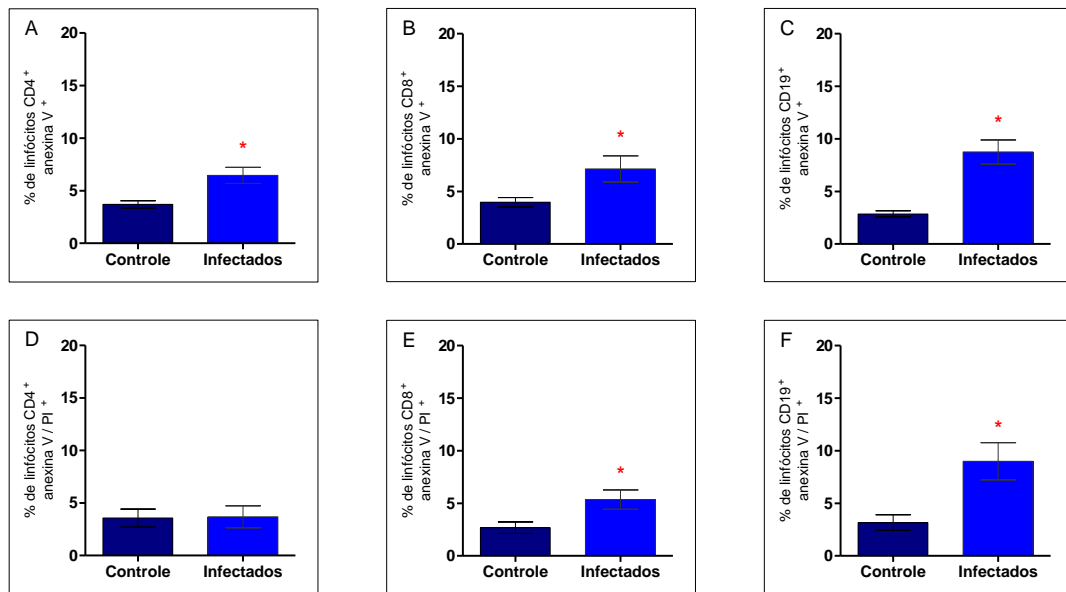
**Figura 22:** Ensaio de proliferação celular por meio da técnica de MTT. As PBMCs ( $2 \times 10^5$ ) de pacientes infectados por ancilostomídeos ( $n=5$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de antígeno ES (A) e antígeno bruto HEX (B) em cultura de 48 horas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.

---

**5.5.3 - Análise das subpopulações de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, marcados com Anexina V e Iodeto de propídeo (PI), em pacientes infectados por ancilostomídeos e indivíduos do grupo controle**

Os biomarcadores Anexina V e Iodeto de propídeo (PI) são ferramentas fundamentais para se avaliar o perfil e estágio apoptótico das células. Dessa forma, avaliamos por citometria de fluxo, o percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, positivos apenas para Anexina V (estágio recente do processo de apoptose) e positivos para Anexina V e PI (estágio tardio de apoptose), em pacientes infectados por ancilostomídeos e indivíduos do grupo controle (**Fig. 23**).

A análise dos dados revelou que os pacientes infectados por ancilostomídeos apresentam um aumento significativo no percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>, marcados com Anexina V, quando comparados com o grupo controle (**Fig. 23.A**). [CT=3,71% e LTCD4<sup>+</sup>=6,45% (p=0,0052)]. Além disso, foi observado um aumento significativo no percentual médio de linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> marcados com Anexina V [CT=3,97 e LTCD8<sup>+</sup>=7,14% (p=0,0269)]; [CT=2,86% e LCD19<sup>+</sup>=8,75% (p<0,0001)] (**Fig. 23.B e C**), e também marcados com Anexina V e PI [CT=2,68 e LTCD8<sup>+</sup>=5,35% (p=0,0248)] ; [CT=3,16% e LCD19<sup>+</sup>=8,99% (p=0,0065) (**Fig. 23.E e F**), quando comparados com o grupo controle.



**Figura 23:** Marcação de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos e de indivíduos do grupo controle com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. As subpopulações de linfócitos, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, foram marcadas com anexina V para caracterização do estágio recente de apoptose (**A**, **B**, **C**) e também com anexina V associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (**D**, **E**, **F**). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.

#### ***5.5.4 - Análise das subpopulações de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, marcados com Anexina V e Iodeto de propídeo (PI), em pacientes infectados por ancilostomídeos, após estímulo com os antígenos ES e HEX de A. ceylanicum***

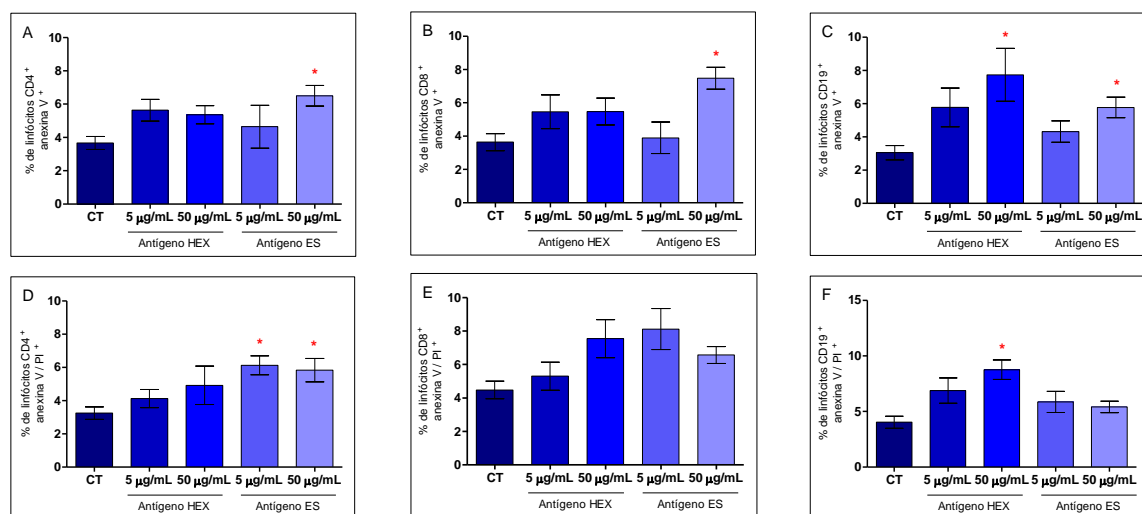
Depois de demonstrado, no contexto *ex vivo*, o aumento de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> de pacientes infectados por ancilostomídeos, marcados com Anexina V e PI (marcadores de apoptose), quando comparados com o grupo controle, o próximo passo foi avaliar o perfil destas células, *in vitro*, quando estimuladas com diferentes concentrações dos antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum*, caracterizando a existência de um perfil de dose-resposta em relação a concentração do antígeno e células apoptóticas.

A análise dos dados referente à subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup>, demonstrou um aumento significativo no percentual de células positivas para Anexina V, após estimulação com antígeno ES (50 µg/mL), quando comparado com células não estimuladas. [CT=3,66% e ES=6,50% (p=0.0366)] (**Fig. 24.A**). Além disso, foi observado um aumento significativo no percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup> marcados com Anexina V e PI, após estimulação com ambas as concentrações de antígeno ES (5 µg/mL e 50 µg/mL) (6,12% e 5.9% respectivamente) quando comparados com o grupo controle (3,25%) (p=0.0274) (**Fig. 24.D**). Não foi evidenciada diferença para a estimulação com antígeno bruto.

Com relação à subpopulação de linfócitos CD8<sup>+</sup>, foi observado somente um aumento estatisticamente significativo de células marcadas com Anexina V, após estimulação com antígeno ES (50 µg/mL), quando comparadas com células não estimuladas. [CT=3,64 % e ES=7,48% (p= 0.0104)] (**Fig. 24.B**).

Por fim, a análise dos dados referentes à subpopulação de linfócitos CD19<sup>+</sup>, demonstrou um aumento significativo, assim como nos linfócitos totais, no percentual de células positivas para Anexina V, nas maiores concentrações de antígeno ES e HEX (50 µg/mL), quando comparado com as células não estimuladas. [CT=3,05%, HEX=7,73% e ES=5,77% (p= 0.0343)] (**Fig. 24.C**). Além disso, observou-se um aumento significativo para células marcadas com Anexina V e PI, após estimulação com antígeno HEX (50 µg/mL). [CT =4,02% e HEX = 8,75% (p=0.0004)] (**Fig. 24.F**).

Esses dados demonstram um perfil de dose-resposta bem característico entre o aumento da concentração dos antígenos HEX e ES de *A. ceylanicum*, com o aumento do número de linfócitos circulantes de pacientes infectados em apoptose, seja em estágio recente ou avançado.



**Figura 24:** Marcação de linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por ancilostomídeos com anexina V e iodeto de propídeo após cultura de 48 horas na ausência (CT) ou presença de antígenos do parasito (ES e HEX) em duas diferentes concentrações (5µg/mL e 50 µg/m). As subpopulações dos linfócitos, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, foram marcados com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose (A, B, C) e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (D, E, F). As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.

### ***5.6 – Análise da expressão de genes relacionados a diferentes vias apoptóticas em células Jurkat, após estimulação com os antígenos ES e HEX de A. ceylanicum***

Uma vez demonstrada a indução do processo de apoptose em diferentes populações celulares após estímulo com os antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum*, o próximo passo foi identificar quais as prováveis vias apoptóticas que estariam sendo ativadas ou moduladas nestas células pelos antígenos. Para isso, escolhemos as células Jurkat para avaliar a expressão dos genes pró- e anti-apoptóticos, após estímulo, *in vitro*, com os antígenos do parasito, por meio da reação de PCR em tempo real, utilizando o kit *Human Apoptosis RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array* (SABiosciences, EUA).

Dos 84 genes avaliados, 32 genes apresentaram maior ou menor expressão em relação ao grupo controle (células não estimuladas). Para a análise dos resultados estes genes foram agrupados de acordo com suas respectivas famílias e funções (**Fig. 25**). Inicialmente quando avaliado os genes associados à família BCL-2, observamos que a estimulação com os antígenos do parasito, principalmente com o antígeno bruto (HEX), induziu um aumento da expressão de genes inibidores do processo de apoptose (BAG-3/BIS, BCL-2L10). Por outro lado, também foi evidenciado um aumento da expressão dos genes BIK (BIP1/BP4) e BAD (BCL-2L8), quando comparado com o grupo controle (**Fig. 25.A**). Esses genes interagem e antagonizam o efeito regulador da BCL-2. Com relação ao gene BNIP3, conhecido por sua função pró-apoptótica, em resposta ao stress celular a nível mitocondrial, observou-se de forma interessante, que ambos os antígenos HEX e ES induzem um aumento de sua expressão quando comparado com as células não estimuladas.

Quando avaliado a expressão da família das caspases e seus receptores, nas células estimuladas pelos antígenos do parasito, observamos de forma interessante, que principalmente o antígeno ES induz uma diminuição (regulação negativa) da expressão dos genes (CASP1, CASP14, CASP5 e CARD8) comparada com o grupo controle. Por outro lado, a estimulação com antígeno HEX induz um aumento da expressão dos genes CASP1 e CASP5, e uma diminuição da expressão do gene CASP2 quando comparados com o grupo controle (**Fig. 25.B**).

A análise dos genes pertencentes à superfamília dos ligantes e receptores de TNF demonstrou, que os antígenos do parasito induzem de um modo geral um aumento da expressão dos genes CD40LG (CD154), FASLG (CD178), LTA (LT/TNFB) e TNF- $\alpha$ , mas em contra partida, de forma surpreendente, também induz uma supressão de seus receptores,

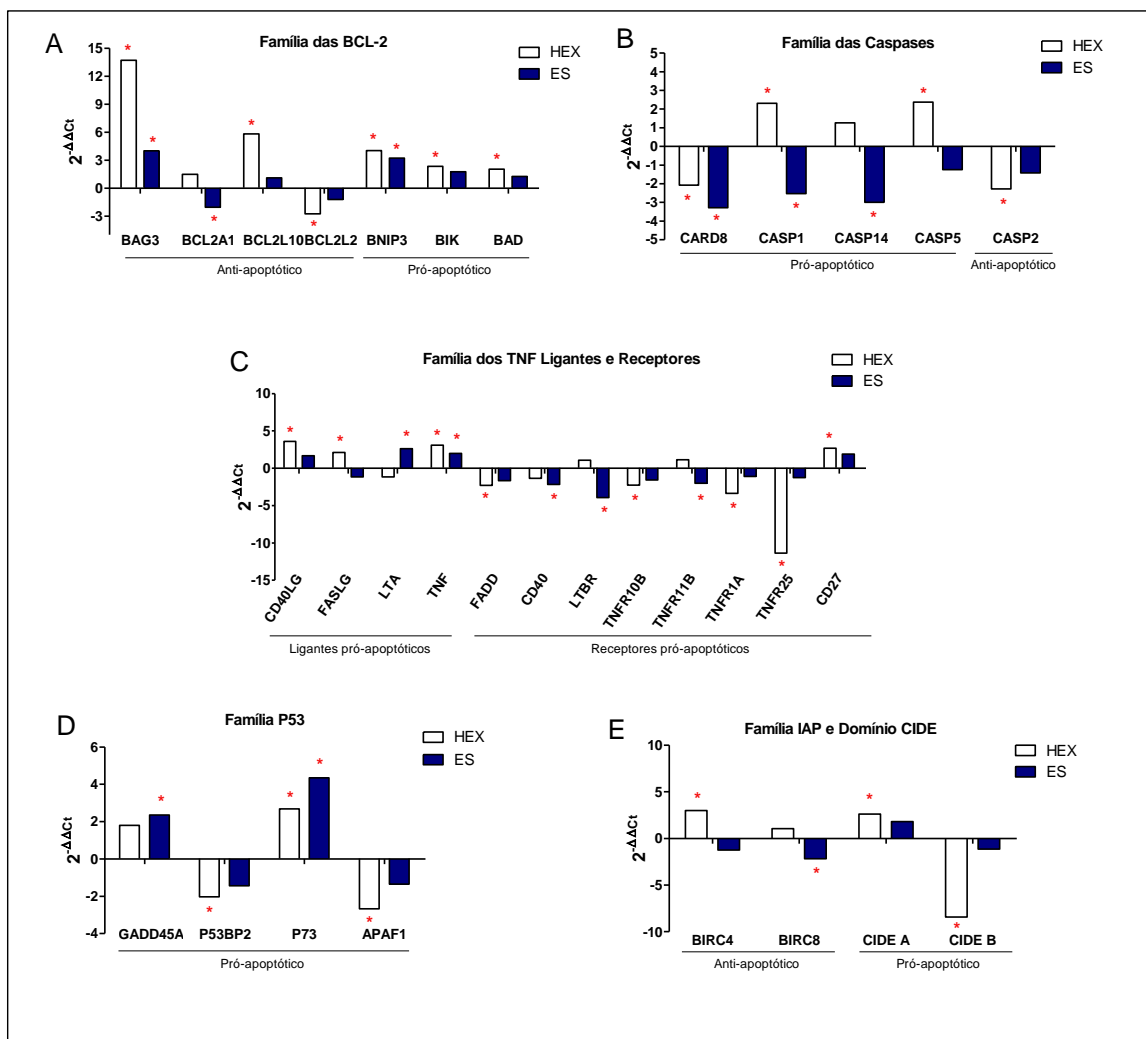
---

chamados de receptores de morte celular, CD40, FADD (GIG3/MORT1), TNFR10B (CD262/DR5), TNFR11B (OCIF/OPG), TNFR1A (CD120a/FPF), TNFR25 (APO-3/DDR3) (**Fig. 25.C**).

Com relação à análise dos genes da família P53, caracterizados por suas atividades pró-apoptóticas, destaca-se o aumento da expressão dos genes P73 e GADD45A nas células estimuladas pelo antígeno ES do parasito, quando comparados com células não estimuladas, e a diminuição da expressão dos genes P53BP2 e APAF-1/CED4 nas células estimuladas com antígeno HEX, novamente quando comparados com células não estimuladas (**Fig. 25.D**).

Por fim, a análise dos resultados demonstrou diferenças significativas para outros genes associados a diferentes vias apoptóticas; são eles: família IAP (inibidores de apoptose) e CIDE (indutores de apoptose) (**Fig. 24.E**). Com relação aos genes da família IAP, o antígeno HEX induziu um aumento da expressão do gene BIRC4 (XIAP), por outro lado, o antígeno ES induziu uma diminuição da expressão do gene BIRC8 (ILP-2), quando comparados com o grupo controle. A análise dos genes da família dos domínios CIDE, revelou que o antígeno HEX tanto induz um aumento da expressão do gene CIDE A, quanto uma diminuição da expressão do gene CIDE B, o que torna este dado ainda inconclusivo, necessitando de novas avaliações, para se entender o real efeito dos antígenos de ancilostomídeos na expressão destes genes.





**Figura 25:** Análise da expressão dos genes relacionados a diferentes vias apoptóticas em células Jurkat, após estimulação com os antígenos ES (100 µg/mL) e HEX (100 µg/mL) por 48 horas. Os valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com o grupo controle.

## **6. DISCUSSÃO**

Inúmeros são os mecanismos propostos para explicar a modulação da resposta imunológica nas infecções helmínticas. Dentre estes, destacam-se fatores como citocinas reguladoras (King *et al.*, 1993), alteração da função de células apresentadoras de antígeno (Loke *et al.*, 2000; Whelan *et al.*, 2000; Semnani *et al.*, 2003), indução da enzima óxido nítrico sintase (Dai e Gottstein, 1999), ação de células T reguladoras (Taylor *et al.*, 2005) e de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Semnani *et al.*, 2003). Na ancilostomíase, cuja resposta imune é caracterizada por uma diminuição da capacidade proliferativa das células, esses mecanismos foram apenas parcialmente demonstrados por evidências obtidas em estudos epidemiológicos, modelos experimentais ou ainda, em análise *in vitro* (Fujiwara *et al.*, 2006).

Na última década, uma nova abordagem nos estudos imunológicos demonstra que a modulação da resposta imune do hospedeiro pelos parasitos poderia também ser mediada por outros mecanismos, como por exemplo, a ação de células Th17 (Bettelli *et al.*, 2007; Diaz e Allen, 2007; Korn *et al.*, 2007; Reece *et al.*, 2008), de macrófagos ativados alternativamente (Kreider *et al.*, 2007; Reece *et al.*, 2008), pela regulação por histamina (Jutel *et al.*, 2005; Jutel *et al.*, 2006), pela regulação de receptores do tipo Toll (Babu *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2006; van Riet *et al.*, 2007; Semnani *et al.*, 2008) e por fim, porém não menos importante, pela indução da apoptose de células reativas (Jenson *et al.*, 2002). Entretanto, devido a escassez de trabalhos voltados para o estudo da resposta celular na infecção por ancilostomídeos, nenhuma dessas vias foi ainda demonstrada para a ancilostomíase humana.

Dessa forma, os resultados obtidos em nosso estudo são fundamentais para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na evasão do sistema imune pelo parasito, sugerindo que para garantir a sobrevivência, os ancilostomídeos modulariam a resposta imune por meio da indução de apoptose nas células do hospedeiro. Uma vez que a influência do processo de apoptose na modulação da resposta imune do hospedeiro já foi demonstrada para outras infecções helmínticas (Tristão *et al.*, 2000; Rutitzky *et al.*, 2003; Jenson *et al.*, 2002; Semnani *et al.*, 2008), avaliou-se no presente estudo, nos contextos *in vitro* e *ex vivo*, a atividade citotóxica dos antígenos ES e HEX de *Ancylostoma ceylanicum* e a ocorrência do processo de apoptose induzida na ancilostomíase humana e experimental.

Os resultados de viabilidade celular realizados nas células Jurkat e nas células de linfonodos mesentéricos (CLM) de hamsters, após estimulação com os antígenos do parasito, demonstraram uma importante atividade citotóxica dose-dependente, principalmente do antígeno ES, corroborando o trabalho de Chow *et al.*, (2000), onde demonstraram que a

---

cultura de células Jurkat (clone E6-1) com 50 µg/mL de antígeno ES de *N. americanus* foi capaz de reduzir mais de 80% da viabilidade destas células.

A redução da viabilidade das CLM de hamsters infectados, após estimulação com os antígenos de verme adulto do parasito, estaria associada com a redução da capacidade proliferativa das mesmas, provavelmente acentuada pela indução de apoptose nestas células. A baixa responsividade das CLM de hamsters infectados, frente aos antígenos do parasito, está amplamente descrita na literatura (Mendez *et al.*, 2005; Dondji *et al.*, 2008; Dondji *et al.*, 2010). Interessantemente, observou-se que estas células são capazes de proliferar normalmente em resposta a um estímulo específico ou inespecífico (mitógeno) até o período em que as larvas desenvolvem-se em vermes adultos, ou seja, até a patência da infecção (Mendez *et al.*, 2005). No período pós-patente o índice de proliferação das CLM de hamsters infectados por ancilostomídeos encontra-se significativamente reduzido, mesmo frente a um estímulo mitogênico (Dondji *et al.*, 2008). Este fenômeno também foi observado em outras infecções helmínticas, causadas pelos filarídeos *Brugia malayi* e *Onchocerca volvulus* (Gosh *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 2001).

Chow *et al.*, (2000) mostraram que a redução da viabilidade das células Jurkat após estímulo com os antígenos de *N. americanus*, poderia estar relacionada com a indução de apoptose nestas células. Neste contexto, a quantificação de células com DNA fragmentado, revelou que os antígenos de *A. ceylanicum*, principalmente os antígenos ES, são capazes de induzir significativamente a apoptose nos linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters infectados por ancilostomídeos, sugerindo que este mecanismo poderia ter íntima relação com a modulação da resposta imune observada nos indivíduos infectados por ancilostomídeos. O fato da apoptose ter sido mais evidente nos animais infectados, poderia ser explicado pelo elevado perfil de ativação em que as células se encontram durante a infecção (Geiger *et al.*, 2007). Dessa forma, o elevado perfil de ativação celular contribuiria para uma maior predisposição das células à apoptose.

Por outro lado, a indução de células apoptóticas pelos antígenos ES do parasito também foi significativo nas células Jurkat e nos linfócitos de LM de hamsters não infectados, sugerindo que a indução da apoptose celular não estaria relacionada simplesmente com a resposta imune do hospedeiro frente à infecção, e sim mediada diretamente pelos produtos de excreção/secreção liberados pelo parasito.

É importante ressaltar que este estudo é o primeiro relato na literatura demonstrando que os antígenos de ancilostomídeos são capazes de reduzir a viabilidade e induzir apoptose

---

nos linfócitos de linfonodos mesentéricos de hamsters sadios e infectados experimentalmente por *A. ceylanicum*.

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) têm sido amplamente utilizados como modelo experimental para o estudo de diferentes aspectos relacionados à infecção pelos ancilostomídeos, pois diferente dos camundongos, os quais não possibilitam o desenvolvimento de vermes adultos, os hamsters são hospedeiros extremamente permissíveis, principalmente para a espécie *A. ceylanicum*, um parasito de cão e gato, mas que também infecta o homem (Fujiwara *et al.*, 2006). Dessa forma, acredita-se que os mecanismos de evasão da resposta imune induzidos em hamsters por *A. ceylanicum*, podem refletir as estratégias utilizadas pelas espécies que mais comumente infectam os homens, *N. americanus* e *A. duodenale*. Além disso, a infecção oral em hamsters reproduz as fisiopatologias observadas na infecção humana pelo *A. duodenale*, como a perda de sangue e de peso (Mendez *et al.*, 2005). Neste contexto, a caracterização da resposta imune da ancilostomíase experimental pode representar uma ferramenta importante para elucidar os fundamentos dos mecanismos imunológicos na ancilostomíase humana.

A ancilostomíase humana é caracterizada por uma resposta imunológica mista, marcada pela participação de células produtoras de citocinas tanto Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) quanto Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Estudos apontam a resposta Th2, como resposta protetora à infecção, pela associação significativa entre os elevados níveis de IL-5 com a redução da carga parasitária (Quinnell *et al.*, 2004). Contudo, apesar da robusta resposta imune sistêmica observada na infecção, sabe-se que a resposta imune celular é suprimida pelos antígenos excretados/secretados do parasito.

Foi observado que os indivíduos infectados por ancilostomídeos residentes em área endêmica para a infecção apresentam uma diminuição no número total de linfócitos circulantes quando comparados com indivíduos não-infectados (controles). Esta observação corrobora os trabalhos na literatura que demonstram que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam uma redução da frequência de linfócitos T (Onyemelukwe e Mousa, 2001) e linfócitos B (Geiger *et al.*, 2007). Além disso, observamos uma diminuição significativa da taxa de proliferação de PBMCs de pacientes infectados, após estímulo específico com os antígenos ES e HEX, corroborando novamente os inúmeros trabalhos na literatura que demonstram o estado “anérgico” das PBMCs de pacientes infectados na fase crônica da ancilostomíase (Fujiwara *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2007;

Geiger *et al.*, 2008; Olatunde e Onyemelukwe, 1994; Onyemelukwe e Mousa, 2001; Maizels *et al.*, 2004).

Paralelamente ao que foi observado, nossos resultados, por meio da marcação com Anexina V e PI, demonstraram de forma interessante, que os pacientes infectados por ancilostomídeos apresentam uma alteração na homeostasia da população linfócitos, caracterizada por um aumento do número de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> em processo de apoptose, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Estes dados sugerem que estas células estariam sendo induzidas à apoptose, *in vivo*, constantemente pelos antígenos do parasito, controlando dessa forma, o número absoluto de linfócitos e regulando negativamente a proliferação dessas células durante a ancilostomíase humana.

Tem sido proposto, por diversos autores (Koyama *et al.*, 1995; Abe e Nawa, 1998; Turner *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004) que a resposta celular pelos linfócitos T é de fundamental importância para a expulsão de diferentes helmintos gastrointestinais em modelos experimentais e em infecções humanas. Segundo Dondji *et al.* (2010), a alteração da homeostasia dos linfócitos, induzida pela depleção experimental da população de LTCD4<sup>+</sup>, foi responsável em aumentar três vezes mais a carga parasitária, assim como diminuir 23% dos níveis de hemoglobina durante a infecção primária em hamsters. Geiger *et al.* (2007) sugerem que a ativação sucessiva dos LTCD8<sup>+</sup> pela constante estimulação antigênica durante a ancilostomíase, induz uma regulação negativa na molécula co-estimulatória CD28, contribuindo para a redução da reatividade celular. Além disso, Fujiwara *et al.* (2005) sugerem o importante papel protetor de linfócitos T e B em animais vacinados com larvas L3 irradiadas de *A. caninum*.

Não obstante, quando avaliado o perfil apoptótico dessas mesmas células após estimulação, *in vitro*, com os antígenos ES e HEX de *A. ceylanicum*, observamos um aumento dose-dependente do número de linfócitos totais, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> em apoptose, sugerindo novamente a capacidade dos antígenos do parasito de induzirem apoptose nas células de defesa do hospedeiro. Diante o exposto, o presente estudo sugere que o fenômeno de apoptose nas populações linfócitos T CD4 e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B CD19<sup>+</sup>, possui um importante papel na regulação negativa da resposta imune em pacientes infectados por ancilostomídeos, criando dessa forma um microambiente favorável para a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro.

Atualmente, sabe-se que muitas moléculas secretadas pelos ancilostomídeos apresentam importantes propriedades imunomodulatórias (Loukas *et al.*, 2005). Entretanto, as

proteínas antigênicas que estariam relacionadas com a indução de apoptose nas células ainda continuam desconhecidas. De fato, já foi demonstrado que os antígenos ES de ancilostomídeos têm a capacidade de se ligarem especificamente nos receptores celulares, modulando a resposta imunológica “protetora” do hospedeiro. Hsieh *et al.* (2004) e Teixeira-Carvalho *et al.* (2009), demonstraram que os produtos ES de *N. americanus* se ligam seletivamente à receptores na célula NK (“*Natural Killer*”), promovendo a sua ativação e produção de elevados níveis de IFN- $\gamma$ , propiciando dessa forma, um microambiente favorável a sobrevivência do parasito.

Neste contexto, novos estudos fazem-se necessários para identificar os componentes dos antígenos HEX e ES envolvidos na modulação da resposta imune do hospedeiro. Não obstante, a inibição da imunomodulação induzida pelo parasito, poderia desenvolver-se em estratégias de imunoterapias contra a ancilostomíase, tais como a vacinação (Mendez *et al.*, 2005).

Motivados pelos resultados obtidos até o momento, e na tentativa de responder alguns questionamentos sobre os possíveis mecanismos de indução de apoptose, foi realizado a avaliação das prováveis vias apoptóticas que estariam sendo ativadas ou moduladas pelos antígenos do parasito nas células Jurkat. Para tanto, observamos a expressão de 84 genes reguladores ou indutores de apoptose, pertencentes a diferentes famílias de genes, após estímulo com ES e HEX de *A. ceylanicum*.

A análise conjunta dos diferentes genes avaliados, apesar de não identificar uma via específica de indução de apoptose, selecionou algumas famílias de genes que estariam sendo regulados tanto negativamente quanto positivamente pelos antígenos do parasito. Em síntese, a regulação negativa dos receptores de morte celular, CD40, FADD (domínio de morte associado ao FAS), TNFR10B (CD262/DR5), TNFR11B (OCIF/OPG), TNFR1A (CD120a/FPF), TNFR25 (APO-3/DDR3), os quais são fundamentais para ativação da via extrínseca apoptótica, somado a regulação positiva dos genes pró-apoptóticos, BNIP3, BIK e BAD, associados a família BCL-2, além dos genes TP73 e GADD45A, da família P53, sugere que os antígenos de *A. ceylanicum* estariam induzindo apoptose celular pela via intrínseca mitocondrial. Entretanto, apesar da modulação negativa dos genes CASP1, CASP2, CASP14, CASP5 e CARD8, da família das caspases, ainda não sabemos se a indução da apoptose pelos antígenos do parasito ocorre via mitocondrial caspase-dependente ou –independente, pela falta de informações conclusivas quanto às caspases iniciadoras (8 e 9) e as caspases executoras (3,6 e 7).

Os resultados obtidos por Chow *et al.* (2000) contribuem para a hipótese de que a via apoptótica mitocondrial é a que estaria sendo ativada pelos antígenos do parasito, uma vez que demonstraram que a indução de apoptose pelos antígenos ES de *Necator americanus*, não envolve as moléculas Fas ligante/Fas receptor, consideradas importantes mediadores de morte celular pela via extrínseca.

A fragmentação do DNA genômico induzida pelos antígenos do parasito, observado nas células Jurkat assim como nos linfócitos de LM de hamsters, é um forte indicativo de ativação da caspase 3, que culmina na migração e ativação da DNase (CAD/DFF-40) para o núcleo celular (Bidere *et al.*, 2001). Por outro lado, já foi demonstrado que os linfócitos T ativados entram em apoptose independentemente das caspases, se expostos a estímulos que não ativam os receptores de morte celular da superfamília TNF, como por exemplo, estaurosporina, moléculas anti-CD2 e anti-MHC classe 1 (Woodle *et al.*, 1997) e espécies de radicais de oxigênio (Hildeman *et al.*, 1999). Além disso, Bidere *et al.* (2001) sugerem que a mitocôndria pode ativar conjuntamente a via caspase-dependente e -independente, contribuindo para a regulação da resposta celular pelos linfócitos T.

Dessa forma estes resultados direcionam novos experimentos suportados pela utilização de inibidores moleculares (RNAi), para o bloqueio vias específicas, a fim de elucidar detalhadamente as vias apoptóticas induzidas pelos antígenos ES e HEX dos ancilostomídeos.



## **7. CONCLUSÃO**

Após a realização deste trabalho, podemos inferir que os antígenos de *A. ceylanicum* apresentam um potencial efeito citotóxico e pró-apoptótico para a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, atuando principalmente no controle do número absoluto e na capacidade proliferativa destas células. Dessa forma, este estudo destaca a indução de apoptose, como um eficiente mecanismo de evasão da resposta imune, desenvolvido pelo parasito, que contribui para modulação da resposta imunológica, e conseqüentemente, para a sua sobrevivência em seu hospedeiro.

## **8. ANEXOS**

<b>GENE TABLE</b>			
<b>Position</b>	<b>Symbol</b>	<b>Description</b>	<b>Gene Name</b>
A01	ABL1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase	ABL, JTK7, bcr, abl, c-ABL, p150, v-abl
A02	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT, MGC99656, PKB, PKB-ALPHA, PRKBA, RAC, RAC-ALPHA
A03	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1, CED4, DKFZp781B1145
A04	BAD	BCL2-associated agonist of cell death	BBC2, BCL2L8
A05	BAG1	BCL2-associated athanogene	RAP46
A06	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	BAG-3, BIS, CAIR-1, MGC104307
A07	BAG4	BCL2-associated athanogene 4	BAG-4, SODD
A08	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	BAK, BAK-LIKE, BCL2L7, CDN1, MGC117255, MGC3887
A09	BAX	BCL2-associated X protein	BCL2L4
A10	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	CARMEN, CIPER, CLAP, c-E10, mE10
A11	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2
A12	BCL2A1	BCL2-related protein A1	ACC-1, ACC-2, BCL2L5, BFL1, GRS, HBPA1
B01	BCL2L1	BCL2-like 1	BCL-XL, S, BCL2L, BCLX, Bcl-X, DKFZp781P2092, bcl-xL, bcl-xS
B02	BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	BCL-B, Boo, Diva, MGC129810, MGC129811
B03	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BAM, BIM, BIM-alpha6, BIM-beta6, BIM-beta7, BOD, BimEL, BimL
B04	BCL2L2	BCL2-like 2	BCL-W, BCLW, KIAA0271
B05	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	BTF, KIAA0164, bK211L9.1
B06	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	BAR, RNF47
B07	BID	BH3 interacting domain death agonist	FP497, MGC15319, MGC42355
B08	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BIP1, BP4, NBK
B09	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	BIRC1, FLJ18088, FLJ42520, FLJ58811, NLRB1, psiNAIP
B10	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	API1, HIAP2, Hiap-2, MIHB, RNF48, cIAP1
B11	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	API1, API2, CIAP2, HAIP1, HIAP1, MALT2, MIHC, RNF49
B12	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	API3, BIRC4, ILP1, MIHA, XLP2
C01	BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6	APOLLON, BRUCE, FLJ13726, FLJ13786, KIAA1289
C02	BIRC8	Baculoviral IAP repeat-containing 8	ILP-2, ILP2, hILP2
C03	BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	NIP1, SEC20, TRG-8
C04	BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	BNIP-2, NIP2
C05	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3
C06	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	BNIP3a, NIX
C07	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	B-RAF1, BRAF1, FLJ95109, MGC126806, MGC138284, RAFB1
C08	NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	CARD4, CLR7.1, NLRC1

C09	CARD6	Caspase recruitment domain family, member 6	CINCIN1
C10	CARD8	Caspase recruitment domain family, member 8	CARDINAL, DACAR, DKFZp779L0366, Dakar, FLJ18119, FLJ18121, KIAA0955, MGC57162, NDPP, NDPP1, TUCAN
C11	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	ICE, IL1BC, P45
C12	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	ALPS2, FLICE2, MCH4
D01	CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	MGC119078, MGC119079
D02	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP-2, ICH-1L, ICH-1L, 1S, ICH1, NEDD2
D03	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CPP32, CPP32B, SCA-1
D04	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	ICE(rel)II, ICEREL-II, ICH-2, Mih1, TX, TX
D05	CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	ICE(rel)III, ICEREL-III, ICH-3, MGC141966
D06	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH2
D07	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	CMH-1, ICE-LAP3, MCH3
D08	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	ALPS2B, CAP4, Casp-8, FLICE, FLJ17672, MACH, MCH5, MGC78473
D09	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	APAF-3, APAF3, CASPASE-9c, ICE-LAP6, MCH6
D10	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	Bp50, CDW40, MGC9013, TNFRSF5, p50
D11	CD40LG	CD40 ligand	CD154, CD40L, HIGM1, IGM, IMD3, T-BAM, TNFSF5, TRAP, gp39, hCD40L
D12	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASH, CASP8AP1, CLARP, Casper, FLAME, FLAME-1, FLAME1, FLIP, I-FLICE, MRIT, c-FLIP, c-FLIPL, c-FLIPR, c-FLIPS
E01	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	CIDE-A
E02	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	-
E03	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	MGC9163, RAIDD
E04	DAPK1	Death-associated protein kinase 1	DAPK, DKFZp781I035
E05	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFF-45, DFF1, ICAD
E06	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	GIG3, MGC8528, MORT1
E07	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	ALPS1A, APO-1, APT1, CD95, FAS1, FASTM, TNFRSF6
E08	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1LG1, CD178, CD95L, FASL, TNFSF6
E09	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DDIT1, GADD45
E10	HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	DP5, HARAKIRI
E11	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	CD221, IGFIR, IGFR, JTK13, MGC142170, MGC142172, MGC18216
E12	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LT, TNFB, TNFSF1
F01	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	CD18, D12S370, LT-BETA-R, TNF-R-III, TNFCR, TNFR-RP, TNFR2-RP, TNFRSF3
F02	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	BCL2L3, EAT, MCL1L, MCL1S, MGC104264, MGC1839, Mcl-1, TM
F03	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	ARC, CARD2, MYC, MYP, NOP, NOP30

F04	PYCARD	PYD and CARD domain containing	ASC, CARD5, MGC10332, TMS, TMS-1, TMS1
F05	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	CARD3, CARDIAK, CCK, GIG30, RICK, RIP2
F06	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2
F07	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	APO2, CD261, DR4, MGC9365, TRAILR-1, TRAILR1
F08	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	CD262, DR5, KILLER, KILLER, DR5, TRAIL-R2, TRAILR2, TRICK2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB, ZTNFR9
F09	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	MGC29565, OCIF, OPG, TR1
F10	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	CD120a, FPF, MGC19588, TBP1, TNF-R, TNF-R-I, TNF-R55, TNFAR, TNFR1, TNFR55, TNFR60, p55, p55-R, p60
F11	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	BM-018, DR6, MGC31965
F12	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	APO-3, DDR3, DR3, LARD, TNFRSF12, TR3, TRAMP, WSL-1, WSL-LR
G01	CD27	CD27 molecule	MGC20393, S152, T14, TNFRSF7, Tp55
G02	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4-1BB, CD137, CDw137, ILA, MGC2172
G03	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	APO2L, Apo-2L, CD253, TL2, TRAIL
G04	CD70	CD70 molecule	CD27L, CD27LG, TNFSF7
G05	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	CD153, CD30L, CD30LG, MGC138144
G06	TP53	Tumor protein p53	FLJ92943, LFS1, TRP53, p53
G07	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2	53BP2, ASPP2, BBP, PPP1R13A, p53BP2
G08	TP73	Tumor protein p73	P73
G09	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Hs.89862, MGC11078
G10	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	MGC:45012, TRAP, TRAP3
G11	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	CAP-1, CD40bp, CRAF1, LAPI
G12	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	CART1, MLN62, RNF83
H01	B2M	Beta-2-microglobulin	-
H02	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT, HPRT
H03	RPL13A	Ribosomal protein L13a	-
H04	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD, GAPD, MGC88685
H05	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
H07	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	PPC	Positive PCR Control	PPC

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abe T e Nawa Y. 1988. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti*infected nude mice. *Immunology*. 63: 181–185
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Jr., Stadecker, M. J., Gause, W. C. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*, 7:975-87.
- Babu, S., Blauvelt, C. P., Kumaraswami, V. ,Nutman, T. B. 2005. Diminished expression and function of TLR in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. *J Immunol*, v. 175, p. 1170-6.
- Babu, S., Blauvelt, C. P., Kumaraswami, V. ,Nutman, T. B. 2006. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol*, v. 176, p. 3885-9.
- Bannai, H., Nishikawa, Y., Ibrahim, H., et al. 2009. Overproduction of the Pro-Apoptotic Molecule, Programmed Cell Death 5, in *Toxoplasma gondii* Leads to Increased Apoptosis of Host Macrophages. *Parasitology*.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D. ,Hotez, P. J. 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367: 1521-32.
- Becker, S., Cho, K., Guo, X., et al 2010. Epithelial cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut. *The American Journal of Pathology*.
- Bidère, N. e Senik, A. 2001. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview. *Apoptosis*; 6: 371–375.
- Blankenberg, F 2008. In Vivo Detection of Apoptosis. *J Nucl Med* 49: 81S–95S.
- Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, et al. 2005. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*. 46:2035– 2050.



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

Brooker, S., Jardim-Botelho, A., Quinnell, R.J. et al. 2007. Age-related changes in hookworm infection, anaemia and iron deficiency in an area of high *Necator americanus* hookworm transmission in south-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 146- 154.

Brown, S. B., M. C. Clarke, L. Magowan, H. Sanderson, and J. Savill. 2000. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis: a caspase-independent cell clearance program. *J. Biol. Chem.* 275:5987.

Brown, M. 2005. Intestinal helminths. *Medicine* 33: 54-57.

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

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

Chinnadurai G., Vijayalingam, R., Gibson, S.B. 2008. BNIP3 subfamily BH3-only proteins - mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*. December; 27(Suppl 1): S114–S127.

Chow, S.C., Peters, I., Orrenius, S 1995. Reevaluation of the role of de novo protein synthesis in rat thymocyte apoptosis. *Exp Cell Res* 216: 149-59.

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

Cotter, T 2009. Apoptosis and Cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews* 9: 501-507.

- Dai, W. J., Gottstein, B. 1999. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunology*, v. 97, p. 107-16.
- de Silva, N.R., Brooker, S., Hotez, P.J., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 19: 547-51.
- Diaz, A., Allen, J. E. 2007. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol*, v. 37, p. 3319-26.
- Dondji, B., Bungiro, RD., Harrison, LM., Vermeire, JJ., Bifulco, C., McMahon-Pratt, D., Cappello, M. 2008. Role for Nitric Oxide in Hookworm-Associated Immune Suppression. *Infection and Immunity*, June, p. 2560–2567.
- Dondji, B., Sun, T., Bungiro, RD., Vermeire, JJ., Harrison, LM., Bifulco, C., Cappello, M. 2010. CD4+ T cells mediate mucosal and systemic immune responses to experimental hookworm infection. *Parasite Immunology*, 32, 406–413.
- Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, JP., Genestier, L. 2002. *Journal of Immunology*. 169: 4805–4810.
- Fujiwara RT, Loukas A, Mendez S et al. Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine* 2005; 24: 501–509.
- Fujiwara, R.T., Geiger, S.M., Bethony, J., Mendez, S 2006. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol* 28: 285-93.
- Fujiwara RT, Cançado GG, Freitas PA, Santiago HC, Massara CL, Dos Santos Carvalho O, Corrêa-Oliveira R, Geiger SM, Bethony J. 2009. *Necator americanus* infection: a possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(3):e399.
- Geiger, S.M., Massara, C.L., Bethony, J., Soboslay, P.T., Correa-Oliveira, R 2004. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol* 136: 334-40.

Geiger, S.M., Caldas, I.R., Mc Glone, B.E., Campi-Azevedo, A.C., De Oliveira, L.M., Brooker, S., Diemert, D., Correa-Oliveira, R., Bethony, J 2007. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunol* 29: 347-58.

Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. May. 9; 417(6885):182-7.

Hildeman DA, Mitchell T, Teague TK, et al. 1999. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity*. 1999; 10: 35–44.

Hockenbery, D. et al. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334–336.

Hotez, P., Zhan, B., Qun, J., Hawdon, J.M., Young, H.A., Simmens, S., Hitzelberg, R., Zook, B 2002. Natural history of primary canine hookworm infections following 3 different oral doses of third-stage infective larvae of *Ancylostoma caninum*. *Comp Parasitol* 69: 72-80.

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

Hotez, P.J., Brooker, S., Bethony, J.M., Bottazzi, M.E., Loukas, A., Xiao, S 2004. Current concepts: hookworm infection. *N Engl J Med* 351: 799-807.

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

Huerta S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.H 2007. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 139:143–156.

Jackson JA, Turner JD, Rentoui L et al. 2004. T helper type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. *J Infect Dis*. 190: 1804–1811.

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

Jenson, J., O'Connor, R., Osborne, J., and Devaney, E. 2002. Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4+ T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur. J. Immunol.* 32: 858.

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

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

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

Kemp, K., Akanmori, B.D., Hviid, L. 2001. West African donors have high percentages of activated cytokine producing T cells that are prone to apoptosis *Clin Exp Immunol.* 126:69±75.

King, C. L., Mahanty, S., Kumaraswami, V., Abrams, J. S., Regunathan, J., Jayaraman, K., Ottesen, E. A., Nutman, T. B. 1993. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. *J Clin Invest*, v. 92, p. 1667-73.

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

Koyama K, Tamauchi H & Ito Y. 1995. The role of CD4+ and CD8+ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunol*; 17: 161–165.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. Sep 1.84(5):1415-20.

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

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

Loke, P., MacDonald, A. S., Robb, A., Maizels, R. M., Allen, J. E. 2000. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur J Immunol*, v. 30, p. 2669-78.

Lomonosova, E., and Chinnadura, G. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview *Oncogene*. December; 27(Suppl 1): S2–19.

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

Loukas, A., Constant, S.L., Bethony, J.M 2005. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 115-24.

Loukas, A., Bethony, J.M., Mendez, S., Fujiwara, R.T., Goud, G.N., Ranjit, N., Zhan, B., Jones, K., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J 2005. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *PLoS Med* 2: 295.

Loukas, A., Bethony, J., Brooker, S., Hotez, P 2006. Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 6: 733-41. Mendez, S., Valenzuela, J.G., Wu, W., Hotez, P.J 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect Immun* 73:3402-7.

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

- Mendez, S., Valenzuela, J.G., Wu, W., Hotez, P.J. 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect Immun*, v. 73, p. 3402-7.
- Munoz LE, Franz S, Pausch F, et al. 2007. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol*. 81:6–14.
- Olatunde, B. O. ,Onyemelukwe, G. C. 1994. Immunosuppression in Nigerians with hookworm infection. *Afr J Med Med Sci*, v. 23, p. 221-5.
- Onyemelukwe, G.C., Musa, B.O 2001. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 30: 255-9.
- Pit, D.S., Polderman, A. M., Baeta, S., Schulz-Key, H., Soboslay, P.T. 2001. Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. *Parasitol Res*, v. 87, p. 722-9.
- Pritchard, D.I., Walsh, E.A 1995. The specificity of the human IgE response to *Necator americanus*. *Parasite Immunol* 17:605-7.
- Pritchard, D.I., Brown, A 2001. Is *Necator americanus* approaching a mutualistic symbiotic relationship with humans? *Trends Parasitol* 17: 169-72.
- Quinnell, R.J., Woolhouse, M.E., Walsh, E.A., Pritchard, D.I 1995. Immunoepidemiology of human necatoriasis: correlations between antibody responses and parasite burdens. *Parasite Immunol* 17:313-8.
- Quinnell, R. J., Pritchard, D. I., Raiko, A., Brown, A. P. ,Shaw, M. A. 2004. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *J Infect Dis*, v. 190, p. 430-8.
- Reece, J. J., Siracusa, M.C., Southard, T.L., Brayton, C.F., Urban, J.F., Jr., Scott, A.L. 2008. Hookworm-induced persistent changes to the immunological environment of the lung. *Infect Immun*, v. 76, p. 3511-24.

Rodrigues-Jr, V., Agrelli, G., Leon, S. et al 2008. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas disease. *Microbes and Infection* 29:37.

Rutitzky, L., Mirkin, G., Stadecker, M 2003. Apoptosis by Neglect of CD4 Th Cells in Granulomas: A Novel Effector Mechanism Involved in the Control of Egg-Induced Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *The Journal of Immunology*.

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

Semnani, R.T., Liu, A.Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J.K., Nutman, T. B. 2003. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells. *J Immunol*, v. 171, p. 1950-60.

Semnani RT, Venugopal PG, Mahapatra L, Skinner JA, Meylan F, Chien D, Dorward DW, Chaussabel D, Siegel RM, Nutman TB. 2008. Induction of TRAIL- and TNF-alpha-dependent apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells by microfilariae of *Brugia malayi*. *J Immunol*. Nov 15;181(10):7081-9.

Stoltzfus RJ, Albonico M, Chwaya HM, Savioli L, Tielsch J, Schulze K, Yip R. 1996. Hemoquant determination of hookworm-related blood loss and its role in iron deficiency in African children. *Am J Trop Med Hyg*.55 (4):399-404.

Tait, J. 2008. Imaging of Apoptosis. *J Nucl Med*; 49:1573–1576.

Taylor, M. D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J. E., Maizels, R. M. 2005. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol*, v. 174, p. 4924-33.

Tristão, A.R., Melo, A.L., Vasconcelos, A.C., Grossi, F.M 2000. Apoptose na modulação da resposta inflamatória aos ovos do *Schistosoma mansoni*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. [online] 52.

Tsujimoto, Y. et al. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097–1099.

Tsujimoto, Y. 1989. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 11, 1331–1336.

Turner JD, Faulkner H, Kamgno J et al. 2003. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. *J Infect Dis.* 188: 1768–1775.

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

Verhagen, A. M. et al. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.

Vogt, C 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte. *Alytes obstetricians* 130.

Weis, M., Schlegel, J., Kass, G.E., Holmstrom, T.H., Peters, I., Eriksson, J., Orrenius, S., Chow, S.C 1995. Cellular events in Fas/APO-1-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp Cell Res* 219: 699-708.

Yang, J. et al 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275, 1129–1132.

Yip, K. W. & Reed, J. C. 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398–6406

Whelan, M., Harnett, M. M., Houston, K. M., Patel, V., Harnett, W., Rigley, K. P. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol*, v. 164, p. 6453-60.

WHO 2005. New technology for sustaining deworming. Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. World Health Organization 27 Geneva.



Woodle ES, Smith DM, Bluestone JA, Kirkman III WM, Green DR, Skowronski EW. 1997. Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway. *J Immunol.* 158: 2156– 2164.