

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“Aspectos da modulação da resposta imunológica
por células T reguladoras e células Th17 na
infecção por ancilostomídeos em humanos”**

NATASHA DELAQUA RICCI

**Belo Horizonte – MG
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“Aspectos da modulação da resposta imunológica
por células T reguladoras e células Th17 na
infecção por ancilostomídeos em humanos”**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

NATASHA DELAQUA RICCI

Belo Horizonte – MG

2012

043

Ricci, Natasha Delaqua.

Aspectos da modulação da resposta imunológica por células T reguladoras e células Th17 na infecção por ancilostomídeos em humanos [manuscrito] / Natasha Delaqua Ricci. - 2012.

169 f.: il.; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia .

1. Parasitologia - Teses. 2. Ancilostomídeos - Teses. 3. Células T - Teses. 4. Infecção - Teses. 5. Infecção humana. 6. Imunorregulação. 7. Células Th17. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. III. Título.

CDU: 616.995.1

COLABORADORES

Centro De Pesquisa René Rachou - Belo Horizonte

Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira

Ms. Jacqueline Araújo Fiúza

Dra. Fernanda Fortes Araújo

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Prof^ª. Dra. Walderez Dutra

Prof^ª Dra. Daniella Bartholomeu

Dr. Germano Carneiro

Ms. Natália Satchiko Hojo de Souza

Dra. Lílian Lacerda Bueno

Ms. Rondon Pessoa Neto

Ms. Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães

Escola de Enfermagem

Prof^ª Dra. Andréa Gazzinelli

Ms. Leonardo F. Matoso

Suporte Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES/REUNI

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

Pró-Reitoria de Pesquisa – UFMG

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais - INCT-DT

Agradecimentos

- *Gostaria primeiramente de agradecer aos meus pais e minha querida tia Leila pelo apoio incondicional...
- *Ao Prof. Ricardo Fujiwara por ter aceito a tarefa de me orientar e de apresentar o mundo da imunologia...
- *À queridíssima Sumara, que me auxiliou no momento em que mais precisei e que sem ela, este trabalho não seria possível...
- *À minha segunda família: Neuri, Giselle, Francely, D. Alice, Adalgisa, pelo apoio e amizade durante todos estes anos.
- * Aos amigos de uma vida toda: André, Adelmo, Juquinha, Regina, Gustavo, Sílvio, Tia Cidinha, Enrico, Preta....
- *Aos amigos da graduação, do laboratório de Músculo Liso Vascular da Profa. Lourdes Weimberg, aos amigos do Laboratório de Biofísica...boas lembranças...
- *Aos amigos da UFMG: Profa. Wânia Carvalho, Ju, Diana, Norinne
- *À Profa. Daniella Bartholomeu, pelo apoio e convivência agradável
- *Aos amigos do LIGP: Sara, Michelle, Jacqueline, Anny, Rondon, Fernando, Sebastian, Patrícia, Tiago, Rodrigo, Gabriela, João, Ana Rita, Ana Carolina, Carolina Cavalcanti, Pedro, Ana Clara, Daniel, Lilian, Ronize, Lívia, Jefferson, Virgílio, Guilherme, David, Leandro...pela amizade e pela convivência agradável.
- *À Valentina & Cindy pela alegria e pelas colaborações no processo de escrita da tese.
- *Aos amigos e companheiros da turma de Mestrado pela amizade e pelo aprendizado
- *A todos os pacientes e doadores que me fornecem valiosas amostras para o desenvolvimento deste trabalho;
- *Aos animais de laboratório que foram sacrificados e tornaram possível a execução deste trabalho;
- À FAPEMIG e CAPES/REUNI pela concessão da bolsa

Dedico aos meus pais....

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”

Jean Cocteau

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Secção de jejuno com a porção anterior de <i>Ancylostoma</i> preso na mucosa.	14
Figura 2	Ciclo biológico dos ancilostomídeos	16
Figura 3	Distribuição Mundial dos ancilostomídeos parasitos do homem	21
Figura 4	O caminho em que os nematódeos intestinais podem afetar o futuro potencial de produtividade mediante anemia e desnutrição e seus efeitos na função cognitiva e desempenho escolar.	22
Figura 5	Origem das células T Regulatórias. (A) Tregs naturais (tímicas) e (B) Tregs induzidas.	28
Figura 6	Organização do gene FOXP3. O gene codificador é composto por 11 exons codificadores e dois exons não codificantes.	29
Figura 7	Localização do SNP IVS9 ⁺ 459	30
Figura 8	Esquema da estrutura do gene TGF-β1. Este localiza-se no cromossomo 19 na região 2q13	34
Figura 9	Origem e ativação das células Th 17.	36
Figura 10	Delineamento experimental destacando os principais procedimentos realizados	
Figura 11	Localização geográfica da área de estudo	45
Figura 12	FACS plot representando no eixo X as células marcadas com CD25 ⁺ e o eixo Y as células CD4 ⁺ .	53
Figuras 13	Análise de células T regulatórias por citometria de fluxo. (A) Expressão de CD25 e FOXP3 em gates de linfócitos CD4 ⁺ T.	56
Figura 14	Análise de citometria de fluxo das citocinas IL-10, TGF-β, e IL-17 dos marcadores CTLA-4 e GITR em células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 em indivíduos infectados e não infectados em número absoluto de células	58
Figura 15	Análise de citometria de fluxo das citocinas IL-10, TGF-β, e IL-17 dos marcadores CTLA-4 e GITR em células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 em indivíduos infectados e não infectados em números percentuais	60
Figura 16	Análise do percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ IL-17 ⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de <i>A. ceylanicum</i> .	58
Figura 17	Análise do percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ CTLA-4 ⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de <i>A. ceylanicum</i> .	59
Figura 18	Análise do percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ GITR ⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de <i>A. ceylanicum</i>	
Figura 19	Análise do percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ IL-10 ⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de <i>A. ceylanicum</i> em números percentuais.	60
Figura 20	Análise do percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ TGF-β ⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de <i>A. ceylanicum</i> .	61
Figura 21	Intensidade média de fluorescência em grupos controle, grupos estimulados com antígeno bruto (AgBr), e grupos antígeno ES (AgES) em pacientes infectados e não-infectados por <i>N. americanus</i> .	63
Figura 22	Intensidade média de fluorescência em grupos controle, grupos estimulados com antígeno bruto (AgBr), e grupos antígeno ES (AgES) em pacientes infectados e não-infectados por <i>N. americanus</i>	65
Figura 23	Análise de citometria de fluxo em PBMCs estimulados com antígeno bruto e antígeno ES de ancilostomídeos em células	67

	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ IL-17 ⁺	
Figura 24	Análise de citometria de fluxo de células CD4 (A, B) e CD8 (C) depletadas de Tregs (PBMCd).	69
Figura 25	Análise de citometria de fluxo de células CD4 (A, B) e CD8 (C) depletadas de Tregs em pacientes não infectados. (PBMCd).	70
Figura 26	Concentração das citocinas (média ± desvio padrão) de IL-2 (A), IFN-γ (B), IL-10 (C) e IL-5(D) em sobrenadantes de cultura(n = 10) de PBMC e células CD4 ⁺ CD25 ⁺ -depletadas PBMCs (dPBMCs) após estimulação com extrato bruto e produtos de excreção-secreção.	72
Figura 27	Análise de citometria de fluxo de células CD4 ⁺ Th17 ⁺ em culturas de sangue (A, B) e CD8 (C) depletadas de Tregs em pacientes infectados e não infectados. (PBMCd).	74
Figura 28	Análise de citometria de fluxo de células CD4 ⁺ IL-10 ⁺ em culturas de sangue total	76
Figura 29	Análise de citometria de fluxo de células CD4 ⁺ TGF-β ⁺ em culturas de sangue total	77
Figura 30	Análise de citometria de fluxo de células CD4 ⁺ IL-17 ⁺ em culturas de sangue total	78
Figura 31	Intensidade média de fluorescência em grupos controle, grupos estimulados com antígeno bruto (HEX), e grupos antígeno ES (ES) em pacientes infectados por <i>N. americanus</i> .	80
Figura 32	Intensidade média de fluorescência em pacientes não-infectados e infectados por <i>N. americanus</i> .	81
Figura 33	Avaliação da correlação de citocinas associadas à imunorregulação	82
Figura 34	Concentração das citocinas (média ± desvio padrão) de IFN-γ (A), TNF-α (B), IL-10 (C), TGF-β (D), IL-6 (E), IL-17 (F), em sobrenadantes de cultura (n=10) de PBMC após estimulação com extrato bruto (HEX) e produtos de excreção-secreção (ES).	84
Figura 35	Concentração das citocinas (média ± desvio padrão) de IL-5 (A), IL-12/IL-23p40(B), IL-13 (C) em sobrenadantes de cultura (n=10) de PBMC após estimulação com extrato bruto (HEX) e produtos de excreção-secreção (ES).	85
Figura 36	Eletroforese demonstrando os fragmentos de restrição obtidos para o gene CTLA-4	88
Figura 37	Frequências genótípicas total (A) e frequência alélica total (B) e frequências genótípicas por subpopulação (C) em relação ao polimorfismo do gene CTLA-4 ⁺⁴⁹	90
Figura 38	Eletroforese demonstrando os fragmentos de restrição obtidos para o gene FOXP3	95
Figura 39	Frequências genótípicas (A) e frequências alélicas (B) e frequências genótípicas das subpopulações (C) referentes ao polimorfismo IVS9 ⁺⁴⁵⁹ do gene para FOXP3.	96
Figura 40	Frequências alélicas de FOXP3 para o sexo feminino (A) e sexo masculino (B).	100
Figura 41	Eletroforese evidenciando os fragmentos de restrição para o gene IL-10	105
Figura 42	Frequência genotípica (A) e frequência alélica (B) em relação ao polimorfismo do gene IL-10 (1082G/A)	106
Figura 43	Eletroforese do poliácridamida evidenciando bandas de restrição para	110

	o gene IL-10	
Figura 44	Frequência genotípica em relação ao polimorfismo do gene TGF- β	111
Figura 45	Distribuição dos alelos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.	111

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
Tabela 1	Diferenças morfológicas entre <i>Necator americanus</i> e <i>Ancylostoma duodenale</i>	19
Tabela 2	Ranking de doenças negligenciadas (DALYs) e comparação com HIV/AIDS, Tuberculose e Malaria	20
Tabela 3	<i>Locus</i> gênicos amplificados	49
Tabela 5	Número de ciclos, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento obtido para a técnica de PCR.	50
Tabela 6	Enzimas utilizadas na digestão e produtos de digestão gerados para reconhecimento dos genótipos	51
Tabela 7	Análise hemograma das populações envolvidas no presente estudo.	54
Tabela 8	Forma clínica X gênero	86
Tabela 9	Teste OR para população total de FOXP3	100
Tabela10	Teste qui-quadrado e OR para populações de FOXP3 analisada separadamente por gênero	101
Tabela 11	Análise de gênero ancestral X alelo polimórfico para FOXP3	102
Tabela 12	Análise alelo polimórfico x alelo ancestral	103
Tabela 13	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	114

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Aloficocianina

APCs- Células Apresentadoras de Antígenos

CD127 - Cluster de Diferenciação 127 (receptor para IL-7)

CD152 - Cluster de Diferenciação 152

CD19 - Cluster de Diferenciação 19

CD25 - Cluster de Diferenciação 25 (Cadeia α do receptor de IL-2)

CD3 – Cluster de Diferenciação 3

CD4 - Cluster de Diferenciação 4

CD40 - Cluster de Diferenciação 40

CD80 - Cluster de Diferenciação 80

CD80/ B7.1 - Cluster de Diferenciação 80

CD86 - Cluster de Diferenciação 86

CD86/B7.2 - Cluster de Diferenciação 86

CFDA-SE- Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester

CTLA-4 – Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico

DCs - Células dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Ensaio imunoenzimático

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FOXP3- do inglês forkhead box P3

Fsc - Forward Scatter

g – grama (unidade de medida de massa)

g- Unidade de aceleração gravitacional

GITR - Receptor de TNF induzido por glicocorticóide

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HCl- Ácido Clorídrico

HLA-DR- Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

IDO - Indolamina-desoxigenase

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12p 70 – Interleucina 12
IL-12/IL-23p40– Interleucina 23
INF- γ - Interferon- gama
IQR - Intervalo interquartil
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro
NaCl- Cloreto de sódio
NaOH- Hidróxido de Sódio
NK- Célula Natural Killer
°C – Graus Celsius (medida de temperatura)
OX40 (CD134)- membro da superfamília dos receptores de TNF
p - p-valor, nível de significância
pb – Pares de bases
PBMCs - Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS- Tampão Salino Fosfatado
PCA- Análise de Componentes Principais
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PE – Ficoeritrina
PECy5 – Ficoeritrina Cy-chrome 5
PerCp – Proteína da Clorofila Peridina
PFA- Paraformaldeído
pg- picogramas (unidade de medida de massa)
PHA- fitohemaglutinina
RPMI- Meio de cultura celular originalmente desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute
rRNA - Ácido Ribonucleico ribossômico
SDS – Sódio dodecil sulfato
SFB - Soro Fetal Bovino
SNP- single-nucleotide polymorphism
Ssc - Side Scatter
T CD4⁺- Linfócito T CD4 positivo
T CD4⁺CD25⁺ - Linfócito T CD4 positivo e CD25 positivo
T CD8⁺- Linfócito T CD8 positivo
TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral beta

Th1- Linfócito T auxiliador (helper) CD4 positivo Th1

Th2- Linfócito T auxiliador (helper) CD4 positivo Th2

TH3- Linfócito T regulador TH3 (Linfócito T auxiliar com função regulatória)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- alpha

TR1- Linfócito T regulador TR1

Treg - Linfócito T regulador

WHO- Organização Mundial da Saúde

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Posição Taxonômica.....	2
1.2 – Morfologia.....	2
1.3 – Ciclo Biológico.....	4
1.4 - Espécies de Importância Médica.....	6
1.6 – Patogenia.....	10
1.7 – Aspectos imunológicos da resposta imune contra ancilostomídeos.....	12
1.7.2 - Padrão de reatividade humoral.....	13
1.7.3 – Padrão da produção de citocinas e quimiocinas em nematódeos.....	13
1.7.4- Mecanismos de evasão à resposta do hospedeiro em nematódeos.....	14
1.8 – Células T Reguladoras.....	16
1.8.1 – Características fenotípicas das células Treguladoras.....	19
1.8.2 – FOXP3.....	19
1.8.4 – GITR.....	21
1.8.5 – TGF- β	22

1.9 – Células Th17	26
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 – Objetivo Geral.....	33
MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 – Delineamento Experimental.....	35
4.2 – Parasitos	36
4.2.1 –Manutenção de <i>A. ceylanicum</i>	36
4.5 – Separação de células mononucleares do sangue periférico	39
4.6 – Culturas de células mononucleares do sangue periférico	39
4.7 – Detecção de proliferação celular em populações específicas de linfócitos por CFDA- SE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)	40
4.8 – Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas	40
4.9 – Determinação do perfil de células reguladoras e células Th17, e avaliação funcional após estímulo de PBMCs com antígenos de <i>A. ceylanicum</i>	40
4.10.1 – Extração de DNA Genômico	42
4.10.2 — Quantificação do DNA	42
4.10.3 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	42
4.10.4 — Eletroforese em gel de Agarose 1%	44
4.10.5 – Digestão dos Produtos de PCR	44
4.10.6 Eletroforese de poliacrilamida para determinação dos genótipos.....	45

4. 13 Análise Estatística.....	45
5- RESULTADOS	48
5.1 – Avaliação de parâmetros hematológicos na ancilostomíase humana	48
5.1.2 Avaliação da fenotipagem de cultura de sangue total em pacientes infectados por <i>N. americanus</i>	49
5.8 Padrão de reatividade de citocinas em sobrenadantes de PBMCd	65
5.9 Análise da população de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-17 ⁺ em amostras de sangue periférico	66
5.10 Análise da população de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-10 ⁺ em amostras de sangue periférico	67
5.11- Análise da população de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ TGF-β ⁺ em amostras de sangue periférico	68
5.12- Análise da população- de células CD4 ⁺ IL-17 ⁺ CD25 ⁻ FOXP3 ⁻ em amostras de sangue periférico	69
5.13- Análise de Intensidade Média de Fluorescência da produção de citocinas em células CD4 ⁺	71
5.15- Avaliação da dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC de doadores infectados e não-infectados mediante estímulo antigênico	74
5.16 Avaliação do perfil eletroforético de bandas obtidos pela técnica de RFLP	77
5.16.1 – CTLA-4.....	78
5.16.2 – FOXP3	82
5.16.3 – IL-10	90
5.16.4 – TGF-β.....	92
6-DISCUSSÃO.....	97

7. RESUMO DOS RESULTADOS	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ANEXO 1.TABELAS.....	142

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Os ancilostomídeos são helmintos cujos estágios parasitários ocorrem em mamíferos, causando a ancilostomose ou ancilostomíase. A ancilostomose infecta cerca de 740 milhões de pessoas no mundo, principalmente nas regiões da África Sub-Saariana, Sudeste da Ásia, China, Brasil e América Central (DE SILVA et al 2003; HOTEZ et al., 2005). É considerada uma doença negligenciada, causando anemia ferropriva e hipoproteïnemia, que podem causar depauperamento físico e mental principalmente em crianças em idade escolar (HOTEZ et al., 2005a; HOTEZ et al., 2005b).

A maioria das infecções helmínticas se não tratadas, durante anos, resultam em desordens inflamatórias que eventualmente causam incapacidade. A cronicidade e incapacidade são características destas infecções, que juntamente com a alta prevalência, formam um problema global de significativo impacto médico, educacional e econômico (WANG et al., 2008). A ancilostomíase apresenta uma íntima ligação entre baixos níveis sócio-econômicos, sendo concentrada entre os 2,7 bilhões de pessoas mais pobres do planeta, as quais sobrevivem com menos de dois dólares por dia e em condições sanitárias extremamente precárias (HOTEZ et al., 2005b). Essa infecção resulta na perda de 1.825.000 anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life years”- DALYs), (Tabela 2) superando todas as outras doenças parasitárias, com exceção da malária, leishmanioses e filariose linfática (HOTEZ et al., 2004b; HOTEZ et al., 2005b; HOTEZ et al., 2008) .

1.1 – Posição Taxonômica

Os ancilostomídeos pertencem ao Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylidea, Família Ancylostomatidae. Esta se divide em duas subfamílias: Bunostominae, cujas espécies apresentam placas cortantes na cápsula bucal, e Ancylostomatinae, que apresentam dentes na cápsula bucal (BLAXTER et al., 1999; BLAXTER, 2000; BROOKER et al., 2004).

1.2 – Morfologia

Os ancilostomídeos (do grego *ankylos* = curvo + gr. *tomma* = boca) são caracterizados por apresentarem cápsula bucal bem desenvolvida (Figura 1). São distinguidos pela extremidade cefálica curvada dorsalmente e presença de cápsula bucal quitinizada, providas de dentes ou lâminas cortantes que são utilizadas para fixação na mucosa intestinal do hospedeiro (ANDERSON et al., 2000).

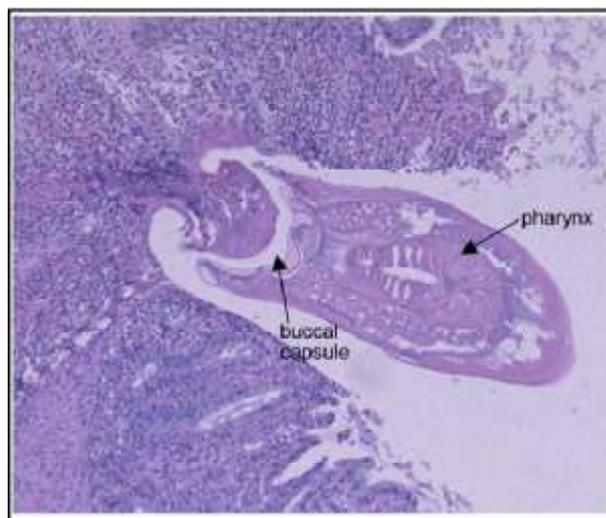


Figura 1 – Secção de jejuno com a porção anterior de *Ancylostoma* preso na mucosa (LOUKAS et al., 2004).

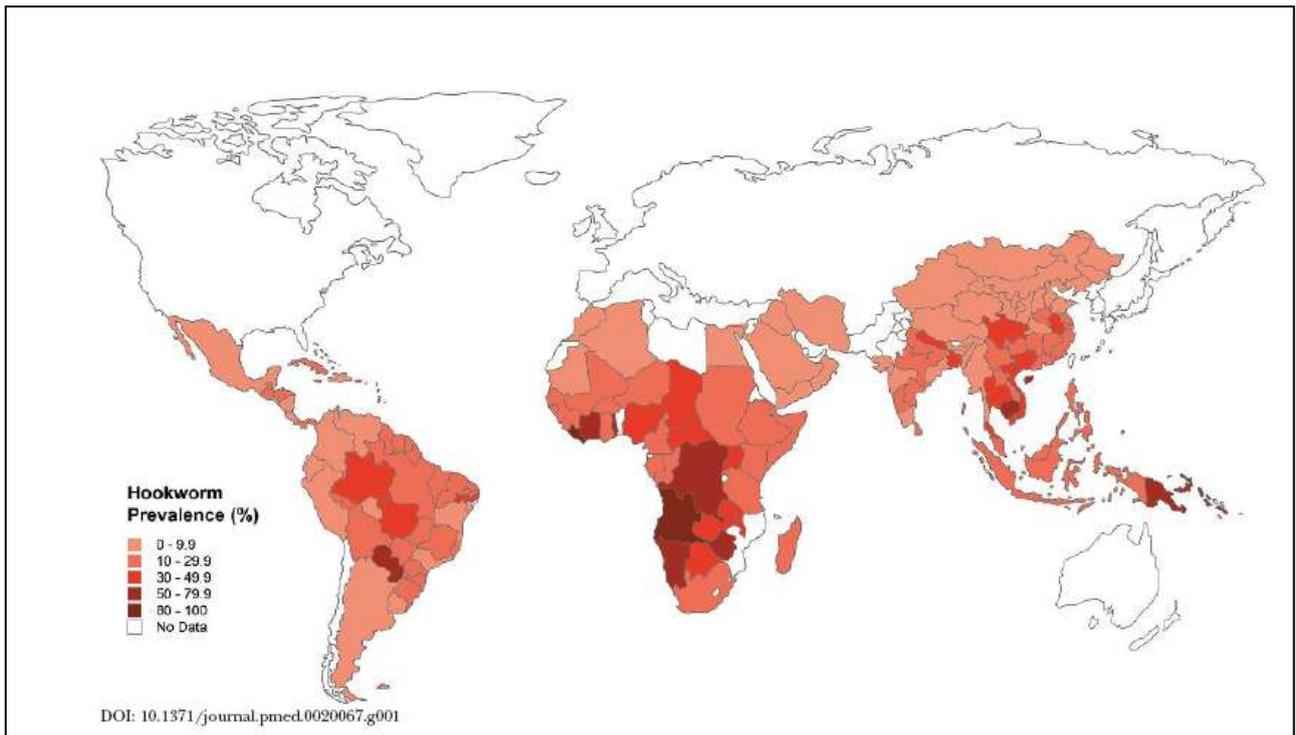


Figura 3- Distribuição Mundial dos ancilostomídeos parasitos do homem

Fonte: HOTEZ et al., 2005b

1.3 – Ciclo Biológico

As fêmeas adultas depositam os ovos na luz intestinal. Estes geralmente passam por quatro a seis estágios celulares quando chegam às fezes do hospedeiro. Em condições adequadas de umidade e temperatura (23–33°C), em um período de aproximadamente 24 horas a larva de primeiro estágio eclode do ovo embrionado. Esta tem aproximadamente 250–300 µm de comprimento com cauda delgada, possui cavidade bucal alongada e esôfago com bulbo. A larva é referida como larva rabditóide, devido à semelhança da morfologia do esôfago em relação a larvas de vida livre, como do gênero *Rhabditis*. A larva rabditóide se alimenta de bactérias e após dois dias sofre muda transformando-se em larva de segundo estágio, que possui 400–430 µm de comprimento, mas com morfologia similar a larva de primeiro estágio (MULLER et al., 2001). A larva de segundo estágio se torna letárgica e o desenvolvimento prossegue para o terceiro e infectivo estágio. O esôfago perde o bulbo com válvula e a cauda se torna relativamente curta e romba. Esta retém a cutícula do segundo estágio, e é conhecida como larva filarióide (MULLER et al., 2001).

Diferentemente dos dois primeiros estágios, a larva de terceiro estágio não se alimenta e sua sobrevivência depende dos nutrientes estocados em seus tecidos. As larvas são ativas, com 500–700 µm de comprimento, e resistentes às condições adversas ambientais. Os ancilostomídeos infectam o hospedeiro pela penetração ativa na pele ou mucosas, após perderem sua bainha, importante descoberta feita por LOOSS (1898) (quando acidentalmente deixou cair água contendo larvas em sua mão). Enzimas liberadas pela larva auxiliam sua passagem pela pele (MULLER et al., 2001). Em poucas horas as larvas entram no tecido subcutâneo, invadem os capilares linfáticos e são carregadas para a região dos nódulos linfáticos, o canal principal do ducto torácico, na circulação geral, e então seguem para o coração e pulmão. No pulmão, as larvas de terceiro estágio penetram nos alvéolos e se desenvolvem em larvas de quarto estágio. O desenvolvimento continua e a larva é carregada, por movimentos ciliares e por muco, para a traquéia; as larvas eventualmente deglutidas alcançam, posteriormente, o intestino. As larvas de quarto estágio, ao chegar no intestino, adquirem uma cápsula bucal provisória que permitem se fixar em sua parede. Durante o desenvolvimento do quarto estágio, a cápsula bucal do adulto se forma posterior e lateralmente a cápsula bucal provisória, enquanto a cutícula é liberada na muda final. Os vermes alcançam o estágio adulto entre duas a sete semanas, dependendo da espécie (Figura 2)

(SOULSBY, 1982; MULLER et al., 2001; ANDERSON et al., 2001). Parasitos do gênero *Ancylostoma* podem fazer a infecção por via oral, através da ingestão de larvas L3 que podem levar a uma infecção patente, algumas larvas se desenvolvem de L3 para L4 na mucosa intestinal, sendo que outras ainda podem penetrar na mucosa até alcançarem os pulmões (LOUKAS & PROCIV, 2001 e BROOKER & BETHONY, 2004).

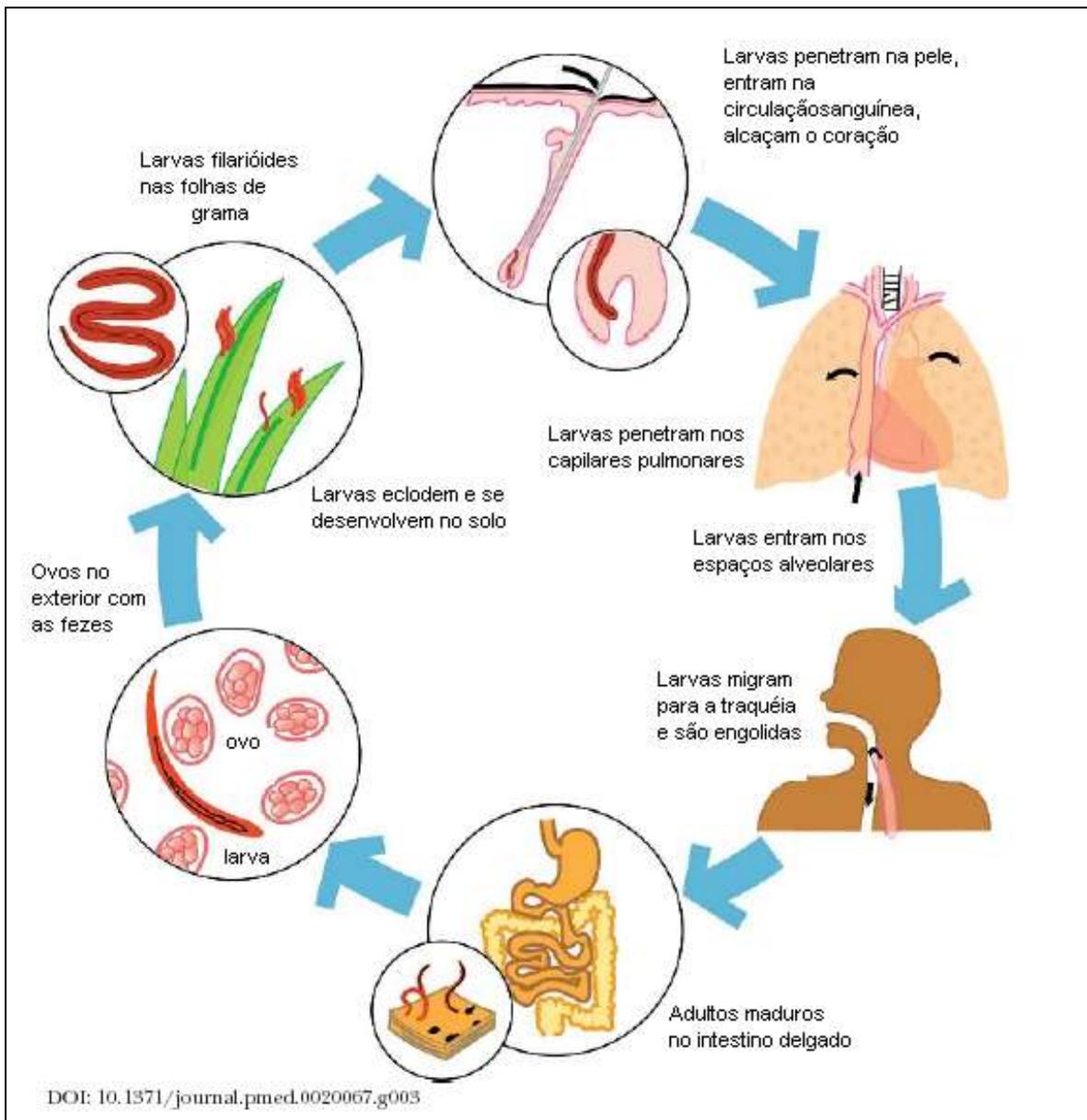


Figura 2 – Ciclo biológico dos ancilostomídeos. Adaptado de HOTEZ et al (2005b).

1.4 - Espécies de Importância Médica

Entre os ancilostomídeos parasitos do homem destacam-se *Necator americanus*, (STILLES, 1902), *Ancylostoma duodenale* (DUBLIN, 1843; CREPLIN, 1845), *A. ceylanicum* (LOSS, 1911), *A. caninum* (ERCOLANI, 1859; HALL, 1913) e *A. braziliense* (DE FARIA, 1910). Destes, *A. duodenale*, *N. americanus* e *A. ceylanicum* completam o ciclo monoxênico no homem (BROWN, 2005; HOTEZ et al., 2005b) e são os principais agentes etiológicos da ancilostomíase humana (HOTEZ et al., 2004a; HOTEZ et al., 2005b). Estas espécies parasitam além do homem, as ordens Carnivora, Primata, Edentata, Rodentia e Suidae (MULLER et al., 2001).

A distribuição original de *N. americanus* localiza-se na região do trópico de Câncer na África, sul da Ásia, leste da Índia, e Ilhas do Pacífico (FAUST, 1949). O parasito foi introduzido nas Américas por escravos e colonizadores da África e de outras regiões do mundo (STOLL, 1923). Os ovos medem 50–80 µm a 36–42 µm e quatro estágios celulares passam nas fezes do hospedeiro. Uma única fêmea do gênero *Necator* produz de 6000-11000 ovos por dia (STOLL, 1923). O desenvolvimento dos ovos e os estádios de vida livre são similares a *Ancylostoma*, mas a temperatura ótima oscila entre 25-58°C. Os ovos de *N. americanus* morrem em temperaturas abaixo de 7°C. As formas infectantes podem ser distinguidas das de *A. duodenale* através das paredes da cavidade bucal que são proeminentes, pelo primórdio genital que se localiza um pouco mais anteriormente e menor e, finalmente, pelo esôfago sendo este amplo e possuindo uma leve constrição no intestino na junção com o esôfago (MULLER et al., 2001). As principais diferenças morfológicas estão ilustradas na Tabela 1. O período pré-patente em humanos varia de 44 a 100 dias. De acordo com KENDRICK (1934) os vermes podem viver de 5-6 anos; PALMER (1955) reportou uma infecção persistente de 15 anos com ausência de reinfeção (MULLER et al., 2001).

A. ceylanicum é parasito do intestino de gatos, cães, roedores e humanos, e sua distribuição se limita em algumas localidades da Ásia. A larva infectante mede 712,1 ± 15,0 µm (MULLER et al., 2001). WIJERS AND SMIT (1966) infectaram voluntários por inóculo cutâneo com *A. ceylanicum*, sendo observado prurido no local de penetração das larvas e desconforto abdominal em 15-20 dias pós-infecção. O período pré-patente varia de 18 a 26 dias em humanos. A larva perde a bainha no intestino 3 horas após a invasão da mucosa intestinal (no caso da infecção oral) e 1 a 2 dias após a infecção se

desenvolve de larva de quarto estágio, que migra para a luz intestinal. Os primeiros ovos são encontrados nas fezes a partir do 14º dia de infecção (MULLER et al., 2001).

Tabela 1- Diferenças morfológicas entre *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*

	<i>Necator americanus</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
Adultos		
Tamanho	♂ 5-9 mm x 0,3mm ♀ 9-11mm x 0,35mm	♂ 8-11mm x 0,45mm ♀ 10-13 mm x 0,6mm
Forma	Cabeça pequena, curvada em direção oposta a curvatura geral	Corpo em forma de arco, cabeça alinhada com o corpo geral
Cápsula bucal	Quase esférica	Alongada, forma de pêra
Boca	Guardada por 2 placas cortantes semilunares	Guardada por dois pares de dentes curvados
Fêmea		
Cauda	Não afiada	Pontiaguda
Vulva	Anterior a porção média	Posterior a porção média
Macho		
Bursa	Estreita e longa	Estendida, mais larga que longa
Raio dorsal	Em forma de fenda, A extremidade de cada raio é dividida em 2	Pouco curvada, A extremidade de cada raio é dividida em 3
Espículas	Extremidades unidas e recurvadas	
Ovos	Extremidades não unidas	
Larvas de 1º e 2º estádios	Indistinguíveis	
Larvas de 3º estágio		
Tamanho	590µm	550 µm
Cauda	Curta e pontiaguda	Longa e romba
Cabeça	Arredondada	Romba
Intestino	Estreitamento entre intestino e esôfago	Não possui estreitamento
Esôfago	Proeminente. Forma de funil	Não proeminente.

Adaptado de Anderson et al., 2001

A ancilostomíase é considerada uma das infecções parasitárias crônicas de maior prevalência no mundo. O número mundial de casos foi recentemente estimado entre 576 e 740 milhões de pessoas infectadas, principalmente residentes em regiões rurais tropicais e subtropicais (DE SILVA et al., 2003; HOTEZ et al., 2005b). A estimativa do número total de casos está ilustrada na Tabela 2.

Tabela 2- Ranking de doenças negligenciadas (DALYs) e comparação com HIV/AIDS, Tuberculose e Malária

Disease	Estimated Global Disease Burden in DALYs	Number of Cases in LAC (Number of Cases Worldwide)	Estimated Percentage of Disease Burden in LAC	Estimated LAC Disease Burden in DALYs	Reference
Hookworm infection	1.5–22.1 million	50 million (576 million)	8.7%	130,500–1,923,000	[17,75]
Ascariasis	1.2–10.5 million	84 million (807 million)	10.4%	124,800–1,092,000	[17,75]
Trichuriasis	1.6–6.4 million	100 million (604 million)	16.6%	265,600–1,062,000	[17,75]
Chagas disease	0.667 million	ND	99.8%	662,000	[18]
Dengue and DHF	0.6 million	ND	11.2%	69,000	[18]
Leishmaniasis	2.1 million	ND	2.1%	44,000	[18]
Schistosomiasis	4.5 million	1.8 million (207 million)	0.8%	36,000	[17,31]
Lymphatic Filariasis	5.8 million	0.72 million (120 million)	0.6%	34,800	[18,33]
Trachoma	2.3 million	1.1 million (84 million)	1.3%	23,200	[18,54]
Leprosy	0.2 million	ND	9.0%	18,000	[18]
Total NTDs	56.6 million		8.8%	1,407,900–4,964,000	
HIV/AIDS	84.5 million		3.8%	3,211,000	[18]
Tuberculosis	34.7 million		2.7%	928,000	[18]
Malaria	46.5 million		0.2%	111,000	[18]

DALYs for each disease in LAC were calculated using global burden data in [17] and [18] and followed by a determination of the percentage of the disease burden in LAC based on the estimated number of cases in LAC (Table 1) divided by the estimated number of cases worldwide [1] multiplied by 100. Alternatively, for Chagas disease, dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), leishmaniasis, and leprosy, information from the disease burdens quoted in [18] were used.
doi:10.1371/journal.pntd.0000300.t002

*LAC: Latin America and Caribbean.

HOTEZ et al., 2008.

1.6 – Patogenia

A morbidade da infecção está diretamente associada à perda de sangue no trato gastrointestinal do hospedeiro, resultante tanto da espoliação sanguínea por vermes adultos e larvas de quarto estágio (MULLER et al., 2000; HOTEZ et al., 2004a) 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., 2005b). Assim, a doença decorrente da infecção é atribuída à perda crônica de sangue, o que leva à anemia ferropriva e hipoproteinemia (ROCHE e LAYRISSE, 1966; FLEMING, 1982; COOPER et al., 1992; BROOKER et al., 2004; HOTEZ et al., 2005b). Apesar da morbidade da ancilostomíase depender da intensidade da carga parasitária, em infecções crônicas a anemia ferropriva e a deficiência de proteínas podem levar ao retardo de crescimento físico, mental e cognitivo (Figura 4) (SAKTI et al., 1999; STOLTZFUS, 2001; JARDIM-BOTELHO et al., 2008); à redução da produtividade no trabalho (BROWN, 2005; HOTEZ et al., 2005b); e à conseqüências materno-fetais adversas (BUNDY et al., 1995; CHAN, 1997; HOTEZ et al., 2005b).

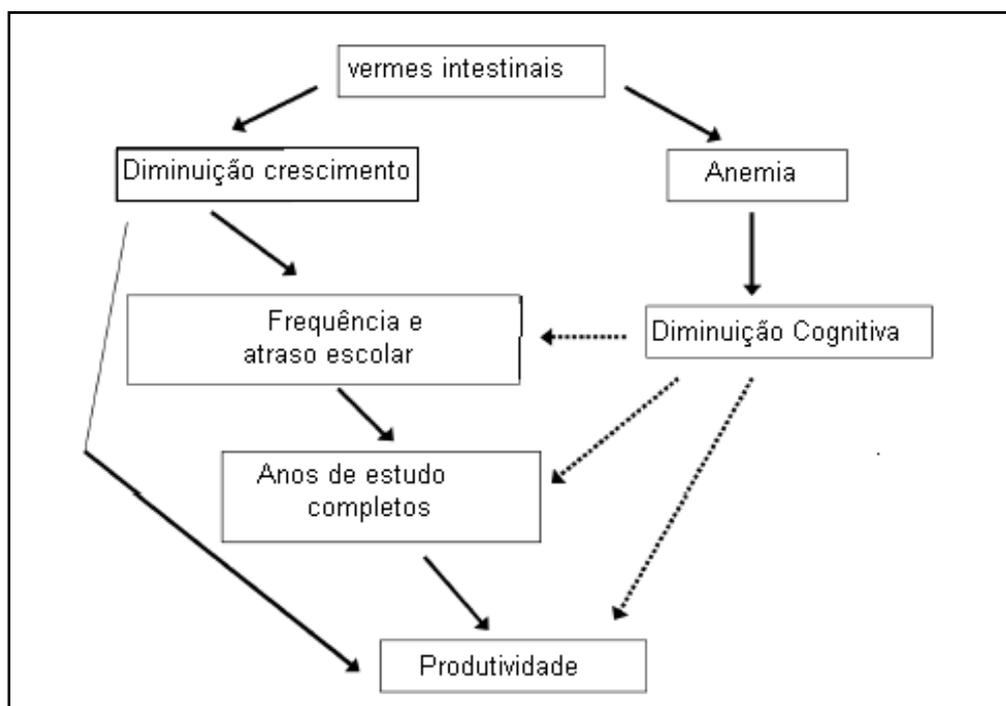


Figura 4- O caminho em que os nematódeos intestinais podem afetar o futuro potencial de produtividade mediante anemia e desnutrição e seus efeitos na função cognitiva e desempenho escolar. A ligação entre função cognitiva e produtividade é menos clara (como indicado nas linhas pontilhadas). Adaptado de BROOKER et al., 2008.

Comparado com outras infecções como a esquistossomose, a infecção por ancilostomídeos exibe um único padrão que relaciona a idade com a intensidade da infecção: onde os picos são encontrados na infância e na adolescência, sendo que a intensidade aumenta constantemente com a idade chegando a um platô na idade adulta. (BETHONY et al., 2002).

A morbidade da infecção é maior em pacientes que abrigam grande número de vermes adultos. Estimativas da intensidade da infecção são tipicamente obtidas pela contagem de ovos nas fezes (HOTEZ et al., 2005b). A Organização Mundial de Saúde (WHO) define infecções de intensidade moderadas em pacientes com 2000-3999 ovos por grama de fezes e infecções de alta intensidade em pacientes com contagem acima de 4000 ovos por grama de fezes (WHO, 2008).

A ocorrência da ancilostomíase em áreas de pobreza e de baixas condições sanitárias dificulta sua erradicação. De fato, na ausência de desenvolvimento econômico, o impacto do sanitarismo, do uso de calçados e da educação em saúde tem sido mínimo (BROOKER et al., 2004). O controle da ancilostomíase preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005; WHO, 2008) é baseado no tratamento em massa periódico das populações afetadas, principalmente de crianças em idade escolar, com drogas anti-helmínticas (HOTEZ et al., 2005b). Apesar dos benefícios do tratamento serem inequívocos, resultando na melhoria da qualidade de vida da população (HOTEZ et al., 2005a; HOTEZ et al., 2005b), seu efeito no controle das ancilostomíases tem sido limitado (BROOKER et al., 2004). Essa limitação tem sido explicada por diversos fatores: (a) baixa taxa de cura após tratamento anti-helmíntico (por exemplo, uma dose única de mebendazol para ancilostomíase apresenta taxa de cura de 21%) (BENNETT & GUYATT, 2000), (b) redução da eficácia dos benzimidazóis (droga padrão no controle da ancilostomíase) com o uso periódico e freqüente (ALBONICO et al., 2003), e (c) alta taxa de reinfecção, geralmente observada poucos meses após o tratamento (ALBONICO et al., 1999). Além disso, uma vez que infecções por ancilostomídeos ocorram tanto em crianças quanto em adultos (BETHONY et al., 2002), a vermifugação de crianças escolares provavelmente não afeta a transmissão na comunidade em que estão inseridas (CHAN et al., 1997). Dessa forma, as limitações observadas no tratamento em massa contra a ancilostomíase levaram à busca de novas alternativas de controle da infecção, como o desenvolvimento de vacinas (BROOKER et al., 2004). Essas vacinas poderiam atuar de forma complementar ao tratamento, melhorando as condições de saúde de populações

residentes em áreas endêmicas. Apesar do desenvolvimento de vacinas ser algo relatado na literatura, o padrão de resposta imune protetor e os mecanismos de evasão da resposta imune desencadeados pelo parasito ainda são pouco esclarecidos (HOTEZ et al., 2006; LOUKAS et al., 2006).

1.7 – Aspectos imunológicos da resposta imune contra ancilostomídeos

Os helmintos parasitos formam uma coleção heterogênea de organismos, com múltiplos mecanismos que podem estimular ou modular a resposta do hospedeiro (WANG et al., 2008). A maioria das infecções helmínticas mostram um perfil de resposta do tipo Th2 (MAIZELS et al., 2004). A infecção por ancilostomídeos apresenta um perfil misto Th1/Th2, com produção de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-12) e também do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (GEIGER et al., 2004; QUINNELL et al., 2004), necessárias para gerar uma imunidade protetora nas infecções por ancilostomídeos (GEIGER et al., 2004; FUJIWARA et al., 2006a).

O conhecimento atual da resposta imune em humanos provém de dados de indivíduos infectados e negativos de áreas endêmicas (GEIGER et al., 2004). Populações naturalmente infectadas apresentam uma forte resposta frente à antígenos. Em geral esta é caracterizada por elevados níveis séricos de anticorpos específicos para antígenos brutos de larvas e antígenos provenientes de produtos de excreção-secreção. (QUINNELL et al., 2004).

Os nematódeos, incluindo os ancilostomídeos, secretam e excretam uma grande variedade de substâncias que possuem potencial imunomodulatório, garantindo a sobrevivência em seus hospedeiros. Em diferentes nematódeos, a injeção de produtos de excreção/secreção (ES) em modelos experimentais demonstrou a indução de uma resposta imune similar à observada durante a infecção com parasitos em modelos animais em laboratório. (ALLEN et al., 1998). Esta resposta inclui a supressão de proliferação celular, sugerindo a capacidade de imunossupressão por produtos ES (LOUKAS et al 2005). A caracterização dos compostos que formam o ES demonstram a presença de diferentes tipos de proteínas incluindo proteases, inibidores de proteases, lectinas C, proteínas anti-oxidantes, anti-inflamatórias, que podem contribuir para a resposta imune atenuada característica da infecção crônica por ancilostomídeos (LOUKAS et al 2001; LOUKAS et al., 2005).

1.7.2 - Padrão de reatividade humoral

Nos indivíduos infectados os anticorpos específicos se mantêm persistentes em altos níveis, e estão presentes todos os isotipos (GEIGER et al., 2004). Os principais marcadores para infecção ativa são IgE e IgG4, específicos para ES de verme adulto, uma vez que estes anticorpos alcançam baixos níveis após tratamento quimioterápico (GEIGER et al., 2004). Pacientes naturalmente infectados por ancilostomídeos em comunidades do Zimbábue apresentaram altos títulos de IgG, IgG1, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, ao serem estimulados tanto com antígenos ES quanto antígeno bruto de larvas (QUINNELL et al., 2005). Geiger e colaboradores (2004) demonstraram que pacientes infectados com *N. americanus* apresentaram alta reatividade para IgG, IgG1, IgG4, IgA e IgE. Pacientes tratados apresentaram reatividade moderadas, enquanto que pacientes negativos de área endêmica apresentaram baixa reatividade. Vale ressaltar que anticorpos anti-ancilostomídeos de todos os isotipos apresentam evidência de reatividade cruzadas com outros helmintos, tais como *Schistosoma mansoni* e *Ascaris lumbricoides* (PRITCHARD et al., 2001); entretanto, respostas a IgG4 e IgE são espécie-específicas. Em infecções por ancilostomídeos, existe uma clara regulação de IgE, acompanhada por aumento de CD23 (receptor de IgE de baixa afinidade), IgG e anticorpos anti-IgE (PRITCHARD et al., 1993).

1.7.3 – Padrão da produção de citocinas e quimiocinas em nematódeos

Estudos em cães confirmam o padrão reportado em humanos, demonstrando a proteção conferida por uma resposta Th2 contra ancilostomídeos (FUJIWARA et al., 2006b). Geiger e col (2008) demonstraram alterações significativas na reatividade celular e secreção de citocinas e quimiocinas durante o período pré-patente e migração da larva, possivelmente para permitir a sobrevivência no trato intestinal, minimizando o processo inflamatório. Durante a migração das larvas, houve queda dos níveis de TNF- α e IFN- γ acompanhados por decréscimo de IL-10 e aumento de CCL17 e IL-13 ao chegar ao intestino. As concentrações de TNF- α e IFN- γ diminuem ocorrendo aumento de IL-10, juntamente com a diminuição da reatividade celular ocorre quando o parasito chega ao intestino, demonstrando claramente a importância de se minimizar a inflamação e a resposta do tipo Th2 (QUINNELL et al., 2004). CCL17 apresenta um papel chave na regulação Th2 mediante inflamação. Em resumo, os níveis de IFN- γ são reduzidos e se associam negativamente com a carga parasitária. Em pacientes

reinfectados, foi reportado que IL-5 apresentou importante papel na redução da infecção (QUINNELL et al., 2004). Indivíduos residentes em áreas endêmicas apresentam altos níveis de IL-10, agindo na regulação da resposta imune.

Em modelos experimentais como *Nippostrongylus brasiliensis*, IL-4 e IL-13 induzem a contratilidade da musculatura lisa intestinal, aumentam a permeabilidade intestinal e a resposta a prostaglandinas do tipo E2, estimulando a secreção de muco. Em adição, IL-13 induz células caliciformes a secretarem RELM- β (Resistin-like molecule $-\beta$) que se liga a estruturas presentes na cutícula interferindo na função quimiotática (ANTHONY et al., 2008; ARTIS et al., 2004).

1.7.4- Mecanismos de evasão à resposta do hospedeiro em nematódeos

Existem vários relatos na literatura que o parasito sobrevive nos hospedeiros por vários anos mesmo frente a uma resposta imune protetora, (LOUKAS E PROCIV, 2001; PRITCHARD E BROWN, 2001; LOUKAS ET AL., 2005), sugerindo a ocorrência de evasão da resposta imune. Apesar deste mecanismo de evasão da resposta imune ser extensivamente relatada na literatura (BROOKER et al., 2004; GEIGER et al., 2004; HOTEZ et al., 2004a; HOTEZ et al., 2005b; LOUKAS et al., 2005b; MENDEZ et al., 2005; BETHONY et al., 2006a; FUJIWARA et al., 2006a; LOUKAS et al., 2006; GEIGER et al., 2007), os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados. As primeiras evidências que demonstraram a evasão da resposta imune pelo parasito vieram da observação de que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam uma redução da resposta proliferativa de linfócitos frente a antígenos do parasito ou mitógenos (TAYLOR e TURTON, 1976; MAXWELL et al., 1987; OLATUNDE e ONYEMELUKWE, 1994; LOUKAS e PROCIV, 2001; MAIZELS et al., 2004; LOUKAS et al., 2005b; GEIGER et al., 2007), e mesmo para antígenos exógenos (OLATUNDE e ONYEMELUKWE, 1994; KALINKOVICH et al., 1998; ONYEMELUKWE e MUSA, 2001), conforme a intensidade da infecção (BETHONY et al., 2006b). Essa redução da reatividade celular seria patente mesmo por breve período (1-4 meses) após tratamento com drogas anti-helmínticas (GEIGER et al., 2004; QUINNELL et al., 2004); a completa restauração da capacidade proliferativa de linfócitos seria observada somente se os pacientes permanecessem livres de infecção por um longo período (KALINKOVICH et al., 1998). Apesar de indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentarem uma redução significativa da frequência de células T

CD3⁺ e T CD4⁺ circulantes (ONYEMELUKWE e MUSA, 2001), ainda não está claro qual subpopulação de linfócitos (ou mesmo de outros leucócitos) seria alvo da modulação causada pelo parasito.

Os mecanismos propostos para explicar a diminuição da capacidade proliferativa de células em outras infecções helmínticas incluem 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; FUJIWARA et al., 2009), apoptose celular (JENSON et al., 2002), 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). Para a ancilostomíase, esses mecanismos foram apenas parcialmente demonstrados por evidências obtidas em estudos epidemiológicos, modelos experimentais ou ainda, em análise *in vitro* (FUJIWARA et al., 2006a). De fato, já foi demonstrado que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam elevados níveis basais de IL-10, e uma maior secreção desta citocina após estimulação de células mononucleares por produtos do parasito (GEIGER et al., 2004; BETHONY et al., 2006a). Além disso, estudos em modelos experimentais mostraram que a produção de IL-10 ocorre após o estabelecimento de vermes adultos no intestino, observado pela patência da infecção (MENDEZ et al., 2005).

Finalmente, a modulação da resposta imune do hospedeiro pelo parasito poderia também ser mediada por outros mecanismos recentemente demonstrados para outras infecções helmínticas, como, por exemplo, pelo mecanismo de macrófagos ativados alternativamente (KREIDER et al., 2007; REECE et al., 2008), pela regulação por histamina (JUTEL et al., 2005; JUTEL et al., 2006a; JUTEL et al., 2006b), 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 ainda pela ação de células Th17 (BETTELLI et al., 2007; DIAZ e ALLEN, 2007; KORN et al., 2007; REECE et al., 2008) e finalmente por células T reguladoras BAECHEER-ALLAN et al., 2001; CHATILA et al., 2005; SHEVACH et al., 2006; DEAGLIO et al., 2007; SAKAGUICHI et al., 1995; YAMAGUCHI et al., 2007). Devido à escassez de trabalhos voltados para o estudo da resposta celular na infecção por ancilostomídeos, nenhuma dessas vias foram ainda demonstradas para a ancilostomíase humana.

1.8 – Células T Reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) foram inicialmente isoladas por Gershon et al. 1970, e descritas por Sakaguchi e colaboradores em 1995, em que suspensões celulares de células T CD4⁺ preparadas de linfonodos e baço de camundongos BALB/cnu⁺ eram depletadas de células CD25⁺ (cadeia α do IL-2R) que ao serem inoculadas em camundongos BALB/cnu/nu (nu/nu atímicos), desenvolviam espontaneamente doenças auto-imunes, como tireoidite, gastrite, insulite, sialodenite, adrenalite, ooforite, glomerulonefrite. A reconstituição das células CD4⁺CD25⁺ em um período limitado após a transferência das CD4⁺CD25⁺ preveniu o desenvolvimento das doenças auto-imunes (SAKAGUCHI et al., 1995).

A presença de células T reguladoras em humanos foi descrita como sendo células caracterizadas pela anergia em resposta a estímulos policlonais, e elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular, através de um mecanismo de contato célula-célula (BAECHER-ALLAN et al., 2001). As células T reguladoras (Tregs) representam cerca de 1 a 3% dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico, são células caracterizadas pela expressão constitutiva de moléculas como o fator de transcrição FOXP3, GITR, CTLA-4 e altos níveis de CD25 (CRUVINEL et al. 2008; SAKAGUCHI et al., 1999; SAKAGUCHI et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2004; CHATILA et al., 2002).

As células T reguladoras são classificadas em células Tregs naturais (nTregs) ou Tregs induzidas (iTregs). BELKAID e cols. ainda subdividem esta população em células produtoras de IL-10 e células produtoras de TGF- β (Figura 5). As Tregs de ocorrência natural estão relacionadas com a manutenção da autotolerância e são de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imunitário (CRUVINEL et al 2008; AECHERT et al., 2005; BELKAID et al., 2002; BELKAID et al., 2000; BELKAID et al., 2010). Estas células estão comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos (SAKAGUCHI et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2004; CRUVINEL et al., 2008) e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e auto-antígenos (CRUVINEL et al., 2008).

O processo de geração das células T reguladoras naturais se inicia quando os tímócitos CD4⁺CD25⁺ são selecionados no timo a partir de interações com peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC-II (ITOH et al., 1999; CRUVINEL et al.,

2008; BELKAID et al., 2010); a seleção positiva destas células depende de interações de alta afinidade com auto antígenos expressos em moléculas de MHC (JORDAN et al., 2001). Uma vez selecionadas positivamente por meio de reconhecimento de alta afinidade de peptídeos próprios, acredita-se que produzam moléculas anti-apoptóticas que as protegem da seleção negativa (MAGGI et al., 2005; CRUVINEL et al., 2008) (Figura 5).

As células T reguladoras induzidas são produzidas na periferia a partir dos linfócitos T naive recém selecionados mediante contato com: citocinas imunomodulatórias (IL-10, TGF- β) a partir de drogas imunossupressivas, ou por células apresentadoras de antígenos (APCs) condicionadas por produtos microbianos (O’GARRA et al., 2004).

Estudos apontam que as células T reguladoras podem inibir as células T através de diferentes mecanismos, tais como: 1- inibição indireta pela modulação da função das células dendríticas (TANG et al., 2006); 2- inibição direta de células por contato célula-célula, ou pela produção de citocinas anti-inflamatórias (MIYARA et al., 2007); 3- produção/secreção das citocinas TGF- β e IL-10, que contribuem para a atividade supressora *in vivo* (von BOEHMER et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que a molécula de CTLA-4, expressa pelas células T reguladoras, induz a expressão de indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que por sua vez degrada o aminoácido essencial triptofano; a carência deste aminoácido inibe a ativação de células T e, ainda, promove sua apoptose (FALLARINO et al., 2003). Finalmente, alguns estudos apontam que a adenosina e a molécula de cAMP contribuem para a atividade supressora das células Tregs (DEAGLIO et al., 2007; BOPP et al., 2007).

Infecções por nematódeos podem induzir e expandir naturalmente a ocorrência de células T reguladoras em humanos e camundongos (CHATILA et al., 2005), sugerindo que o papel destas células esteja associado com a modulação nos processos inflamatórios (BELKAID et al 2005; BELKAID, 2007). Ainda em helmintos, estudos em infecções crônicas com *Schistosoma mansoni* em camundongos demonstram o papel protetor destas células na imunopatologia e que sua remoção aumenta o dano tecidual (HESSE et al., 2004).

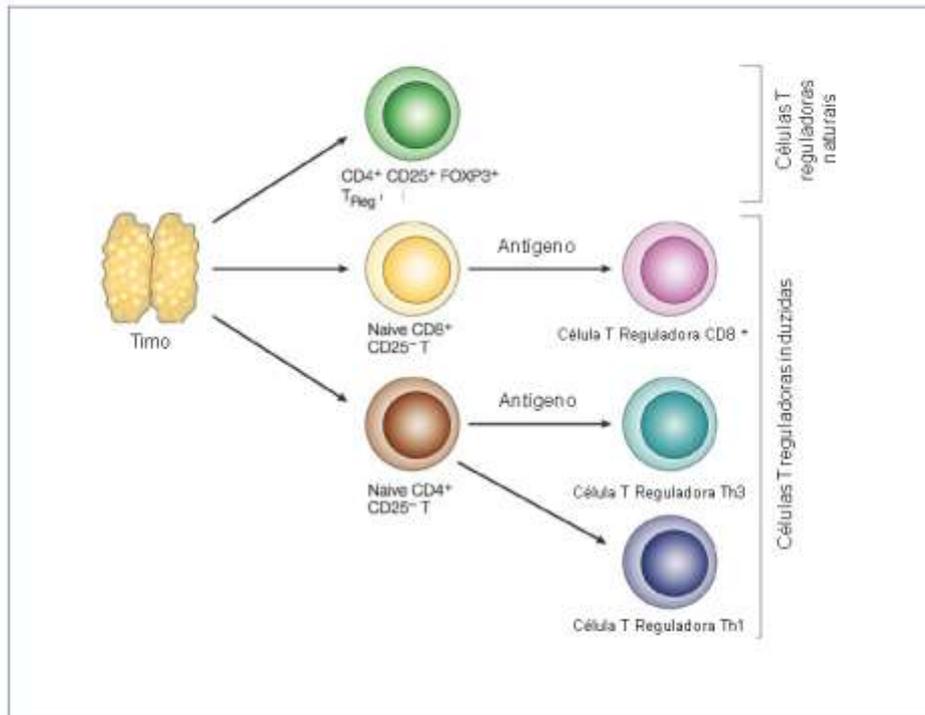


Figura 5- Origem e geração das células T reguladoras (Adaptado de MILLS et al., 2004).

1.8.1 – Características fenotípicas das células T reguladoras

As células T reguladoras podem ser distinguidas fenotipicamente de outras populações celulares devido a expressão de alguns genes associados a regulação. Células T reguladoras possuem os seguintes marcadores: FOXP3 (*Forkhead Box P3*), receptor α do IL-2 (também conhecido como CD25), CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein*), OX40, CD39, CD73 e altos níveis de FR4 (*folate receptor*), CD62L, CD45RO, CD127-, IL-35 (BAECHER-ALLAN et al., 2001), embora até o momento nenhum destes marcadores sejam específicos para as células T reguladoras (BELKAID et al., 2010; CHATILA et al., 2005; SHEVACH et al., 2006; DEAGLIO et al., 2007; YAMAGUCHI et al., 2007).

1.8.2 – FOXP3

O fator de transcrição FOXP3 é o mais definitivo sinalizador de células T reguladoras em camundongos (SHEVACH et al., 2006). A sua expressão em humanos é regulada de forma transiente em células T humanas ativadas (BELKAID et al., 2010). O gene FOXP3 se localiza no cromossomo X e é composto por 11 *exons* (Figura 6).

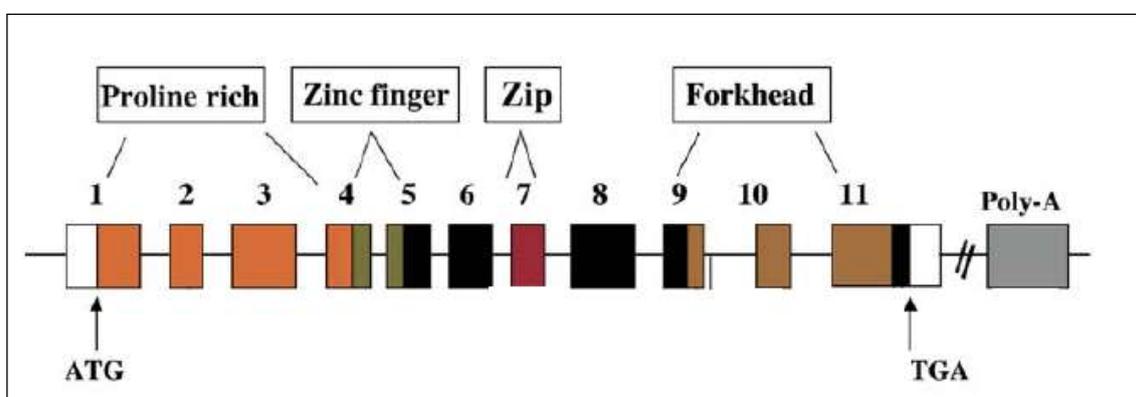


Figura 6 - Organização do gene FOXP3. O gene codificador é composto por 11 exons codificadores e dois exons não codificantes. A posição do códon de início e final da transcrição está indicada pelas setas. O domínio funcional inclui uma região N-terminal rica em prolina (aminoácidos 200-223), um dedo de zinco (aminoácidos 240-261), zíper de leucina (zip), e o domínio *forkhead* (aminoácidos 338-421). Regiões não preenchidas dos exons 1 e 11 representam regiões não traduzíveis (Adaptado de CHATILA et al., 2005).

O fator de transcrição FOXP3 foi identificado originalmente através de suas mutações, onde causa uma síndrome letal ligada ao cromossomo X recessiva denominada de IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked*) e a doença auto-imune denominada XLAAD (*X-linked auto-immunity-allergic dysregulation syndrome*) (CHATILA et al., 2005). Pacientes com IPEX desenvolvem doenças autoimunes, tais como diabetes Tipo 1 e tireoidite, bem como doença intestinal inflamatória e alergias (WILDIN et al., 2002).

Populações celulares onde o marcador FOXP3 é expresso possuem como característica a inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas podemos destacar IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-17 e acentuam a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e de CTLA-4, um inibidor co-estimulatório de Tregs (SHEVACH et al., 2006; CHATILA et al., 2005).

A sequência do gene FOXP3 é polimórfica, e dentre as várias sequências relacionadas na literatura, destacamos a análise de restrição para o SNP IVS9⁺459, que pertence ao cromossomo X, que consiste na troca da seqüência da região 459 do intron 9 do nucleotídeo A→G, (onde A é o alelo selvagem e G é o alelo polimórfico) (Figura 7). Estudos afirmam a possibilidade do alelo G poder alterar direta ou indiretamente o nível de expressão de FOXP3 nas células (GAO et al., 2010). O polimorfismo do gene de FOXP3 pode ocasionar mutações funcionais ou quantitativas, resultando na carência de células T reguladoras funcionais (WILDIN et al., 2002), como já relatado em algumas doenças autoimunes, como diabetes tipo 1 (BASSUNY et al., 2003), cirrose inflamatória biliar, psoríase, dentre outras (PARK et al., 2005; GAO et al., 2010).

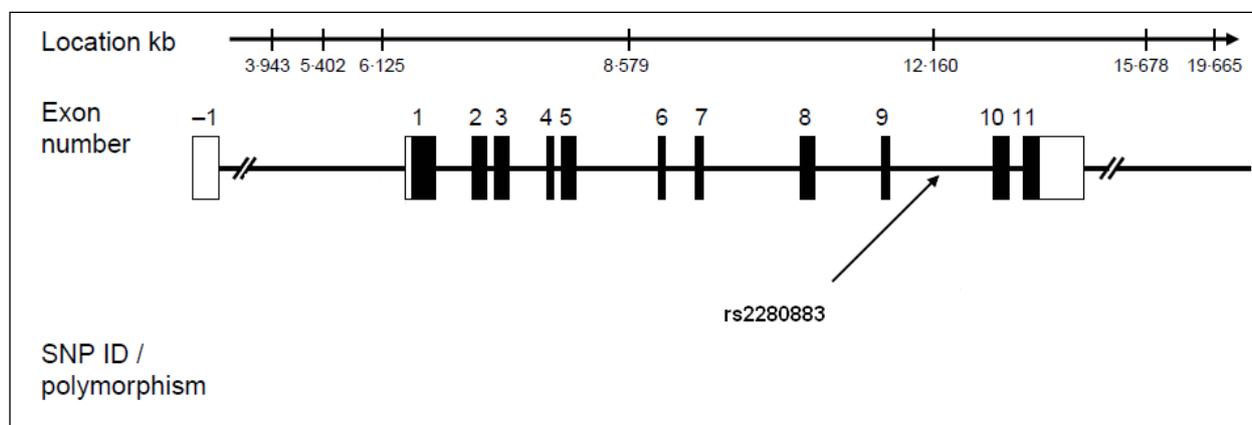


Figura 7 – Localização do SNP IVS9⁺459 (número de acesso rs2280883) (adaptado de GAO et al., 2010).

1.8.3 – CTLA-4

O CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), também identificado como CD152, é uma molécula pertencente à família das imunoglobulinas, com duas cadeias interligadas por ligações dissulfeto e um domínio extracelular variável (IgV) (SCHWARTZ et al., 2002).

Os linfócitos T para se ativarem requerem dois sinais estimulatórios; o primeiro sinal é baseado na apresentação de antígenos pelo MHC com os receptores de linfócitos T (TCR), enquanto o segundo, é proveniente da interação da família dos receptores co-estimulatórios CD28, CTLA-4 e ICOS, presentes na superfície dos linfócitos T (ROTTMAN et al., 2001; SHWARTZ et al., 2002; VAN VEEN et al., 2003). O CTLA-4 interage com as moléculas B7-1 (CD80), B7-2 (CD86). da via co-estimulatória B7/CD28/CTLA-4. A molécula CTLA-4 é expressa apenas em células T ativadas e é considerada um elemento regulatório chave na interação com células apresentadoras de antígeno, uma vez que B7-1 e B7-2 possuem mais afinidade ao CTLA-4 do que CD28; CTLA-4 pode ser considerado como o receptor predominante de B7 em células T ativadas (REISER et al., 1996).

Ainda não está bem estabelecido qual o mecanismo responsável pelo efeito inibitório sobre a ativação das células T. Atualmente, uma das hipóteses levantadas seria que a interação CTLA-4/B7 se realiza por meio de indução da apoptose (GRIBBEN et al., 1995).

O gene codificador para a molécula CTLA-4 encontra-se no cromossomo 2, região 2q33. Dentre vários polimorfismos relatados, destaca-se o polimorfismo pontual (SNP) A→G na posição ⁺⁴⁹, acarretando mudanças na estrutura do peptídeo líder (Thr/Ala) no códon 17 (DJILALISIAH et al., 2010). Este polimorfismo tem sido relacionado à susceptibilidade dos indivíduos desenvolverem doenças autoimunes (KOUKI et al., 2000; NALUAI et al., 2000; MÄRER et al., 2001; DONNER et al., 1997).

1.8.4 – GITR

O GITR (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), também conhecido como TNFRSF18, é um membro da superfamília TNF-NGF (fator de necrose tumoral-fator de crescimento nervoso), expresso em muitas células e tecidos, tais como células T, células

NK (natural killer) e células da imunidade inata (NOCENTINI et al., 2005; NOCENTINI et al., 2007; SHIMIZU et al., 2002). É predominantemente expresso em $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^+CD8^-$ (NOCENTINI et al., 2005). A sua expressão na membrana celular é aumentada pela ativação em células T (NOCENTINI et al., 2005). Esta molécula desencadeia a coativação de linfócitos T efetores e modula a atividade das Tregs (SHIMIZU et al., 2002). Ono e cols (2006) indicam que a sua expressão é regulada por FOXP3, principal marcador das células T reguladoras. GITR é ativado pelo GITR ligante (GITRL), expresso principalmente em APC, e acredita-se que este transmita sinais para o domínio citoplasmático, embora mais estudos sejam necessários para definir sua sinalização bioquímica (NOCENTINI et al., 2005).

A ativação do GITR aumenta a resistência a tumores e infecções virais e também está envolvido em processos autoimunes e inflamatórios, regulando o extravasamento leucocitário (NOCENTINI et al., 2005; SHEVACH et al., 2006). No entanto, mais estudos se tornam necessários para que esclarecer qual o papel da molécula GITR na atividade das células T reguladoras.

1.8.5 – TGF- β

TGF- β 1, β 2, e β 3 são as três isoformas do fator de crescimento tumoral β identificadas em mamíferos. Entre estas isoformas, TGF- β 1 é expresso predominantemente no sistema imune e acredita-se possuir propriedades imunorregulatórias (CHANG et al., 2003). Camundongos deficientes em TGF- β 1 desenvolvem doença autoimune inflamatória e morrem poucas semanas após o nascimento (SHULL et al., 1992). Esta molécula é sintetizada na forma inativa, como pré-pró-TGF- β precursor, sendo que a pro-proteína é denominada de peptídeo associado à latência (LAP). O complexo LAP/TGF- β se liga à proteína latente e o complexo formado é secretado, se ligando ao colágeno e a outras proteínas da matrix. LAP/TGF- β é altamente expresso em Tregs (ANNES et al., 2003; NAKAMURA et al., 2004). TGF- β se liga ao TGF- β R, que ativa o fator de transcrição Smad (formado por Smad2, Smad3 e Smad4). Este complexo é então translocado para o núcleo, onde regula a transcrição dos genes alvo (DERYNCK et al., 2003). Múltiplas funções do sistema imune são reguladas por TGF- β , tais como: supressão da diferenciação de células T helper; conversão de células T naïve em células T reguladoras; inibição da proliferação de células T e B; e, inibição da produção de citocinas efetoras, como IL-2, IFN- γ e IL-

4; supressão de macrófagos, células dendríticas e células NK (YOSHIMURA et al., 2010).

O TGF- β é essencial no mecanismo de supressão do processo inflamatório. Estudos revelam que o TGF- β aumenta a expressão de células T reguladoras (células FOXP3 positivas – iTregs) na presença de IL-2 (CHEN et al., 2003), enquanto que a presença de IL-6 induz a produção “patogênica” de IL-17. O TGF- β inibe a proliferação celular e a produção de citocinas por mecanismos dependentes e independentes de FOXP3. Pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos moleculares envolvidos no mecanismo supressor via TGF- β , entretanto, o fator de transcrição Smad 2/3 tem demonstrado um papel essencial na indução de FOXP3, enquanto que a diferenciação de IL-17 é promovida via independente de Smad (CHEN et al., 2003; SAKAGUCHI et al., 2004; CHANG et al., 2003) (Figura 7). Em células T reguladoras, TGF- β induz sua formação através de células naïve (iTregs) e também atua na manutenção de FOXP3 em células Tregs derivadas do timo (nTregs) (SAKAGUCHI et al., 2004).

Em relação a sua molécula, o TGF- β 1 é sintetizado como uma proteína latente composta por 390 aminoácidos, que na molécula ativa é formada por duas cadeias idênticas de dissulfeto composta por 112 aminoácidos. O gene TGF- β 1 humano localiza-se no cromossomo 19 na região 19q13 e contém sete éxons (LAWRENCE et al., 1996) (Figura 8).

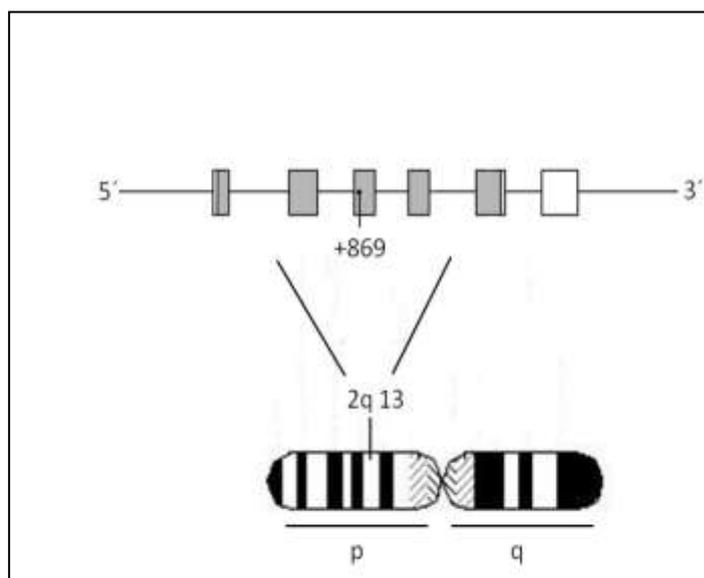


Figura 8- Esquema da estrutura do gene TGF- β 1. Este localiza-se no cromossomo 19 na região 2q13. Acima podemos observar a estrutura do gene, onde as áreas cinzas

representam as regiões codificadoras e as áreas brancas as regiões não codificantes. O esquema também representa a região ⁺⁸⁶⁹ (número de acesso rs 1982073), que corresponde a sequência polimórfica avaliada. Figura do autor.

Muitos polimorfismos para o gene TGF- β 1 tem sido relatados e certos alelos polimórficos sugerem a associação com elevados níveis de TGF- β 1 in vitro e in vivo (AWAD et al., 1998). Dentre as várias sequências polimórficas destacadas na literatura, encontramos o polimorfismo funcional TGF- β 1 ^{+869C/T}, sendo este um polimorfismo funcional associado com altos níveis circulantes de TGF- β 1 que podem, em última análise modular o microambiente celular (TEIXEIRA et al., 2010). Este polimorfismo é responsável pela substituição do aminoácido timina por citosina na região 29 do códon 10 (número de acesso rs 1982073). Esta variação está localizada no núcleo hidrofóbico do peptídeo sinal, resultando na substituição de uma leucina hidrofóbica por uma prolina neutra, sendo portanto esta substituição responsável pelos altos níveis circulantes de TGF- β 1 (GRAINGER et al., 1999; YOKOTA et al., 2000) (Figura 8).

1.8.6 – IL- 10

A interleucina 10 (IL-10) tem papel crucial na prevenção dos processos inflamatórios e de patologias autoimunes. IL-10 é uma citocina com propriedades antiinflamatórias e possui papel central em processos infecciosos, através da limitação da resposta imune a patógenos e assim prevenindo danos ao hospedeiro (O’GARRA et al., 2010). É produzida em linfócitos T do tipo Th2 e por macrófagos ativados (MOORE et al., 2001). Células apresentadoras de antígeno, sob ação da IL-10, sofrem uma regulação negativa da expressão de moléculas das vias estimulatórias e costimulatórias como MHC-II, IL-12, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7), CD86 (B7-2). Vários estudos demonstram que IL-10 provoca inibição dos macrófagos ativados, por meio da regulação negativa de IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- α , além de agir como antagonista do IFN- γ (MOORE et al., 2001). Estudos também demonstram que esta citocina inibe a proliferação de linfócitos T, assim como o desenvolvimento de células T citotóxicas antígeno-específicas (BEJARANO et al., 1992).

Células T reguladoras produtoras de IL-10 (também conhecida como Tr1) se desenvolvem a partir de células T após como sinais específicos, tais como exposição à APC desativadas ou imaturas, exposição à antígenos, ou à própria molécula de IL-10 (O’GARRA et al., 2010; RONCAROLO et al., 2006). Interessantemente, células Tr1

podem ser geradas de células T naïve na presença de células dendríticas estimuladas com fosfatidilserina de *S. mansoni* (VAN DER KLEIJ et al., 2002).

O gene IL-10 humano está localizado no cromossomo 1 e tem sido mapeado na junção entre 1q31 e 1q32 (KIM et al., 1992). O promotor do gene IL-10 é altamente polimórfico e a correlação entre o alelo polimórfico A na posição -1082 G/A (rs1800896) está associado com baixa produção de IL-10, conforme descrito por Koch et al. (2001).

1.9 – Células Th17

As células naïve, sob processo de ativação, se diferenciam em células T efetoras com funções e padrões de citocinas específicas. O paradigma Th1/Th2 tem sido reavaliado para incluir uma terceira população de células T efetoras produtoras de IL-17 denominadas de Th17 (KORN et al., 2007).

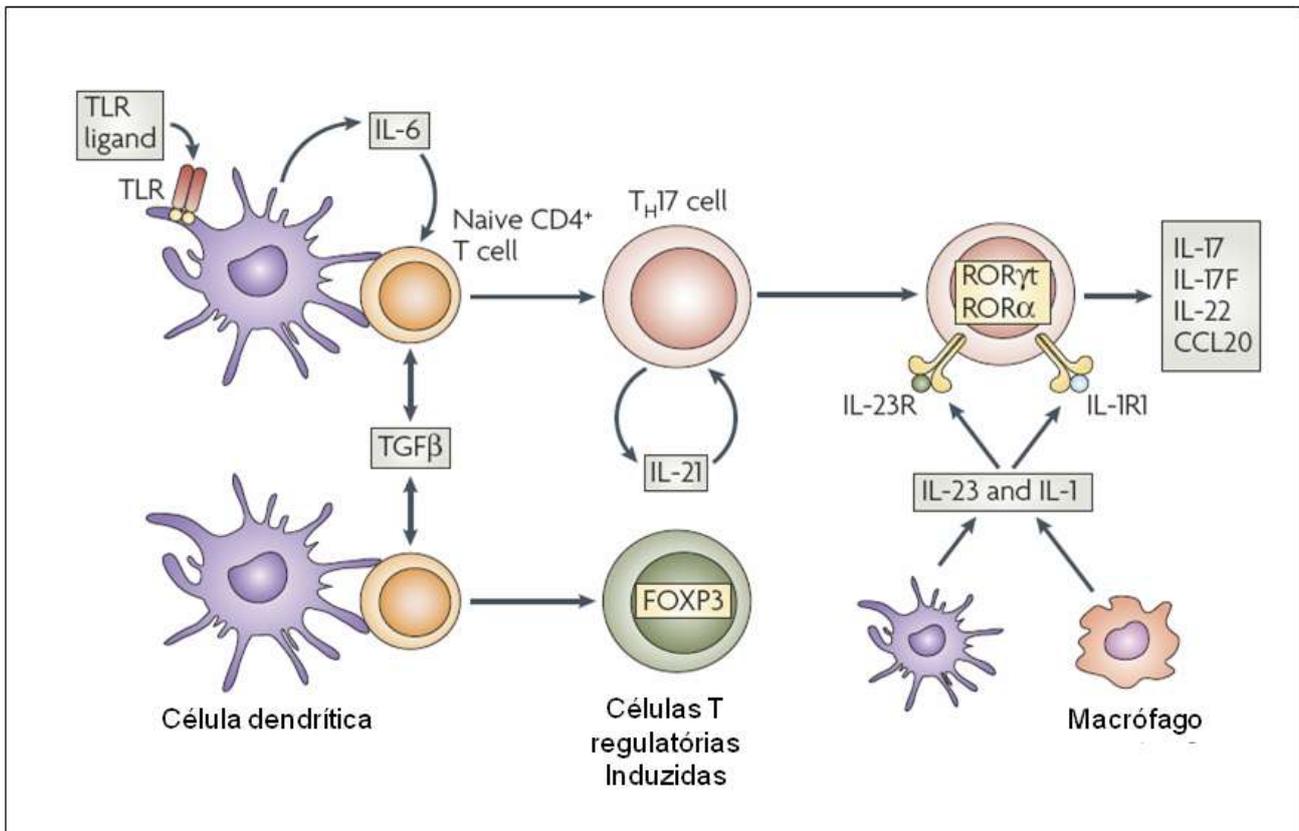


Figura- 9 Origem e ativação das células Th 17. Adaptado de Dong et al 2008.

As células Th17 representam uma subpopulação das células T CD4⁺ definidas pela produção de IL-17, IL-6, IL-21e IL-22 e ausência de expressão de IFN- γ ou IL-4 (WEAVER et al., 2009), que podem mediar a inflamação crônica em doenças autoimunes como encefalites e artrite (HARRINGTON et al., 2006). A elucidação dos fatores promotores de desenvolvimento como TGF- β , IL-6 e IL-21 (BETTELLI et al., 2006) estabeleceram as células Th17 como um terceiro tipo de células efetoras (WEAVER et al 2007), onde a resposta Th17 é protetora contra algumas infecções bacterianas e fúngicas (O'CONNOR et al., 2010) Esta população celular também se distinguem de outras células T não apenas por sua expressão gênica e regulação, mas também por suas funções biológicas. Células Th17, através da produção de IL-17 e de IL-17F são

conhecidas por apresentarem perfil pro-inflamatório, possuindo papel importante na defesa do organismo contra infecções, pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos no local da infecção (DONG et al., 2008). As células Th17 são estimuladas por IL-23, uma citocina formada por um heterodímero composto pelas subunidades IL-12p40 e IL-23p19 (BETELLI et al., 2007; HARRIGTON et al., 2006; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Estudos recentes apontam que IL-6, TGF- β e IL-21 são responsáveis pela diferenciação das células Th17, e que IL-23 está ligada à sobrevivência e expansão destas células (WEAVER et al 2007).

IL-17 pertence a uma família de citocinas recentemente descritas que compreendem: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (AGGARWAL et al., 2002; MOSELEY et al., 2003). Os receptores relacionados identificados até o momento são: IL-17R, IL-17RH1, IL-17RL (receptor like), IL-17RD e IL-17RE. Entretanto, os ligantes específicos de muitos destes receptores ainda não estão totalmente estabelecidos (MOSELEY et al., 2003).

Em infecções helmínticas, como *S. mansoni*, a exarcebação da patologia induzida pela produção de ovos está associada a elevados níveis de IL-17 que ocorrem após a imunização com SEA (antígenos derivado de ovos de *S. mansoni*), sugerindo IL-17/IL-23 possuem um papel chave no desenvolvimento da infecção grave (RUTITZKY et al., 2005; BETTELLI et al., 2007). É importante salientar que ainda não existem relatos na literatura a relacionados a células Th17 em infecções por ancilostomídeos, bem como ainda é escasso o número de informações em infecções helmínticas.

1.10- Polimorfismo genético e suas implicações na resposta imunológica contra helmintos

O polimorfismo é caracterizado quando há dois ou mais genótipos, em uma população com tal frequência que o mais raro não poderia ser mantido apenas por mutação recorrente. (LEWIN, 1997). Um locus é considerado polimórfico se o alelo raro tem frequência de pelo menos 0,01% e os heterozigotos portadores desse alelo ocorram numa frequência superior a 2%. Cerca de 1/3 dos loci gênicos humanos são polimórficos (LEWIN, 1997; MAIZELS et al., 2009).

Os genes do sistema imune são excepcionalmente polimórficos, refletindo em parte a seleção por diversidade e pela variação rápida dos patógenos, mas também pela necessidade do balanço para eliminação contra o risco de reações auto-destrutivas (MAIZELS et al., 2009).

Atualmente, têm sido reportados na literatura, vários trabalhos enfocando polimorfismos associados à resposta imunológica contra helmintos. Na resposta imune em humanos contra *S. mansoni*, Gatlin e cols, identificaram polimorfismo para IFN- γ (região 874), IL-13, (região 21055) e IL-4 (região 2590); Chevillard e cols (2010) identificaram sequências polimórficas para IFN- γ (regiões 2109 e 3810), associadas à fibrose hepática grave; Abbas e cols verificaram a relação entre polimorfismos para IL-10 (regiões -1082, -819 e -592) e a ocorrência em pacientes com Hepatite C em pacientes co-infectados ou não com *S. mansoni*. Em relação ao parasito, Ramos e cols identificaram sequências polimórficas para a sequência candidata à vacina Sm14.

Na infecção por *Onchocerca volvulus*, Ali e cols em 2003 investigaram a ocorrência da associação entre polimorfismo de CD32 e a ocorrência de oncodermatite grave. infecção humana por *Schistosoma japonicum*, HE e cols (2007), identificaram a associação do polimorfismo entre a sequência reguladora STAT6 e alto níveis de infecção; Ellis e cols (2007) investigaram a relação entre SNPs presentes no gene codificador de IL-5 e infecção assintomática. Em infecções por *Ascaris lumbricoides*, foi demonstrado que polimorfismos de LIG4, TNFSF13B e IRS2 influenciam nos níveis séricos de IgE e IgG durante o processo infeccioso (ACEVEDO et al., 2009); interessante, variantes da sequência reguladora STAT-6, estão associados com alta incidência de asma e ao mesmo tempo diminui a susceptibilidade à infecção por *Ascaris lumbricoides* (MOLLER et al., 2007).

Entre pacientes infectados por filarídeos, foi identificado por Debrah e cols (2006) polimorfismo presente no gene VEGF-A em *Wuchereria bancrofti*; ainda para

W. bancrofti; Hoti e cols (2009) associaram o polimorfismo da sequência alergênica gp15/400 em áreas endêmicas na Índia; interessante, foi identificado por Hise e cols (2007), o polimorfismo para sequências gênicas TLR-2 e TLR4 que está correlacionado com a susceptibilidade à infecção humana.

Finalmente, em *Echinococcus granulosus* foi verificado que o polimorfismo para as sequências TAP1 e TAP2 (transportador de peptídeos antigênicos) estão relacionados com a susceptibilidade da infecção em crianças na Turquia (KIPER et al., 2010).

A associação da expressão de variantes polimórficas com carga parasitária e patogenia da infecção permitiria o melhor entendimento da relação parasito hospedeiro, observando o papel deste último no sucesso da infecção ou instalação da doença.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

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 papel em processos vacinais contra a ancilostomíase ou mesmo contra outras infecções (MAIZELS et al., 2004). Assim, para garantir sua sobrevivência no hospedeiro, os ancilostomídeos estabeleceriam um sítio de “privilégio imune” em seus arredores, permitindo a inibição de qualquer função da resposta imune localizada mesmo em face de um desenvolvimento de resposta imune sistêmica contra o parasito (PRITCHARD & BROWN, 2001).

As estratégias até então investigadas para explicar o mecanismo de imunomodulação em infecções helmínticas incluem 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; FUJIWARA et al., 2009), apoptose celular (JENSON et al., 2002), indução da enzima óxido nítrico sintase (DAI e GOTTSTEIN, 1999), e de citocinas pró- e anti-inflamatórias (SEMNANI et al., 2003) ação de células T reguladoras (TAYLOR et al., 2005) e de células Th17 (BETELLI et al., 2007). Para a ancilostomíase, esses mecanismos foram apenas parcialmente demonstrados por evidências obtidas em estudos epidemiológicos, modelos experimentais ou ainda, em análise *in vitro* (FUJIWARA et al., 2006a). Além disso, ainda não foi totalmente esclarecido se a modulação da resposta imune na ancilostomíase seria decorrente da presença e ação de produtos do parasito, da expressão polimórfica de genes associados a resposta imune por parte do hospedeiro, ou de ambos fatores.

O presente trabalho propõe esclarecer o papel das células T reguladoras e das células Th17 no processo de infecção por ancilostomídeos, observando a modulação da resposta imunológica do hospedeiro desencadeados pela presença do parasito e ainda, por fatores relacionados ao hospedeiro. Este estudo poderá contribuir substancialmente para o entendimento da biologia da infecção por ancilostomídeos e seus mecanismos de sobrevivência no hospedeiro, que até então é ainda está carente de informações mais precisas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar o papel das células T reguladoras e das células Th17 frente ao processo de modulação da resposta imune causada por ancilostomídeos na infecção humana.

3.2 – Objetivos Específicos

3.1.1 Avaliar a capacidade proliferativa de populações específicas de linfócitos circulantes de pacientes infectados por ancilostomídeos estimuladas por antígenos excretados-secretados e bruto de vermes adultos, em culturas de sangue total e em culturas celulares adicionadas/depletadas de células T reguladoras;

3.1.2 Avaliar o perfil e níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, e IL-23) em sobrenadantes de culturas de PBMCs de pacientes infectados por ancilostomídeos, após exposição aos antígenos do parasito;

3.1.3 Avaliar a ocorrência de polimorfismos relacionados às principais citocinas e marcadores das células T reguladoras, tais como IL-10, TGF- β , CTLA-4, FOXP3;

3.1.4 Investigar níveis de IL-17, em sobrenadantes de culturas de PBMCs de pacientes infectados por ancilostomídeos após exposição aos antígenos do parasito e correlacionar estes achados com citocinas associadas à imunorregulação;

3.1.5 Avaliar a capacidade proliferativa de populações específicas de linfócitos circulantes de pacientes infectados por ancilostomídeos expressando IL-17 em culturas de sangue total estimuladas por antígenos excretados-secretados e bruto de vermes adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi realizado de acordo com o descrito na Figura 10.

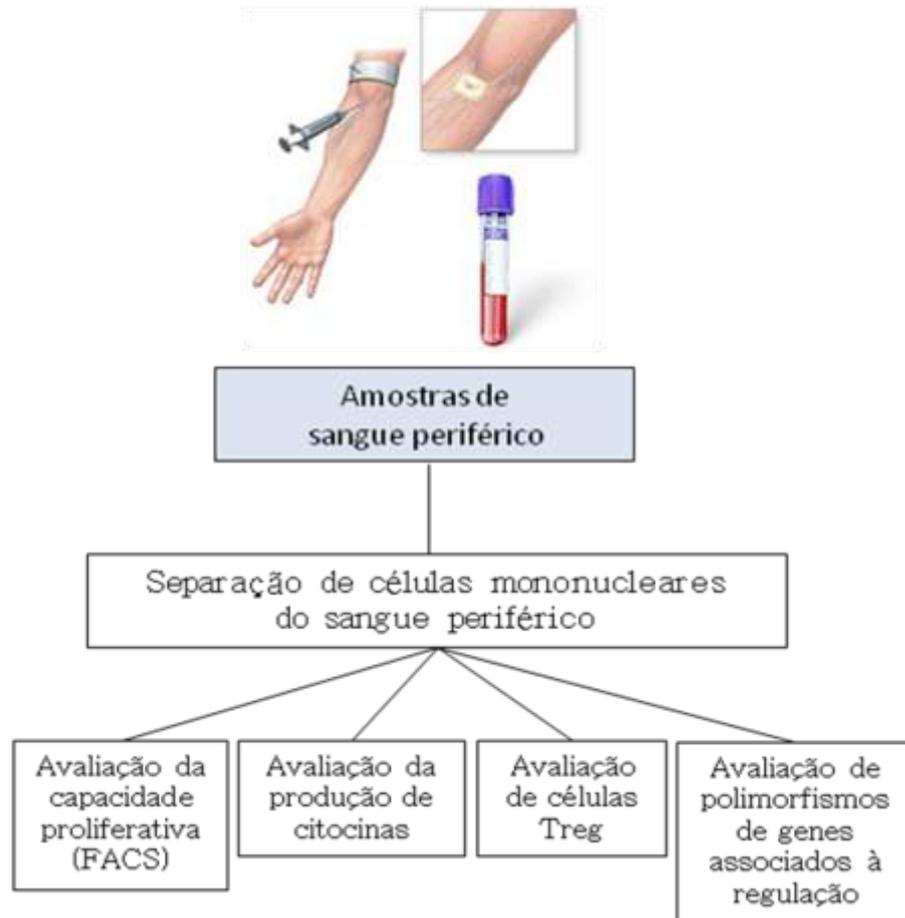


Figura 10- Delineamento experimental destacando os principais procedimentos realizados.

4.1 – Parasitos

A cepa de *A. ceylanicum* é mantida no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. Esta cepa foi utilizada para preparações antigênicas (antígenos excretados-secretados e extrato bruto de vermes adultos) utilizadas na avaliação da resposta imunológica.

4.2 – Manutenção dos parasitos

4.2.1 –Manutenção de *A. ceylanicum*

Para manutenção da cepa de *A. ceylanicum* foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), 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 à 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 12%. Foi fornecido ração granulada balanceada (Labina, Cargill Nutrição Animal) e água potável *ad libitum*. Os animais foram submetidos previamente ao tratamento oral com 4 mg/kg de Ivermectina (Chemitec Agro) por 7 dias consecutivos (KLEMENT et al., 1996).

Larvas de terceiro estágio (L3) de *A. ceylanicum* foram isoladas vinte e oito dias após infecção oral com inóculo de 50 larvas. Após contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) pela técnica de McMaster, as fezes foram submetidas à coprocultura. Esta foi realizada sob incubação a 26°C por cinco dias, quando foi realizado o exame de Baermann-Moraes modificado (BARCANTE et al., 2003) para recuperação das larvas L3. Quarenta dias após a infecção, os animais infectados foram eutanasiados por injeção letal de anestésicos. O intestino delgado foi retirado e aberto em placa de Petri contendo solução salina (PBS) para recuperação de vermes adultos. Os procedimentos para manutenção das cepas foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Parecer CETEA 066/2008).

4.3 – Produção de antígenos

Para a produção de antígenos excretados-secretados (ES), vermes adultos de *A. ceylanicum* foram distribuídos em diversos poços de uma placa de cultura de 8 poços (NUNC, EUA), os quais foram completados com 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen, EUA) e 2% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Estados Unidos). As culturas foram mantidas em uma atmosfera úmida a 37 °C e 5% CO₂. Após incubação, sobrenadantes de culturas foram coletados (produtos ES de adultos), centrifugados a 14000 rpm por 3 minutos e filtrados em filtros de seringa 0,22 µm (PVDF, low-protein binding; Millipore EUA). Os produtos ES serão posteriormente armazenados a - 70 °C até o seu uso.

Vermes adultos remanescentes do cultivo de antígenos ES foram utilizados na obtenção de extratos bruto do parasito. A produção do extrato foi obtida pela maceração mecânica do parasito por macerador de tecidos (Tissue Grinder, Fisher Scientific EUA) seguido da separação de debris por centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. O sedimento foi então descartado e os sobrenadantes armazenados a - 70 °C até o seu uso.

A quantidade de proteínas em todas as preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce BCA kit, Pierce EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

4.4 – População do estudo

O estudo foi conduzido com amostras provenientes da área endêmica para ancilostomídeos localizada em Virgem das Graças, área rural do município de Ponto dos Volantes, localizado no Vale do Jequitinhonha Estado de Minas Gerais, e da cidade de São Pedro, localizado na mesma região, conhecida como uma das áreas mais pobres do país (Figura 11). Nestas regiões, a transmissão potencial de geohelmintos é elevada, pois o saneamento básico é inexistente, e as condições de higiene são precárias (GAZZINELLI et al., 2006).

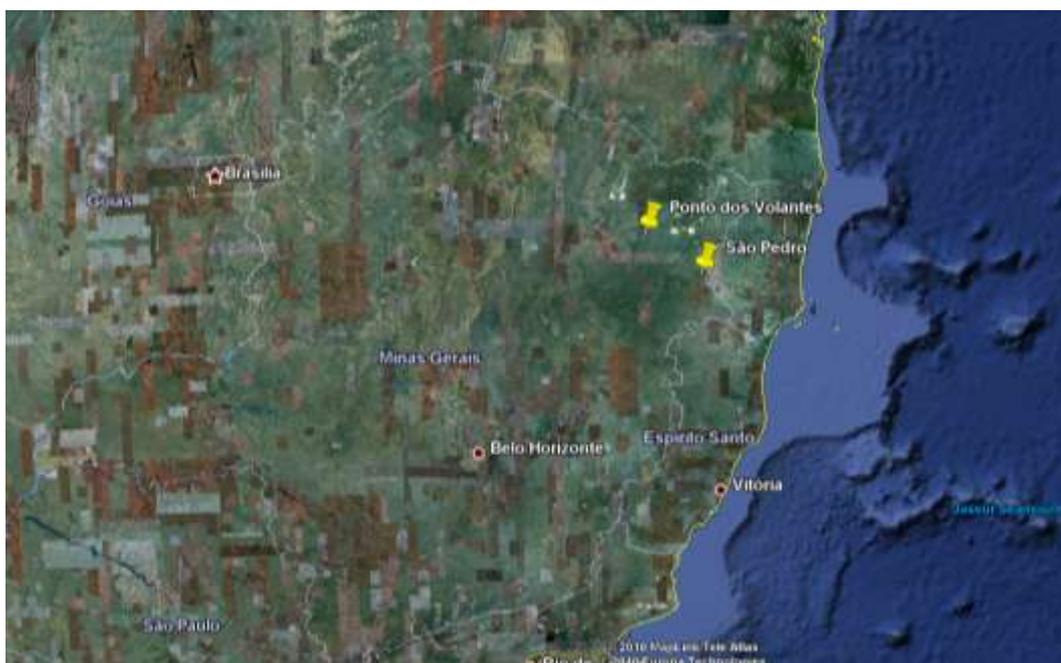


Figura 11- Localização geográfica da população de estudo (Fonte: Google Earth acessado em 08/2010).

A presença da infecção foi determinada pela técnica de sedimentação por formalina-éter (RITCHIE et al., 1972) e, se positiva, duas amostras adicionais de fezes foram analisadas pela técnica de esfregaço fecal Kato-Katz (KATZ et al., 1972); a carga parasitária foi expressa em ovos por grama de fezes (opg). Foram consentidos entre 80 a 120 indivíduos residentes na área endêmica e que apresentem infecção moderada ou alta (BROOKER et al., 2004; BETHONY et al., 2006a). O mesmo número de doadores saudáveis, residentes em Belo Horizonte (Minas Gerais) e não expostos à infecção por ancilostomídeos, foi selecionado como controle. Em caso de diagnóstico positivo para helmintos, todos os pacientes foram tratados com Albendazol, dose oral única de 400

mg. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou/FIOCRUZ (Parecer CEPESH/CPqRR #04/2006) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer ETIC 0449.023.000-09). Termos de consentimento livre e esclarecido foram obtidos de todos os voluntários participantes do estudo.

4.5 – Separação de células mononucleares do sangue periférico

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). O plasma obtido após separação celular foi armazenado a –70°C para determinação da presença de anticorpos. Ao final, as células foram ressuspendidas para 1 mL, com a contagem das mesmas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Trypan (Sigma, EUA).

4.6 – Culturas de células mononucleares do sangue periférico

5×10^6 células mononucleares do sangue periféricos (PBMCs) foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ em placas de 24 poços, em duplicatas, na presença ou ausência dos antígenos do parasito (produtos ES e extrato bruto de vermes adultos), na concentração de 5 µg/poço, em meio RPMI 1640 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA), 3% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Sigma, EUA). Culturas adicionais com estimulação por mitógeno (PHA, Sigma, EUA) na concentração de 2,5 µg/poço, e estimulação por 3 dias a 37°C e 5% CO₂ foram realizadas para determinação da viabilidade celular.

4.7 – Detecção de proliferação celular em populações específicas de linfócitos por CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)

Para detecção de proliferação celular, as culturas de PBMCs foram estimuladas por 4 dias com antígenos de *A. ceylanicum* (produtos ES e extrato bruto de vermes adultos). Os PBMCs foram marcados com aproximadamente 5 µg/mL de CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Vybrant™ CFDA-SE Cell Tracer Kit, Molecular Probes, USA) para cada 1×10^7 células, conforme protocolo descrito pelo fabricante.

4.8 – Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas

As citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β, TNF-α, IFN-γ, IL-12p40/IL-23, IL-17 e IL-23 foram detectadas e quantificadas nos sobrenadantes de culturas de PBMCs, através da técnica de ELISA utilizando-se kits comerciais anti-citocinas humanas (R&D Systems, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 – Determinação do perfil de células reguladoras e células Th17, e avaliação funcional após estímulo de PBMCs com antígenos de *A. ceylanicum*

Culturas de sangue total na presença de antígenos de *A. ceylanicum*, foram incubadas por 48 horas em 37°C/5% CO₂. Nas últimas 4 horas de cultura foi acrescido 10 µg/mL de Brefeldin A (Sigma, EUA). Após tempo total de incubação, as células foram marcadas com anticorpos específicos para CD4 e CD25 por 30 minutos e à temperatura ambiente, protegidas da luz. As células foram então permeabilizadas em PBS contendo 0,5% de saponina (Sigma, EUA) por 15 minutos. Finalmente, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais reativos a IL-10, CD152/CTLA-4, GITR, TGF-β, IL-17, IFN-γ e FOXP3 marcados com fluorocromos (CD4 PerCP, CD25 FITC, FOXP3 APC, IL-17 PE, IL-10 PE, TGF-β PE, GITR PE, CTLA-4 PE (BD Biosciences, EUA). Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience), selecionando-se as populações de linfócitos ou monócitos. Trinta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software Cell Quest

(BD Biosciences, EUA). Controles isotípicos, marcados com FITC, PE, PE-Cy5 e APC, foram usados em todos os experimentos.

Para a avaliação funcional, linfócitos $CD4^+CD25^+$ foram isolados com auxílio da técnica de MACS (magnetic activated cell sorting). Em resumo, a população de interesse foi magneticamente marcada com microesferas anti-CD4 e anti-CD25 (Miltenyi Biotec EUA). Em seguida, a suspensão celular foi submetida a um campo magnético de um separador MACS (QuadroMACS®, Miltenyi Biotec, EUA). Células não marcadas passaram pela coluna e foram agrupadas para posterior utilização. Após remoção da coluna do campo magnético, as células magneticamente retidas foram eluídas (PBS pH 7,2 com 0,5% BSA e 2 mM EDTA), lavadas (PBS) e contadas em câmara de Neubauer. A população de células $CD4^+CD25^+$ obtidas alcançou 90% de pureza, conforme representado na Figura 12:

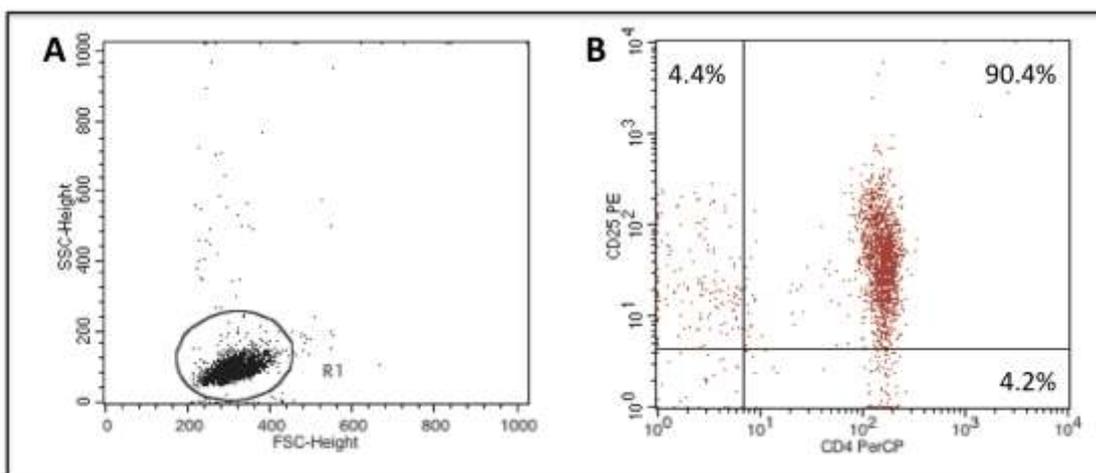


Figura12- Em A, FACS plot com gate representativo da população de linfócitos. Em B FACS plot representando no eixo Y as células marcadas com $CD25^+$ e o eixo X as células $CD4^+$. O gráfico B representa as células $CD4^+CD25^+$, com pureza equivalente a 90,4%. Dados adquiridos com o programa CellQuest (BD Biosciences, EUA) (RICCI et al., 2011).

Células $CD4^+CD25^+$ foram co-incubadas (50.000 células) com uma proporção de 1:10 PBMCs autólogos estimulados por mitógenos e antígenos do parasito, em ambiente de 37°C e 5% CO₂, por 3 (mitógeno) e 6 (antígenos) dias de incubação. A proliferação de PBMCs foi avaliada por marcação celular, utilizando-se CFDA-SE (Molecular Probes, EUA), conforme as instruções do fabricante. As células agrupadas

que foram recuperadas na coluna magnética, denominadas de PBMCs depletadas de células CD4⁺CD25⁺ (PBMCd), foram incubadas tal como descrito para os PBMCs autólogos.

4.10 -Estudo da ocorrência de polimorfismos pela técnica de RFLP- Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição

4.10.1 – Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de sangue total de pacientes de positivos e negativos para infecção por ancilostomídeos. O DNA foi extraído utilizando-se o kit Wizard (Promega, EUA), conforme instruções do fabricante, e armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

4.10.2 — Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado e avaliado quanto à sua concentração (ng/μL) e à sua pureza por meio da densidade óptica, através da relação dos comprimentos 260/280 nm, em espectrofotômetro *Nanodrop*® ND-1000 (Thermo Scientific, EUA). O DNA posteriormente foi quantificado quanto à sua qualidade por meio da análise em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta, e as amostras foram comparadas aos padrões, determinando as concentrações aproximadas e o nível de degradação em cada amostra.

4.10.3 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização da técnica de PCR, foi utilizado aproximadamente 150 ng da amostra de DNA, adicionado a uma solução contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria), tampão Go Taq 5x (Promega, EUA) (50 nM KCl, 10 nM tris-HCl, 0,1%, pH 8,4, Triton x-100, MgCl₂ 1,5 nM), acrescidos dos iniciadores (0,5μM) para cada gene em questão, acrescidos de água Milli-Q para se completar 50 μL de reação.

Tabela 3- *Locus* gênicos amplificados

<i>Gene</i>	<i>Locus</i>	<i>Referência na literatura</i>	<i>Iniciador direto</i> 5' → 3'	<i>Iniciador Reverso</i> 5' → 3'
IL-10	-1082 G/A	Koch et al., 2001	CCAAGACAACACTACTA AGGCTCCTTT	GCTTCTTATAGCTAGT CAGGTA
CTLA-4	+49A/G	Donner et al., 1997	GCTCTACTTCCTGAAGA CCT	AGTCTCACTCACCTTT GCAG
TGF-β	869 C/T	Fen Wu et al., 2008	CTTCCGGGTGGGGCTGC GGC	CGGCACCTCCCCCTG GCTCG
FOXP3	IV59 459 A/G (rs 2280883)	Gao et al., 2010	TACACCCCAATGGGAGC	TGGGGTTCCGGTGTGG AGTGA

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático (TC-312, TECHNE) nas seguintes condições:

- 1-Desnaturação inicial: 94° C por 10 minutos
- 2-Anelamento: por 30 segundos (com temperatura específica para cada par de iniciadores, ver Tabela 4).
- 3-Extensão: 72° C por 45 segundos
- 4-Desnaturação: 94° C por 30 segundos
- 5-Repetição das etapas (2), (3) e (4) por 40 vezes
- 6-Extensão final: 72° C por 7 minutos

Tabela 4- número de ciclos, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento obtido para a técnica de PCR.

<i>Gene</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>	<i>Tamanho do fragmento obtido</i>
IL-10	40	56	377 pb
CTLA-4	30	58	162 pb
TGF- β	30	67	199pb
FOXP3	40	60	327pb

4.10.4 — Eletroforese em gel de Agarose 1%

Para a visualização do material amplificado pelas PCR, estes foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e visualizados no sistema de fotodocumentação AlphaDigiDoc (AlphaInnotech, EUA). As intensidades das bandas foram determinadas por comparação com padrões de massas moleculares conhecidas de DNA. Como padrões de massa molecular de DNA foram utilizados 100 pb DNA ladder (Fermentas, EUA) ou 100 pb DNA ladder (Life Technologies, EUA).

4.10.5 – Digestão dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão por enzimas de restrição específicas para cada sequência (Tabela 5). Ao produto de PCR, foram adicionadas quantidades específica de enzima (aproximadamente 2 unidades para cada 0,5 μg de produto de PCR) e tampão, de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, o material foi incubado em termociclador por 37°C ou 65°C por 4 horas seguidas de incubação de 65°C por 20 minutos para inativação enzimática.

Tabela 5- Enzimas utilizadas na digestão e produtos de digestão gerados para reconhecimento dos genótipos.

<i>Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Produtos da digestão em relação aos fenótipos</i>	<i>Enzimas de restrição</i>
IL-10	-1082 G/A	GG: 253pb 97pb 27pb AG: 280pb 253pb 97pb 27 pb AA: 280 pb 97 pb	ECONI (XAGI) (Fermentas)
CTLA-4	+49 A/G	AA:162 pb AG:162pb 88pb 74 pb GG: 88 pb74 pb	Bbv I (Fermentas)
TGF- β	+869 C/T (rs1982073)	CC: 182bp, 17bp CT: 199bp, 182pb,17bp TT: 199bp	NOT I (Fermentas)
FOXP3	459 A/G (RS 2280883)	GG: 327pb GA: 327 pb, 307pb, 20pb AA: 307pb, 20pb	BsmI (Fermentas)

4.10.6 Eletroforese de poliacrilamida para determinação dos genótipos

Os produtos de digestão foram analisados pelo perfil de bandas visualizados em eletroforese de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. Padrões de peso molecular foram utilizados para determinação do peso molecular dos fragmentos de 100 pb DNA ladder (Fermentas, EUA) ou 100 pb DNA ladder (Life Technologies, EUA). Os géis foram fotografados e visualizados no sistema de fotodocumentação AlphaDigiDoc (AlphaInnotech, EUA).

4. 13 Análise Estatística

Para as análises referentes aos ensaios de proliferação celular, os cálculos estatísticos foram consideradas significativas as comparações em que $p \leq 0,05$. O valor p foi determinado utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns utilizando-se o software GraphPad Prism Software 5.0 para Windows (GraphPad Inc, EUA). Para as análises referentes à técnica de RFLP, os resultados foram submetidos

aos testes do qui-quadrado (χ^2) para tabelas de contingência 3x3 ou o teste exato de Fisher, para tabelas de contingência 2x2. Para os resultados significativos, calculou-se o OR ("odds ratio"). Estes testes foram realizados em software SPSS 16 (SAS Institute, EUA). As análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram utilizados os softwares programa R(1) (www.rproject.org) e o pacote HardyWeinberg (GRAFFELMAN, & MORALES-CAMARENA, (2008).

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1 – Avaliação de parâmetros hematológicos na ancilostomíase humana

A análise da população foi realizada a partir de hemogramas obtidos a partir de todos os indivíduos envolvidos neste estudo. Os resultados obtidos reportam que não houve diferença estatística entre a taxa de hemoglobina entre os grupos infectados e não infectados. O mesmo ocorre com a contagem total de células por mm³. Interessantemente, foi identificado diferença entre o número total de linfócitos circulantes e o número de eosinófilos. Estes dados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Descrição da população de estudo por idade, intensidade da infecção e parâmetros hematológicos.

Table 1. Description of the study population by age, intensity of infection and hematological parameters (Mean and range).

	Individuals	
	Wecator-infected (n = 10)	Non-infected (n = 10)
Age mean, years	35.35 (18–76)	36.25 (30–55)
Intensity of infection*	109.66 (4–872)	0
Hemoglobin(g/dL)	14.43 (11.8–16.4)	14.52 (14–16.5)
Whole blood count (cell/mm ³)	6,821 (4,200–12,100)	7,600 (5,300–10,700)
Eosinophil (cell/mm ³)	395.63 (59.4–1,711.3)**	180.7 (108–303)
Eosinophil (%)	5.43% (0.9–15.7)**	2.4% (2.0–4.0)
Lymphocytes (cell/mm ³)	2,248.6 (1,055.6–3,368.9)**	3,116.3 (2,300.0–4,462.0)
Lymphocytes (%)	31.23% (17.1–57.1)**	36% (25.0–46.0)

*number of eggs per gram of feces.
**Statistically different from control group (p<0.05).
doi:10.1371/journal.pntd.0001383.t001

*A intensidade da infecção foi expressa pela média do número dos ovos em grama de fezes.

**Valor estatisticamente diferente do grupo controle (p < 0,05)

RICCI et al ., 2011

5.1.2 Avaliação da fenotipagem de cultura de sangue total em pacientes infectados por *N. americanus*

A análise do número total de PBMC mostrou um aumento significativo no número absoluto de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ quando comparado com indivíduos infectados e não-infectados ($p < 0,0001$). Também foram analisados o número de linfócitos em que indivíduos infectados apresentaram um menor número total quando comparado com indivíduos não-infectados ($p = 0,0018$, Figura 13 A, B e C).

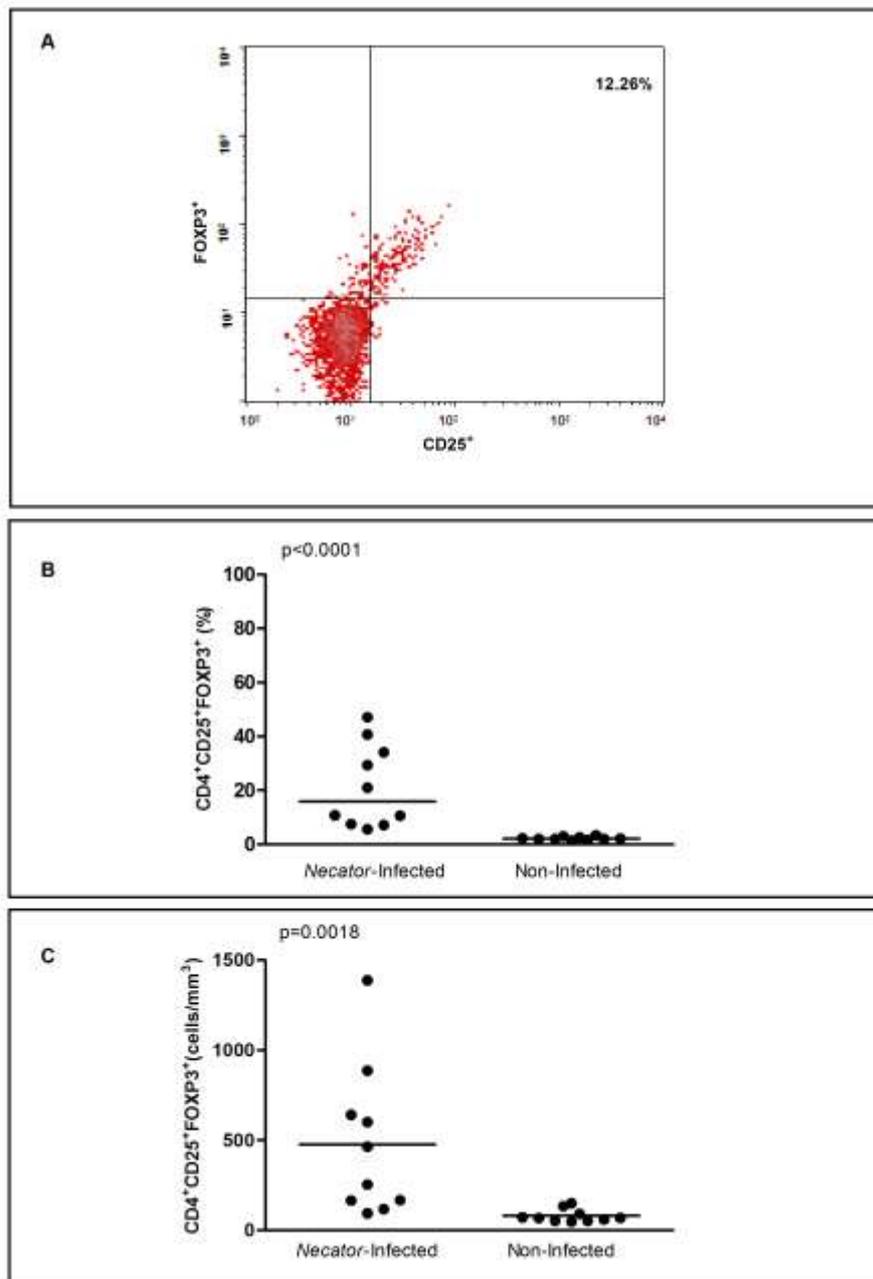


Figura 13- Análise de células T reguladoras por citometria de fluxo. Em A, gráfico de distribuição pontual representando no eixo X as células marcadas com CD25⁺ e o eixo Y as células FOXP3⁺. Em B, porcentagem de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ circulantes em indivíduos infectados e não infectados (n=10 e 10, respectivamente). Em C, número absoluto de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ circulantes em indivíduos infectados e não infectados (n=10 para ambos), representado em porcentagem. Diferenças estatísticas foram detectadas utilizando o teste de Mann-Whitney, que está indicado no gráfico com o valor p (RICCI et al., 2011).

5.2 Perfil de Subpopulações de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

A análise por citometria de fluxo de IL-10, TGF- β e IL-17, o marcador de superfície GITR e o marcador intracelular CTLA-4 avaliados demonstrou que a infecção por *N. americanus* induz o aumento significativo do número absoluto de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ produtoras de IL-10 ($p < 0,0001$), TGF- β ($p < 0,0001$) e IL-17 ($p = 0,0003$). Resultados semelhantes foram observados em células expressando CTLA-4 ($p < 0,0001$) e GITR ($p = 0,0002$). Os resultados foram significativos em número absoluto de células e porcentagem (como ilustrado nas Figuras 14 e 15, respectivamente).

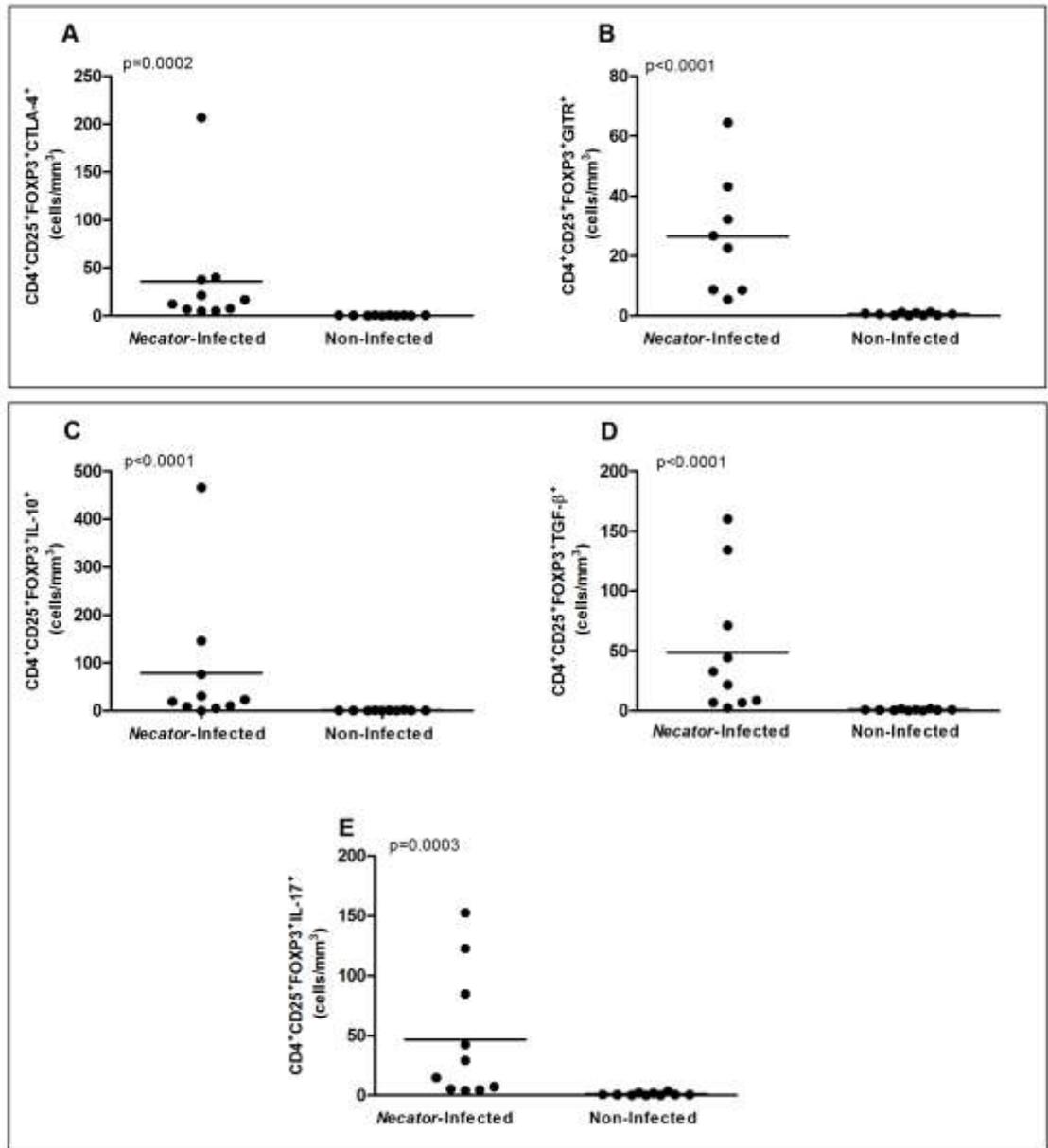


Figura 14- Análise de citometria de fluxo das citocinas IL-10, TGF- β , e IL-17 dos marcadores CTLA-4 e GITR em células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em indivíduos infectados e não infectados ($n = 10$ em cada grupo). Os resultados foram expressos em número absoluto de células expressando (A) IL-10, (B) TGF- β , (C) IL-17, (D) CTLA-4, e (E) GITR. O número absoluto de células (células/mm³) são indicados no eixo Y e as linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas foram detectadas utilizando o teste de Mann-Whitney, que está indicado no gráfico com o valor p.

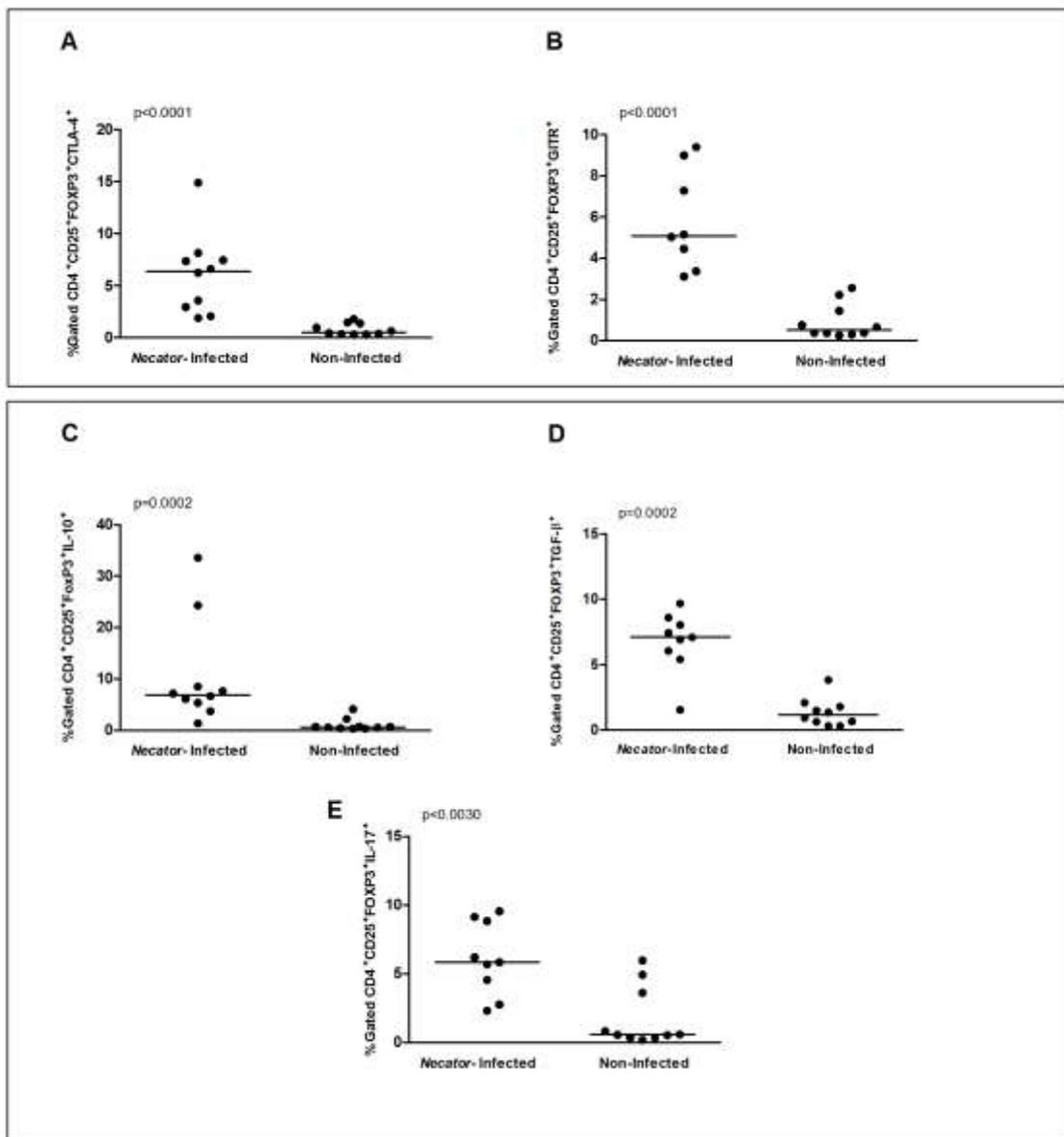


Figura 15- Análise de citometria de fluxo das citocinas IL-10, TGF-β, e IL-17 dos marcadores CTLA-4 e GITR em células CD4⁺CD25⁺FOXP3 em indivíduos infectados e não infectados (n = 10 em cada grupo). Os resultados foram expressos em números percentuais: (A) IL-10, (B) TGF-β, (C) IL-17, (D) CTLA-4 e (E) GITR. O percentual está indicado no eixo Y em porcentagem e as linhas representam a mediana. Diferenças estatísticas estão indicadas no gráfico com o valor p (RICCI et al., 2011).

5.3 Padrão de reatividade à antígenos em subpopulações de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

A caracterização do perfil das subpopulações das células Treg foi realizada para determinarmos a especificidade desta população de células no presente estudo. O estudo foi realizado utilizando-se antígenos bruto e ES de vermes adultos de *A. ceylanicum*, em grupos infectados e não infectados.

Interessantemente, foi observado que houve diferença significativa ($p < 0,0015$) em células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno bruto de *A. ceylanicum* (Figura 12 A). Comparativamente, em indivíduos infectados, o número de células expressando CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ foi significativamente menor após estimulação com antígeno bruto (Figura 16).

A análise dos dados mostrou que não houve diferença estatística nos grupos de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ produtoras de CTLA-4, GITR, IL-10 e TGF- β , estimuladas com antígeno bruto e antígeno ES de *A. ceylanicum*, em indivíduos positivos quando comparado com indivíduos negativos para infecção (Figuras 17, 18 e 19 e 20 respectivamente).

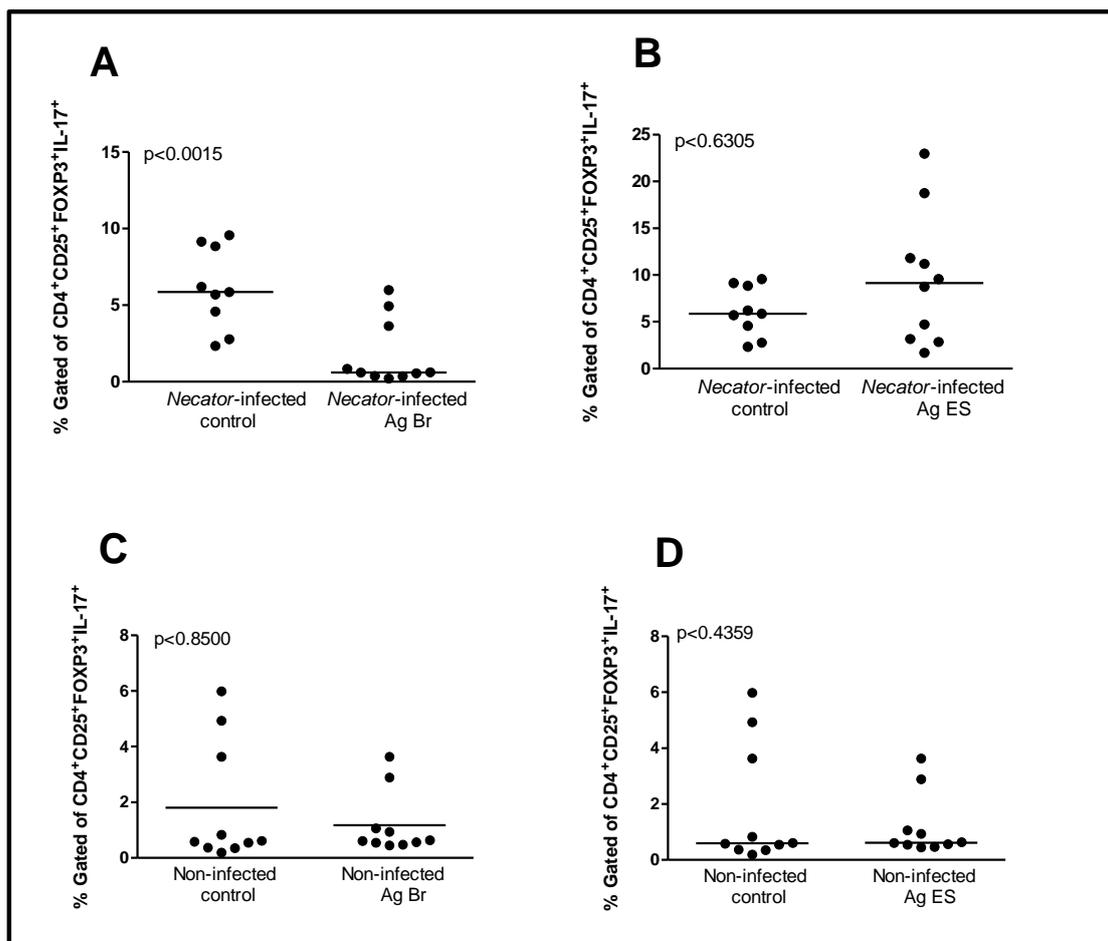


Figura 16- Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de *A. ceylanicum*. (A) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (B) Percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. (C) Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ de indivíduos não infectados infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (D) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. As análises estatísticas estão representadas em relação ao valor p.

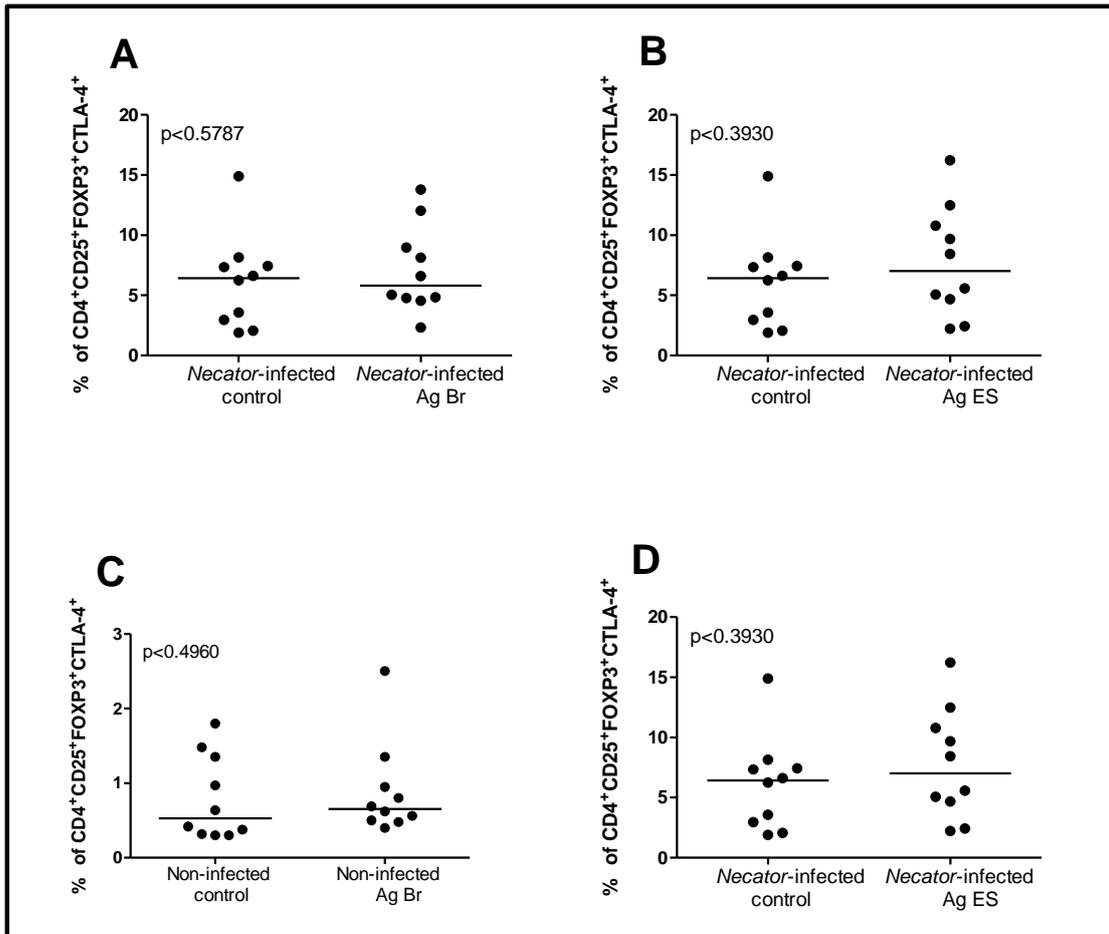


Figura 17 - Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de *A. ceylanicum*. (A) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (B) Percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. (C) Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (D) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. As análises estatísticas estão representadas em relação ao valor p.

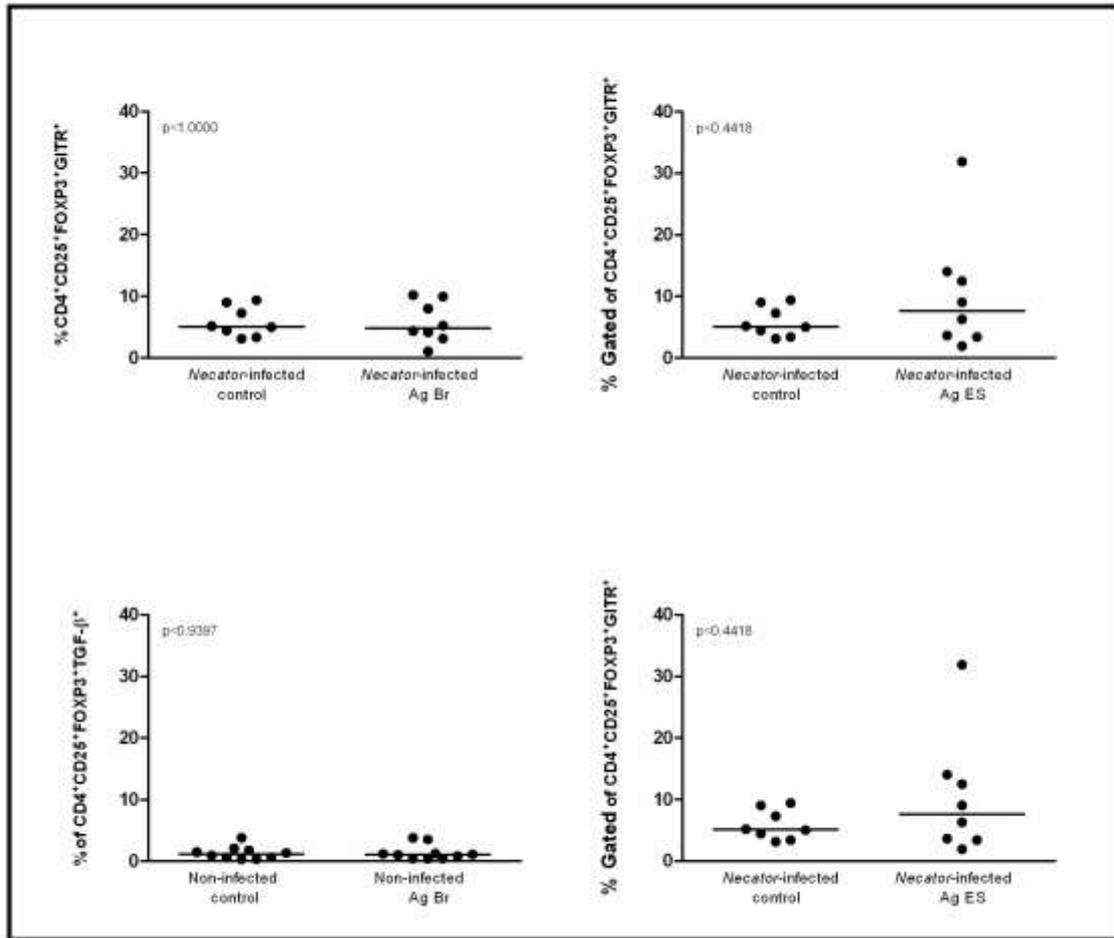


Figura 18 - Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de *A. ceylanicum*. (A) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (B) Percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. (C) Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (D) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺GITR⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. As análises estatísticas estão representadas em relação ao valor p.

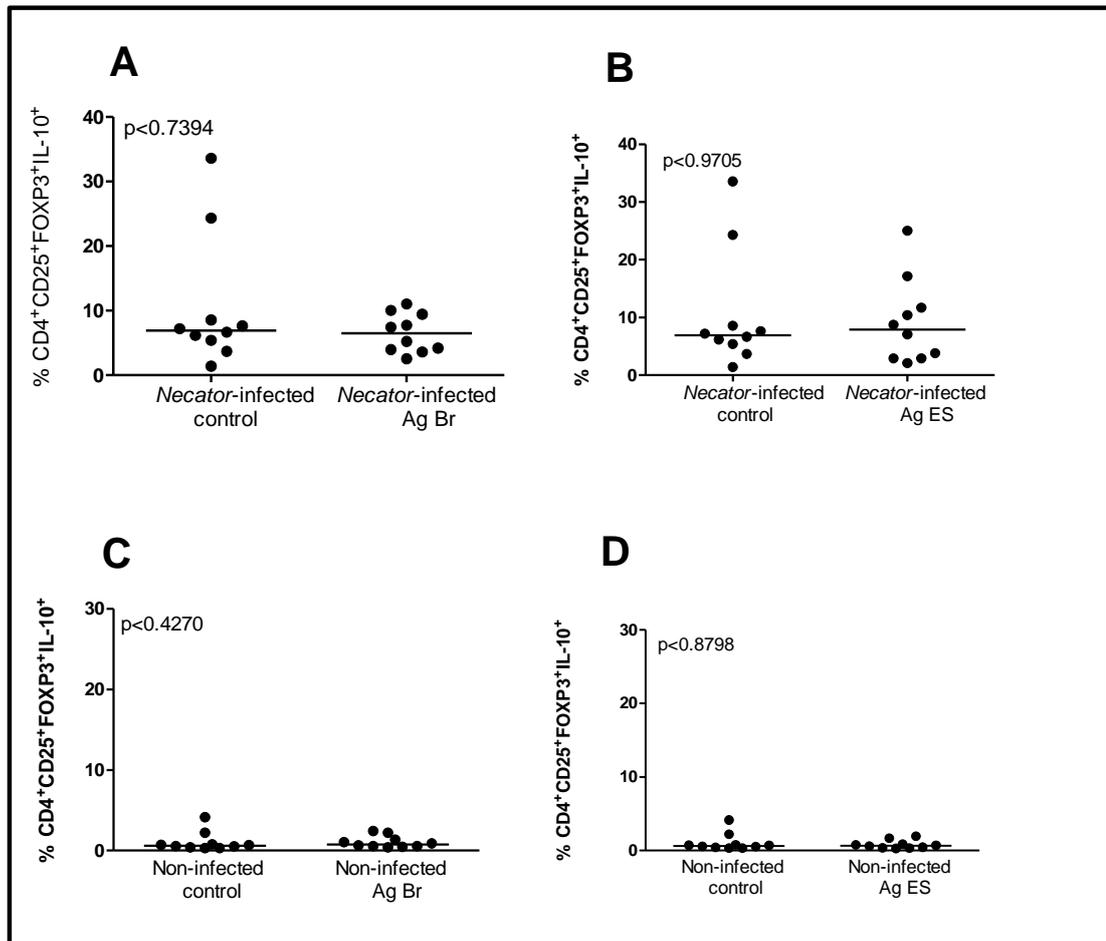


Figura 19- Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de *A. ceylanicum*. (A) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (B) Percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. (C) Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (D) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. As análises estatísticas estão representadas em relação ao valor p.

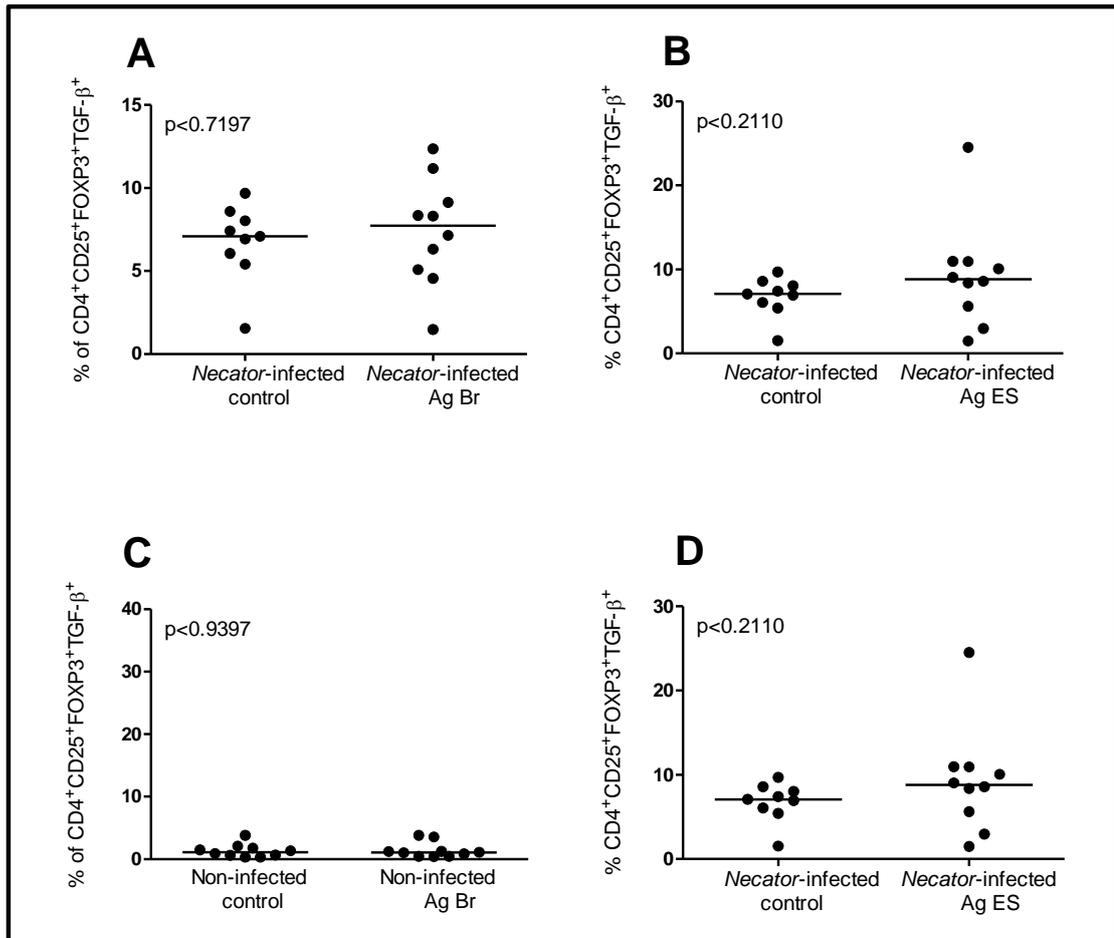


Figura 20- Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺TGF-β⁺ no sangue periférico após estimulação com antígenos de *A. ceylanicum*. (A) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺TGF-β⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno bruto de *A. ceylanicum*. (B) Percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺TGF-β⁺ de indivíduos infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. (C) Análise do percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno Bruto de *A. ceylanicum*. (D) percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺TGF-β⁺ de indivíduos não-infectados estimuladas com antígeno ES de *A. ceylanicum*. As análises estatísticas estão representadas em relação ao valor p.

5.4 Análise de Intensidade Média de Fluorescência (IMF)

A análise da expressão das citocinas, dos marcadores de superfície intracelular foi determinada pela intensidade média de fluorescência para obtenção da expressão de cada marcador por célula analisada. A análise da expressão por IMF poderia identificar possíveis diferenças na expressão de cada marcador independente do número de células apresentado. Após a análise por citometria de fluxo, foi observado que não houve diferenças significativas na expressão de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ produtoras de IL-10, TGF- β , CTLA-4 e GITR entre indivíduos infectados e indivíduos controles (Figuras 21 e 22).

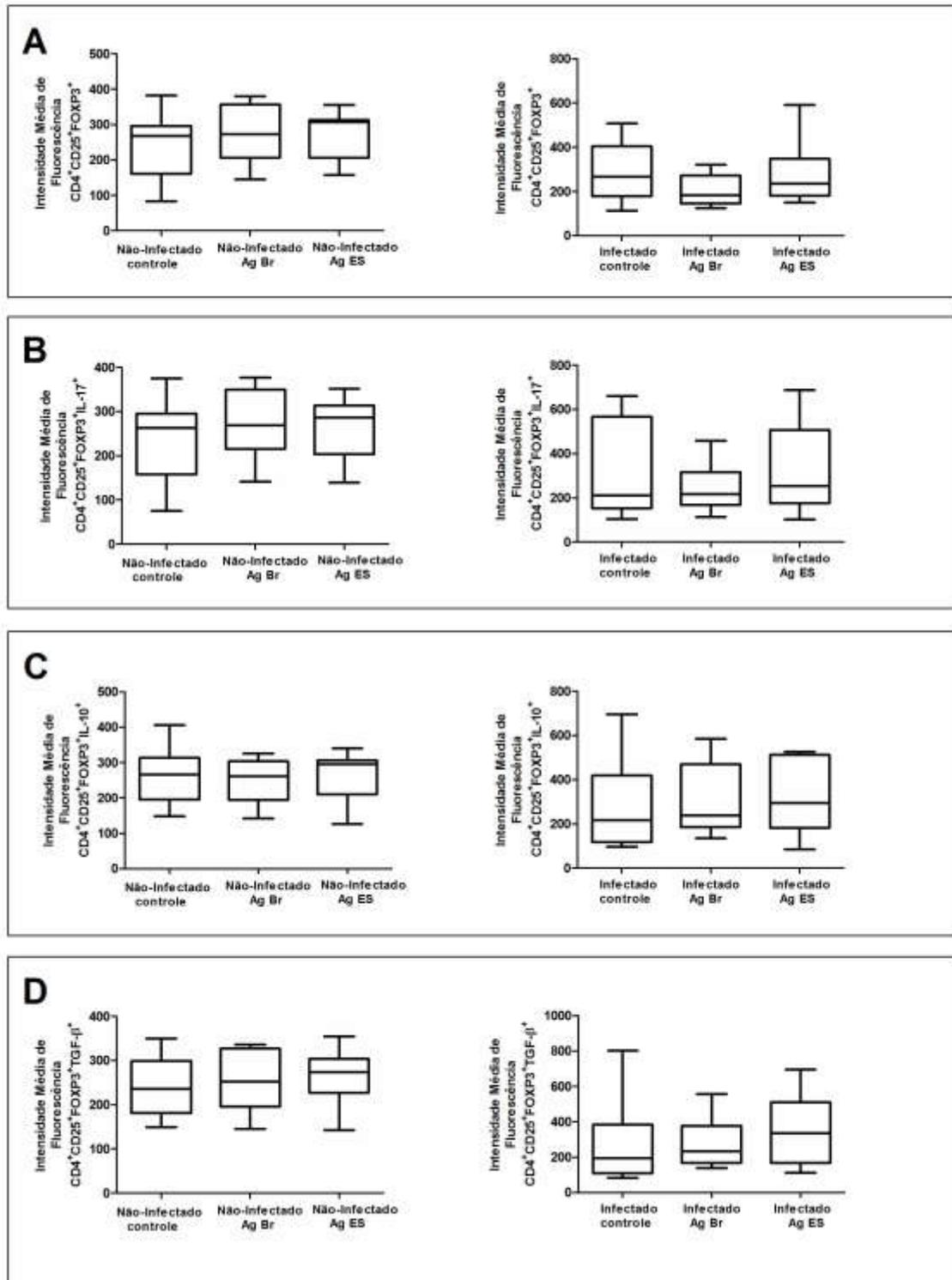


Figura 21- Intensidade média de fluorescência de IL-10 (A), IL-17 (B), FOXP3 (C) e TGF- β (D) em células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em grupos controle, grupos estimulados com antígeno bruto (AgBr), e grupos antígeno ES (AgES) em pacientes infectados e não-infectados por *N. americanus*.

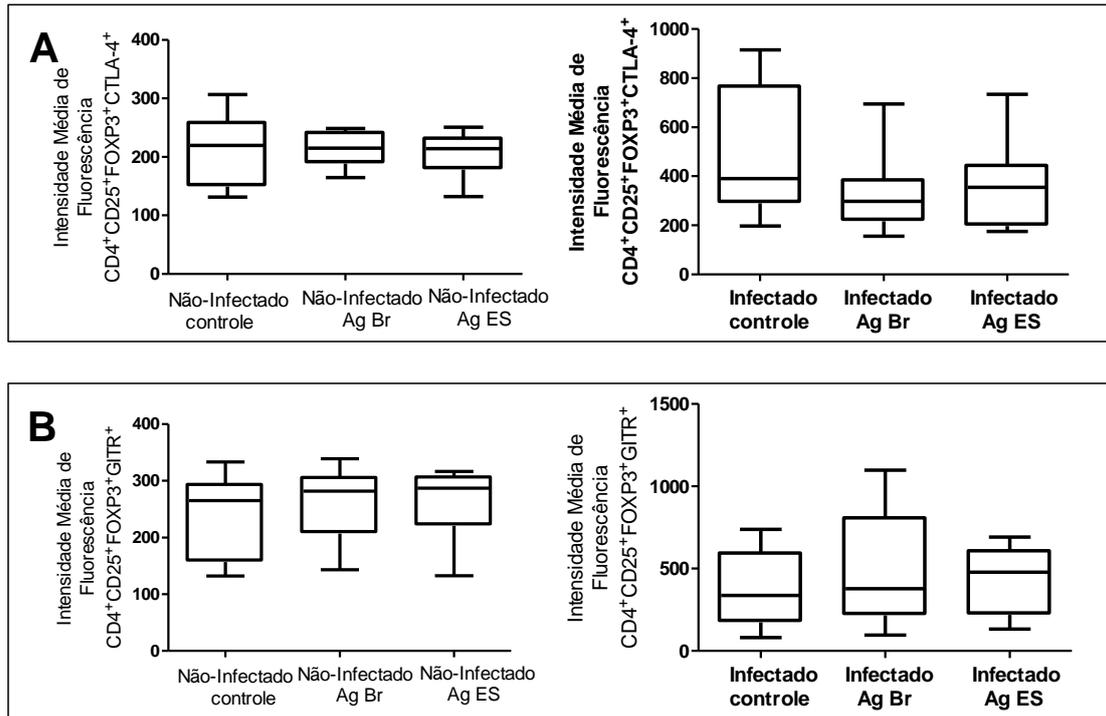


Figura 22- Intensidade média de fluorescência de CTLA-4⁺ (A) e GTR⁺ (B) em células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em grupos controle, grupos estimulados com antígeno bruto (AgBr), e grupos antígeno ES (AgES) em pacientes infectados e não-infectados por *N. americanus*.

5.5 Alteração da frequência de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ induzidas por antígenos de ancilostomídeos

Uma vez detectado que indivíduos infectados apresentam maior quantidade de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ circulantes em relação a indivíduos não infectados, realizamos a análise da expressão de IL-17 em células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ por citometria de fluxo. Nossos resultados indicam que pacientes infectados apresentam uma redução significativa no número de células por mm³ produtoras de IL-17 mediante estimulação com antígeno bruto (Figura 23).

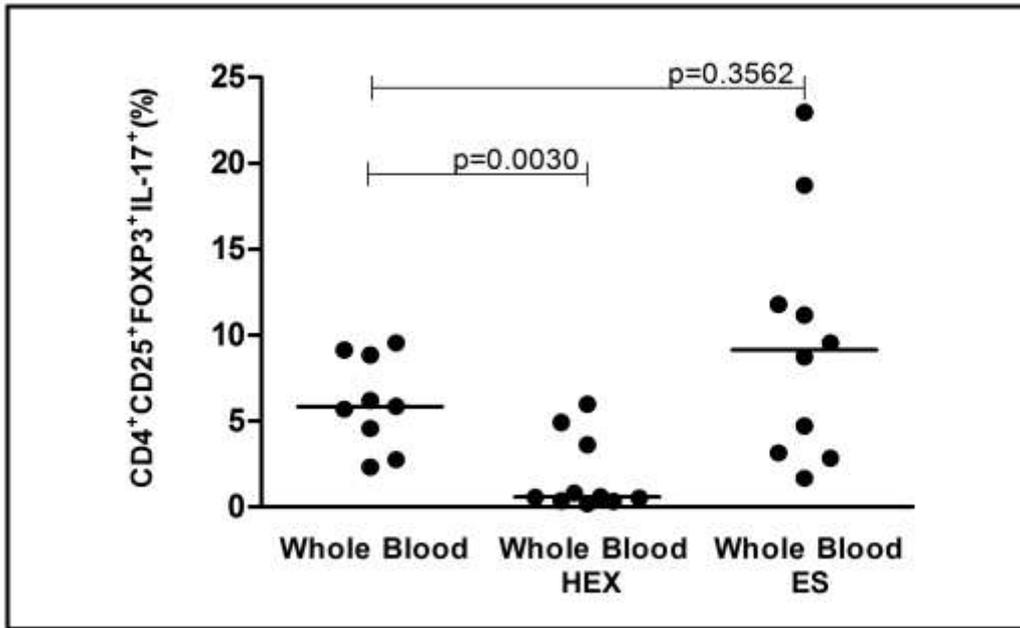


Figura 23- Análise da frequência da população de PBMCs estimulados com antígeno bruto e antígeno ES de ancilostomídeos (n = 9, n=10 e n= 10 respectivamente). Resultados expressos como porcentagem indicado no eixo Y e as linhas representam mediana. As diferenças estatísticas estão indicados no gráfico como valor p significativo. HEX: antígeno bruto e ES: antígeno secretado-excretado. (RICCI et al., 2011).

5.6 Padrão de proliferação em culturas depletadas de células T reguladoras

Nas culturas de PBMCs depletadas de Tregs (PBMCd) foi observado o reestabelecimento da proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de indivíduos infectados por ancilostomídeos, após estimuladas com antígenos bruto e ES (Figura 23). Nenhuma diferença significativa foi detectada em culturas de indivíduos controles (Figura 25).

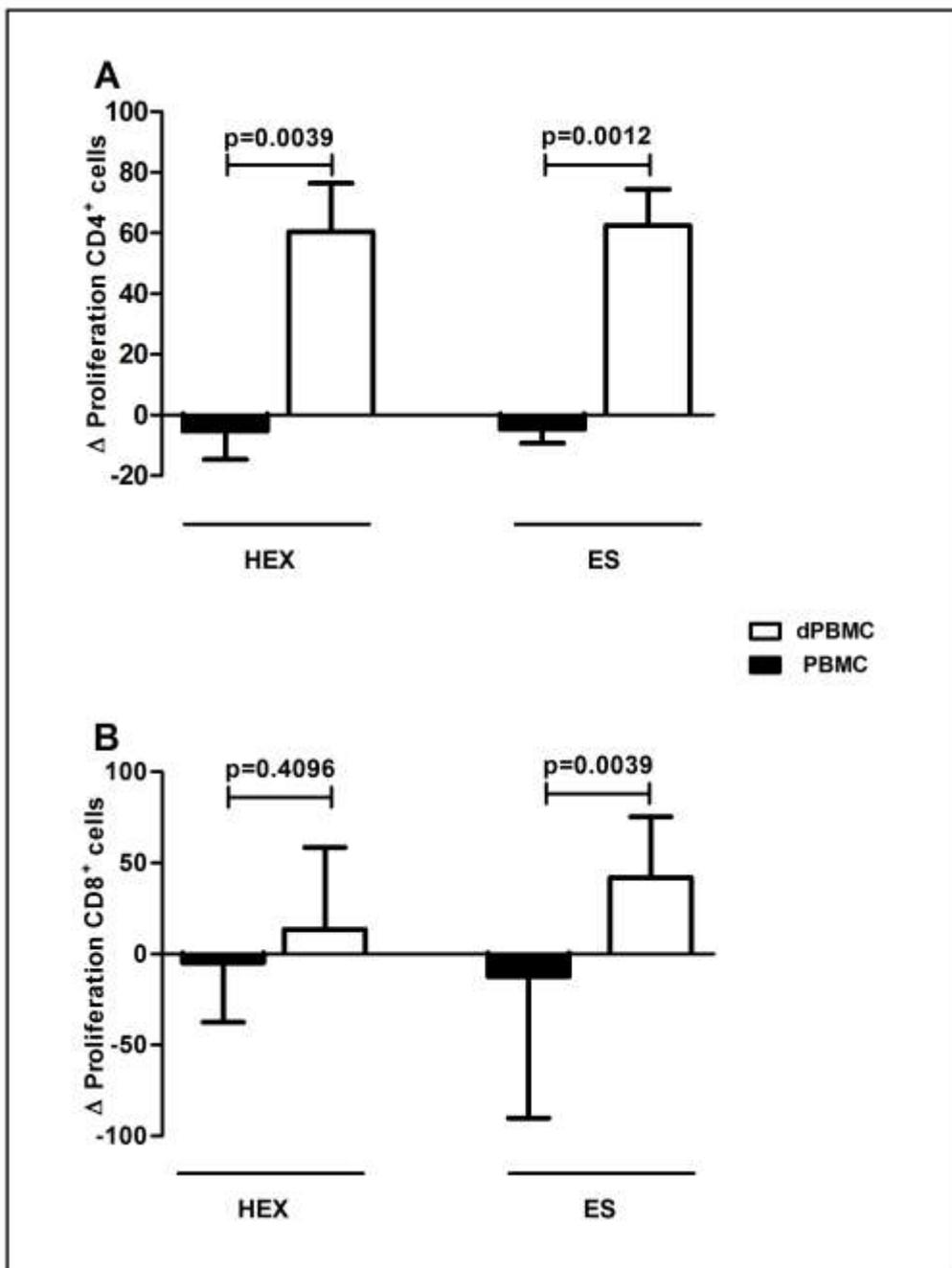


Figura 24- Análise por citometria de fluxo de células CD4 (A) e CD8 (B) depletadas de células T reguladoras (PBMCd) em pacientes infectados. Os resultados foram expressos como porcentagem indicados no eixo Y e linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos.

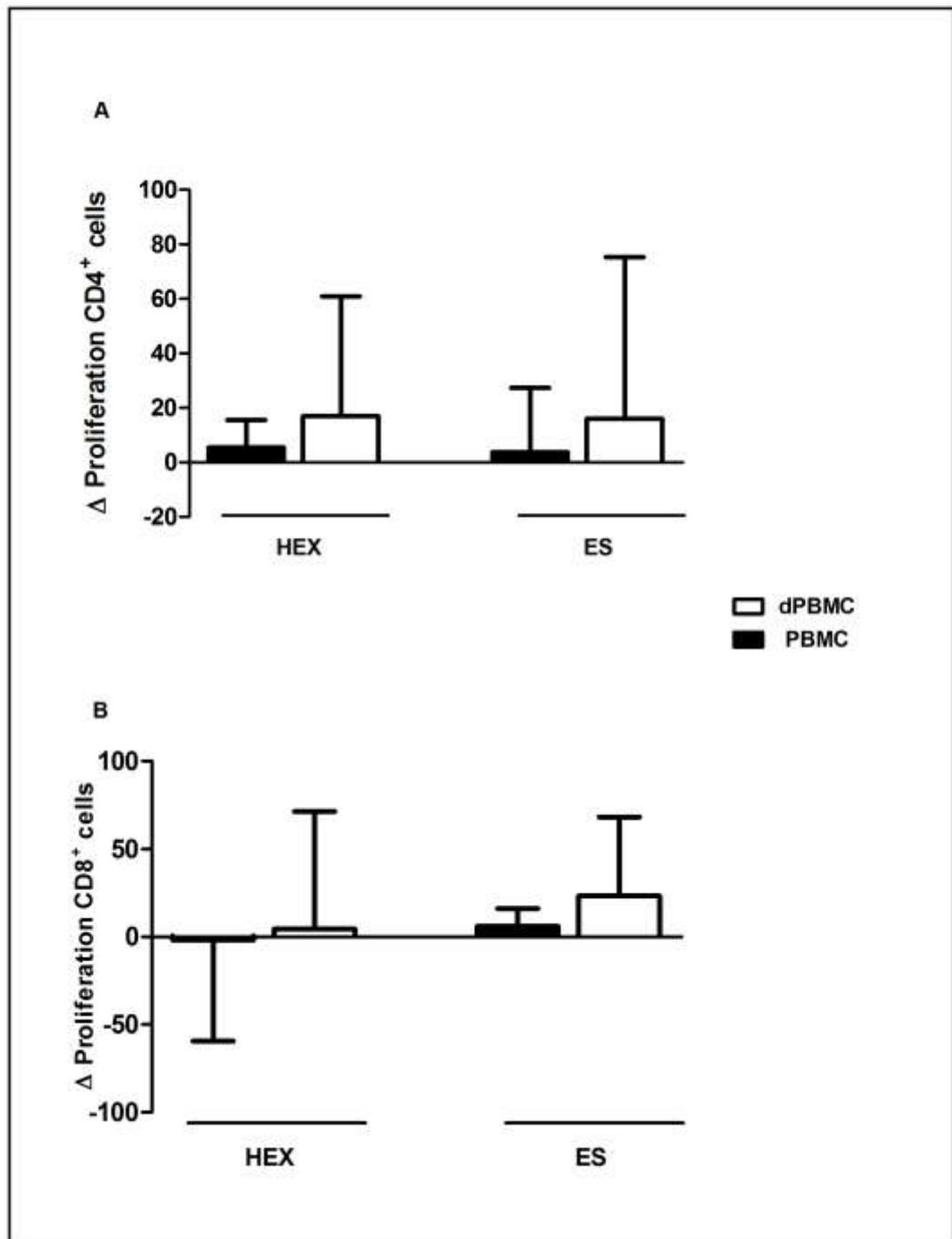


Figura 25- Análise por citometria de fluxo de células CD4 (A, B) e CD8 (C) depletadas de células T reguladoras em pacientes não infectados. (PBMCd). Os resultados foram expressos como porcentagem indicados no eixo Y e linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos.

5.7 Padrão de proliferação em culturas estimuladas com antígenos bruto e ES na presença de células T reguladoras autólogas previamente purificadas

Culturas de células estimuladas com antígeno bruto e antígenos ES foram coincubadas com 50.000 células CD4⁺CD25⁺/well. As células em seguida foram marcadas com anticorpos para as populações celulares CD4, CD8 e CD19. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo analisando também dados de proliferação celular pela marcação com CFDA-SE. Não foi detectado diferenças significativas na proliferação celular em culturas estimuladas com antígenos na presença ou ausência de células CD4⁺CD25⁺.

5.8 Padrão de reatividade de citocinas em sobrenadantes de PBMCd

Na análise da produção das citocinas IL-2, IL-5, IL-10, IL-12 p70 e IFN- γ em sobrenadantes de culturas de PBMC, não foram observadas diferenças significativas na produção de citocinas após estímulo antigênico, tanto na presença quanto na ausência de células $CD4^+CD25^+$, como ilustrado na Figura 26.

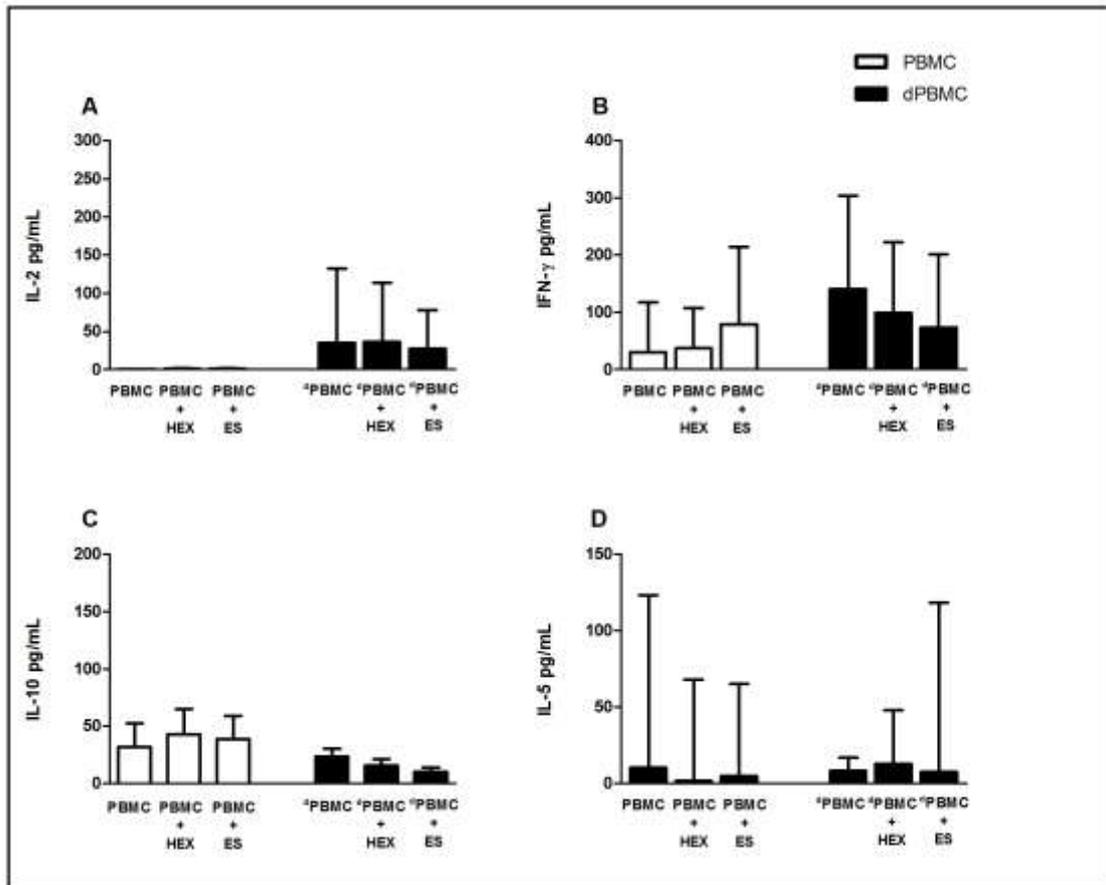


Figura 26- Concentração das citocinas (média \pm desvio padrão) de IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-5 (D) em sobrenadantes de cultura (n = 10) de PBMC e células $CD4^+CD25^+$ -depletadas PBMCs (dPBMCs) após estimulação com extrato bruto e produtos de excreção-secreção.

5.9 Análise da população de células CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ em amostras de sangue periférico

A análise por citometria de fluxo de culturas de sangue total nos demonstrou uma redução no número absoluto de células CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ em indivíduos infectados após estímulo com antígeno bruto e antígeno ES ($p < 0,0001$ em ambos os casos). Esta diminuição também ocorreu em culturas de pacientes não infectados após estímulo com antígeno bruto (Figura 27).

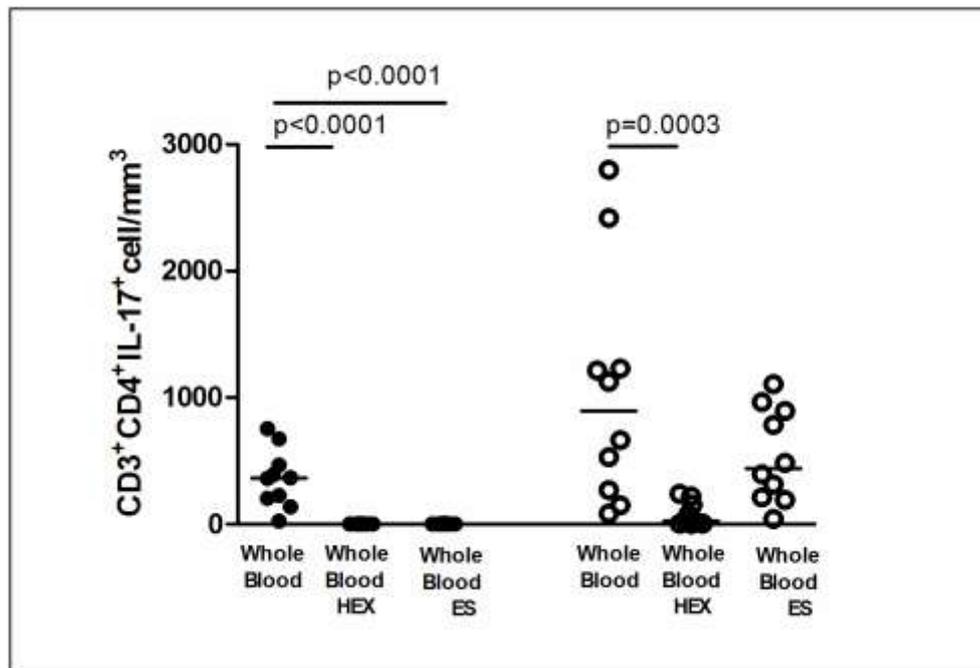


Figura 27- Análise de citometria de fluxo de células CD3⁺CD4⁺IL17⁺ em culturas de sangue em pacientes infectados e não infectados. Os resultados foram expressos em números de células por mm³ indicados no eixo Y e linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos. Os círculos escuros representam pacientes infectados e os círculos claros, pacientes não infectados. Círculos fechados representam pacientes infectados e círculos abertos representam pacientes não-infectados.

5.10 Análise da população de células $CD3^+CD4^+IL-10^+$ em amostras de sangue periférico

A análise das células $CD3^+CD4^+IL-10^+$ em culturas de sangue total nos demonstra que quando células de doadores infectados são estimuladas com antígeno bruto e antígeno ES ocorre uma redução em seu número absoluto, sendo esta diminuição significativa (onde $p=0,0148$ quando estimuladas com Ag bruto e de $p=0,0002$ quando estimuladas com AgES). Este padrão de redução do número de células é observado também em pacientes não infectados (valor de $p<0.0001$ em ambos os casos) (Figura 28).

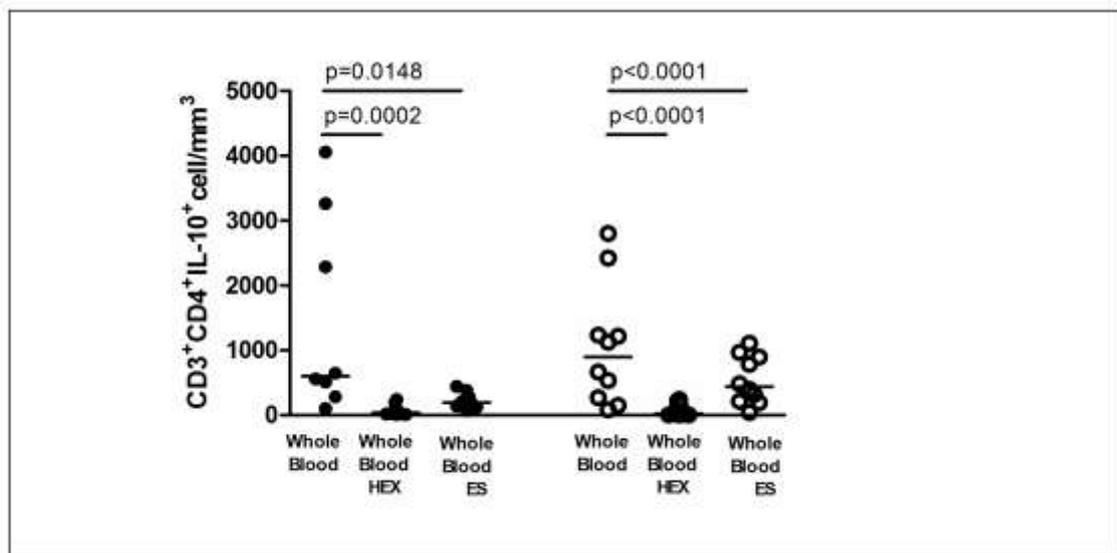


Figura 28- Análise de citometria de fluxo de células $CD3^+CD4^+IL-10^+$ em culturas de sangue total. Os resultados foram expressos como número absoluto de células por mm^3 indicados no eixo Y e linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos. Os círculos escuros representam pacientes infectados e os círculos claros, pacientes não infectados.

5.11- Análise da população de células $CD3^+CD4^+TGF-\beta^+$ em amostras de sangue periférico

A análise das células $CD3^+CD4^+TGF-\beta^+$ em culturas de sangue total nos demonstra que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de células por mm^3 quando comparamos células de doadores infectados estimuladas com antígeno bruto e antígeno ES quando estimuladas com Ag bruto. Este padrão de proliferação de células é observado também em pacientes não infectados (Figura 29).

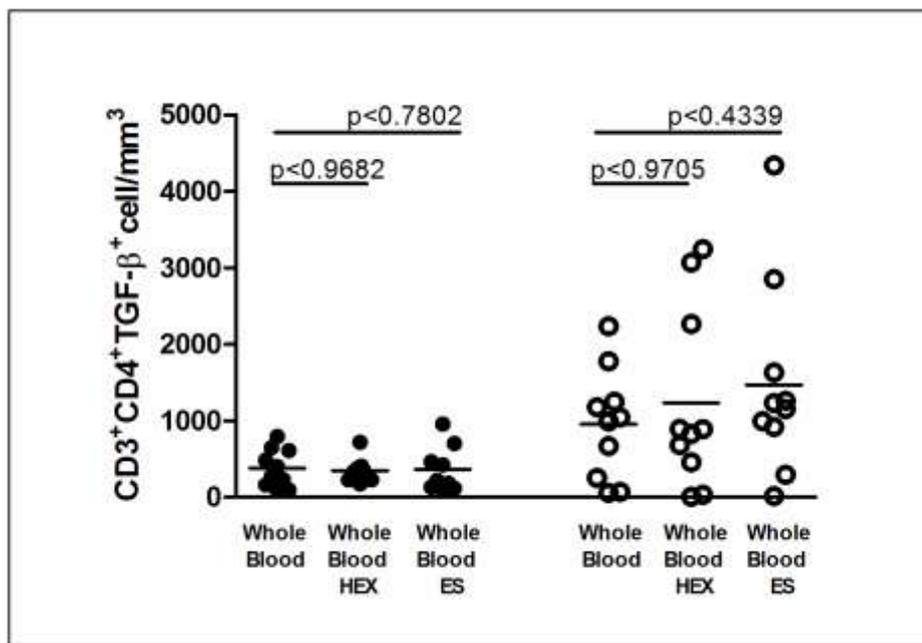


Figura 29- Análise de citometria de fluxo de células $CD3^+CD4^+TGF-\beta^+$ em culturas de sangue total. Os resultados foram expressos como número de células por mm^3 indicados no eixo Y e linhas representam as medianas. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos. Os círculos escuros representam pacientes infectados e os círculos claros, pacientes não infectados.

5.12- Análise da população- de células $CD4^+IL-17^+CD25^-FOXP3^-$ em amostras de sangue periférico

Para corroboramos a hipótese da participação das células Th17 na infecção por ancilostomídeos, analisamos a frequência da população de células $CD4^+IL-17^+CD25^-FOXP3^-$ para avaliação da produção de IL-17 em células não caracterizadas como células T reguladoras (Figura 30 A e B).

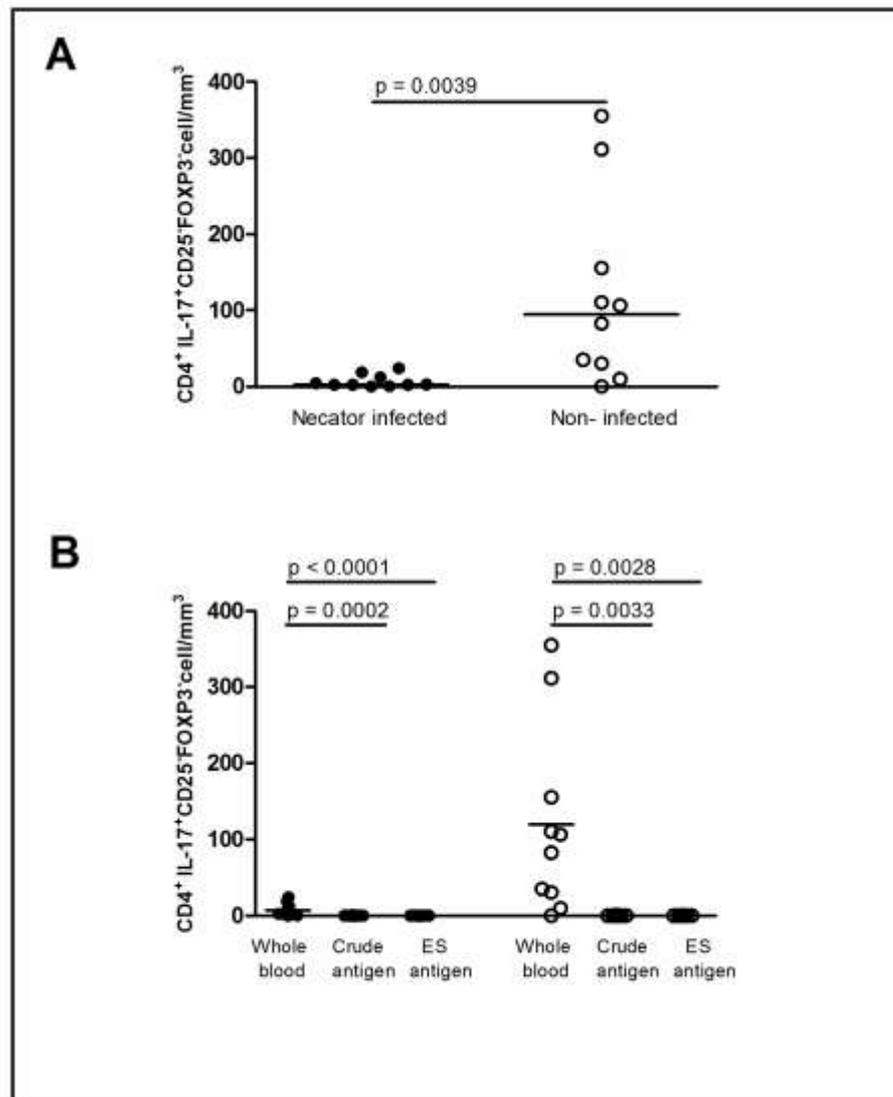


Figura 30 - Análise de citometria de fluxo de células $CD4^+IL-17^+$ em culturas de sangue total. (A) Frequência de células $CD4^+IL-17^+CD25^-FOXP3^-$ em pacientes infectados e não infectados. (B) Frequências de células $CD4^+IL-17^+CD25^-FOXP3^-$ em pacientes infectados e não infectados mediante estímulo antigênico. Os resultados foram expressos por número absoluto de células por mm³ indicados no eixo Y e

linhas no eixo X representam as medianas. Diferenças significativas estão indicadas com valores p específicos.

5.13- Análise de Intensidade Média de Fluorescência da produção de citocinas em células CD4⁺

A análise da intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo, foi observado que não houve diferenças estatísticas na expressão de células CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ e CD3⁺CD4⁺TGF-β⁺, em culturas de sangue total de indivíduos infectados estimuladas com antígeno bruto e antígeno ES e culturas não estimuladas (Figura 31 e 32).

Em células CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ ocorreu uma diminuição estatística da expressão de IL-17 em culturas estimuladas com antígeno bruto e culturas estimuladas com antígeno ES.

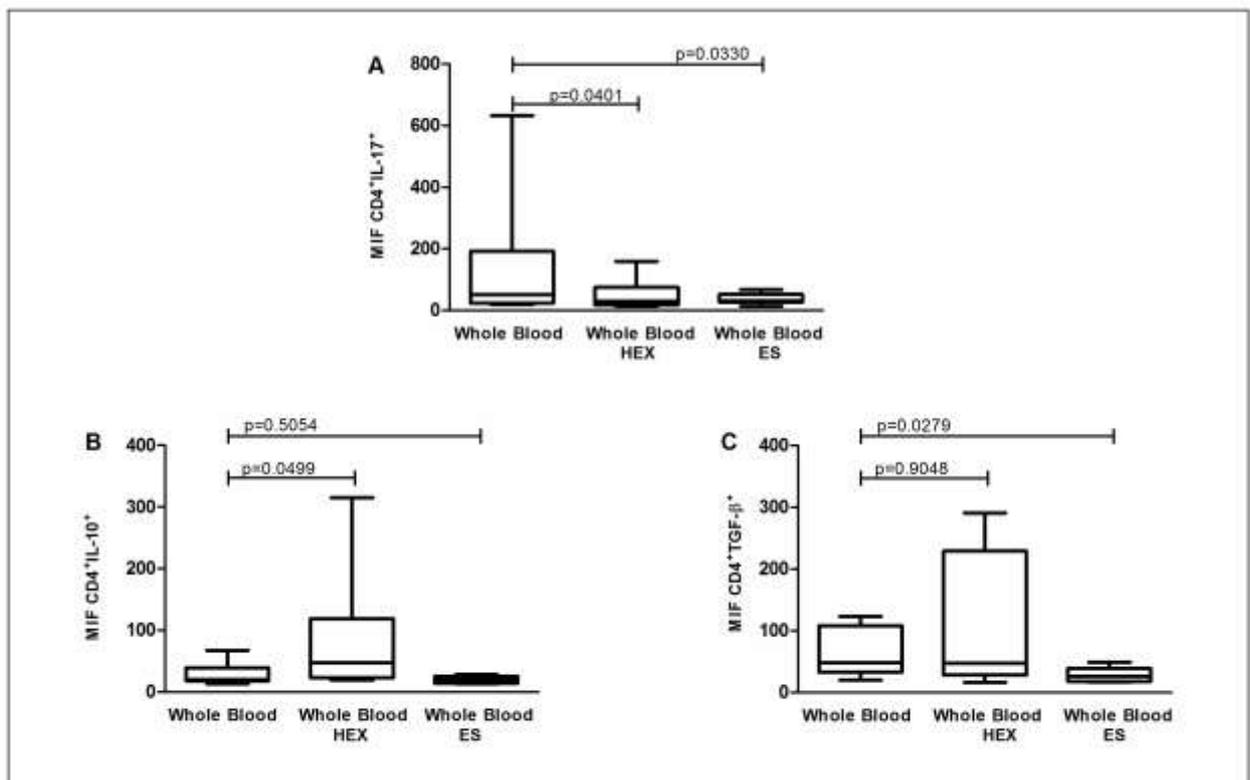


Figura 31- Intensidade média de fluorescência de IL-17 (A), IL-10 (B) e TGF-β (C) em células CD4⁺ de culturas controle, estimuladas com antígeno bruto (HEX), ou antígeno ES (ES) em pacientes infectados por *N. americanus*. Diferenças estão indicadas com valores p significativos.

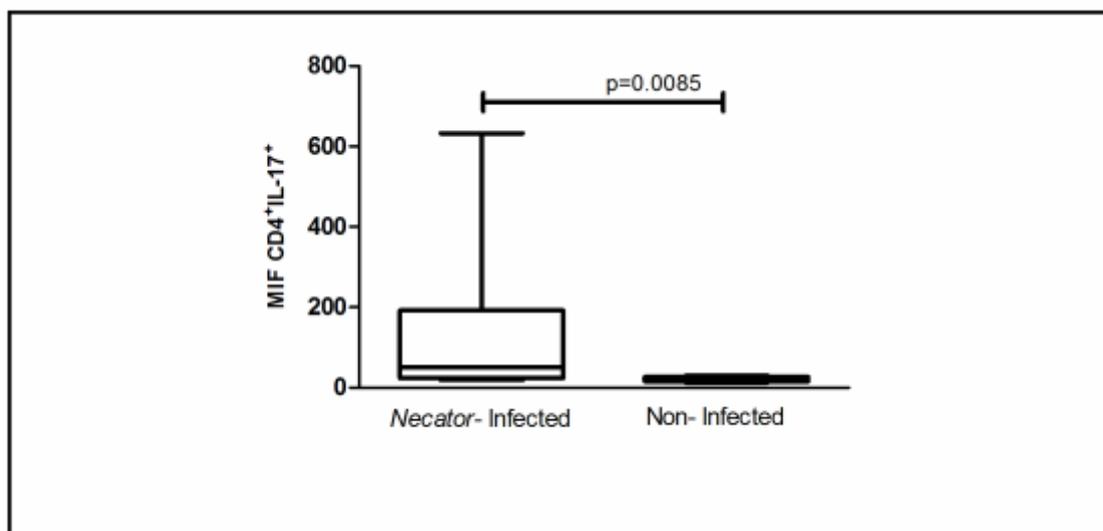


Figura 32- Intensidade média de fluorescência de IL-17⁺ em células CD4⁺ em culturas não estimuladas em pacientes não-infectados e infectados por *N. americanus*. Diferenças estatísticas estão indicadas com valores p significativos.

5.14- Correlação da produção de citocinas associadas à regulação

Após a determinação do número de células por mm^3 , os valores obtidos foram analisados e submetidos à testes de correlação entre cada subpopulação celular. Os dados obtidos demonstram que houve associação positiva entre as citocinas IL-10 x IL-17 (A), TGF- β x IL-17 (B), TGF- β x IL-10 (C), ou seja, que os números de células produtoras destas citocinas aumentam de forma proporcional. (Figura 33).

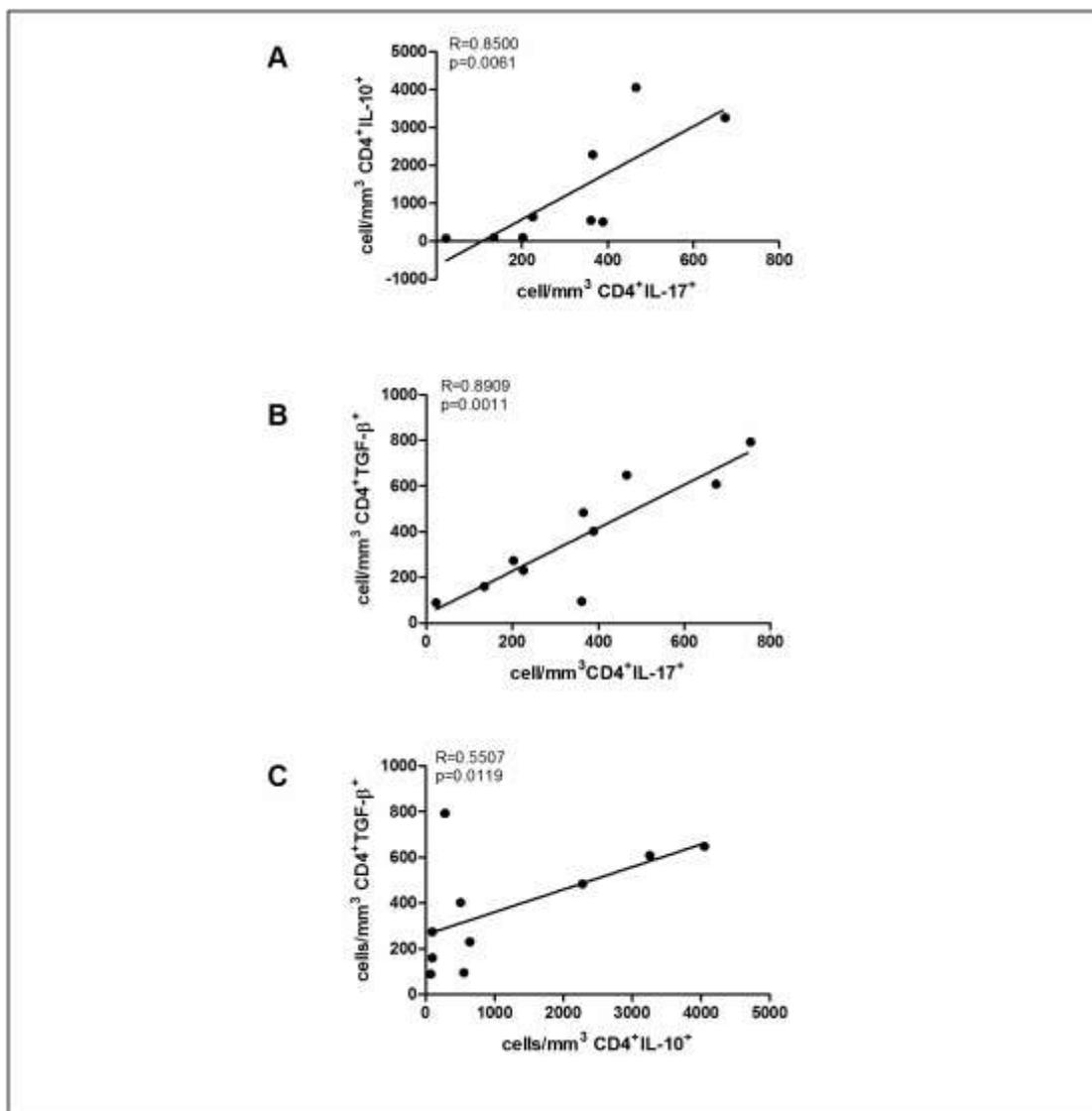


Figura 33- Avaliação da correlação de citocinas associadas à imunorregulação

5.15- Avaliação da dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC de doadores infectados e não-infectados mediante estímulo antigênico

Os sobrenadantes obtidos em culturas celulares estimuladas e não estimuladas com antígeno bruto (HEX) e antígeno ES (ES) do parasito foram dosados quanto a concentração das seguintes citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17, IL-5, IL-23 p40 e IL-13.

As dosagens relativas a citocina IL-10 apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos infectados e não infectados nas três condições avaliadas (células sem estímulo (PBMC), estimuladas com antígeno bruto (HEX) e estimuladas com antígeno ES(ES)). Em relação à dosagem da citocina TGF- β , observamos diferença estatística ($p = 0,0286$), nos grupos não estimulados (PBMC). A dosagem da citocina IL-12/IL-23p40 apresentou diferença entre os indivíduos infectados e não infectados: grupos não estimulados (PBMC) apresentaram ($p = 0,0024$), com antígeno bruto (HEX) ($p = 0,0038$) e antígeno ES ($p = 0,0033$). Os resultados estão ilustrados nas Figuras 34 e 35.

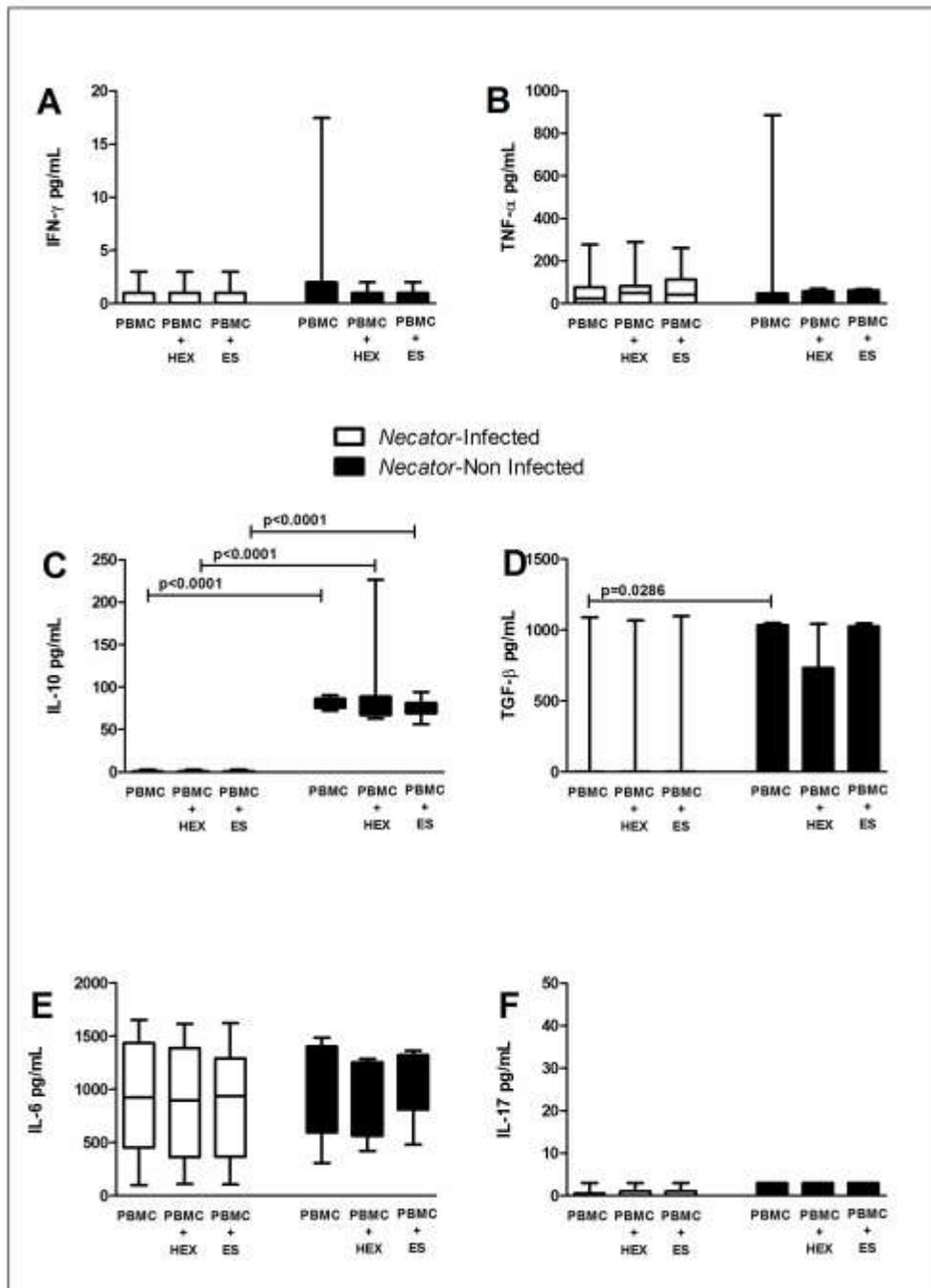


Figura 34- Dosagem das citocinas (mediana/ intervalo interquartil) IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-10 (C), TGF- β (D), IL-6 (E), IL-17 (F), em sobrenadantes de cultura (n=10) de PBMC em grupos controles e após estimulação com extrato bruto (HEX) e produtos de excreção-secreção ES).

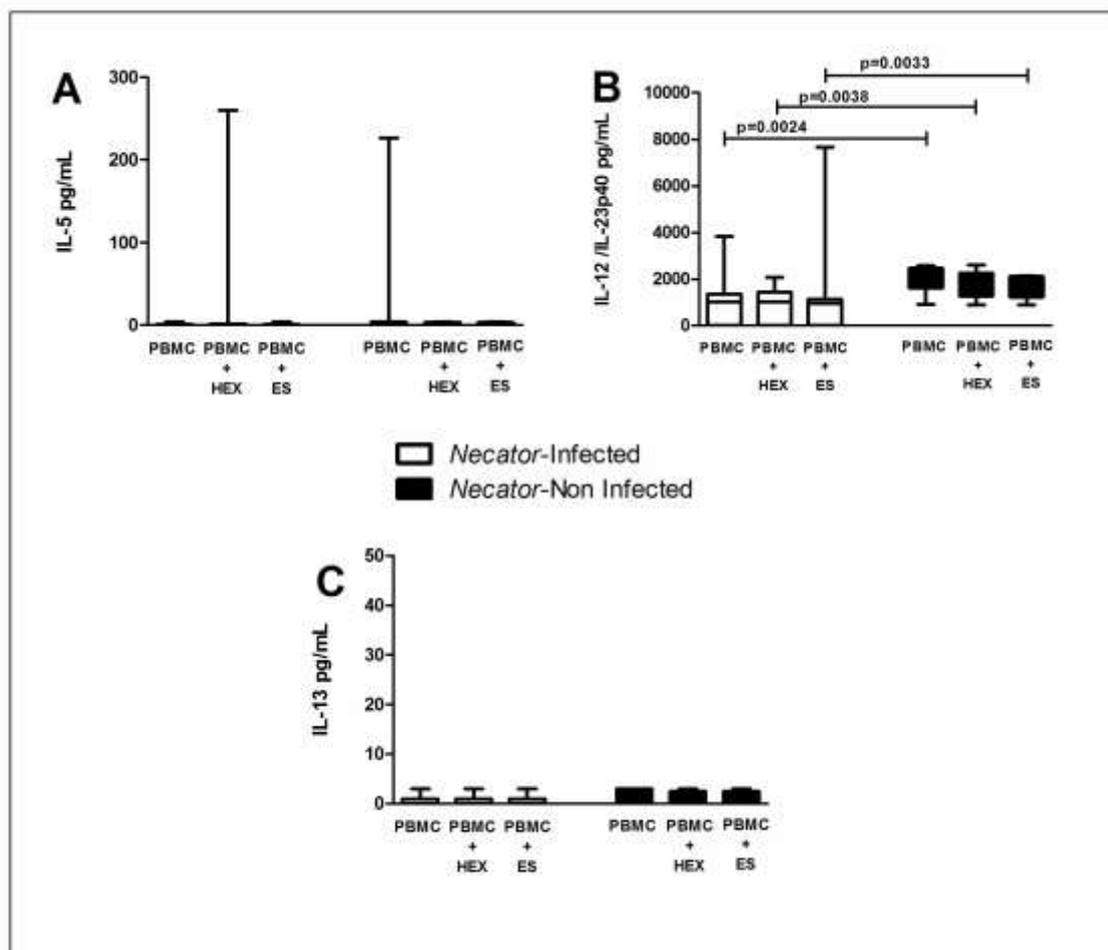


Figura 35- Dosagem das citocinas (mediana/ intervalo interquartil) de IL-5 (A), IL-12/IL-23p40 (B), IL-13 (C) em sobrenadantes de cultura (n=10) de PBMC após estimulação com extrato bruto (HEX) e produtos de excreção-secreção (ES).

5.16 Avaliação do perfil eletroforético de bandas obtidos pela técnica de RFLP

Para a realização dos experimentos relacionados aos polimorfismos, foram utilizadas amostras e de doadores positivo de área endêmicas, e de doadores negativos doadores negativos de área endêmica (ovo-negativo) provenientes de área não endêmica para ancilostomíase, totalizando 306 pacientes distribuídos como apresentado na Tabela 8:

Tabela 8-Doadores x gênero

Doadores	Sexo	Sexo
	Masculino	Feminino
	%	%
Positivos	40,9%	59,1%
Negativo	32,5%	67,5%
Endêmico		
Negativo	40,4%	59,1%

5.16.1 – CTLA-4

A técnica de RFLP apresenta três possíveis padrões de bandas identificados para a determinação dos genótipos referentes ao polimorfismo para o CTLA-4 (+49A/G) representadas na Figura 36.

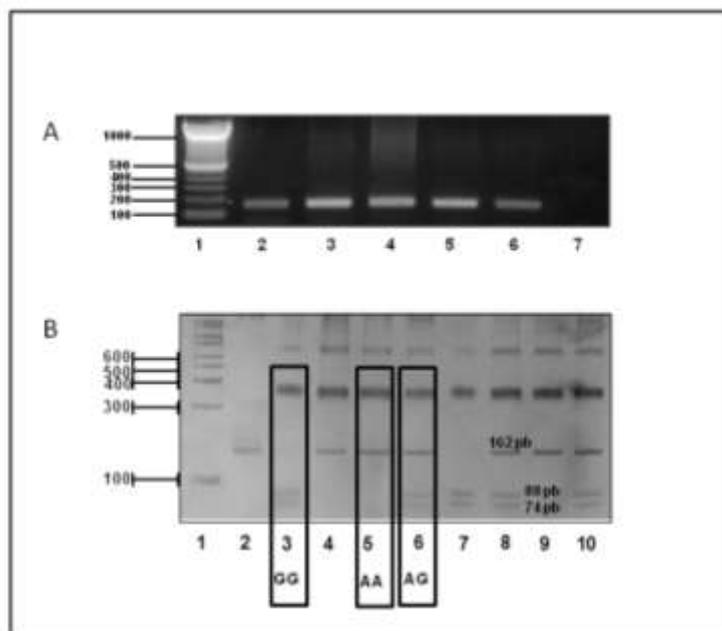


Figura 36- Figura representativa para os alelos CTLA-4. (A) representa eletroforese de agarose 1% representando o amplicom de 162 pb do fragmento de gene CTLA-4. Em 1, padrão de peso molecular de 100pb. Canaletas de 2 a 6 representam o amplicom de 162 pb. Em 7, controle negativo da reação A imagem representada em B corresponde à eletroforese em poliácridamida 10% corada com nitrato de prata representando os três possíveis padrões de bandas identificados para a determinação dos genótipos referentes ao polimorfismo para o CTLA-4 (+49A/G), Na canaleta 1 padrão de peso molecular. Canaletas 2, 4, 5 e 9 fragmento único de 162 pb, que corresponde ao genótipo AA. Nas canaletas 3, 5, 6, 8, e 10, fragmentos de 162, 88 e 74 pb correspondentes ao genótipo AG e na canaleta 10, fragmentos de 88 e 74pb que corresponde aos alelos GG.

A população analisada para CTLA-4 é um total de 277 indivíduos, o que totaliza 90,5% da amostra total. A frequência genotípica observada está ilustrada no gráfico da Figura 36, e corresponde à população total do estudo. Através deste gráficos podemos verificar uma baixa frequência do genótipo homozigoto (polimórfico) na população. Em relação

a frequência alélica do gene CTLA-4, podemos verificar uma maior frequência do alelo selvagem, em uma razão de 2:1, sendo o alelo selvagem A(+49) o mais frequente na população (72,4% A e 27,6% G). Os dados foram analisados através dos testes de qui-quadrado de cada subpopulação em relação ao CTLA-4, onde foram geradas as seguintes tabelas de contingência: É importante salientar que foram realizadas análises levando em conta a população total e cada gene polimórfico e cada uma das populações *versus* a outra separadamente (Figura 37).

As frequências de cada subpopulação são respectivamente: negativos endêmicos AA 45,37%, AG 35,18%, GG 19,44%; negativos AA 36,53%, AG 19,23%, GG 44,23%; positivo de área endêmicas AA 53,65%, AG 25,20%; GG 21,1%.

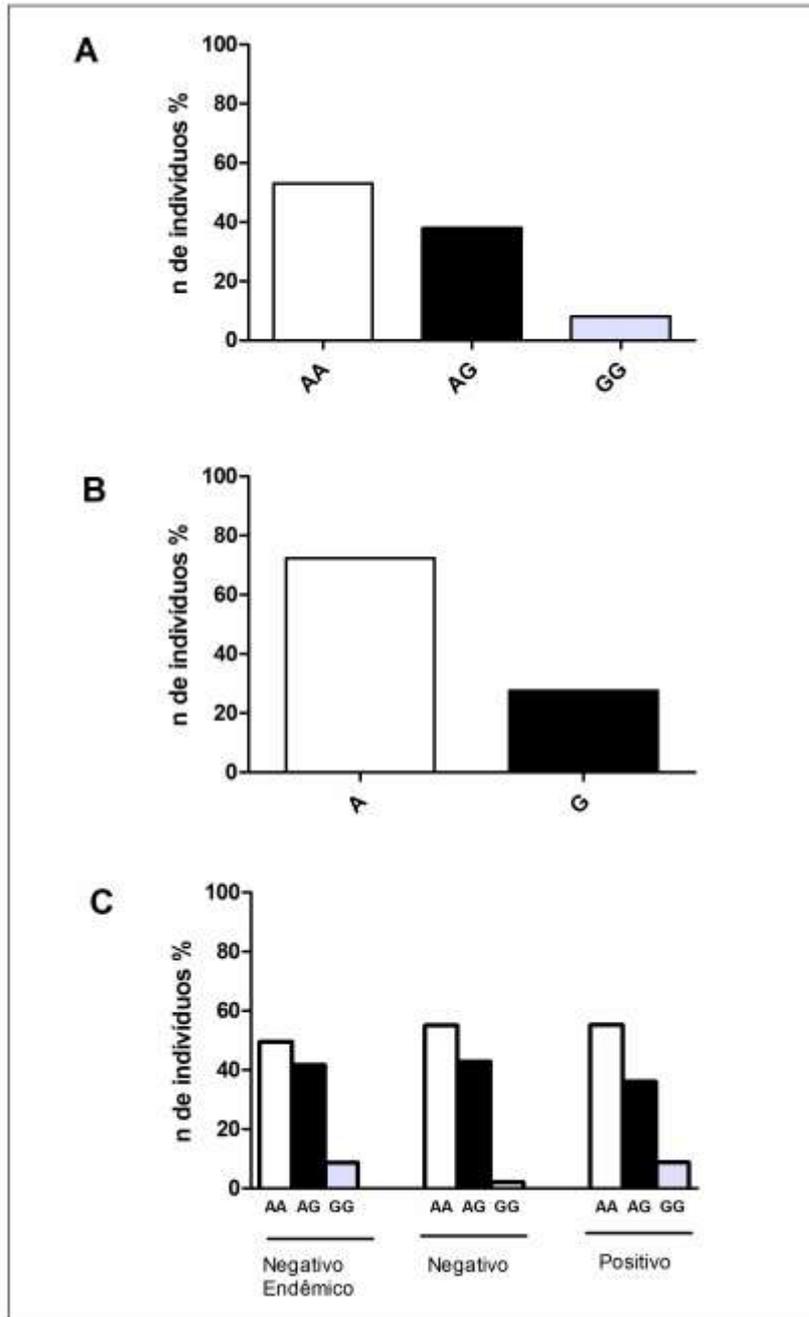


Figura 37- Frequências genóticas total (A) e frequência alélica total (B) e frequências genóticas por subpopulação (C) em relação ao polimorfismo do gene CTLA-4⁺⁴⁹.

As frequências alélicas observadas para o polimorfismo do gene CTLA-4 +49 são :A= 72,4% e G=27,6%.

As análises referentes a este polimorfismo não resultaram em significância estatística, e os resultados estão apresentados no ANEXO I.

5.16.2FOXP3

Análise dos dados foram realizadas considerando a população total e realizada separadamente para homens e mulheres devido ao fato que FOXP3 está localizado no cromossomo X humano.

Em relação ao SNP ⁺459A/G FOXP3 representado na Figura 38, a clivagem com a enzima de restrição BsmI resulta em fragmentos que correspondem aos alelos: banda única de 307 pb: AA, banda única de 327 pb: GG, e presença de bandas de 307 e 327 pb: alelos AG, como representado na Figura 38:

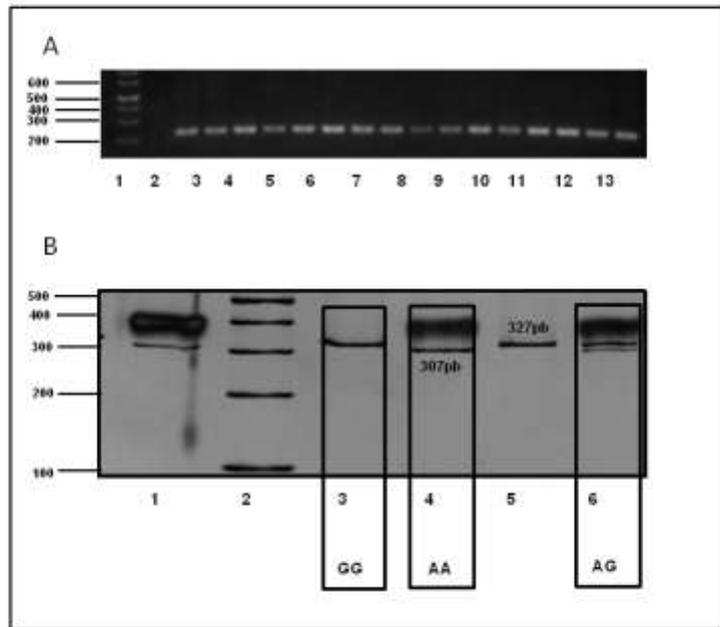


Figura 38- A imagem (A) representa uma eletroforese de agarose 1% representando o amplicon de 327pb do fragmento correspondente a sequência do gene FOXP3. Em (B) está representado eletroforese em poliacrilamida 10% corada com nitrato de prata referente à reação de PCR do gene FOXP3. Na canaleta 2 padrão de peso molecular 100bp DNA Ladder (Fementas). Canaleta 1: produto de PCR de 327 pb. Canaletas 3 e 5 banda de 307pb (GG). Canaleta 4: resendendo uma banda de 307pb (AA). Canaleta 6: amostra de DNA resendendo uma banda de 327pb e de 307 pb (AG).

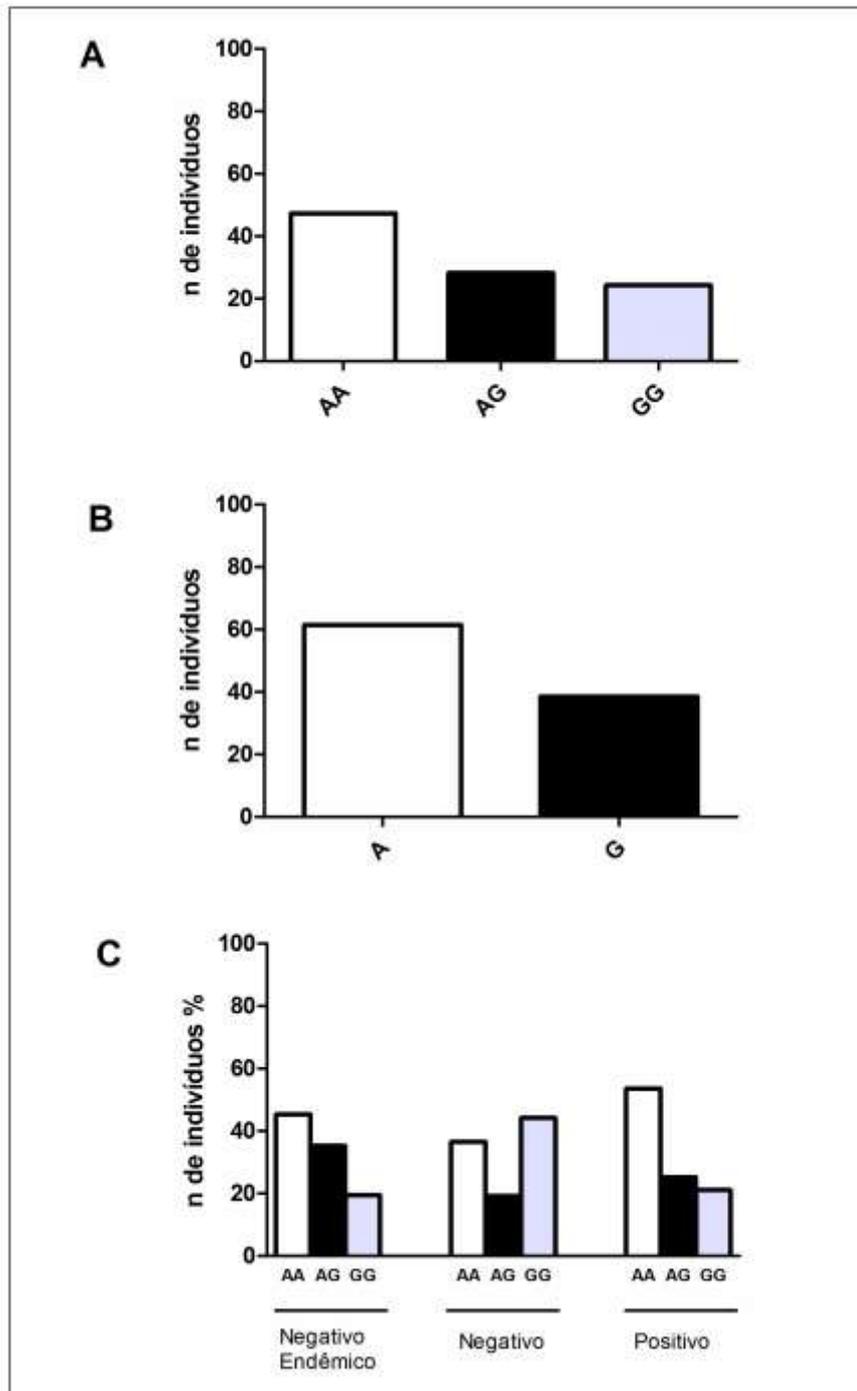


Figura 39- Frequências genóticas (A) e frequências alélicas (B) e frequências genóticas das subpopulações (C) referentes ao polimorfismo IVS9⁺⁴⁵⁹ do gene para FOXP3.

A população analisada para o gene FOXP3 totaliza 283 indivíduos, o que totaliza 92,5% da amostra total. Em relação à população total, foi realizado o cálculo das frequências genotípicas e alélicas, sendo as seguintes frequências observadas: AA 47,3%, AG 28,2%, GG 24,3%. Em relação às frequências alélicas estas foram as seguintes: A 61,4% e G 38,5%. Estes valores estão representados na Figura 39 A, B e C:

As frequências genotípicas para cada subpopulação são respectivamente: Negativos endêmicos AA 45,37%, AG 35,18%, GG 19,44%; negativos AA 36,53%, 19,23%, GG 44,23%; positivo de área endêmica AA 53,65%, AG 25,20%, GG 21,13%. Os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado de cada subpopulação em relação ao gene FOXP3, onde os resultados estão ilustrados na Tabela 9:

Tabela 9- Resultados dos testes qui-quadrado para população total de FOXP3

População analisada	χ^2	p
População total x FOXP3	16,037	0,003
Negativo de área endêmica x Negativos	11,464	0,003
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	2,793	0,243
Negativos x Positivo de área endêmicas	9,723	0,008

Onde podemos encontrar diferenças estatística entre as três populações, entre os grupos negativos e negativo de área endêmica e negativos e positivo de área endêmicas.

Em seguida calculamos o qui-quadrado referente à presença/ausência do alelo polimórfico, onde não encontramos associação estatística entre a população de estudo e polimorfismo do gene FOXP3, onde os valores encontrados foram $\chi^2 = 4,571$ e $p=0,102$.

Após estas análises calculou-se Odds Ratio (OR). Os resultados referentes ao OR estão representados na Tabela 10:

Tabela 10- Teste OR para população total de FOXP3

População analisada	χ^2	p	OR
Negativo de área endêmica x Negativos	1,120	0,290	
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	1,580	0,209	
Negativos x Positivo de área endêmicas	4,288	0,038	2,011-IC 1,033-3,916

IC: Intervalo de Confiança 95%.

O próximo passo referente à análise de FOXP3 foi realizar as análises separadamente em relação ao sexo. Em relação às frequências obtidas encontramos os seguintes valores: sexo masculino pacientes negativos endêmicos 75,7% A, 24,3% G; pacientes negativos 38,1% A, 61,9% G; pacientes positivo de área endêmicas 76,5% A, 28,5% G.

Já as frequências observadas para o sexo feminino foram: pacientes negativos endêmicos: 56,3% A, 43,7% G; pacientes negativos 51,6% A, 48,4% G; pacientes positivo de área endêmicas 59% A, 41% G.

As frequências alélicas para os pacientes do sexo masculino e feminino estão representadas na Figura 40:

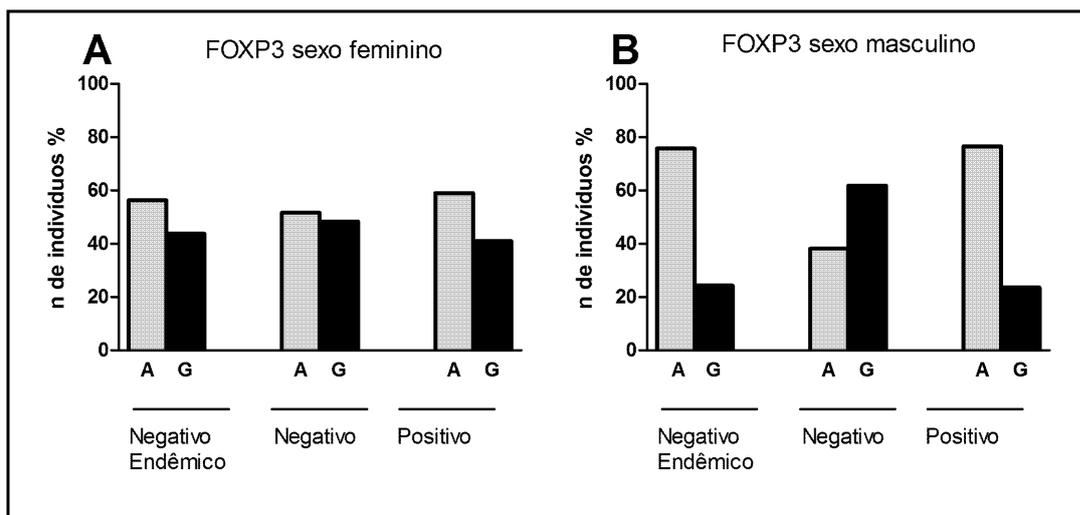


Figura 40- Frequências alélicas de FOXP3 para o sexo feminino (A) e sexo masculino (B).

Após o cálculo destas frequências, analisamos a população total de cada sexo e as subpopulações *versus* FOXP3. Os resultados estão ilustrados na Tabela 11 ,onde podemos observar valores com significância estatística em pacientes do sexo masculino.

Tabela 11- Teste qui-quadrado e OR para populações de FOXP3 analisada por gênero

População analisada	sexo	χ^2	p	OR
População total x FOXP3	Masculino	12,846	0,012	
Negativo de área endêmica x Negativos	Masculino	8,659	0,013	
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	Masculino	1,389	0,499	
Negativos x Positivo de área endêmicas	Masculino	8,885	0,003	0,205 IC 0,006-0,004
População total x FOXP3	Feminino	5,699	0,223	
Negativo de área endêmica x Negativos	Feminino	4,518		0,104
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	Feminino	1,584	0,453	
Negativos x Positivo de área endêmicas	Feminino	2,597	0,273	

IC; intervalo de confiança 95%.

Em seguida realizamos a correlação entre presença/ausência do alelo polimórfico, os resultados referentes a esta análise estão representados na Tabela 12:

Tabela 12- Análise de gênero ancestral x alelo polimórfico para FOXP3

População analisada	sexo	χ^2	p	OR
População total x FOXP3	Masculino	10,284	0,006	
Negativo de área endêmica x Negativos	Masculino	7,202	0,007	0,220 IC 0,70-0,686
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	Masculino	0,020	0,888	1,071 IC 0,412-2,789
Negativos x Positivo de área endêmicas	Masculino	8,885	0,003	4,875 IC 1,653-14,377
População total x FOXP3	Feminino	1,318	0,517	
Negativo de área endêmica x Negativos	Feminino	0,422	0,516	1,348 IC 0,547-3,318
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	Feminino	1,283	0,257	1,503 IC 0,741-3,049
Negativos x Positivo de área endêmicas	Feminino	0,060	0,807	1,116 IC 0,464-2,684

Na análise de correlação pelo teste qui-quadrado entre o gene ancestral e o gene polimórfico foram encontradas associações significativas para os grupos do sexo masculino. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 13:

Tabela 13 –Análise da frequência alélica e Odds ratio entre alelo polimórfico x alelo ancestral

População analisada	χ^2	p	Graus De Liberdade	Correção de Yates/p	Sexo	OR	p/IC
Negativo de área endêmica x Negativos x Positivo de área endêmica	22,875	0,000	2		Masculino		
Negativo de área endêmica x Negativo	16,072	0,000	1	14,516	Masculino	0,1978	0,001 0,0873- 0,4484
Negativo x Negativo de área endêmica	-	-	-	-	Masculino	5,0565	0,001 2,2301- 11,4610
Negativos x Positivo de área endêmicas	19,329	0,000	1	17,673/0,000	Masculino	5,2813	0,000/ 2,4385- 11,4379
Positivo de área endêmicas x Negativos	-	-	-		Masculino	0,1893	0,000/0,087 4-0,4101
Negativo de área endêmica x Positivo de área endêmicas	0,0015	0,9028	1	0,003/0,9543	Masculino		
Negativo de área endêmica x Negativosx Positivo de área endêmica	0,997	0,6135	1		Feminino		
Negativo de área endêmica x Negativo	0,389	0,5327	1	0,2222/0,6377	Feminino		
Negativos x Positivo de área endêmicas	0,971	0,3244	1	0,692/0,4053	Feminino		
Positivo de área endêmica x Negativo de área endêmica	0,212	0,6453	1	0,116/0,7334	Feminino		

5.16.3 – IL-10

Os três possíveis padrões de bandas que foram encontrados referentes ao polimorfismo do gene da IL-10 (-1082G/A) representam os genótipos GG,GA e AA, como ilustrado. As bandas de 27pb não foram identificadas devido ao seu reduzido tamanho. Entretanto o ocorrido não afeta a confiabilidade dos resultados obtidos, visto que a identificação dos genótipos foi realizada pela comparação entre bandas de 280 e 257 pb, como ilustrado na Figura 41:

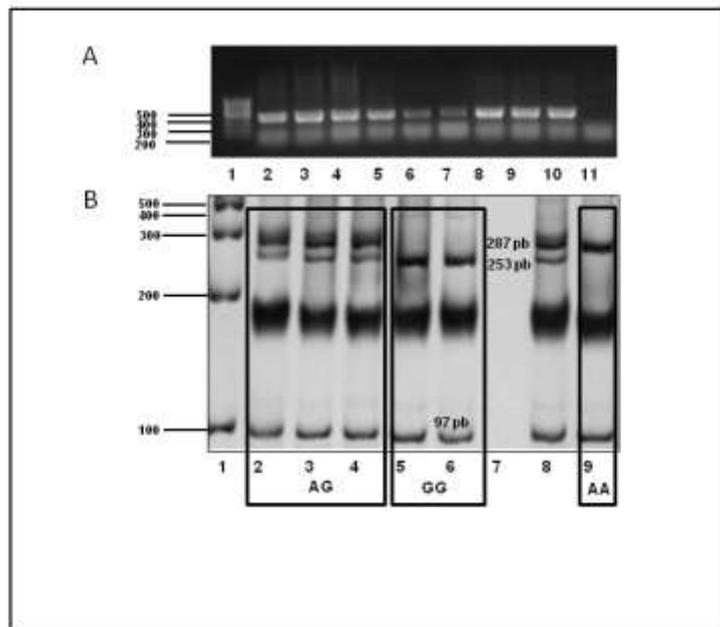


Figura 41- (A) Eletroforese de gel de agarose 1% representando o amplicon de 377pb do fragmento correspondente a sequência do gene IL-10. Em (B) a imagem inferior representa eletroforese em poliacrilamida 10% corada com nitrato de prata representando os três possíveis padrões de bandas identificados para a determinação dos genótipos referentes ao polimorfismo para IL-10, Na canaleta 1 padrão de peso molecular. Canaletas 2,3,4 e 8 fragmentos de 253 e 287 pb, que corresponde ao genótipo AG. Nas canaletas 5, e 6 representam fragmentos de 253 pb correspondentes ao genótipo GG e na canaleta 10 fragmentos de 287pb que corresponde aos alelos AA.

A população analisada para o gene IL-10 é um total de 251 indivíduos, o que totaliza 82% da amostra total. A frequência genotípica observada está ilustrada no gráfico da Figura 42. Através destes gráficos podemos verificar uma baixa frequência do genótipo homozigoto AA (polimórfico) na população AA 17,9%,AG 45,2% e GG 39,6%. Em relação a frequência alélica do gene IL-10, podemos verificar uma maior frequência do alelo selvagem (-1082 G) 62,2%, em uma razão de 2:1, sendo o alelo polimórfico (-1082 A) 37,6%.

As frequências genotípicas são: AA 17,9%, AG 45,2%, GG 39,6%; para as subpopulações: Negativo de área endêmica AA 34,73%,AG 50,52%, GG 14,73%; Negativos AA 40,095, AG 40,90%, GG 18,18%; Positivo de área endêmicas AA 42,85%, AG 43,75 5, GG 13,39%. Os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado de cada subpopulação em relação ao gene IL-10, onde não foram detectadas diferenças estatísticas nos grupos avaliados. Os valores obtidos não apresentaram significância estatística e estão indicados no ANEXO I.

5.16.4 – TGF- β

A análise de restrição da sequência ⁺⁸⁶⁹ C/T gera um padrão de bandas de DNA conforme ilustrado na Figura 43:

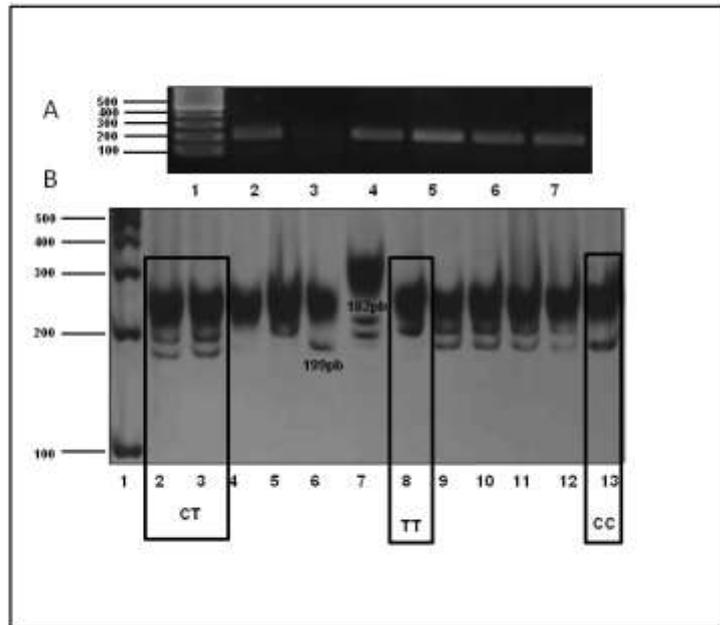


Figura 43- (A) representa eletroforese de agarose 1% representando o amplicon de 377pb do fragmento correspondente a sequência do gene IL-10. (B) representa eletroforese em poliacrilamida 10% corada com nitrato de prata representando os três possíveis padrões de bandas identificados para a determinação dos genótipos referentes ao polimorfismo para IL-10. Na canaleta 1 padrão de peso molecular. Canaletas 4 e 8 fragmentos de 182 pb, que corresponde ao genótipo TT. Nas canaletas 2,3,7,9,10,11,12, fragmentos de 182 e 199 pb correspondentes ao genótipo CT e na canaleta 6 e 13 fragmentos de 199pb que corresponde aos alelos CC.

A população analisada para o gene TGF- β é um total de 243 indivíduos, o que totaliza 79,4% da amostra total. A frequência genotípica observada está ilustrada nos gráficos da Figura 43. Através destes gráficos podemos verificar uma alta frequência do genótipo homozigoto TT (polimórfico) na população CC 17,9%,CT 45,2% e TT 39,6%.

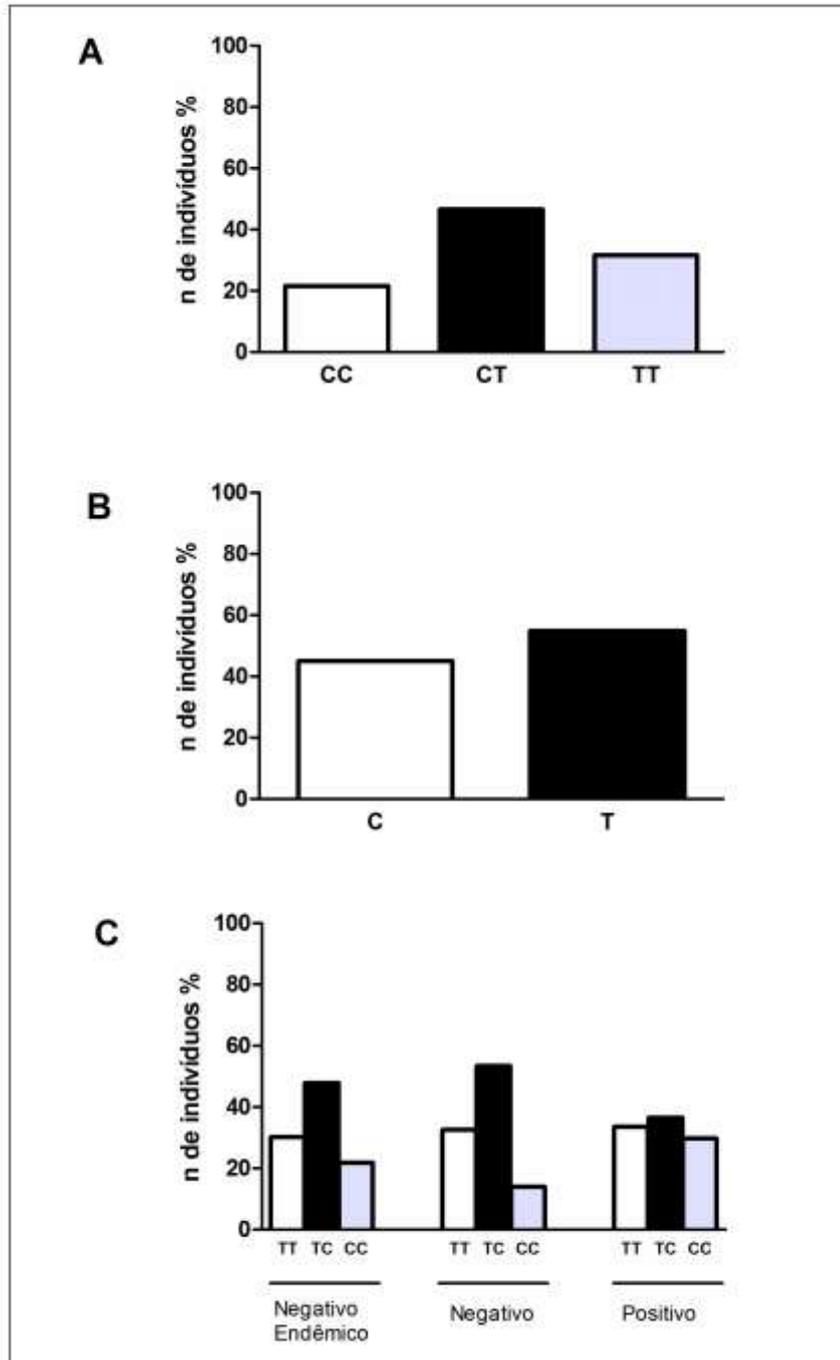


Figura 44- Frequência genotípica em relação ao polimorfismo do gene TGF- β

Em relação as frequências das populações estas são respectivamente: pacientes negativos endêmico: TT 30,20%, TC 47,91%, CC 21,87%; Negativos TT 32,55%, TC 53,48%, CC 13,95%; Positivo de área endêmicas TT 33,65%, TC 36,53%, CC 29,8%. Os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado de cada subpopulação em relação ao gene TGF- β , onde foram geradas tabelas de contingência:, onde não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados . Os cálculos referentes a estas análises estão ilustrados no ANEXO I.

5.17 – Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para verificar se as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, estas foram analisadas com o programa R e o pacote Hardy-Weinberg, com $\alpha=0,05$ e sem correção de continuidade. Os resultados estão ilustrados na Tabela 14, onde verificamos que a população referente a FOXP3 não se encontra em equilíbrio. A partir dos valores obtidos foi possível constriuir um diagrama representando cada uma das populações, este diagrama está representado na Figura 45:

Tabela 14 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Gene	χ^2	p	D
CTLA-4	0.3433758	0.5578871	-1.948741
IL-10	0.3439198	0.5575753	-2.186508
TGF- β	0.683546	0.4083683	-2.979953
FOXP3	45.99425	1.186007e-11	-27.01767

D: Valor referente a metade desvio relativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para o genótipo hipotético AB.

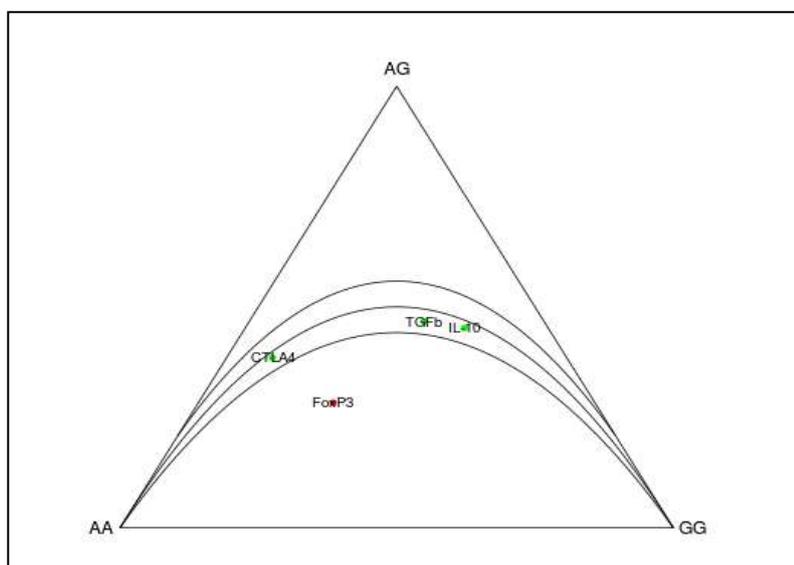


Figura 45- Distribuição das populações de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. D: Valor referente a metade desvio relativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para o genótipo hipotético AB.

DISCUSSÃO

6-DISCUSSÃO

Os ancilostomídeos conseguem sobreviver em seus hospedeiros mesmo diante de uma resposta imune robusta, o que representa um forte indicativo da evasão da resposta imune desencadeada pelo parasito. Apesar da evasão da resposta imune ser extensivamente relatada na literatura, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados. Neste sentido, o presente estudo propõe, em sua primeira parte, esclarecer o papel do mecanismo de modulação através das ação das células T reguladoras dentro do contexto da resposta imunológica do hospedeiro desencadeado pela presença do parasito durante a infecção humana e, em uma segunda parte, a influência de polimorfismos de genes associados a regulação, observando uma possível associação do mecanismo de modulação da resposta imunológica com fatores genéticos do hospedeiro.

Uma das hipóteses atuais ainda não comprovada para explicar a modulação da resposta imune durante a infecção parasitária seria a presença de células T reguladoras (Treg). Em humanos, estas foram descritas como células responsáveis pela anergia em resposta a estímulos policlonais, com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e proliferação celular por mecanismo de contato célula-célula (BAECHER-ALLAN et al., 2001). As células T reguladoras representam cerca de 1 a 3% dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico, e são caracterizadas pela expressão constitutiva de moléculas como o fator de transcrição FOXP3, GITR, CTLA-4 e, ainda, altos níveis de CD25 (CRUVINEL et al. 2008; SAKAGUCHI et al., 1999; SAKAGUCHI et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2004; CHATILA et al., 2002). Estas células estão comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto reativos nos tecidos periféricos (SAKAGUCHI et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2004; CRUVINEL et al., 2008) e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e auto antígenos (CRUVINEL et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na imunomodulação por infecções parasitárias são múltiplos e algumas evidências experimentais têm apontado para o possível envolvimento de células T reguladoras naturais e/ou induzidas na imunorregulação de células T efetoras durante a infecção crônica por ancilostomídeos. Nas últimas quatro décadas (GERSHON et al., 1970; GERSHON et al 1971), vários estudos têm tentado descrever o papel das células T reguladoras em doenças parasitárias (revisto em

BELKAID et al., 2005; 2007), incluindo leishmanioses, esquistossomose, malária e filariose linfática. No entanto, um número limitado de estudos têm-se centrado no conhecimento real sobre a dinâmica e capacidade funcional de células T reguladoras em infecções helmínticas. Ainda assim, evidências da atividade de células T reguladoras nas infecções humanas por helmintos foram demonstradas primeiramente pela geração de clones de células T em pacientes com oncocercose (SATOGUINA et al., 2002) e recentemente descrita para geohelmintos (WAMMES et al., 2010). Mesmo em modelos experimentais, poucos estudos foram realizados, nos quais foi demonstrado que as populações de células T reguladoras se desenvolvem no curso da filariose (BAUMGART et al., 2006) e esquistossomose (TAYLOR et al., 2006), e que a regulação por células $CD4^+CD25^+$ suprime a resposta alérgica durante a infecção com o nematóide *Heligmosomoides bakeri* (WILSON et al., 2006).

Nas infecções por nematódeos, infecções podem induzir e expandir naturalmente a ocorrência de T reguladoras em humanos e camundongos (CHATILA et al., 2005), sugerindo que o papel destas células esteja associado com a modulação nos processos inflamatórios (BELKAID et al 2005; BELKAID, 2007). Interessantemente, estudos em infecções crônicas com *Schistosoma mansoni* em camundongos demonstram o papel protetor destas células na imunopatologia e que sua remoção aumenta o dano tecidual (HESSE et al., 2004).

As células T reguladoras $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ constituem uma subpopulação de linfócitos T $CD4^+$, que exercem importante papel no controle na extensão da patologia mediada pela resposta imunológica e realizam a manutenção da homeostase da tolerância imunológica e imunológica (SCHEVACH et al., 2002; KURSAR et al., 2002). Esta população celular suprime a ativação e proliferação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ por contato direto ou através da secreção de citocinas imunorregulatórias, dentre as quais podemos destacar IL-10 e TGF- β (BELKAID et al., 2002; KURSAR et al., 2002). Além disso, o mecanismo de imunomodulação mediado pelas células T reguladoras levam à sobrevivência de patógenos, e em alguns casos, a sua persistência a longo prazo (BELKAID et al., 2005). De fato, uma das características marcantes das infecções crônicas por helmintos é a indução de células T hiporresponsivas (anérgicas) (MAIZELS et al., 2008).

No presente trabalho, descrevemos o papel de células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ na infecção humana por *N. americanus*. Para explorar os mecanismos celulares imunológicos na infecção por ancilostomídeos, onde classicamente encontramos células

T hiporresponsivas, analisamos as frequências de células T reguladoras no sangue periférico e realizamos o “add-back” e a depleção de células CD4⁺CD25⁺ em PBMCs isolados de indivíduos infectados por *N. americanus*.

Inicialmente demonstramos que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam um aumento significativo de células T reguladoras circulantes no sangue periférico em comparação aos voluntários saudáveis não infectados, conforme já demonstrado em outras infecções por nematódeos (LAYLAND et al., 2010; DÉLIA et al., 2009; TAYLOR et al., 2009). Apesar da ausência de diferenças na expressão dos marcadores associados com a atividade imunomoduladora quando avaliado a intensidade de expressão das diversas moléculas estudadas, houve um aumento efetivo do número de células T CD4⁺CD25⁺ que expressam o fator de transcrição FOXP3⁺ em indivíduos infectados. De fato, a expressão aumentada de FOXP3⁺ em células T naïve pode ser provocada por produtos de excreção e secreção de nematódeos, resultando na indução da expressão *de novo* de FOXP3 e conseqüentemente a ativação de células supressoras (GRAINGER et al., 2010). Interessantemente, indivíduos infectados por ancilostomídeos também apresentaram níveis significativamente mais baixos de linfócitos circulantes, o que pode ser parcialmente explicado pela inibição de células T efetoras durante a fase indutora da resposta imune nos tecidos linfóides secundários por IL-10 através de mecanismos independentes (WINSTEAD et al., 2008). É possível que o aumento das células T reguladoras desencadeie a modulação da resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, promova a sobrevivência prolongada dos ancilostomídeos. Por outro lado, o aumento de células T reguladoras poderia também contribuir para a limitação de infecção exacerbada induzida pela patologia dos tecidos, o que seria em última análise benéfica para o hospedeiro.

Vários potenciais mediadores da atividade de células T reguladoras que poderiam contribuir para a supressão da resposta imune do hospedeiro foram identificados, incluindo GITR (SHIMIZU et al., 2002), CTLA-4 (CHEN et al., 1998), FOXP3 (HORI et al., 2003; FONTENOT et al., 2003) e as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β (SHEVACH et al., 1998; FONTENOT et al., 2003). Neste trabalho, um aumento significativo de linfócitos CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ circulantes, co-expressando GITR, CTLA-4, IL-10, TGF-β ou IL-17, foi demonstrado em indivíduos infectados por *N. americanus*, em comparação com indivíduos não-infectados. No entanto, uma maior expressão destes marcadores por célula, quando avaliado por intensidade média de

fluorescência, não foi observada em doadores infectados em relação aos indivíduos saudáveis.

GITR e CTLA-4 são moléculas constitutivamente expressas na superfície celular de células T reguladoras naturais (BELKAID et al., 2005) e são reguladas pela expressão do fator de transcrição FOXP3 (COOLS et al., 2008; YAGI et al., 2004). Os primeiros estudos relacionados aos efeitos do GITR em células T reguladoras indicaram que a interação desse receptor com anti-anticorpo anti-GITR ou GITR ligante (GITRL) levou a uma aparente anulação da atividade supressora de células T reguladoras (SHIMIZU et al., 2002). De fato, o tratamento de camundongos infectados com *Trichuris muris* com anticorpo anti-GITR resultou em uma expulsão precoce do verme (DÉLIA et al., 2009). Embora não seja essencial para a atividade das células T reguladoras (NOCCENTINI et al., 2007), a participação de GITR promove a sua proliferação (NOCCENTINI et al., 2007) e um potencial aumento de sua função supressiva (SHEVACH et al., 2006). O aumento significativo de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+GITR^+$ circulantes e $CD4^+CD25^+FOXP3^+CTLA-4^+$ em doadores infectados pode parcialmente refletir o aumento concomitante de células T reguladoras. Da mesma forma, camundongos infectados experimentalmente com *H. bakeri* ou *Litomosoides sigmodontis* também apresentaram um aumento proeminente dos níveis de expressão de GITR e CTLA-4 (MAIZELS et al., 2004).

O receptor do CTLA-4 apresenta homologia parcial à molécula CD28 e interage com os ligantes CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras de antígeno (ALEGRE et al., 2001). O efeito supressivo da CTLA-4 é associado com a reduzida produção de IL-2 e da expressão deste receptor e também pelo bloqueio de células T na fase G1 do ciclo celular (KRUMMEL et al., 1995). Além disso, células T reguladoras expressando CTLA-4 induzem a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas células apresentadoras de antígenos que degradam o triptofano e, a falta deste aminoácido essencial, inibe a ativação de células T promovendo a apoptose (FALLARINO et al., 2003). Em infecções por helmintos, como na filariose linfática, a expansão das populações de células T CTLA-4⁺ está associada com a supressão da função das células T (STEEL et al., 2003). O aumento do número de células GITR⁺ e CTLA-4⁺ circulantes em indivíduos infectados sugere que essas células podem desempenhar um papel supressivo sobre a regulação imune do hospedeiro (STEEL et al., 2003).

Embora tenha sido historicamente reconhecido que células T produtoras de IL-10 poderiam ser geradas *in vivo* durante a infecção parasitária com contribuição direta para a regulação da resposta imune (MAIZELS et al., 2003), somente nos últimos anos é que surgiu o conceito que subpopulações especializadas de células T reguladoras poderiam contribuir para o mecanismo de imunorregulação (BELKAID et al., 2007; BELKAID et al., 2010). No estudo, indivíduos infectados apresentaram um aumento significativo de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ produtoras de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β. De fato, um aumento na secreção de IL-10 foi demonstrado em culturas primárias de PBMCs estimuladas com antígeno ES durante a ancilostomíase experimental e na infecção natural em humanos (GEIGER et al., 2004; GEIGER et al., 2008). IL-10 e TGF-β são produzidas naturalmente por células T reguladoras (BELKAID et al., 2005) e induzem a expressão do fator de transcrição FOXP3 (SCHOLZEN et al., 2006). Embora não seja claro como a infecção influencia a produção dessas citocinas anti-inflamatórias, baixos níveis de IL-10 foram observados em sobrenadantes de culturas após depleção, que pode corroborar a hipótese de que produtos de *N. americanus* contribuiriam como importante estímulo para a produção de IL-10 por células T reguladoras. Da mesma forma, resultados similares foram observados para a produção de IL-2, que pode estar intimamente associado à depleção das células T reguladoras, uma vez que estas células depletam IL-2 no ambiente celular pela ligação com o receptor de CD25 (BELKAID et al., 2005).

Os resultados apresentados demonstram que indivíduos infectados por ancilostomídeos apresentam um aumento significativo de células T reguladoras ativadas no sangue periférico, observado pelo aumento do número de subpopulações de células T reguladoras expressando moléculas de superfície celular e mediadores associada à supressão da resposta imune. Estas células podem contribuir para o efeito supressor da infecção parasitária, levando à redução da resposta antígeno-específica e resposta proliferativa anteriormente demonstrada em populações humanas e modelos animais (FUJIWARA et al., 2009; FUJIWARA et al., 2006). De fato, a infecção crônica humana por *N. americanus* é classicamente associada a uma redução profunda da proliferação celular, o que pode até mesmo se estender a outros agentes infecciosos e mitógenos (GEIGER et al., 2004; BETHONY et al., 2005).

No presente estudo foi observado que por ensaios funcionais as respostas proliferativas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, estimuladas por antígeno bruto ou por antígeno ES, foram parcialmente reestabelecidas após a depleção de células T

reguladoras, seguido por um aumento da secreção de IL-2 e diminuição dos níveis de IL-10, o que poderia explicar o efeito imunomodulador específico observado durante a infecção. É importante ressaltar que, em ensaios onde as células T reguladoras foram adicionadas, não houve mudança no perfil de proliferação, continuando o padrão clássico observado de células hiporresponsivas (FUJIWARA et al., 2009; FUJIWARA et al., 2006; MAIZELS et al., 2008).

Recentemente, Cuéllar et al (2009) demonstrou que a coincubação de células de esplenócitos de camundongos com células dendríticas estimuladas com o antígeno recombinante de *Ancylostoma caninum*, Ac-TMP-1, induziu a sua diferenciação em células CD4⁺ e, particularmente, em células CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ que expressavam IL-10 (CUÉLLAR et al., 2009). Estas células foram capazes de suprimir a proliferação de células T CD4⁺TGF-β-dependentes (CD4⁺supressoras) ou independentes (CD8⁺supressoras). No entanto, enquanto evidenciamos que a expansão e os efeitos supressores de células T reguladoras são proeminentes durante a fase crônica, nenhuma alteração no número de células T nem na contagem do número absoluto de células T reguladoras foram observados na primo-infecção com *N. americanus* (BLOUNT et al., 2009). No entanto, os dados do presente trabalho sugerem que os ancilostomídeos se beneficiariam da presença e expansão das células T reguladoras, que poderia facilitar sua sobrevivência pela modulação direta sobre a resposta imune do hospedeiro.

Neste ambiente sabidamente imunorregulatório, é possível observar ao mesmo tempo fatores pró-inflamatórios e fatores anti-inflamatórios. Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ produtoras de IL-17 em doadores infectados, onde esta citocina está associada a resposta inflamatória crônica. Estudos prévios já demonstraram a presença dessa subpopulação celular em humanos portadores de doenças parasitárias, como helmintoses e malária (BUENO et al., 2010; GRAINGER et al., 2010; SCHOLZEN et al., 2009). Notavelmente, um estudo recente demonstrou que produtos ES de ancilostomídeos são capazes de influenciar a via pró-inflamatória de células Th17, promovendo uma diminuição significativa na produção de IL-17 em camundongos BALB/c tratados com produtos do parasito (CANÇADO et al., 2011), fato também observado por Ruysers e colaboradores, que demonstraram que os antígenos de helmintos podem reduzir a expressão de IL-17 no cólon e em linfonodos mesentéricos (RUYSSERS et al., 2009). Interessantemente, foi detectado uma redução significativa no número absoluto de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-17⁺ após estimulação com antígeno bruto, sugerindo a secreção

rápida desta citocina ou mesmo uma inibição da expressão de IL-17 após estimulação celular. De fato, Elliott et al (2008) mostrou que a colonização de camundongos com a *H. bakeri* reduz a expressão do mRNA da IL-17 em células de linfonodos mesentérico (MLN) inibiu a produção de IL-17 em cultura de células mononucleares da lâmina própria e células (MLN) (ELLIOT et al., 2008). Além disso, a co-expressão de FOXP3 e IL-17 poderia indicar o estado transitório de linfócitos CD4⁺ a partir de indivíduos infectados, onde o desenvolvimento de uma via de diferenciação é dirigida por TGF-β e IL-6 (KORN et al., 2009). A diminuição de IL-17 após a estimulação antigênica pode implicar na diferenciação destas células transitórias em células T reguladoras verdadeiramente efetoras. Estes resultados nos levaram a investigar qual seria a influência de células produtoras de IL-17 na infecção por ancilostomídeos, uma vez que constatamos que antígenos de ancilostomídeos são capazes de induzir um microambiente imunomodulatório no local da infecção. Embora evidências recentes demonstrem a supressão local das respostas de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 e Th17 durante a infecção (MCSORLEY et al., 2010), o papel da IL-17 na ancilostomíase ainda não foi totalmente esclarecido.

As células Th17 desempenham papel importante na indução e propagação de autoimunidade em modelos animais e, potencialmente, também em doenças autoimunes humanas (BETTELLI et al, 2007a; 2007b; ACOSTA-RODRIGUEZ et al, 2007 CUA et al., 2003). Membros da família Th17 atuam em vários mecanismos da resposta imune adaptativa e tornaram-se peça chave para uma compreensão ampliada das redes de citocinas que coordenam a imunidade inata e adaptativa a certos patógenos (SHAINHEIT et al., 2008). Células Th17 podem mediar a inflamação crônica nas doenças auto-imunes, como a encefalite e artrite (CUA et al., 2003). Esta população celular (Th17) é estimulada por IL-23, uma citocina heterodimérica composta das subunidades IL-12p40 e IL-23p19 (AGGARWAL et al., 2003). A citocina IL-17 está associada com a resposta do tipo Th2 e pode promover diferenciação celular e expulsão de nematódeos parasitas (FALLON et al., 2006). No entanto, o papel das células Th17 na infecção por helmintos ainda não foi estabelecido. Em camundongos infectados por *Trichinella spiralis*, foi observado um aumento de células produtoras de IL-17 durante a fase aguda, as quais poderiam contribuir para o aumento de contratilidade muscular jejunal (FU et al 2009). Na esquistossomose, a exacerbação da patologia induzida pelos ovos está associada com elevados níveis de IL-17, conforme demonstrado na imunização de camundongos C57BL/6 ou camundongos IL-12p35-deficientes com

antígeno solúvel do ovo (RUTITZKY et al., 2001; 2005). Além disso, a resposta Th17 também foi determinada como responsável pela resposta inflamatória induzida pelos antígenos do ovo de *S. mansoni* em camundongos CBA (SHAINHEIT et al., 2008).

Pacientes infectados por *N. americanus* sofrem uma diminuição significativa no número absoluto de células CD3⁺CD4⁺ produtoras de IL-17 quando estimuladas com antígeno bruto e ES de ancilostomídeos, sugerindo que estas células poderiam secretar rapidamente esta citocina. Esta redução também é observada em células de pacientes não infectados, quando estimuladas com antígeno bruto. Neste sentido, analisamos populações celulares CD4⁺CD25-FOXP3-IL-17⁺, ou seja, populações celulares onde não há a ativação do fator de transcrição FOXP3. Nesta população celular há uma abrupta diminuição no número absoluto de células circulantes em doadores infectados, quando comparado com valores apresentados por doadores saudáveis.

Resultados semelhantes foram observados quando células CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ estimuladas com antígeno bruto e ES, em cultura de células de doadores infectados e não infectados, demonstrando uma diminuição do número absoluto desta população celular, embora não tenha sido detectado diferenças na frequência de células CD3⁺CD4⁺TGF-β⁺ nos grupos analisados. Para avaliar a possível relação entre a produção de citocinas reguladoras e a presença de células Th17, correlações entre as diferentes populações celulares foram avaliadas, demonstrando associação positivas e significativas entre as citocinas IL-10 e TGF-β com a produção de IL-17. A correlação positiva entre IL-17 e as citocinas IL-10 e TGF-β poderia ser explicada pela sobreposição da resposta supressiva das células T reguladoras. Embora estas correlações não impliquem necessariamente na produção concomitante, mas somente na produção coincidente dos fatores estudados. Ainda assim, os resultados sugerem que células Th17 (sem a expressão de FOXP3) poderiam também ser responsáveis pela produção de citocinas reguladoras.

É importante ressaltar que muitos nematódeos, dentre eles os ancilostomídeos, excretam/secretam vários produtos com potencial imunomodulatório. No caso dos nematódeos como descrito para *Brugia malayi*, a injeção de produtos de excreção/secreção (ES) induz resposta similar às respostas observadas durante a infecção em modelos experimentais (ALLEN et al., 1998). Estas respostas incluem a supressão da proliferação celular, sugerindo uma capacidade de supressão/imunorregulação pelos produtos ES (LOUKAS et al., 2005). A caracterização do ES tem revelado a presença de várias proteínas, dentre elas proteases, inibidores de

proteases, lectinas e proteínas antioxidantes e antiinflamatórias (LOUKAS & PROCIV, 2001), que podem contribuir para a hiporresponsividade celular característica da infecção crônica por ancilostomídeos (LOUKAS et al., 2005). Além disso, o antígeno bruto do parasito, além de possuir tais características possuem ainda um vasto repertório de proteínas de superfície potencialmente imunogênicas, como por exemplo, quitinases (LOUKAS & PROCIV, 2001). Neste estudo, células $CD3^+CD4^+$, quando estimuladas com antígeno bruto e ES apresentaram diferenças significativas na intensidade média de fluorescência de IL-17, quando comparadas com células não estimuladas. Surpreendentemente, células $CD3^+CD4^+IL-17^+$ de pacientes infectados apresentaram uma redução da intensidade média de fluorescência (IMF) quando estimulados os antígenos de ancilostomídeos bruto e ES ($p = 0,0401$ e $p = 0,0330$, respectivamente). Estes dados sugerem novamente que a IL-17 produzida seria secretada rapidamente e, conseqüentemente, consumida no ambiente celular. A IMF de $IL-10^+$ células $CD3^+CD4^+$ apresentou um aumento significativo na expressão dos receptores em células de pacientes infectados estimuladas com antígeno bruto, sugerindo, portanto, uma secreção de IL-10 após estimulação antigênica. Finalmente, as células $CD3^+CD4^+$ que expressam TGF- β apresentaram uma diminuição da expressão quando estimuladas com antígeno ES. É importante ressaltar que, embora nem sempre seja detectada significância estatística, podemos observar que culturas celulares estimuladas com antígeno bruto apresentam um aumento da expressão de TGF- β e IL-10, ao passo que células estimuladas com antígeno ES, apresentam uma diminuição da intensidade de fluorescência para os mesmos marcadores. Estes dados sugerem que o antígeno bruto possui um potencial imunomodulatório mais pronunciado que o antígeno ES.

Em conclusão, os dados apresentados no presente estudo sugerem que o estabelecimento e manutenção da infecção por ancilostomídeos poderia ser beneficiado pela atividade das células T reguladoras em suprimir/modular as respostas proliferativas. Embora seja conhecido que os produtos ES de nematódeos podem estimular diretamente células T reguladoras (GRAINGER et al., 2010), poucos estudos demonstram as propriedades imunomoduladoras da ancilostomíase derivados de antígenos (MCSORLEY et al., 2010; LOUKAS et al., 2005). Considerando a recente disponibilidade de dados do transcriptoma dos ancilostomídeos, (WANG et al., 2010; CANTACESSI et al., 2011), mais estudos ainda são necessários para identificar antígenos especificamente associado com supressão imunológica do hospedeiro,

levando à compreensão dos mecanismos utilizados pelo parasito para evasão da resposta imune do hospedeiro, e a possível descoberta de antígenos candidatos a vacina.

Até o presente momento, investigamos fatores que correspondem às ações do parasito frente ao hospedeiro. Na última parte do nosso estudo investigamos quais seriam os fatores intrínsecos ao hospedeiro que influenciariam a resposta imunológica e o curso da infecção pelos ancilostomídeos. Para atingir tal objetivo, avaliamos qual seria a frequência na população de polimorfismos relacionados à imunomodulação, dentre eles o fator de transcrição FOXP3, o marcador de imunorregulação CTLA-4 e as citocinas imunorreguladoras IL-10 e TGF- β . É importante ressaltar que não há registro na literatura de estudos envolvendo a investigação de polimorfismos em genes relacionados à resposta imunológica em ancilostomídeos, o que dificulta o entendimento sobre os fatores do hospedeiro relacionados com a patogênese da doença. A realização destes estudos poderia portanto, determinar padrões genéticos de susceptibilidade ao desenvolvimento da doença.

Dentre os quatro genes investigados, o gene CTLA-4 tem sido implicado em várias doenças autoimunes endócrinas. O gene codificador para CTLA-4 encontra-se no cromossomo 2, na região 2q33. O polimorfismo (⁺49) para CTLA-4, também conhecido como Ala17- CTLA-4 está associada a doenças autoimunes tais como doença de Graves e diabetes mellitus tipo 1 (insulina dependente) (KING et al., 2002; UEDA et al., 2003; TEUTSCH et al., 2004). Através do sequenciamento da região cromossômica contendo os genes codificadores das moléculas co-estimulatórias, Ueda et al., (2003), verificaram que somente o SNP ⁺49 A/G acarretavam mudanças na estrutura do peptídeo (Thr/Ala) no códon 17 (DJILALISIAH et al., 2001). Esta mutação tem sido atribuída ao fenótipo G relacionado à diminuição da expressão da molécula do CTLA-4 de superfície (MAURER et al., 2001). Dentre vários trabalhos onde encontramos associação positiva com este polimorfismo, destacamos a doença celíaca (NALUIAI et al., 2000) e tireoidite de Hashimoto (DONNER et al., 1997). Em relação aos resultados obtidos, considerando a população total analisada, observamos uma frequência genotípica de 53% AA, 38% AG e 8% GG e uma frequência alélica de 72,4% A e 27,6% G. Resultados semelhantes em relação a frequência alélica foi encontrado por Costa et al (2005), onde as frequências alélicas obtidas foram de 69% A e 31% G, em estudo onde foi identificado que este polimorfismo (a presença do alelo selvagem G-) está associado com o desenvolvimento da forma indeterminada em indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Estes resultados são referentes à população brasileira, porém Nistico et al.,

(1996), encontrou valores de frequências semelhantes em populações européias para susceptibilidade à diabetes mellitus, onde observou a distribuição de 37% para o alelo A e 63% do alelo G para. Em relação às subpopulações, as frequências observadas apontam para uma não associação entre os alelos, embora exista um aumento da frequência do alelo polimórfico G em pacientes negativos. Esta observação no entanto é interessante, pois o alelo G confere a uma menor expressão da molécula de CTLA-4, e em áreas endêmicas, é observado uma maior frequência do alelo A, que caracteriza uma maior expressão deste marcador, onde poderíamos sugerir que este fato seria benéfico para o estabelecimento e sobrevivência do parasito.

Considerando ainda o processo de imunorregulação, o gene IL-10 está presente no cromossomo 1, na junção 1q31 e 1q32. A região promotora do gene IL-10 é altamente polimórfica, e contém vários sítios de regulação positiva, o que faz com que polimorfismos localizados na região promotora estejam fortemente relacionados à regulação da produção de IL-10 (LUOMALA et al., 2003) e estudos apontam que o alelo A esteja relacionado com baixa expressão de IL-10 (TURNER et al., 1997). A região próxima ao promotor contém três polimorfismos de interesse: -819C/T, 592C/A e o -1082G/A (KUBE et al., 1995). Vários estudos apontam que esta sequência é um importante sítio de interação protéica (REES et al., 2002; WASYLYK et al., 1993). Estudos apontam que este polimorfismo está relacionado a uma susceptibilidade no desenvolvimento de doenças autoimunes e patologias tais como periodontites (MOREIRA et al., 2009); infarto do miocárdio e doenças coronarianas (KOCH et al., 2000); inibição do desenvolvimento da forma grave de hemofilia A (PAVLOVA et al., 2006); e cardiomiopatia associada à Doença de Chagas (COSTA et al., 2009).

Resultados referentes ao SNP -1082G/A apontam uma maior frequência do alelo selvagem (-1082 G) 62,2%, em uma razão de 2:1, para o alelo polimórfico A 37,6%. Em relação às subpopulações, observamos uma discreta diminuição do genótipo GG em indivíduos negativos. Os dados obtidos foram semelhantes aos encontrados por Costa et al. (2005), que ao avaliar este polimorfismo, o identificou como marcador para susceptibilidade à cardiomiopatia Chagásica. Em todos os grupos avaliados, não observamos diferenças significativas nos testes aplicados; em todos os grupos analisados o alelo polimórfico A foi encontrado em maior frequência, quando

comparado ao alelo G. Isto sugere que esta alteração ao passar das gerações, se tornou benéfica para o hospedeiro e acabou por se fixar na população.

Por fim, foi avaliado o polimorfismo pontual (SNP) para a citocina TGF- β . A molécula do TGF- β , por sua vez, na forma ativa é formada por duas pontes de dissulfeto idênticas ligadas a cadeias polipeptídicas consistindo em 112 aminoácidos na região C-terminal da proteína precursora. A seqüência de aminoácidos da forma ativa do TGF- β é altamente conservada entre espécies de mamíferos, indicando uma forte seleção contra as formas variantes da proteína. Entretanto, as formas qualitativamente variáveis da molécula TGF- β são raras em humanos e a expressão constitutiva ou induzida da forma variável da proteína como consequência da variabilidade do gene TGF- β é concebível e poderia ser associada com diferentes efeitos do TGF- β sobre o crescimento celular e formação da matriz extracelular, dentre outros (LAURENCE et al., 1996). O polimorfismo na posição ⁺869 é registrado na literatura como um das mutações pontuais que mais apresentou associações positivas para várias patologias, tais como silicose e tuberculose pulmonar, (WU et al., 2008); aborto espontâneo (AMANI et al., 2005); câncer de pulmão (TEIXEIRA et al., 2010); lesões renais (SHIRLEY et al., 2002), dentre outros. Este SNP é um polimorfismo funcional está associado com altos níveis circulantes de TGF- β 1 que podem, em última análise modular o microambiente celular (TEIXEIRA et al., 2010). Este polimorfismo é caracterizado pela substituição do aminoácido timina por citosina na região 29 do códon 10 (número de acesso rs 1982073). Esta variação está localizada no núcleo hidrofóbico do peptídeo sinal, resultando na substituição de uma leucina hidrofóbica por uma prolina neutra, sendo, portanto esta substituição responsável pelos altos níveis circulantes de TGF- β 1 (GRAINGER et al., 1999; YOKOTA et al., 2000)

As análises referentes a este polimorfismo indicam que a população de estudo apresenta uma diminuição da frequência de CC em pacientes negativos. Estes achados são semelhantes aos encontrados por Teixeira et al (2010), que associou este polimorfismo ao câncer de pulmão, onde o alelo C está relacionado com o aumento do risco do desenvolvimento da doença, e que a frequência do alelo CC está discretamente aumentada na população de estudo. Embora semelhantes, nossos dados não obtiveram significância como os de Teixeira e colaboradores, em todos os testes utilizados.

O último polimorfismo analisado é referente ao fator de transcrição FOXP3, o mais bem estabelecido marcador para células T reguladoras (BELKAID et al., 2005). O

gene responsável pela codificação para este fator de transcrição está localizado no cromossomo X (Xp11.23). Mutações de FOXP3 em humanos causa a síndrome denominada de *Imunodesregulação, Poliendocrinopatia e Enteropatia*; ligada ao X (IPEX) é caracterizada por uma alta incidência de doenças autoimunes incluindo diabetes mellitus insulino-dependente, tireoidites, diarreia grave refratária e eczema, normalmente correlacionadas com elevados níveis séricos de imunoglobulina E (CHATILA et al., 2000; BENETT et al 2001). Bacchetta et al. relataram que mutações em FOXP3 resultam em anormalidades e diversos fenótipos clínicos em pacientes com IPEX (BACCHETTA et al., 2006). Polimorfismos do gene FOXP3 que ocorrem em alta frequência na população foram estudadas em doenças multifatoriais das humanas tais como diabetes tipo I, doença de Crohn, cirrose biliar primária, doença de Graves, doença de Addison e aterosclerose (BASSUNY et al., 2003).

A sequência do gene FOXP3 é polimórfica, e dentre as várias sequências relatadas na literatura, destacamos a análise de restrição para o SNP IVS9⁺459, que pertence ao cromossomo X, que consiste na troca da sequência da região 459 do íntron 9 do nucleotídeo A pelo nucleotídeo G. Estudos afirmam a possibilidade do alelo G poder alterar direta ou indiretamente o nível de expressão de FOXP3 nas células (GAO et al., 2010). O polimorfismo do gene de FOXP3 pode ocasionar mutações funcionais ou quantitativas, resultando na diminuição da frequência de células T reguladoras (GAO et al., 2010).

Como descrito anteriormente, a sequência de FOXP3 está localizada no cromossomo X, e desta forma, as análises foram realizadas com a população total e na população estratificada por sexo, como descrito por Fodor et al.(2011) e Gao et al., (2010). Nos indivíduos negativos foi registrado um aumento da frequência do alelo GG em relação aos indivíduos positivos de área endêmica e negativos de área endêmica. Estes dados estão de acordo com os achados por Gao et al., (2010), que avaliou indivíduos com psoríase e apresentaram frequências semelhantes, embora o genótipo GG esteja aumentado nos indivíduos portadores de psoríase.

A análise estatística do teste qui-quadrado foi significativa entre as três subpopulações (p=0,003), entre os grupos Negativos de área endêmica x Negativos (p=0,003) e entre Negativos x Positivos de área endêmica (p=0,008). No cálculo de risco relativo houve associação positiva entre os grupos Negativos x Positivos de área endêmica (em que o valor p=0,038, OD= 2,011 e Intervalo de Confiança 1,033-3,916).

Na análise por gênero, não foi registrado nenhum tipo de associação no sexo feminino, mas no sexo masculino, há um aumento do alelo G nos pacientes negativos. Estes dados são semelhantes aos observados na população total entretanto, mais estudos e a realização de análises adicionais são ainda necessários para esclarecer tal padrão. Em relação ao gênero Gao et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes analisando o SNP -3279 de FOXP3, onde encontrou associações positivas somente no sexo masculino. Esta diferença pode ser explicada pela localização do gene FOXP3, que está no cromossomo X, portanto levando a diferenças entre os gêneros. Dados semelhantes foram obtidos por Bassuny et al. (2003) que investigou o SNP IVS9⁺459 em pacientes com diabetes mellitus e Park et al. (2005) que investigou a susceptibilidade desta associação na doença de Crohn.

Os dados obtidos na população total corroboram a nossa hipótese que alterações no genótipo do hospedeiro podem alterar a susceptibilidade à infecção, pois o alelo G está relacionado à uma diminuição do número de células T reguladoras. De fato, há um aumento da frequência do alelo G em indivíduos não infectados, sugerindo que são menos suscetíveis à infecção quando comparados aos indivíduos de área endêmica. Considerando que o genótipo pode influenciar o fenótipo, é possível que ocorra uma associação entre a produção de FOXP3 e susceptibilidade à ancilostomíase, entretanto, ainda não é claro como as variações polimórficas de FOXP3 influenciam na patogênese da ancilostomíase e estudos adicionais se tornam necessários para comprovar tal associação. Uma última análise realizada, foi o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde os polimorfismos referentes a IL-10, TGF- β e CTLA-4 se encontram em equilíbrio. Já o polimorfismo referente a FOXP3 se encontra fora do equilíbrio, em talvez em decorrência da associação positiva que identificamos.

Embora os resultados lancem luz sobre os mecanismos patentes de imunossupressão na ancilostomíase, é importante mencionar que o tamanho amostral e a variação de idade de nossa população podem ser considerados como possíveis fatores limitantes do estudo. Além disso, um fator limitante a ser considerado seria a ausência de indivíduos negativos de áreas endêmicas como controles em experimentos de resposta imune celular, cujo grupo não foi incluído no delineamento experimental uma vez que não é possível garantir a ausência de infecção nestes doadores (devido à sensibilidade limitada dos exames de fezes ou período de pré-patência). Além disso, foi

demonstrado anteriormente que o estado imunológico de pacientes infectados pelo helminto permanece inalterados após o tratamento anti-helmíntico durante vários meses (LOUKAS et al., 2005). No entanto, este estudo foi desenhado para minimizar possíveis fatores de confusão, o que poderia mascarar a avaliação imunológica da ancilostomose. Portanto, nossos dados devem ser validados por grandes levantamentos immunoepidemiológicos a serem realizados em áreas endêmicas.

Este estudo contribui não somente para o entendimento da biologia da infecção, mas também favorece o estudo de fatores relacionados ao parasito e inerentes ao hospedeiro, que no futuro podem auxiliar no desenvolvimento de vacinas e elucidar mecanismos imunológicos que permitam a instalação da infecção não somente para os ancilostomídeos mas também outras infecções helmínticas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram pela primeira vez, o papel das células T reguladoras na infecção por ancilostomídeos na infecção humana, bem como aumento de células produtoras de fatores associados à imunorregulação, dentre eles CTLA-4, GITR, IL-10 e TGF- β . Além disso, foi demonstrado a influência de células produtoras de IL-17 na infecção, através da diminuição da sua população mediante estímulo antigênico, bem como a presença de células FOXP3 positivas produtoras de IL-17. Também foi identificada a associação de polimorfismos (SNP) com a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por ancilostomídeos; em relação às outras moléculas avaliadas, mais estudos tornam-se necessários para elucidar tal associações. Este estudo contribui para o entendimento da biologia da infecção por ancilostomídeos e seus mecanismos de sobrevivência no hospedeiro, abrindo novas perspectivas no entendimento da relação parasito-hospedeiro.

RESUMO DOS RESULTADOS

7. RESUMO DOS RESULTADOS

- Através deste estudo podemos sugerir que as células T reguladoras participam do mecanismo de imunorregulação na infecção por ancilostomídeos, através do reestabelecimento da proliferação de culturas depletadas de células $CD4^+CD25^+$;

-Constatamos que em pacientes infectados por ancilostomídeos há uma diminuição de linfócitos T circulantes;

-Embora apresentando um quadro de linfopenia, há um aumento de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ no sangue periférico;

-Também foi registado um aumento de células produtoras de IL-10, CTLA-4, TGF-B e GITR em culturas de PBMCs estimuladas com antígeno bruto e antígeno ES de pacientes infectados por ancilostomídeos;

-Além disso, foi identificado que células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ produtoras de IL-17⁺, que podem significar um estado transiente entre uma resposta inflamatória e supressora na infecção por ancilostomídeos, e o número absoluto desta população celular sofre uma diminuição quando estimuladas pelo antígeno bruto do parasito, sugerindo que estas citocinas são liberadas e consumidas rapidamente no ambiente celular;

-Em culturas de células $CD3^+CD4^+IL-17^+$, verificamos novamente a diminuição da expressão desta população, sendo que há uma redução do número absoluto de células quando estimuladas tanto com antígeno bruto quanto antígeno ES. E vale ressaltar que esta redução é tão intensa que pacientes não infectados também apresentam este perfil;

-Para eliminarmos a hipótese de que as células T reguladoras influenciariam a redução acima citada, realizamos a análise da população de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+IL-17^+$, onde observamos o mesmo quadro de redução de células anteriormente;

-Em culturas de sangue total, células $CD3^+CD4^+IL10^+$ e $CD3^+CD4^+TGF-\beta^+$, observamos uma diminuição do número de células produtoras de IL-10 quando estimuladas com antígenos do parasito e um padrão pouco variável de células produtoras de TGF- β , o que nos faz acreditar que o seu número absoluto de células não

variou por esta citocina participar da manutenção de células T reguladoras e de células Th17;

-Nos polimorfismos avaliados, podemos sugerir que há um aumento do genótipo GG caracterizado por ser baixo produtor do fator de transcrição FOXP3 em pacientes não infectados por ancilostomídeos, sugerindo que características genóticas do indivíduo possam torná-lo mais susceptível à infecção, embora mais estudos ainda sejam necessários para o estabelecimento desta hipótese, tanto para FOXP3 quanto para os outros genes avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS OM, ABDEL-RAHMAN MH, OMAR NA, BADRAN HM, AMIR EM. Interleukin-10 promoter polymorphisms in hepatitis C patients with and without *Schistosoma mansoni* co-infection. System, v.13 p.1422-1430,2009.

ACEVEDO N, MERCADO D, VERGARA C. Association between total immunoglobulin E and antibody responses to naturally acquired *Ascaris lumbricoides* infection and polymorphisms of immune system-related LIG4, TNFSF13B and IRS2 genes. Clinical and experimental immunology. v.157(2)p.282-90,2009.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E V RIVINO, L GEGINAT, J JARROSSAY, D GATTORNO, M LANZAVECCHIA, A SALLUSTO, F NAPOLITANI, G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nat. Immunol v.8(6) 639-646, 2007.

AGGARWAL S, GHILARDI N, XIE M H, DE SAUVAGE FJ & GURNEY A .L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterization by the production of interleukin -17. J.Biol. Chem. V.278 p. 1910-1914,2003.

AGGARWAL,S & GURNEY, A. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. J. LEukoc. Biol. V.71 p 1-8, 2002.

ALBONICO, M., BICKLE, Q., RAMSAN, M., MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. ,TAYLOR, M. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. Bull World Health Organ, v. 81, p. 343-52, 2003.

ALBONICO, M., CROMPTON, D. W., SAVIOLI, L. Control strategies for human intestinal nematode infections. *Adv Parasitol*, v. 42, p. 277-341, 1999.

ALEGRE ML, FRAUWIRTH KA, THOMPSON CB T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* v.1,p. 220-228, 2001.

ALLEN, J.E. and MACDONALD, A.S. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol*, v.20. p.241-247, 2008.

ALI MM, ELGHAZALI G, MONTGOMERY SM,. Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism and onchocercal skin disease: implications for the development of severe reactive onchodermatitis (ROD). *The American journal of tropical medicine and hygiene*.v.77(6)p.1074-8,2007.

ANDERSON R. C. Nematode Parasites Of Vertebrates:Their Development And Transmissionr . 2nd Edition, Department of Zoology,University of Guelph, Guelph, Ontario, CanadaPublication Number of Pages: 672 PagesBinding: Hardback.February 2000.

ANTHONY, R. M, RUTITZKY, L. , URBAN, J. F., JR., STADECKER, M. J. ,GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*, v. 7, p. 975-87, 2007.

AWAD M R, EL-GAMEL A, HASLETON P. Genotypic variation in the transforming growth factor- B1 gene: association with TGF- β 1 production. *Transplantation*, v. 66 p. 1014-1020, 1998.

BACCHETTA R, GAMBINERY, RONCAROLO MG. Role of regulatory T cell and FOXP3 in human disease. *J Allergy Clin Immunol* v. 16, p. 1643-1656, 2004.

BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V &HAFLER DA. Human CD4⁺CD25⁼ regulatory t cells. *Semin Immunol* v.16 p. 89-98, 2004.

BASSUNY WM, IHARA K, SASAKI Y, KUROMARU R, KOHNO H, MATSUURA N,. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes.. *Immunogenetics.* ;55(3):149-56. 2003.

BARCANTE, J. M., BARCANTE, T. A., DIAS, S. R., VIEIRA, L. Q., LIMA, W. S. ,NEGRAO-CORREA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res*, v. 89, p. 89-93, 2003.

BAUMGART M, TOMPKINS F, LENG J, HESSE M Naturally occurring CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol* v.176, p.5374-5387, 2006.

BLAXTER, M.L.;DORRIS,M.; DE LEY.P. Molecular analysis of Nematode diversity and the evolution of parasitism. *Paras. Today.* v. 15.p. 188-193. 1999.

BLAXTER, M.L. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. for Parasit.* 30 347-355 2000.

BELKAID Y, ROUSE BT Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* v.6,p. 353-360, 2005.

BELKAID Y Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* v.7, p. 875-888, 2007.

BEJARANO, MT. Interleukin-10 inhibits allo-specific proliferative and cytotoxic T-cell responses generated in mixed lymphocyte cultures. *int. immunol.* v.4 p. 1389-1397, 1992.

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

BETHONY, J., BROOKER, S., ALBONICO, M., GEIGER, S. M., LOUKAS, A., DIEMERT, D. ,HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, v. 367, p. 1521-32, 2006a.

BETHONY, J., CHEN, J., LIN, S., XIAO, S., ZHAN, B., LI, S., XUE, H., XING, F., HUMPHRIES, D., YAN, W., CHEN, G., FOSTER, V., HAWDON, J. M. ,HOTEZ, P. J. Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, People's Republic of China. *Clin Infect Dis*, v. 35, p. 1336-44, 2002.

BETHONY J, LOUKAS A, SMOUT M, BROOKER S, MENDEZ S. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. *FASEB J* v.19 p. 1743-1745, 2005.

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

BOPP T, BECKER C, KLEIN M, KLEIN-HESSLING S, PALMETSHOFER A. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204:1303–10, 2007.

BROOKER, S., BETHONY, J., HOTEZ, P. J. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol*, v. 58, p. 197-288, 2004.

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

CANTACESSI C, MITREVA M, JEX AR, YOUNG ND, CAMPBELL BE. Massively parallel sequencing and analysis of the *Necator americanus* transcriptome. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e684.

CARR, A & PRITCHARD, D I, Antigen expression during development of the human hookworm, *Necator americanus* (Nematoda). *Par. Immunol* v. 9 p. 219-234, 1987.

CHAN, M. S. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. *Parasitol Today*, v. 13, p. 438-43, 1997.

CHAN, M. S., BRADLEY, M., BUNDY, D. A. Transmission patterns and the epidemiology of hookworm infection. *Int J Epidemiol*, v. 26, p. 1392-400, 1997.

CHATILA, TA, BLAESER, N, HO, N, LEDEMAN, HN, HELM, C. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* v.15 p.430-435, 2003.

CHEN W, JIN W, WAHL SM Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4⁽⁺⁾ T cells. J Exp Med v.188 p.1849-1857, 1998.

CHEVILLARD C, MOUKOKO CE, ELWALI NM. Human Hepatic Schistosomiasis with Severe Hepatic Fibrosis in IFN- γ +3810 Are Associated (IFN- γ +2109 and IFN- γ Polymorphisms J. Immunol, v.171p.5596-5601, 2003.

CHOW, S. C., BROWN, A. ,PRITCHARD, D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. Parasite Immunol, v. 22, p. 21-9, 2000.

COOPER, E. S., WHYTE-ALLEN, C. A., FINZI-SMITH, J. S. ,MACDONALD, T. T. Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. Parasitology, v. 104 Suppl, p. S91-103, 1992.

COSTA G, ROCHA MOC, MOREIRA PR, MENEZES CAS, SILVA MR, GOLLOB, KJ, DUTRA, WO. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. JID v. 199, p451-454, 2009.

COTTON S, GBADEGESIN R, WILLIAMS S BRENCHLEV EC, WEBB N. Role of TGF-B1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. v. 61, p.61-67, 2002.

CUA DJ. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature v.421 p.744-748, 2003.

CUELLAR C, WU W, MENDEZ S. The hookworm tissue inhibitor of metalloproteases (Ac-TMP-1) modifies dendritic cell function and induces generation of CD4 and CD8 suppressor T cells. *PLoS Negl Trop Dis* v.3, p.439, 2009.

DAI, W. J. ,GOTTSTEIN, B. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunology*, v. 97, p. 107-16, 1999.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A,. Adenosine generation catalyzed byCD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257–65,2007.

DE SILVA, N. R., BROOKER, S., HOTEZ, P. J., MONTRESOR, A., ENGELS, D. ,SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol*, v. 19, p. 547-51, 2003.

D'ELIA R, BEHNKE JM, BRADLEY JE, ELSE KJ. Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival. *J Immunol* v.182p. 2340-2348, 2009.

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

DJILALISIAIAH I, OUELLETTE P, CAILLAT-ZUCMAN S, DEBRAY D, KHON JI, ALVAREZ F. CTLA-4 /CD28 region polymorphism in children from families with autoimmune hepatitis. *H. Immunol*, v. 62, p.1356-1362, 2001.

DONG,C. Th 17 cells in development: an updated view of their molecular identity and gwnwtic programming. *Nat. Rev. Immunol* v. 8 p.337-348, 2008.

DONNER,H BRAUN J,SEIDL,C HAU, H FINKE,H VENTZ,H WALFISH, P. Codon 17 Polymorphism of the Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 Gene in Hashimoto's Thyroiditis and Addison's Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* v.82p.4130-4133.

ELLIOTT DE, METWALI A, LEUNG J, SETIAWAN T, BLUM AM. Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *J Immunol* v.181 p.2414-2419, 2008.

ESZTER FODOR A, EDINA GARACZI A, HILDA POLYÂNKÁ B, ANDREA KORECK A,C, LAJOS KEMËNY A,B, MÂRTA SZËLL B The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Human Immunology* v.72 p.926-929,2011.

FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, ORABONA C, VACCA C, Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:1206–12 2003.

FAUST, E.C. *Human Helminthology. A Manual for Physicians, Sanitarians and Medical Zoologists*, 3rd edn. Lea and Febiger, Philadelphia. 1949.

FODOR E, GARACZI E, POLYANKA H, KORECK A, KEMENY L, SZELL M. The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Human Immunol*, v. 72, p. 922-929, 2011.

FU Y, WANG W, TONG J, PAN Q, LONG Y, QIAN W, HOU X. Th17 cells influence intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* v.29(4)p.481-5, 2009.

FU W, QU Y, TANG Y, DUOZHI C, SUN P, XIA Z. Lack of association between cytokine gene polymorphism and silicosis and pulmonary tuberculosis in chinese iron miners. *J Occup Heaht* v. 50, p 445-454, 2008.

FUJIWARA, R. T., CANÇADO, G. G. L., FREITAS, P. A., SANTIAGO, H. C., MASSARA, C. L., CORREA-OLIVEIRA, R., GEIGER, S. M. ,BETHONY, J. *Necator americanus* infection alters dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals. *PLoS Negl Trop Dis*, v11. p15-121, 2009.

FUJIWARA, R. T., GEIGER, S. M., BETHONY, J. ,MENDEZ, S. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol*, v. 28, p. 285-93, 2006a.

FUJIWARA, R. T., LOUKAS, A., MENDEZ, S., WILLIAMSON, A. L., BUENO, L. L., WANG, Y., SAMUEL, A., ZHAN, B., BOTTAZZI, M. E., HOTEZ, P. J. ,BETHONY, J. M. Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine*, v. 24, p. 501-9, 2006b.

FUJIWARA, R. T., ZHAN, B., MENDEZ, S., LOUKAS, A., BUENO, L. L., WANG, Y., PLIESKATT, J., OKSOV, Y., LUSTIGMAN, S., BOTTAZZI, M. E., HOTEZ, P. ,BETHONY, J. M. Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16. *Clin Vaccine Immunol*, v. 14, p. 281-7, 2007.

GAO L, LI K, LI F, LI H, LIU L, WANG L,. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *Journal of Dermatological Science*.;v.5751-p.56 2010.

GATLIN MR, BLACK CL, MWINZI PN, SECOR WE, KARANJA DM. Association of the Gene Polymorphisms IFN- γ +874, IL-13 21055 and IL-4 2590 with Patterns of Reinfection with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* v.3(2) p.375,2009.

GAZZINELLI, A. Aglomeração Espacial da Esquistossomose E Dos Geohelminthos Antes E Após O Tratamento. Projeto de Pesquisa. Belo Horizonte, 2006. 33p.

GRAFFELMAN, J. & MORALES-CAMARENA, J. Graphical tests for Hardy-Weinberg equilibrium based on the ternary plot. *Human Heredity* 65(2): 77-84. 2008.

GEIGER S. M., MASSARA C. L., BETHON, J., SOBOLAY P. T. ,CORREA-OLIVEIRA R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol*, v. 136, p. 334-40, 2004.

GEIGER, S. M.,FUJIWARA,R.T,SANTIAGO, H. CORREA-OLIVEIRA, R. ,BETHONY, J. M..Early stage-specific immune responses in primary experimental human hookworm infection.*microbes and infection*. v.10, p 1524-1535.(2008).

GEIGER, S. M., CALDAS, I. R., MC GLONE, B. E., CAMPI-AZEVEDO, A. C., DE OLIVEIRA, L. M., BROOKER, S., DIEMERT, D., CORREA-OLIVEIRA, R. BETHONY, J. M. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunol*, v. 29, p. 347-58, 2007.

GERSHON RK, KONDO K Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* v.18,p. 723-737,1970.

GERSHON RK, KONDO K Infectious immunological tolerance. *Immunology* v.21: p.903-914, 1971.

GRAINGER, D J, HEATHCOTE K, CHIANO M, SNIEDER H, KEMP P R, METCALFE J C, CARTER N D, SPECTOR T D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol. Genet.* v.8 p.93-97, 1999.

GRAINGER JR, SMITH KA, HEWITSON JP, MCSORLEY HJ, HARCUS Y. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med* v.207, p. 2331-2341, 2010.

HESSE M, PICRILLO CA, BELKAID Y, PRUFER J, MENTINK-KANE M, LEUSINK M. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*, v.172 p.3157-3166, 2004.

HISE AG, HAZLETT FE, BOCKARIE MJ, Polymorphisms of innate immunity genes and susceptibility to lymphatic filariasis. *Genes and immunity* v.4(7)p.524-7, 2003.

HOTEZ, P. J HOTEZ PJ, BOTTAZZI ME, FRANCO-PAREDES C, AULT SK, PERIAGO MR. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2(9): 2008.

HOTEZ, P. J., ARORA, S., BETHONY, J., BOTTAZZI, M. E., LOUKAS, A., CORREA-OLIVEIRA, R., BROOKER, S. Helminth infections of children: prospects for control. *Adv Exp Med Biol*, v. 568, p. 135-44, 2005a.

HOTEZ, P. J., BETHONY, J., BOTTAZZI, M. E., BROOKER, S., BUSS, P. Hookworm: "the great infection of mankind". *PLoS Med*, v. 2, p. e67, 2005b.

HOTEZ, P. J., BETHONY, J., BOTTAZZI, M. E., BROOKER, S., DIEMERT, D., LOUKAS, A. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol*, v. 22, p. 327-31, 2006.

HOTEZ, P. J., BROOKER, S., BETHONY, J. M., BOTTAZZI, M. E., LOUKAS, A., XIAO, S. Hookworm infection. *N Engl J Med*, v. 351, p. 799-807, 2004a.

HOTEZ, P. J., HAWDON, J. M., CAPPELLO, M., JONES, B. F., GHOSH, K., VOLVOVITZ, F., XIAO, S. H. Molecular approaches to vaccinating against hookworm disease. *Pediatr Res*, v. 40, p. 515-21, 1996.

HOTEZ, P. J., REMME, J. H., BUSS, P., ALLEYNE, G., MOREL, C., BREMAN, J. G. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis*, v. 38, p. 871-8, 2004b.

HOTI SL, THANGADURAI R, PATRA KP, DAS PK. Polymorphism of gp15/400 allergen gene of *Wuchereria bancrofti* from different regions of India endemic for lymphatic filariasis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*,v.7(2)p.213-8,2007.

JARDIM-BOTELHO, A., BROOKER, S., GEIGER, S. M., FLEMING, F., SOUZA LOPES, A. C., DIEMERT, D. J., CORREA-OLIVEIRA, R., BETHONY, J. M. Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. *Trop Med Int Health*, v. 13, p. 458-67, 2008.

JENSON, J. S., O'CONNOR, R., OSBORNE, J., DEVANEY, E. Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4⁽⁺⁾ T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur J Immunol*, v. 32, p. 858-67, 2002.

JIAN, X., SEN, L., HUI-QIN, Q., HAI-NAN, R., TIE-HUA, L., HAI-CHOU, X., HOTEZ, P. J., SHU-HUA, X. *Necator americanus*: maintenance through one hundred generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). I. Host sex-associated differences in hookworm burden and fecundity. *Exp Parasitol*, v. 104, p. 62-6, 2003a.

JIAN, X., SHU-HUA, X., HUI-QING, Q., SEN, L., HOTEZ, P., BING-GUI, S., HAI-CHOU, X., TIE-HUA, L., BIN, Z. *Necator americanus*: maintenance through one hundred generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). II. Morphological development of the adult and its comparison with humans. *Exp Parasitol*, v. 105, p. 192-200, 2003b.

KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z., GREENBERG, Z., NAHMIAS, J., EITAN, S., STEIN, M., BENTWICH, Z. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin Exp Immunol*, v. 114, p. 414-21, 1998.

KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 14, p. 397-400, 1972.

KIM, JM, BRANNAN CI, COPELAND NG, JENKINS NA, KHAN TA, MOORE, KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J. Immunol* v; 148, p. 3618-23. 1992.

KING AL, MOODIE SJ, FRASER JS, CURTIS D, REID E, DEARLOVE AM, ELLIS HJ, CICLITIRA PJ. CTLA-4 /CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet*, v. 39, p. 51-54, 2002.

KIPER N, GERÇEKER F, UTINE E, TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in childhood cystic echinococcosis. *Parasitology international*, v. 59(2) p. 283-5, 2010.

KOCH, W KASTRATI A, BÖTTIGER, C MEHILLI, J VON BECKRATH, N SCHÖMING, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphism and risk of coronary artery disease and myocardial infection. *Arteriosclerosis* v. 159 p. 137-44. 2001.

KORN, T., OUKKA, M., KUCHROO, V., BETTELLI, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*, v. 19, p. 362-71, 2007.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* v. 27, p. 485-517, 2009.

KUBE D, PLATZER C, VON KNETHEN A, STRAUB H, BOHLEN H, HAFNER M, TESCH H. Isolation of the human interleukin 10 promoter characterization of the promoter activity in burkitt lymphoma cell lines. *Cytokine*. v. 7, p. 1-7, 1995.

KURSAR M, BONHAGEN K, FENSTERLE J, KOHLER A, HURWITZ R. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells restrict memory CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med* v.196 p.1585-1592,2002.

KOURIBA B, CHEVILLARD C, BREM JH, ARGIRO L, DESSEIN H, ARNAUD V, SANGASE L, DABO A, BEAVOGUI AH, ARAMA C, TRAORÉ HÁ, DOUMBO O, DESSEIN A. Analysis of the 5q31-q33 locus shows no association between IL-13-1055C/T IL-13 -591A/G polymorphism and *Schistosoma haematobium* infections. *J Immunol* v. 174 p. 6274-6281, 2005.

KRUMMEL MF, ALLISON JP CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* v.182p.459-465, 1995.

LAWRENCE D A. Transforming growth factor beta -1: a general review. *Eur. Cytokines Netw*. v.7 p.363-374, 1996.

LAYLAND LE, MAGES J, LODDENKEMPER C, HOERAUF A, WAGNER H. Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *J Immunol* v.184, p.713-724, 2010.

LOUKAS,A., CONSTANT ,I.S. ,BETHONY, J.M. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunol Med Microbiology*, 43 115-124. 2005

LOUKAS, A. & PROCIV,P. Immune responses in hookworm infections. Clin.Microbiol. Rev. v.14. p.689-703.2001

MAIZELS, R. M., BALIC, A., GOMEZ-ESCOBAR, N., NAIR, M., TAYLOR, M. D. ,ALLEN, J. E. Helminth parasites--masters of regulation. Immunol Rev, v. 201, p. 89-116, 2004.

MAIZELS RM. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system.. Journal of biology. 2009 ;8(7):62.

MAURER M, LOSERTH S, KRUSE N, RIECKMAN P. A polymorphism in the human cytotoxic T- lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene alters T- cell activation. Immunogenetics, v. 54, p. 1-8, 2002.

MAXWELL, C., HUSSAIN, R., NUTMAN, T. B., POINDEXTER, R. W., LITTLE, M. D., SCHAD, G. A. ,OTTESEN, E. A. The clinical and immunologic responses of normal human volunteers to low dose hookworm (*Necator americanus*) infection. Am J Trop Med Hyg, v. 37, p. 126-34, 1987.

MCHUGH RS, WHITTERS MJ, PICCIRILLO CA, YOUNG DA, SHEVACH EM. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Immunity v.16 ,p. 311-323,2002.

MCSORLEY HJ, LOUKAS A. The immunology of human hookworm infections. *Parasite Immunol* 32: 549-559, 2010.

MENDEZ, S., VALENZUELA, J. G., WU, W. ,HOTEZ, P. J. 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, 2005.

MIYARA M, SAKAGUCHI S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* 13:108–162007.

MOREIRA PR,COSTA JE,GOMEZ RS,GOLLOB KJ, DUTRA,W. TNFA and IL-10 gene polymorphism are not associated with periodontitis in Brazilians. *The o Den J*, v. 3,p. 184-190, 2009.

MOORE KW, MALEFYT RW, COFFMAN RL, O'GARRA, A. interleukin -10 and the interleukin -10 receptor. *Annu. rev. immunol.* v.19 p.683-765, 2001.

MOLLER M, GRAVENOR MB, ROBERTS SE, SUN D, GAO P, HOPKIN JM. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection yo parasitic worms. *Hu, Mol Genet* v.16 p. 1828-1836, 2007.

MOSELEY T.A,HAUDENSCHILD D R, ROSE L,&REDDI AH. Interleukin -17 family an IL-17 receptors. *Cytokine grow Factor Rev* v.14 p.155-174, 2003.

MOYLE, M., FOSTER, D. L., MCGRATH, D. E., BROWN, S. M., LAROCHE, Y., DE MEUTTER, J., STANSSENS, P., BOGOWITZ, C. A., FRIED, V. A., ELY, J. A. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *J Biol Chem*, v. 269, p. 10008-15, 1994.

MULLER , R. *Worms and Human Disease*, Second Edition The London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK Publication Number of Pages: 320 Pages. 2001.

MURIGLAM SJ, RAMIREZ-MONTAGUT T, ALPDOGAN O, VAN HUYSTEE TW, ENG JM, HUBBARD VM. GITR activation induces an opposite on alloreactive CD4⁽⁺⁾ and CD8⁽⁺⁾ T cells in graft-versus -host disease. *J Exp Med* v. 200 p.149-187, 2004.

NALUAI AT. The CTLA-4 /CD28 gene region polymorphism on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tis Antigens*, v. 56, p. 350- 355, 2000.

ONYEMELUKWE, G. C. ,MUSA, B. O. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *Afr J Med Med Sci*, v. 30, p. 255-9, 2001.

PAVLOVA A, DELEV D, LACROIX-DESMAZES, SCHWAAB R, MENDE M, FIMMERS R. Impact of polymorphism on the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb and Hem* v.7, p.2006-2015, 2009.

PARK O, GRISHINA I, LEUNG PS. Analysis of the FOXP3 / Scurfin Gene in Crohn ' s Disease. *New York*. ;228218-228 2005.

PIT, D. S., POLDERMAN, A. M., BAETA, S., SCHULZ-KEY, H. ,SOBOSLAY, P. T. Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. Parasitol Res, v. 87, p. 722-9, 2001.

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

PRITCHARD, D. I., QUINNELL, R. J. ,WALSH, E. A. Immunity in humans to *Necator americanus*: IgE, parasite weight and fecundity. Parasite Immunol, v. 17, p. 71-5, 1995.

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

QUINNELL, R. J., PRITCHARD, D. I., RAIKO, A., BROWN, A. P. ,SHAW, M. A. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. J Infect Dis, v. 190, p. 430-8, 2004.

QUINNELL, R. J., WOOLHOUSE, M. E., WALSH, E. A. ,PRITCHARD, D. I. Immunoepidemiology of human necatoriasis: correlations between antibody responses and parasite burdens. Parasite Immunol, v. 17, p. 313-8, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL(2009) <http://www.R-project.org>.

RAMOS CR, FIGUEREDO RC, PERTINHEZ TA. Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. Molecular, functional, and immunoprotection analysis. *The Journal of biological chemistry*, v.278(15)p.12745-51,2003.

REECE, J. J., SIRACUSA, M. C., SOUTHARD, T. L., BRAYTON, C. F., URBAN, J. F., JR. ,SCOTT, A. L. Hookworm-induced persistent changes to the immunological environment of the lung. *Infect Immun*, v. 76, p. 3511-24, 2008.

REES LEN, WOOD NAP, GILLESPIE KM, LAI KN, GASTON K, MATHIESON PW. The interleukin 10 -1082 G/A polymorphism; allele frequency in different populations and functional significance. *Cell Mol Life Sci*, v. 59, p. 560-569, 2002.

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

RONCAROLO, MG GREGORI S, BATTAGLIA M, BACCHETTA R, FLEISCHHAUER K, LEVINGS MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 212:28–50, 2006.

SAKTI, H., NOKES, C., HERTANTO, W. S., HENDRATNO, S., HALL, A., BUNDY, D. A. ,SATOTO. Evidence for an association between hookworm infection and cognitive function in Indonesian school children. *Trop Med Int Health*, v. 4, p. 322-34, 1999.

SATOGUINA J, MEMPEL M, LARBI J, BADUSCHE M, LOLIGER C. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect* v.4 p.1291-1300, 2002.

SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. Stimulation of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* v.3 p.135-142, 2002.

SCHOLZEN A, MITTAG D, ROGERSON SJ, COOKE BM, PLEBANSKI M. Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25⁺Foxp3⁺ CD4⁺ T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFβ. *PLoS Pathog*, 2009.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall. Londres. 1982.

STEEL C, NUTMAN TB. CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. *J Immunol* v.170 p.1930-1938, 2003.

TALIAFERRO, W. R. ,SARLES, M. P. The cellular reactions in the skin, lungs, and intestine of normal and immune rats after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Infect Dis*, v. 64, p. 157-92, 1939.

TANG Q, ADAMS JY, TOOLEY AJ, BI M, FIFE BT. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 7:83–92 2006.

TAYLOR, M D, LEGOFF L, HARRIS A, MALONE E, ALLEN, J E ,MAIZELS R. M. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. J Immunol, v. 174, p. 4924-33, 2005.

TAYLOR MD, VAN DER WERF N, HARRIS A, GRAHAM AL, BAIN O Early recruitment of natural CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. Eur J Immunol 39: 192-206, 2009.

TAYLOR MJ, CROSS HF, BILO K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic Wolbachia bacteria. J Exp Med.v.191p.1429–36,2000.

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

TAYLOR JJ, MOHRS M, PEARCE EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. J Immunol v.176 p. 5839-5847,2006.

TEIXEIRA AL,ARAUJO A, COELHO A, RIBEIRO R,GOMES M,PEREIRA C,MEDEIROS R. Influence of TGF-B1+869T>C functional polymorphism in non-small cell lun cancer(NSCLC) risk. J Cancer Res Clin Oncol v. 44 p.345-367, 2010.

UEDA H, HOWSON JMM, ESPOSITO L, HOWARD J, SNOOK H. Association of the T-cell regulatory genes CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature Pub. Group*, v. 423, p.506-511, 2003. []

VAN DER KLEIJ D, VAN REMOORTERE A, SCHUITEMAKER JH, KAPSENBERG ML, DEELDER AM, Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitopeGalNAcb1-4(Fuca1-2Fuca1-3) GlcNAc. *J. Infect. Dis.* v.185p.531–39,2002.

VAN RIET, E., HARTGERS, F. C. ,YAZDANBAKHS, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology*, v. 212, p. 475-90, 2007.

VON BOEHMER H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6:338–442005.

WAMMES LJ, HAMID F, WIRIA AE. Regulatory T cells in human geohelminth infection suppress immune responses to BCG and Plasmodium falciparum. *Eur J Immunol.*v.40(2)p.437-42,2010.

WANG, L.J, CAO, Y, SHI, HN.Helminth infestions and intestinal inflammation. *World J Gastroenterol*; v.14(33) p.5125-5132, 2008.

WASYLYK B, HAN, GIOVANE A. The Ets family of transcription factors.*Eur j Biochem* v. 211, p. 7-18, 1993.

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

WHO. Worm control (www.who.int/wormcontrol). 03 de agosto de 2008, 2008.

WILDINRS,S.M.,YK-PEARSON A.H, FILIPOVICH, AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome JMedGenet;v.39 p.537–545,2002.

WILDIN RS, SMYK-PEARSON S,FILIPOVICH AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J Med. Genet. v.39 p. 537-545, 2002.

WINSTEAD CJ, FRASER JM, KHORUTS A. Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells selectively inhibit the spontaneous form of lymphopenia-induced proliferation of naive T cells. J Immunol v.180, p.7305-7317, 2008.

WILSON MS, TAYLOR MD, BALIC A, FINNEY CA, LAMB JR. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. J Exp Med v.202: p.1199-1212, 2005.

XUE, J., HUI-QING, Q., JUN-MING, Y., FUJIWARA, R., ZHAN, B., HOTEZ, P., SHU-HUA, X. *Necator americanus*: optimization of the golden hamster model for testing anthelmintic drugs. Exp Parasitol, v. 111, p. 219-23, 2005.

YOKOTA M, ICHIARA S, LIN TL, NAKASHIMA N, YAMADA Y, Association of a T29C polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*, v. 101, p. 2783-2787, 2000.

ZHANG L,ZHANG Y, DESROSIERS M,WANG C,ZHAO Y,HAN D. Genetic association study of FOXP3 polymorphism in allergic rhinitis in a Chinese population. *Human Immunol*, v. 70, p. 930-934, 2009.

ANEXO 1.TABELAS

1 – CTLA-4

Tabela I- Teste qui-quadrado para subpopulações x CTLA-4

População analisada	χ^2	p
População total x CTLA-4	4,268	0,371
Negativo de área endêmica x Negativos	2,976	0,0226
Negativo de área endêmica x Positivos	0,830	0,660
Negativos x Positivos	3,353	0,187

Tabela II-Resultado dos testes OR para CTLA-4

População analisada	χ^2	p	OR
Negativo de área endêmica x Negativos	0,415	0,519	xx
Negativo de área endêmica x Positivos	0,732	0,392	xx
Negativos x Positivos	0	0,991	xx

Tabela III- Análise gene ancestral x gene polimórfico para CTLA-4

População analisada	χ^2	p	Graus de liberdade	Correção de Yates/p
Negativo de área endêmica x Negativosx Positivo	1,311	0,5191	2	0,965/0,3260
Negativo de área endêmica x Negativo	1,253	0,2630	1	0,9651/0,3260
Negativos x Positivos	0,407	0,5233	1	0,252/0,6156
Negativo de área endêmica x Positivos	0,422	0,5061	1	0,314/0,5753

2- IL-10

Tabela IV- Teste qui-quadrado para subpopulações x IL-10

População analisada	χ^2	p
População total x IL-10	2,176	0,704
Negativo de área endêmica x Negativos	1,124	0,570
Negativo de área endêmica x Positivos	1,436	0,488
Negativos x Positivos	0,579	0,749

Tabela V- Teste OR para populações IL-10

População analisada	χ^2	p	OR
Negativo de área endêmica x Negativos	0,268	0,605	xx
Negativo de área endêmica x Positivos	0,077	0,781	xx
Negativos x Positivos	0,576	0,448	xx

Tabela VI- Análise gene ancestral e gene polimórfico para IL-10

População analisada	χ^2	p	Graus de liberdade	Correção de Yates/p
Negativo de área endêmica x Negativos x Positivo	1,025	0,5990	2	xx
Negativo de área endêmica x Negativo	0,0047	0,8288	1	xx
Negativos x Positivos	0,310	0,5775	1	0,182/0,6700
Negativo de área endêmica x Positivos	0,983	0,3215	1	0,791/0,3737

Tabela VII- Teste OR para populações IL-10

População analisada	χ^2	p	OR
Negativo de área endêmica x Negativos	0,268	0,605	xx
Negativo de área endêmica x Positivos	0,077	0,781	xx
Negativos x Positivos	0,576	0,448	xx

Tabela VIII- Análise gene ancestral e gene polimórfico para IL-10

População analisada	χ^2	p	Graus de liberdade	Correção de Yates/p
Negativo de área endêmica x Negativos x Positivo	1,025	0,5990	2	xx
Negativo de área endêmica x Negativo	0,0047	0,8288	1	xx
Negativos x Positivos	0,310	0,5775	1	0,182/0,6700
Negativo de área endêmica x Positivos	0,983	0,3215	1	0,791/0,3737

3- TGF- β

Tabela IX- Teste qui-quadrado para subpopulações x TGF- β

População analisada	χ^2	p
População total x TGF- β	6,184	0,186
Negativos Endêmico x Negativos	1,198	0,549
Negativos Endêmico x Positivos	2,932	0,231
Negativos x Positivos	5,155	0,076

Tabela X- Teste OR para gene TGF- β

População analisada	χ^2	p	OR
Negativos Endêmico x Negativos	0,077	0,782	1,115 IC 0,515-2,415
Negativos Endêmico x Positivos	0,272	0,602	1,172 IC 0,646-2,127
Negativos x Positivos	0,016	0,898	1,051 IC 0,493-2,239

IC: Intervalo de Confiança 95%

Tabela XI- análise gene ancestral x gene polimórfico

População analisada	χ^2	p	Graus de liberdade	Correção de Yates/p
Negativos Endêmico x Negativos x Positivo	1,335	0,5131	1	xx
Negativos Endêmico x Negativos	0,635	0,4255	1	0,444/0,5052
Negativos x Positivos	0,310	0,5775	1	0,182/0,6700
Negativos Endêmico x Positivos	0,202	0,6533	1	0,122/0,7272