

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA

Rafael Pires de Oliveira

**Efeitos da imuno-senescência na infecção
murina pelo *Schistosoma mansoni***

Belo Horizonte

2010

Rafael Pires de Oliveira

**Efeitos da imuno-senescência na infecção
murina pelo *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da UFMG para obtenção do
grau de Mestre.

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientador: Tomaz Aroldo da Mota Santos

Colaboradora: Deborah Aparecida Negrão Corrêa

Belo Horizonte

2010



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAEL PIRES DE OLIVEIRA. Aos oito dias do mês de fevereiro de 2010 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “*Efeitos da Imuno-senescencia na infecção murina pelo Schistosoma mansoni*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Prof. Fabiano Comin da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, aprovado; Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Prof. Tomaz Aroldo da Mota Santos, co-orientador, aprovado; Profa. Ana Maria Caetano de Faria, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 8 de fevereiro de 2010.


Dr. Fabiano Comin – FIOCRUZ – RJ


Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares – UFMG


Dr. Tomaz Aroldo da Mota Santos – co-orientador – UFMG


Dra. Ana Maria Caetano de Faria – orientadora - UFMG


Prof. Paulo Sérgio Carneiro Szirão
Coordenador “pro tempore” do Curso
de Pós Graduação em
Bioquímica - Imunologia
ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

À vida, em todas as suas formas, por me trazer fascínio, curiosidade e entusiasmo.

À Ciência, por me fazer acreditar na evolução da humanidade.

Aos meus queridos pais, Ronald e Édila, por todo amor e carinho e pela dedicação total a nossa família.

Aos meus amados irmãos, Lud e Felipe, pelo companheirismo.

À minha linda Lorena, pela doçura e por me fazer feliz, amado e completo.

Ao André, pelo seu alto-astral, companheirismo e pelos seus valiosos ensinamentos científicos e de generosidade.

À Ana Caetano de Faria, pela confiança, pela maneira sábia e aplicada de conduzir a pesquisa, e por ser extraordinária professora e orientadora.

Ao Tomaz da Mota-Santos, por sua cordialidade e por sempre compartilhar comigo seu vasto conhecimento.

Ao Nelson Vaz, por sua genialidade e por motivar tão interessantes questionamentos sobre a vida e a ciência.

À Claudia Carvalho, por sua delicadeza e disposição em ajudar, aperfeiçoar e discutir as pesquisas do nosso grupo.

À Ildinha, por sua dedicação e seu sorriso sincero de todos os dias.

À Frank, pela competência e amizade.

À inteligência contagiante do Archimedes e ao convívio amigo do Bernardo, que juntos fortalecem a ala masculina do laboratório.

Obrigado, Andrezza, Rapha, Tati, Samara, Josy e Magda, pelos incentivos, cooperações e por trazerem alegria ao LIB.

A todos do LIB, desde a velha geração, que deixou tantas boas lembranças, até os novos colegas, que irão manter a harmonia e o bom trabalho do nosso laboratório.

À professora Deborah Negrão-Corrêa, do Departamento de Parasitologia, pela valiosa colaboração com este trabalho. Obrigado Michelle, Cíntia, Flor e José Carlos pela imensa contribuição durante o estudo parasitológico.

A todos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pela prestatividade e pelo convívio amigável.

À Celise, pelo acolhimento sempre sereno e solícito.

Aos velhos amigos da Biologia, por me darem mais um bom motivo para vir todos os dias ao ICB.

Às agências financiadoras de pesquisa que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

À UFMG, que me fez sentir em casa durante esses vários anos de estudo. Obrigado, professores, funcionários e alunos que fazem parte desta adorável comunidade.

E finalmente, a Deus, por proporcionar tantos motivos de sublime felicidade em minha vida.

Resumo

A imuno-senescência é o resultado cumulativo do processo de declínio progressivo da atividade do sistema imune devido ao processo de envelhecimento. Ela contribui para o aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes. As alterações relacionadas ao envelhecimento incluem a involução tímica, alterações nos fenótipos celulares, perfil de citocinas e no repertório de linfócitos. De um modo geral, animais e humanos idosos apresentam uma redução no número de linfócitos T virgens com o aumento paralelo dos linfócitos T de memória, uma reatividade imunológica comprometida e uma diminuição na sua capacidade de reagir a antígenos novos. Vários trabalhos relatam modificações no desenvolvimento de doenças parasitárias ao longo do processo de envelhecimento no que diz respeito a sua prevalência e intensidade. Aponta-se uma forte associação entre idade e resistência à infecções e reinfecções por parasitos, tais como o *Schistosoma mansoni*, causador de doença endêmica debilitante e que afeta mais de duzentos milhões de pessoas em países em desenvolvimento. É possível que a menor intensidade observada em adultos resulte da aquisição de imunidade protetora devido ao estímulo antigênico crônico. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do envelhecimento na reatividade imunológica à infecção pelo *Schistosoma mansoni* em modelo experimental murino. Verificamos que camundongos C57BL/6 velhos apresentam uma resposta inflamatória diminuída aos antígenos do parasito, resultando em títulos mais baixos de anticorpos específicos. Apesar da resposta imune humoral diminuída, os animais velhos são igualmente susceptíveis à infecção por *S. mansoni*, e também desenvolvem imunidade protetora frente a uma reinfecção. Em animais velhos infectados, a atividade de eosinófilos parece estar preservada e pode ter contribuído para a eliminação de vermes na reinfecção. Possivelmente, a menor polarização na produção de citocinas durante a evolução da patologia altera a dinâmica da formação/involução do granuloma no velho. Camundongos velhos formam granulomas menores durante a fase aguda da infecção, mas não é observado o processo de imunomodulação na fase crônica, como bem descrito nos jovens. Observamos um aumento na frequência de células T com perfil de ativação em animais jovens infectados, entretanto, em camundongos velhos, que já possuem maior proporção de linfócitos ativados, a infecção não altera a frequência dessas células. Devido a esse estado constitutivo de ativação dos linfócitos durante a senescência, é provável que respostas inflamatórias a novos antígenos sejam inibidas por encontrarem o sistema imune altamente povoado por células efetoras.

Abstract

The immunosenescence is defined as a cumulative result of decline in the activity of the immune system activity due to progressive aging, and contributes to increased susceptibility to infectious diseases, cancer and autoimmune diseases. Such aging-related changes include thymic involution, changes in frequencies of activated lymphocytes, in cytokine profile and in lymphocyte repertoire. Generally, aged animals and humans show a reduction in the frequency of naïve T lymphocytes, increased proportion of memory T cells and a diminished immune reactivity to novel antigens. Many studies report changes in the prevalence and intensity of parasitic diseases during aging. There is a strong association between age and resistance to infectious diseases, such as schistosomiasis, an endemic disease that affects more than two hundred million people in developing countries. It is possible that the lower infection intensity observed in adults results from the acquisition of protective immunity due to chronic antigenic stimulation. The aim of this work was to evaluate the influence of aging in immune reactivity to infection by *Schistosoma mansoni* in the mouse. We observed that aged C57BL/6 mice have a reduced inflammatory response to parasite antigens, resulting in lower specific antibody titles. Despite the reduced humoral immune response, old animals were as susceptible to infection as young animals, and they also develop protective immunity against reinfection. Eosinophils activity seemed to be conserved in aged infected animals and may have contributed to worm elimination during reinfection. It is plausible that the altered cytokine balance during disease development changes the dynamics of the granuloma formation/involution in aged mice. Aged mice formed smaller granulomas at acute phase of infection, but they did not develop the process of immunomodulation in chronic phase, as described in young animals. After infection, young mice showed a typical increase in the frequency of activated T cells. On the other hand, we found increased frequencies of activated T cells in non-infected aged mice regardless of their infection status. Lymphocytes in non-infected aged animals were constitutively activated and it is likely that inflammatory responses to novel antigens may be impaired when facing an immune system already highly populated by effector cells.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Composição absoluta da população brasileira por idade e sexo.....	2
FIGURA 2 - Distribuição global da esquistossomose.....	8
FIGURA 3 - Infecção de camundongos pelo <i>S. mansoni</i> por via percutânea.....	20
FIGURA 4 - Protocolo experimental de infecção pelo <i>Schistosma mansoni</i>	21
FIGURA 5 - Estágios evolutivos de <i>S. mansoni</i> no hospedeiro definitivo.....	22
FIGURA 6 -Estratégia utilizada para análise da expressão de moléculas de interesse nos linfócitos do baço.....	25
FIGURA 7 - Avaliação do número de ovos/g de fezes dos animais 8 semanas após a primoinfecção com 50 cercárias de <i>S mansoni</i>	31
FIGURA 8 - Avaliação do peso corporal dos animais 8 semanas após a primoinfecção com 50 cercárias de <i>S mansoni</i>	33
FIGURA 9 - Níveis de IgE total em camundongos jovens e velhos.....	34
FIGURA 10 - Produção de anticorpos específicos para antígenos do parasito.....	35
FIGURA 11 - Níveis de isotipos de igG anti-SEA e anti-SWAP em camundongos jovens e velhos infectados com <i>S. mansoni</i>	36
FIGURA 12 - Frequência de linfócitos T e B em camundongos jovens e velhos infectados com <i>S. mansoni</i>	37

FIGURA 13 - Frequência de linfócitos T virgens e ativados em camundongos jovens e velhos infectados com <i>S. mansoni</i>	38
FIGURA 14 - Frequência de linfócitos T reguladores no baço de camundongos jovens e velhos infectados com <i>S. mansoni</i>	39
FIGURA 15 - Frequência de células NK e NKT no baço de camundongos jovens e velhos controles e infectados com <i>S. mansoni</i>	40
FIGURA 16 -Perfil de produção de citocinas após estímulo in vitro de esplenócitos com SWAP.....	41
FIGURA 17 -Quantificação indireta de eosinófilos pela peroxidase eosinofílica (EPO).....	42

ABREVIACES UTILIZADAS

ADCC	<i>Antibody Dependent Cell Cytotoxicity</i> - Citotoxicidade cel. dependente de anticorpo
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> - Célula Apresentadora de Antígenos
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
ConA	Concanavalina A
Cy	CyChrome
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio Imunoenzimático
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i> - Peroxidase eosinofílica
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> – Citometria de Fluxo
FITC	fluorescena
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> – Molécula de adesão intracelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
NK	<i>Natural killer cells</i>
NKT	<i>Natural Killer T cells</i>
NO	xido nítrico
ONU	Organizao das Nações Unidas
OPD	Ortofenileno-diamino
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> - Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
p.i.	Pós-infeco
s.c.	Sub-cutâneo
SEA	<i>Soluble egg antigen</i> – Antígeno solúvel do ovo
SWAP	<i>Soluble worm antigen preparation</i> – Antígeno solúvel de verme adulto
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de crescimento transformante
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Tumor necrosis factor – Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócitos T reguladores
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1. Senescência	
1.1 O envelhecimento da população mundial.....	1
1.2 Biologia do envelhecimento.....	2
1.3 Imuno-senescência.....	3
2. Esquistossomose	
2.1 Aspectos gerais.....	8
2.2 <i>Schistosoma mansoni</i> e a infecção.....	9
2.3 Imunopatologia.....	10
2.4 A resposta imune na esquistossomose.....	11
3. Imuno-senescência e Esquistossomose.....	14

OBJETIVO

Objetivos específicos.....	18
----------------------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Camundongos.....	20
2. Infecção.....	20
3. Determinação da carga parasitária.....	21
4. Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> no fígado e intestino.....	22
5. Quantificação de ovos nas fezes.....	22
6. Obtenção do antígeno solúvel do ovo do parasita (SEA).....	23
7. Obtenção do antígeno solúvel de verme adulto (SWAP).....	23
8. Sangrias e obtenção do soro.....	23
9. Preparação de suspensões de células do baço.....	23
10. Cultura de células.....	24
11. Análise fenotípica de células por citometria de fluxo.....	24

12. Ensaio imunoenzimático para medida de anticorpos séricos específicos.....	25
13. Ensaio imunoenzimático para medida de isotipos de IgG séricas específicas.....	26
14. Ensaio imunoenzimático para medida de IgE sérica total.....	26
15. Ensaio Imunoenzimático para medida da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura celular.....	27
16. Quantificação indireta de eosinófilos pela peroxidase eosinofílica (EPO).....	28
17. Cálculos estatísticos.....	28
 RESULTADOS	
1. Suscetibilidade à infecção pelo <i>S. mansoni</i>	30
2. Resposta imune humoral à infecção.....	34
3. Resposta imune celular à infecção.....	37
4. Produção de citocinas.....	40
5. Atividade eosinofílica.....	42
 DISCUSSÃO	 44
 CONCLUSÃO	 52
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 54

INTRODUÇÃO

1. SENESCÊNCIA

3.1 O envelhecimento da população mundial

A população mundial vem passando por uma gradativa alteração na sua composição etária desde meados do último século. O efeito combinado da redução dos níveis de fecundidade e mortalidade, e do aumento da expectativa de vida repercutiu num processo de envelhecimento populacional que se caracteriza pela redução da composição relativa de crianças e jovens, acompanhada do aumento da camada de adultos e, particularmente, dos idosos. Os avanços da medicina e as melhorias nas condições gerais de vida contribuíram para elevar a expectativa de vida de 46 anos, em 1950, para 68 em 2010 e para os estimados 75 anos, em 2050. Em 1950, existiam cerca de 204 milhões de pessoas com mais de 60 anos (8% da população), e espera-se que em 2050 nesta faixa etária haja 2 bilhões de pessoas (22%) (*Onu, 2008*), ultrapassando o número de jovens de até 14 anos

Já no Brasil, estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística apontam que os indivíduos acima dos 60 anos de idade, que em 1980 eram 7 milhões de pessoas (6% da população), em 2050 alcancem 64 milhões (30%) (*Ibge, 2008*). A alteração no padrão etário da população brasileira é bem ilustrada pelo estreitamento da base e concomitante alargamento do ápice da pirâmide demográfica, característica de uma sociedade em acelerado processo de envelhecimento (Figura 1).

As rápidas transformações no perfil demográfico em direção a uma população bastante envelhecida devem ser acompanhadas por medidas que promovam o bem-estar da sociedade. O mobiliário urbano, as edificações públicas, privadas e para fins de moradia, os meios de transporte público, as pesquisas científicas e a medicina, o mercado de trabalho, os sistemas público e privado de saúde, bem como a previdência e a assistência social deverão passar por uma complexa evolução para assegurar a inclusão, na família, na cidade e na sociedade de modo geral, de um contingente a cada dia maior de idosos (*Timo-Iaria, 2003*).

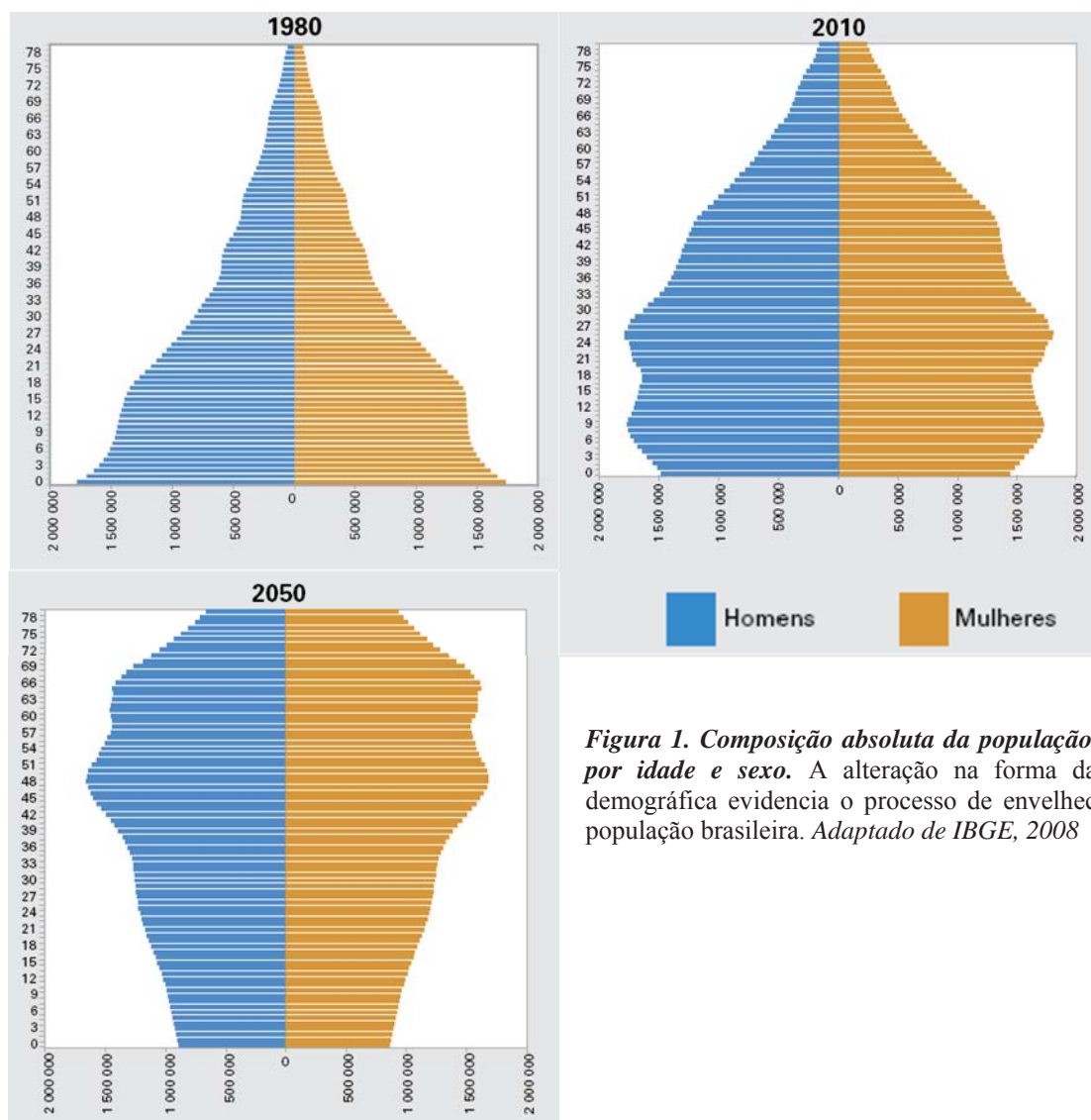


Figura 1. Composição absoluta da população brasileira por idade e sexo. A alteração na forma da pirâmide demográfica evidencia o processo de envelhecimento da população brasileira. Adaptado de IBGE, 2008

1.2 Biologia do envelhecimento

Geralmente, considera-se o envelhecimento como um processo que se inicia em fases muito tardias da vida, mas as alterações biológicas decorrentes do avanço da idade constituem um fenômeno constante e gradual durante todos os períodos do desenvolvimento. A senescência é uma fase particular em que essas mudanças gradativas se acumulam e se acentuam e quando se tornam mais nítidos o comprometimento e o declínio das funções que caracterizam o organismo vivo (Bauer, 2005)

O envelhecimento é um fenômeno complexo caracterizado por alterações quantitativas, qualitativas e estruturais no organismo. Muitos trabalhos demonstram que o

envelhecimento, antes de tudo, manifesta-se em nível celular, fenômeno conhecido como senescência celular ou senescência replicativa. Harman propôs uma associação entre um progressivo desarranjo molecular, com aumento gradativo dos intermediários reativos de oxigênio (radicais livres), danificando o DNA, RNA, lipídeos e proteínas, e o declínio geral das funções celulares com consequente envelhecimento (*Harman, 1956*). Hayflick propôs que as células somáticas normais possuem um limite de divisões celulares possíveis devido à existência de um mecanismo de contagem de eventos mitóticos batizado de “replicômetro” (*Hayflick, 1965*). Posteriormente, os telômeros foram identificados como responsáveis por este relógio replicativo, visto que ocorre o encurtamento dos mesmos a cada divisão celular (*Olovnikov, 1971*).

Dentre as principais alterações funcionais durante a senescência, podemos enumerar a perda da massa e da força muscular, fragilidade óssea, diminuição das acuidades visual e auditiva, redução de desempenho mental e capacidade de aprendizagem e memória, comprometimento da função cardíaca e circulatória, atividade renal deteriorada, declínio das funções respiratórias, distúrbios do sono, alteração das redes endócrinas, e comprometimento da atividade imunológica (*Timo-Iaria, 2003*).

1.3 Imuno-senescência

A imuno-senescência compreende um declínio da atividade do sistema imune devido ao progressivo envelhecimento e contribui para o aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes (*Solana e Pawelec, 1998*).

Este processo, bem descrito em humanos e camundongos, é caracterizado por diversas alterações funcionais no sistema imune. Tais modificações podem ser encontradas tanto na arquitetura e funcionamento dos órgãos linfóides quanto nos componentes celulares do sistema imune (*Takeoka et al., 1996; Faria et al., 2008*).

O envelhecimento é geralmente acompanhado por uma condição inflamatória sistêmica. Neste fenômeno, referido como “Inflamm-aging” (*Franceschi et al., 2000b*), as alterações na produção de mediadores inflamatórios podem ser causadas por condições pré-existentes, como auto-imunidade, doenças degenerativas e câncer. Entretanto, podem também resultar de defeitos intrínsecos à senescência no sistema imune inato, que participa do equilíbrio de citocinas e do desencadeamento da inflamação (*Solana et al., 2006*).

Em relação à imunidade inata na senescência, há uma perda da capacidade fagocítica e da quimiotaxia em macrófagos, decréscimo na geração de radicais óxidos e na eliminação de patógenos em neutrófilos, embora ocorra um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (*Straub et al., 2000*). A ativação e a apresentação de antígenos por macrófagos, a migração de células dendríticas e a ativação mediada por receptores Toll mostraram-se diminuídas ou desreguladas (*Nikolich-Zugich, 2005*). Um aumento no número de células NK e NKT foi observado em humanos e camundongos idosos, embora a citotoxicidade e a produção de citocinas e quimiocinas por essas células estejam reduzidas. Assim, as alterações funcionais, de frequência e de processos de sinalização desses vários tipos celulares poderiam contribuir para o aumento da suscetibilidade à infecções em idades mais avançadas. (*Solana et al., 2006*).

Embora haja alterações importantes em componentes inatos do sistema imune, o maior impacto do envelhecimento se localiza na produção e na atividade dos linfócitos.

Um efeito acentuado do envelhecimento no sistema imune pode ser observado no timo. Este órgão, local de desenvolvimento de células T, sofre uma grande atrofia, caracterizada pela perda da região cortical, mas não da região medular. Essa atrofia acarreta perda de tímócitos imaturos e afeta a maturação das células T por interferência no processo de seleção dos linfócitos (*Takeoka et al., 1996*).

A consequência imediata das alterações na produção de linfócitos T no timo, durante o envelhecimento, é a mudança no perfil das células T periféricas. Alterações na expressão de receptores de adesão, de moléculas envolvidas na migração para sítios periféricos e moléculas co-estimuladoras são características da imuno-senescência. A frequência de linfócitos T ativados e de memória (caracterizado pela expressão CD28^{lo}, CD44^{hi} CD45RB^{lo}, CD62L^{lo}) nos animais idosos é muito maior (*Ernst et al., 1993; Barrat et al., 1995; Kurashima e Utsuyama, 1997; Timm e Thoman, 1999; Faria et al., 2008*) e, por outro lado, há uma redução na expressão de moléculas que caracterizam células virgens (caracterizados pela expressão de CD28^{hi}, CD62L^{hi}, CD45RB^{hi} e CD44^{lo}) (*Thoman, 1997; Solana e Pawelec, 1998; Faria et al., 2008*).

Uma consequência direta deste decréscimo de linfócitos T virgens no envelhecimento é a diminuição da diversidade do repertório antígeno-específico. Estudos da expressão da cadeia V β do TCR em células T humanas constataram uma redução de repertório de 10⁸, em indivíduos adultos, para 10⁶, em idosos (*Weng, 2006*).

Os mecanismos fisiológicos que regulam a proporção de células virgens ou de memória na periferia são desconhecidos. Recentemente, foi proposto que o acúmulo de células de memória se deve a um aumento da expressão do ligante de Fas (Fas-l) em células virgens, aumentando sua sensibilidade a apoptose (*Collaziol et al., 2004*). A explicação mais aceita, no entanto, propõe que o decréscimo do número de linfócitos virgens é um resultado direto da redução da produção de novos linfócitos no timo (*Linton e Dorshkind, 2004*). Embora o timo continue funcionalmente competente em idosos, o percentual de exportação é insuficiente para repor as células T virgens perdidas diariamente na periferia. O número de timócitos emigrantes decai e a proliferação homeostática das células residentes é requerida para manter o *pool* celular. Como conseqüência disso, ocorre um aumento progressivo do número de células de memória, gerando, porém, uma diversidade restrita e uma tendência à oligoclonalidade, ou seja, poucos clones ocupam uma proporção significativa do conjunto de células T. Com o tempo, essas mudanças se tornam mais pronunciadas e estão muito associadas com o aumento da incidência de doenças autoimunes e diminuição da capacidade de resposta frente a novos antígenos (*Berzins et al., 2002*).

O sistema imune adaptativo depende da habilidade dos linfócitos em se dividirem em resposta a um desafio antigênico. A redução dos telômeros em linfócitos foi demonstrada durante a diferenciação de células T virgens em células de memória e o encurtamento telomérico pode agir como um fator limitante da capacidade de multiplicação celular, levando a célula à apoptose. Dessa forma, o tamanho do telômero não só controla a atividade replicativa celular, como é um marcador do declínio da função de linfócitos associado ao envelhecimento (*Weng, 2006*).

Em camundongos idosos, ocorre diminuição na expressão do receptor de IL-2, que é importante no processo de proliferação celular, bem como na expressão da molécula co-estimuladora CD28 em células T estimuladas pelo mitógeno concanavalina A (ConA) (*Wakikawa et al., 1997*). Essa alteração também foi observada em humanos, que apresentam um aumento de linfócitos T CD8⁺CD28⁻ na senescência (*Pawelec et al., 2001*).

Outra alteração no sistema imune associada ao envelhecimento é a diferença no padrão de síntese de citocinas pelos linfócitos, uma vez que as células T virgens secretam um perfil de citocinas diferente das células T ativadas. A síntese de IL-2 por células T CD4⁺ e CD8⁺ de animais velhos está diminuída, enquanto citocinas efetoras tais como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, INF- γ e TGF- β aumentam em animais idosos (*Daynes et al., 1993; Hobbs et al., 1993; Hobbs et al., 1994; Mu e Thoman, 1999*). A influência do envelhecimento na secreção de IL-10 não

é, no entanto, um consenso e existem trabalhos que demonstram um aumento na produção de IL-10 em macrófagos (*Pawelec et al., 2000*), e outros que não apontam alteração de IL-10 na senescência. (*Thoman, 1997; Forsey et al., 2003*).

A função de células B também é alterada na imuno-senescência. A diminuição de suas progenitoras na medula óssea tem também um efeito direto sobre o *pool* periférico de células virgens (*Weng, 2006*). A formação de centros germinativos e a resposta de anticorpos estão diminuídas ou retardadas (*Nikolich-Zugich, 2005*), e a maturação de afinidade dos anticorpos é prejudicada devido a falhas no mecanismo de hipermutação somática (*Song et al., 1997*). Pode-se observar, portanto, diminuição no repertório de células B e consequente comprometimento da diversidade clonal. (*Weksler e Szabo, 2000*).

Quanto aos níveis de imunoglobulinas, há certa discordância na literatura. *Speziali* e colaboradores demonstraram que, apesar da resposta humoral antígeno-específica estar diminuída em camundongos velhos, o nível total de anticorpos séricos, assim como a frequência de células produtora de anticorpos na medula e no baço estão aumentados (*Speziali et al., 2009*). Alguns estudos mostraram um declínio nos níveis de IgM, IgG e IgA nos linfonodos periféricos e de IgA secretória no muco intestinal de animais idosos. Outros estudos mostram que há um aumento de IgM e IgG no plasma e soro e de IgA no soro e saliva de humanos e no muco intestinal de camundongos na senescência (*Szewczuk et al., 1981; Arranz et al., 1992; Fujihashi e Mcghee, 2004; Listi et al., 2006*) No entanto, dados do nosso laboratório demonstram que os níveis de IgA secretória no muco se mantem inalterados durante o envelhecimento em camundongos. (*Santiago et al., 2008*).

Algumas evidências indicam que a frequência aumentada de doenças autoimunes na senescência pode estar relacionada a uma transdução de sinais alterada nos linfócitos. As alterações na sinalização celular nos linfócitos T podem também estar associadas à deficiência na reatividade imunológica observada em idosos. Células T de camundongos e humanos idosos mostram defeitos na mobilização de cálcio e na fosforilação de proteínas após contato com APCs (*Miller, 1987; Grossmann et al., 1990*). O envelhecimento leva ao declínio na fosforilação promovida por quinases tanto em resposta ao mitógeno ConA, como aos anticorpos anti-CD3 e anti-TCR (*Patel e Miller, 1992*) e a própria distribuição dessas quinases dentro da célula parece estar também bastante alterada (*Ghosh e Miller, 1995*). Em células B, também ocorrem alterações substanciais no mecanismo celular de transmissão de sinais (*Hasler e Zouali, 2005*). Assim, mecanismos moleculares de ativação dos linfócitos,

tanto pelo seu receptor clonal quanto por moléculas co-receptoras e co-estimuladoras, apresentam modificações marcantes durante o envelhecimento (*Shi e Miller, 1992*).

Um dos problemas frequentemente enfrentados no estudo dos efeitos do envelhecimento sobre os sistemas biológicos é a confusão entre o processo do envelhecimento e as doenças associadas a ele. Entretanto, estudos com indivíduos centenários proporcionaram o surgimento de uma nova abordagem de estudo da imuno-senescência saudável. Dados obtidos utilizando-se um rígido critério de exclusão de doenças associadas à senescência, conhecido como Protocolo SENIEUR (*Lighthart et al., 1984*), permitem propor que o envelhecimento não é necessariamente caracterizado por uma deterioração, mas sim por uma remodelagem da função imune (*Pawelec et al., 2002*). Neste sentido, muitas funções imunológicas estão bem preservadas no idoso e poderiam compensar outras que estão comprometidas (*Franceschi et al., 2000a; Franceschi et al., 2000c*). O conceito de envelhecimento saudável, proposto por estes estudos, esclarece a distinção entre o envelhecer e o adoecer. Por esta perspectiva, a imuno-senescência não envolve um simples declínio unidirecional de todas as funções, mas é mais apropriadamente definida como uma remodelagem dinâmica durante o envelhecimento do organismo (*Franceschi et al., 1996; Globerson e Effros, 2000*).

Um interessante trabalho, que corrobora esse raciocínio, mostra que camundongos BALB/c velhos se tornam mais resistentes à infecção por *Leishmania major* quando comparados a animais jovens, que apresentam uma reação inflamatória local muito mais acentuada e maior parasitemia. Essa resistência dos velhos estaria relacionada a um aumento constitutivo na produção de IL-12 pelos macrófagos nessa linhagem que, associado ao estímulo com antígenos microbianos durante a vida, gera um perfil imunológico mais eficiente no controle da infecção (*Ehrchen et al., 2004*).

Trabalhos do nosso grupo também mostram que o sistema imune inato pode estar bem preservado na senescência. Um exemplo disso são as células NK, que apresentam um aumento de sua frequência e perfil de ativação em alguns indivíduos idosos. Dessa forma, mecanismos da imunidade inata poderiam agir de forma compensatória e suprir o declínio da atividade de linfócitos T durante o envelhecimento (*Comin et al., 2007; Comin et al., 2008*).

2. ESQUISTOSSOMOSE

2.1 Aspectos gerais

A esquistossomose é uma doença debilitante e potencialmente letal que afeta 200 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada a segunda doença parasitária em mortalidade, precedida apenas pela malária (Capron *et al.*, 1995). Mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e estima-se que essa parasitose cause mais de 500 mil mortes anuais (Who, 2010).

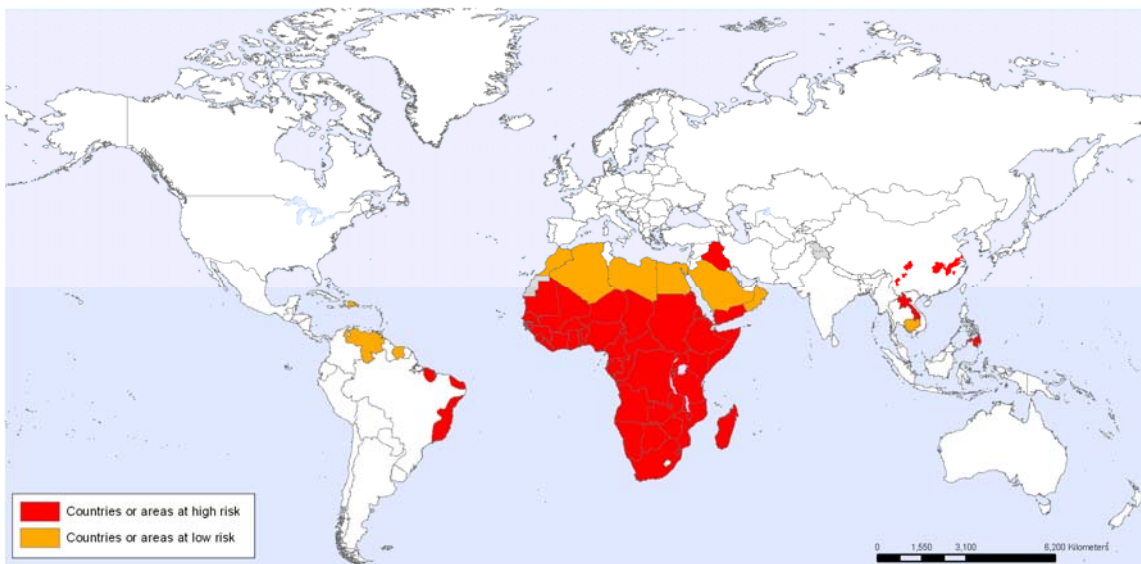


Figura 2 . Distribuição global da esquistossomose. Países e áreas de risco de infecção por *Schistosoma sp.* Adaptado de WHO, 2009.

A distribuição geográfica da esquistossomose é ampla, afetando cerca de 80 países distribuídos na América do Sul, Caribe, África, Oriente Médio, Filipinas e no Sudoeste Asiático (Who, 2010) (Figura 2). No Brasil, existe uma vasta área endêmica que se estende do norte do Estado do Pará até o Estado Rio Grande do Sul, sendo o litoral do Nordeste e o Estado de Minas Gerais os mais atingidos (Pessoa, 1986).

No homem, a doença é causada por cinco espécies do gênero *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, sendo as mais comuns o *Schistosoma mansoni* e o *Schistosoma japonicum* que causam a esquistossomose intestinal e o *Schistosoma haematobium* que causa a esquistossomose urinária. As espécies *S. intercalatum* e *S. mekongi* são menos comuns e têm suas áreas de distribuição mais restritas. O *S. mansoni* é a espécie que causa o maior número de casos de esquistossomose humana, sendo este um

dos motivos de ser tão amplamente estudada (*Chitsulo et al., 2000*). Esta é a única espécie presente nas Américas, onde ocorre principalmente no Brasil, Suriname, Venezuela e ilhas do Caribe (*Savioli et al., 1997*). Sua transmissão se dá pelo contato com água contaminada com a forma infectante do parasito, a cercária, sendo o homem o grande responsável pela dispersão e manutenção da doença no meio ambiente e pela sua vasta distribuição geográfica (*Pessoa, 1986*).

Trata-se de uma doença inicialmente assintomática que pode evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente ao óbito. A magnitude de sua prevalência, associada à severidade das formas clínicas e a sua evolução, conferem à esquistossomose uma grande relevância como problema de saúde pública (*Saúde, 2009*). Diante da grande morbidade provocada pela infecção por esse parasito, a esquistossomose é uma das dez doenças tropicais que estão sob programas de controle da Organização Mundial de Saúde. (*Morel, 2000*).

No Brasil, apesar da inexistência de dados mais recentes, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) possivelmente levou a uma redução do percentual de indivíduos infectados, mas não à redução do número absoluto de indivíduos infectados, uma vez que ocorreu um grande crescimento populacional nesse período (*Katz e Peixoto, 2000*).

Contudo, não existem no Brasil estudos atualizados que permitam avaliar com precisão a atual situação da esquistossomose mansônica. Alguns estudos regionais mostram uma situação preocupante e ainda longe da erradicação do parasito ou da sua transmissão (*Cutrim et al., 1998; Katz e Peixoto, 2000*). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde considera que há no Brasil quase 7 milhões de infectados e 42 milhões de pessoas em áreas endêmicas (WHO, 2008)

2.2 *Schistosoma mansoni* e a infecção

O parasito causador da esquistossomose está classificado na classe trematoda do filo Platyelminthes. Suas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo e suas formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria* no Brasil. Ao contrário de outros gêneros dessa classe taxonômica, o *Schistosoma* possui sexos separados e apresenta acentuado dimorfismo sexual. Esses vermes

tem vida média de 5 a 10 anos, entretanto existem relatos de indivíduos que estão fora da área endêmica por mais de 20 anos e que ainda estão infectados e eliminam ovos (*Warren et al., 1974*).

A infecção tem início quando o indivíduo se expõe à água contaminada onde existem cercárias que são liberadas pelo caramujo infectado. As cercárias, ao encontrarem a pele ou mucosas do hospedeiro, penetram ativamente, perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos, que então atingem a circulação sanguínea e seguem para os pulmões. Posteriormente, os esquistossômulos migram para o sistema porta intra-hepático onde se desenvolvem e se transformam em vermes adultos em torno de 30 dias após a infecção. Logo depois, os vermes adultos, machos e fêmeas, migram acasalados até a veia mesentérica inferior onde as fêmeas fazem a oviposição de aproximadamente 300 ovos/fêmea/dia. Esses ovos ficam aderidos ao endotélio dos vasos, porém grande parte é carregada pela corrente circulatória para espaços intra-hepáticos onde os ovos se tornam alvos da resposta imune celular do hospedeiro, desenvolvendo uma reação granulomatosa típica (*Bogliolo, 1958; Warren et al., 1967*). Aqueles ovos que ficaram aderidos ao endotélio sofrem um processo de translocação por diversas camadas celulares, indo da luz do vaso até a luz intestinal. Esse processo de migração parece estar intimamente ligado à presença de uma resposta inflamatória mediada por eosinófilos (*Lenzi et al., 1987*). Durante a migração, parte dos ovos fica apreendida na mucosa intestinal, gerando posteriormente granulomas. Os demais sofrem um processo de amadurecimento e ao alcançarem a luz intestinal são eliminados com as fezes, já apresentando uma larva ciliada em seu interior, o miracídio. Caso esses ovos alcancem coleções de água doce, as larvas eclodem e migram ativamente em busca do hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*.

Os miracídios penetram nos tecidos do molusco, efetuam reproduções assexuadas que posteriormente formarão novo tipo de larva, as cercárias. As cercárias abandonam ativamente o caramujo e são capazes de infectar o hospedeiro definitivo: o homem ou alguns outros pequenos mamíferos (*Pessoa, 1987*).

2.3 Imunopatologia

Logo após a penetração das cercárias, pode ocorrer um quadro de dermatite cercariana, caracterizado por eritema, edema e prurido. Decorridas três a sete semanas de exposição, podem aparecer os sintomas característicos da esquistossomose aguda, com quadro de febre,

anorexia, dor abdominal e cefaléia, além da hepatomegalia. Esse quadro, porém, raramente é encontrado em pacientes de área endêmica (*Bina, 1984*).

Com a deposição dos ovos nos tecidos, a doença começa a evoluir para seu estágio crônico, podendo persistir por vários anos. Nessa fase, vários órgãos, principalmente fígado, baço e intestino, são afetados, podendo ocorrer graus extremos de danos. Entretanto, as manifestações clínicas variam, dependendo da cepa e intensidade do parasitismo, do sexo, idade, e estado nutricional do hospedeiro e da resposta imune do indivíduo à infecção. A doença apresenta-se frequentemente sob a forma clínica intestinal, normalmente assintomática. No entanto, mesmo nos portadores da forma intestinal podem surgir episódios ocasionais de diarreia com dor e desconforto abdominal. A forma hepatoesplênica pode gerar, além dos sintomas intestinais, hepatomegalia e esplenomegalia (*Pessoa, 1986*).

A reação granulomatosa desencadeada pelos ovos no tecido é a principal causa da patologia, envolvendo a deposição excessiva de matriz de tecido conectivo, principalmente com deposição de colágeno (*Wylar et al., 1987*). Esse quadro conduz ao aparecimento de fibrose que pode atingir diferentes graus de intensidade, desencadeando alterações hepáticas e esplênicas (*Bassily et al., 1979*). Embora o granuloma seja responsável por danos teciduais, ele protege o hospedeiro por impedir a dispersão dos antígenos do ovo (*Von, 1964*).

2.4 A resposta imune na esquistossomose

Vários estudos têm demonstrado que, na esquistossomose mansoni, diversos mecanismos da resposta imune celular e humoral estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da patologia ou resistência à infecção/reinfecção.

No estágio inicial da doença, a liberação intravascular de antígenos do tegumento e do intestino dos parasitos provoca uma reatividade inflamatória caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1, como IL-2 e IFN- γ . Observa-se um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos.

Durante a formação dos granulomas, os antígenos solúveis do ovo induzem uma resposta imune de hipersensibilidade retardada resultante da atividade de células T CD4⁺ ativadas (*Mathew e Boros, 1986*). Em modelos experimentais, o estágio inicial de formação do granuloma envolve a participação de moléculas de adesão, como ICAM-I, induzidas por IL-1,

IFN- γ e TNF- α (Dustin et al., 1986). O desenvolvimento do granuloma nesse estágio é predominantemente celular sendo formado principalmente por eosinófilos, macrófagos, linfócitos, alguns neutrófilos e células gigantes multinucleadas (Weinstock, 1992). A migração desses diversos tipos celulares para o sítio de inflamação é controlada por várias citocinas e quimiocinas (Pearce e Macdonald, 2002).

Com o avanço da fase postural, ocorre uma alteração importante no padrão de resposta imune para um perfil do tipo 2 com predomínio de citocinas como IL-4 e IL-5 embora a participação de TNF- α e INF- γ sejam de grande importância para o processo de recrutamento primário de células (Pearce et al., 1991).

Durante a fase crônica da infecção, ocorre a redução do volume dos granulomas em torno dos ovos. Esse processo de “imunomodulação” envolve a diminuição da resposta proliferativa aos antígenos do parasita e da produção de citocinas do tipo 1. (Andrade, 1964). A base imunológica do fenômeno da imunomodulação ainda não está totalmente esclarecida, mas vários mecanismos explicativos já foram sugeridos: a inativação de linfócitos Th1 (Stadecker, 1992); a imunomodulação por IL-10 (Flores Villanueva et al., 1994; Falcao et al., 1998); a ação de linfócitos T supressores (Fidel e Boros, 1990); a apoptose de linfócitos no fígado (Carneiro-Santos et al., 2000); e a modulação da resposta de células T por anticorpos anti-idiotipos (Lima et al., 1986; Parra et al., 1988) tem sido propostos.

Em relação à patologia no homem, já se encontra bem estabelecido que a maioria dos pacientes infectados pelo *Schistosoma mansoni*, residentes em áreas endêmicas, desenvolvem a forma crônica intestinal, mais branda. Vários estudos têm demonstrado que os pacientes apresentando essa forma clínica desenvolvem mecanismos que estão envolvidos na modulação da resposta imunológica contra a infecção. Como mencionado anteriormente, diversos mecanismos envolvidos nesse controle já foram descritos, entre eles, a participação de células T CD8⁺ (Doughty e Phillips, 1982) e a regulação mediada por IL-10 (Araujo et al., 1996).

As citocinas também têm sido associadas com a susceptibilidade ou resistência a infecções pelo *Schistosoma* no homem. Na esquistossomose humana urinária, foi proposto um possível mecanismo de supressão de proliferação de células T e produção de IFN- γ através da inibição, por IL-10, da expressão da molécula co-estimuladora CD80 nas APCs. (King et al., 1996). O envolvimento de IL-10 na diminuição da expressão de CD80 em células apresentadoras de antígenos também foi demonstrado em modelo murino de infecção pelo

Schistosoma mansoni (Flores Villanueva et al., 1994). Esses dados reforçam a hipótese do papel modulador de IL-10 durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

O aumento de IL-5 contribui para a eosinofilia (Sher et al., 1990; Weinstock, 1992), e a atividade dos eosinófilos, através da liberação de nitrogênio reativo (NO), peróxido de hidrogênio, ou pela imobilização dos estágios larvais do verme *Schistosoma mansoni* (Maizels et al., 2004), é importante no combate à infecção por esse parasito. Comparando a produção de citocinas entre pacientes resistentes ou susceptíveis à reinfeção após quimioterapia, Medhat e colaboradores descreveram que indivíduos resistentes apresentavam maior frequência de linfócitos produtores de IL-4 e IL-5, e níveis aumentados dessas citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC reativos aos antígenos de vermes adultos (Medhat et al., 1998).

As citocinas também atuam como fatores importantes na troca de isotipos, influenciando na seleção de classes e subclasses de imunoglobulinas produzidas por células B (Finkelman et al., 1990). A citocina IL-4 induz as células B a produzirem IgG1 (Snapper e Paul, 1987) e inibe a secreção de IgG2a, enquanto IFN- γ aumenta a produção de IgG2a, mas inibe IgG1 (Stevens et al., 1988). Há evidências de que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade, a intensidade de infecção e, provavelmente, com a duração da infecção (Dunne et al., 1988). Alguns estudos tem demonstrado que a composição de isotipos de anticorpos anti-*Schistosoma* pode desempenhar uma influência marcante na eficiência de mecanismos efetores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e, conseqüentemente, na expressão da imunidade protetora ou da patologia (Dunne et al., 1993). Dessa forma, a influência do perfil de citocinas na produção de anticorpos em resposta à presença do *S. mansoni* demonstra a importância do diálogo entre a imunidade celular e humoral na definição dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção e à patologia causada por este helminto.

Anticorpos dos isotipos IgE e de algumas subclasses de IgG estão diretamente envolvidos na morte de esquistossômulos *in vitro* e *in vivo* em associação com populações de células efectoras, tais como macrófagos, eosinófilos e plaquetas. Infecções experimentais, utilizando camundongos deficientes em IgE, confirmam a importância dessa imunoglobulina para o controle da infecção, já que a carga parasitária nesses animais é maior (King et al., 1997).

3. IMUNO-SENSCÊNCIA E ESQUISTOSSOMOSE

Algumas características epidemiológicas da esquistossomose merecem destaque. Em diferentes áreas endêmicas, as curvas de prevalência e intensidade de infecção em relação à idade apresentam um padrão comum: ambas aumentam progressivamente nas faixas etárias mais jovens e declinam após a segunda década de vida. Os indivíduos de faixas etárias até os 20 anos são os que apresentam a maior prevalência e as cargas parasitárias mais altas, o que parece estar relacionado à atividade imunológica e aos aspectos comportamentais (Neves, 1995). Dentre os fatores comportamentais, discute-se uma mudança do padrão de contato com a água infestada por cercárias. Alguns trabalhos apontam para um menor contato com águas nas faixas etárias mais elevadas, determinando a diminuição da infecção (Warren, 1973; Dalton e Pole, 1978). Por outro lado, a queda da prevalência com o aumento da idade pode estar relacionada a mecanismos imunológicos adquiridos em decorrência a várias infecções ocorridas na infância (Butterworth et al., 1985; Wilkins et al., 1987). Estudos epidemiológicos realizados sobre o *S. mansoni* no Kenya (Sturrock et al., 1983; Butterworth et al., 1985), no Egito (Colley et al., 1986) e no Brasil (Dessein et al., 1988; Gazzinelli et al., 2001) demonstram que embora ocorra uma pequena redução nos níveis de exposição com a idade, essa é insuficiente para explicar a grande redução na intensidade de infecção/reinfecção, validando a provável resistência adquirida com a idade.

Essa relação entre idade e suscetibilidade incentivou esforços para se elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ao *Schistosoma*. Desde 1969, quando Smithers e Terry introduziram o conceito de imunidade concomitante, inferindo que a presença de vermes adultos induz uma imunoproteção parcial contra as formas imaturas de *S. mansoni* (Smithers e Terry, 1969; Dean, 1983), inúmeros estudos foram realizados usando o modelo murino para tentar se identificar mecanismos envolvidos nessa proteção (Dean, 1983). Ainda assim, a associação entre os fatores imunológicos e o desenvolvimento da resistência à reinfecção pelo *S. mansoni* ainda não são totalmente conhecidos. Entretanto, vários mecanismos de morte do parasito já foram identificados *in vitro*. Entre eles, a existência de anticorpos letais (Capron et al., 1974; Capron et al., 1977; Correa-Oliveira et al., 1982); a citotoxicidade de eosinófilos e de neutrófilos dependentes de anticorpos (Joseph et al., 1983); a citotoxicidade celular dependente de complemento e a ativação de macrófagos (Capron et al., 1975).

Curiosamente, alguns relatos mostram que em indivíduos acima de 60 anos ocorre um novo aumento na intensidade de infecção (*Fulford et al., 1998*). Dados recentes do nosso grupo demonstram que a reatividade imunológica frente aos antígenos liberados pelo parasita é influenciada pelo envelhecimento e que dois aspectos são importantes na relação entre imuno-senescência e a capacidade de proteção na infecção/reinfecção crônica por *S. mansoni* em humanos: a imunidade inata e a imunoregulação. Observamos que indivíduos idosos de áreas endêmicas que permanecem negativos para a presença de ovos nas fezes (sugerindo que eles não se re-infectaram) apresentam uma frequência maior de células NK CD56low (citotóxicas) no sangue periférico quando comparados com indivíduos idosos infectados ou com jovens. Além disto, esses indivíduos idosos negativos apresentam uma frequência mais elevada de células NK, células dendríticas e macrófagos expressando TLR-1 e um percentual significativamente maior de células NK produtoras de IFN- γ . Esses dados sugerem, então, que a imunidade inata pode cumprir um papel importante na proteção anti-infecciosa nos idosos. Foi observado ainda que ocorre uma menor produção de IFN- γ e maior produção de IL-4 e de IL-10 em indivíduos idosos infectados quando comparados com jovens e idosos de área endêmica não infectados. Isto sugere que mecanismos de imunoregulação estão preservados, enquanto a imunidade protetora é deficiente nos idosos infectados. (*Speziali et al., 2004; Comin et al., 2007*).

Se a reatividade inflamatória aos antígenos do parasito parece ser importante na imunidade adquirida e na proteção a reinfecção, o fenômeno da imunomodulação tem um papel fundamental na diminuição do dano tecidual e sua ausência está associada ao desenvolvimento das formas mais graves da doença em humanos e camundongos. O estudo dos efeitos da imuno-senescência na esquistossomose envolve necessariamente a abordagem desses dois aspectos da imunidade na infecção. Assim, embora existam evidências das relações entre envelhecimento e infecção, as correlações mais claras entre o processo de senescência e a resposta imunológica ligada à proteção e morbidade na esquistossomose ainda necessitam de maiores estudos.

As pesquisas realizadas com pacientes são muito importantes, no entanto, o estudo de processos infecciosos humanos apresenta limitações éticas de investigação. O material biológico disponível para análise geralmente se restringe ao plasma e às células do sangue, que refletem apenas parcialmente a atividade imunológica do organismo. Além disso, em áreas endêmicas, a parasitose e o envelhecimento se sobrepõem, impedindo a avaliação fidedigna do efeito da senescência sobre a infecção.

O modelo murino de infecção experimental reproduz em muitos aspectos a patogenia em humanos. Em camundongos infectados, a imunopatologia também se dá pela formação de granulomas induzidos pelos ovos do parasito no fígado. Quando a infecção atinge sua fase crônica, também se observa a modulação do volume desses granulomas. Além disso, já foi demonstrado em camundongos o estabelecimento de resistência à reinfecções pelo *S. mansoni*. Desta forma, o uso do modelo murino permite estudar mais detalhadamente todas as fases da doença, a carga parasitária, a ativação inflamatória em órgãos, como o fígado e o baço, além de excluir variáveis que podem influenciar a interpretação dos dados, como os padrões de contato com a água, as co-infecções e o tratamento da população.

OBJETIVOS

OBJETIVO

Estudar a influência do envelhecimento na reatividade imunológica à infecção pelo *Schistosoma mansoni* em modelo experimental murino.

Objetivos específicos:

- Comparar a suscetibilidade de camundongos jovens e idosos à infecção e reinfecção por *Schistosoma mansoni* através de avaliação da carga parasitária;
- Quantificar a deposição de ovos no fígado e intestino;
- Caracterizar os perfis fenotípicos das subpopulações linfocitárias do baço de camundongos jovens e idosos, normais e infectados pelo *S. mansoni*;
- Quantificar a produção de citocinas produzidas em cultura celular de esplenócitos estimulados com antígenos do parasito;
- Avaliar a atividade eosinofílica no fígado de camundongos jovens e idosos infectados;
- Analisar a influência da senescência na resposta imune humoral contra o parasito.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Camundongos

Foram utilizadas fêmeas de C57BL/6, obtidas do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Durante todo o experimento, os camundongos jovens (2 meses) e velhos (15 meses de idade) foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG, sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (*nº de protocolo 117/2007*).

2. Infecção

Foram utilizadas cercárias de *S. mansoni* da cepa LE, obtidas de caramujos infectados no Grupo Interdepartamental de Estudos Sobre Esquistossomose (GIDE) do Departamento de Parasitologia do ICB. Após a eliminação de cercárias pelos caramujos expostos a luz, a concentração de larvas na solução obtida foi determinada pela contagem de alíquotas em lupa estereoscópica. Foram inoculadas, por via subcutânea, na primoinfecção, 20 ou 50 cercárias.

Para a reinfecção, foram utilizadas 70 cercárias por via percutânea. Neste método de infecção, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma solução salina contendo cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e, após raspagem do pelo do abdômen, foram expostos por 40 minutos à cerca de 250 µl da solução cercariana disposta na cavidade de uma pequena placa plástica perfurada em seu centro (*Figuras 3 e 4*).



Figura 3. Infecção de camundongos pelo *S. mansoni* por via percutânea. Os animais são anestesiados, imobilizados e as cercárias são colocadas sobre o abdômen depilado (A), através do orifício de uma pequena placa (B). Esta forma de infecção é muitas vezes citada como método do anel.

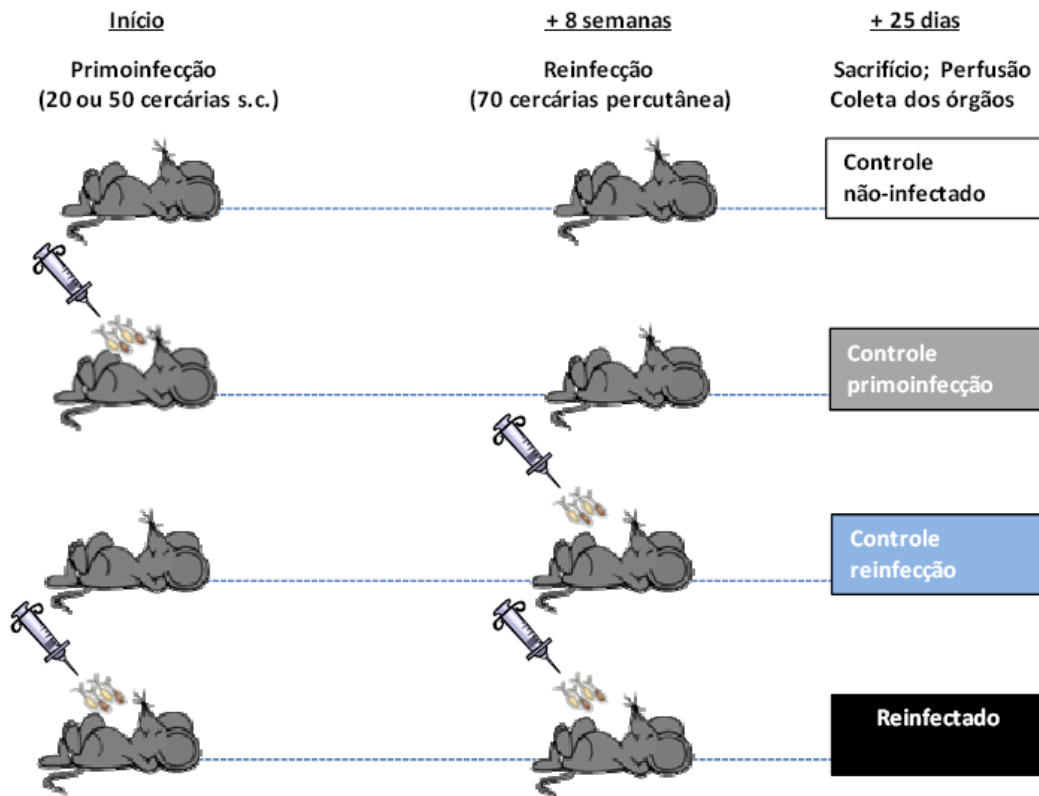


Figura 4. Protocolo experimental de infecção. Camundongos jovens e velhos foram divididos em 4 grupos experimentais e receberam o tratamento acima descrito.

3. Determinação da carga parasitária

Para avaliação das cargas parasitárias, os animais foram submetidos ao processo de perfusão hepática descrito por (*Pellegrino e Siqueira, 1956*). Após o sacrifício por deslocamento cervical, as cavidades torácica e abdominal foram abertas, a porção final do tubo digestivo foi ocluída, e a veia porta foi seccionada bem próximo ao fígado. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, foi injetada solução salina heparinizada pelo ramo descendente da artéria aorta do animal, permitindo a saída dos parasitos, que habitavam o interior dos vasos sanguíneos, pela veia porta seccionada. O fígado foi também perfundido através da artéria hepática, expulsando os vermes localizados nos vasos intra-hepáticos. Todo o líquido resultante desse processo foi coletado individualmente e, após decantação do material, os parasitos extraídos foram lavados, e com auxílio de uma lupa, foram contados e tiveram o sexo e a maturidade determinados (*Figura 5*).

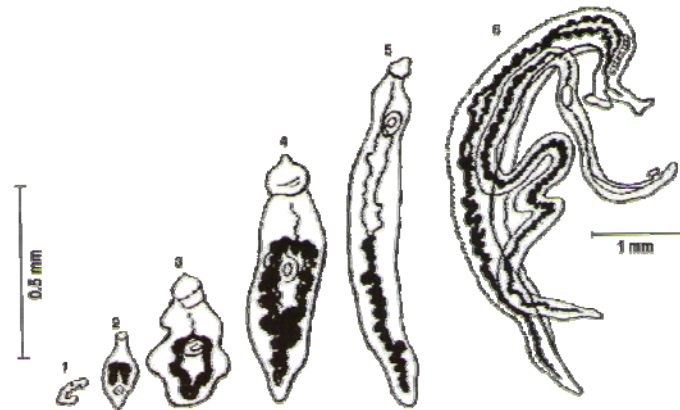


Figura 5. Estágios evolutivos de *S. mansoni* no hospedeiro definitivo Representação esquemática das etapas do desenvolvimento dos esquistossômulos de pele até a forma adulta acasalada. (Schistograma). Esta notável diferença no tamanho dos vermes adultos (6) e imaturos (1 a 5) foi utilizada para distinção de vermes provenientes da primoinfecção e da reinfecção. Adaptado de (Carvalho, 2008)

4. Quantificação de ovos de *S. mansoni* no fígado e intestino

Após a perfusão, o fígado e os intestino foram retirados, picotados e colocados em tubos de 15ml contendo solução de KOH 5% a 37 °C até que não se observasse a presença de fragmentos de tecido. O material resultante da digestão tecidual foi então centrifugado por 1 minuto a 300g. O sobrenadante foi desprezado através de sucção por vácuo e foi adicionada solução salina 0,85%. O procedimento de lavagem foi repetido por três vezes e o material foi finalmente ressuscitado em 10 ml de solução de formol 10 % tamponado até a contagem. Posteriormente, duas alíquotas de 100µl de cada amostra foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínula e examinadas ao microscópio óptico para contagem em duplicata. A média dos valores obtidos foi apresentada como total de ovos por órgão.

5. Quantificação de ovos nas fezes

Amostras de fezes de cada camundongo foram coletadas, pesadas e homogeneizadas em salina 0,85%. Para conservação dos ovos, foi acrescida solução de formol 10% tamponado. Duas alíquotas de 100µl de cada amostra foram colocadas em lâmina, coberta com lamínula e os ovos foram contados em microscópio óptico. Os resultados foram expressos como médias do número de ovos por grama de fezes.

6. Obtenção do antígeno solúvel do ovo do parasita (SEA)

Os ovos de *S. mansoni* foram obtidos pela trituração, em salina 1,7% a 4°C, de fígados de camundongos SWISS infectados com a cepa LE de *S. mansoni*. Essa suspensão foi homogeneizada cerca de cinco vezes em homogeneizador de tecidos. Esse procedimento foi repetido até que não se detectasse mais ovos inteiros na suspensão, o que pode ser confirmado através da análise de parte do material numa lâmina ao microscópio ótico. Posteriormente, o material foi centrifugado à 50.000g, durante 1 hora a 4° C, e o sobrenadante foi coletado e esterilizado. O conteúdo protéico presente no material foi determinado pelo método de Lowry (*Lowry et al., 1951*). Para o ensaio de cultura celular, a solução resultante foi diluída em meio RPMI numa concentração final de 30 µg de proteína/ml.

7. Obtenção do antígeno solúvel de verme adulto (SWAP)

Vermes adultos perfundidos de camundongos SWISS foram triturados em salina 1,7% a 4°C até a obtenção de um homogenato. Em seguida, o homogenato é submetido à centrifugação a 50.000g durante 1 hora a 4° C, e o sobrenadante é coletado e esterilizado. A concentração de proteínas do extrato antigênico é determinada pelo método de Lowry. Para o ensaio de cultura celular, a solução resultante foi diluída em meio RPMI numa concentração final de 30 µg de proteína/ml.

8. Sangrias e obtenção do soro

Para a obtenção do soro, os camundongos foram sangrados pelo plexo retro-orbital. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado através de centrifugação das amostras, durante dez minutos, a 600g. O soro foi então armazenado a -20°C para ser utilizado posteriormente nos ensaios de ELISA.

9. Preparação de suspensão de células do baço

Após o sacrifício por deslocamento cervical, o baço de cada animal foi retirado, em ambiente estéril, e mantido em meio de cultura RPMI completo (GIBCO) em tubos cônicos de

15ml em gelo. Depois de macerado, o material foi centrifugado durante dez minutos a 300g, a 4°C. Após a remoção das hemáceas através da lise com água, as suspensões celulares foram novamente centrifugadas durante 10 minutos a 300g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de meio RPMI completo. O número de células viáveis nessa suspensão foi estimado contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então ajustadas para 1×10^7 células/ml.

10. Cultura de células

As células foram distribuídas nas placas de 96 poços estéreis (Falcon) 1×10^6 células/poço e incubadas por 72 horas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ com estímulo de SEA, SWAP (3 µg/poço), RPMI completo (controle negativo) ou ConA (0,2µg/poço) (controle positivo). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

11. Análise fenotípica de células através de citometria de fluxo

Em placas de 96 poços de fundo em U foram colocados 25 µl de suspensão celular ($2,5 \times 10^5$ células) e 10 µl de anticorpos (em diluição previamente padronizada) que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células dos camundongos, conjugados com os fluorocromos – PE (ficoeritrina), FITC (fluoresceína) ou Cy (CyChrome) (BD Pharmingen). Foram utilizados os anticorpos IgG2a FITC, IgG2a PE e IgG2a Cy como controles negativos. As placas foram incubadas a 4 °C durante 30 minutos e então lavadas por duas vezes com PBS-wash, através de centrifugação a 300g a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, vertendo-se as placas e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de solução fixadora Macs Facs Fix. As suspensões celulares foram transferidas para microtubos de leitura e armazenadas a 4 °C, protegidas de luz. Para a marcação da molécula intranuclear foxp3, foi realizada uma etapa posterior de permeabilização da membrana da célula com PBS-P (saponina) e adição do respectivo anticorpo com nova etapa de incubação, lavagem e fixação. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura de cinco parâmetros FACScan (Becton Dickinson) acoplado a um computador com o software Cell Quest (Becton Dickinson).

A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células através do padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (Forward Scatter x Side Scatter), foi feito um *gate* na população de linfócitos e a partir deste foram gravados 30.000 eventos para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra (*Figura 6*). Análises posteriores foram feitas utilizando o software Flow Jo (Tree Star) para determinação das populações positivas e negativas para cada marcação.

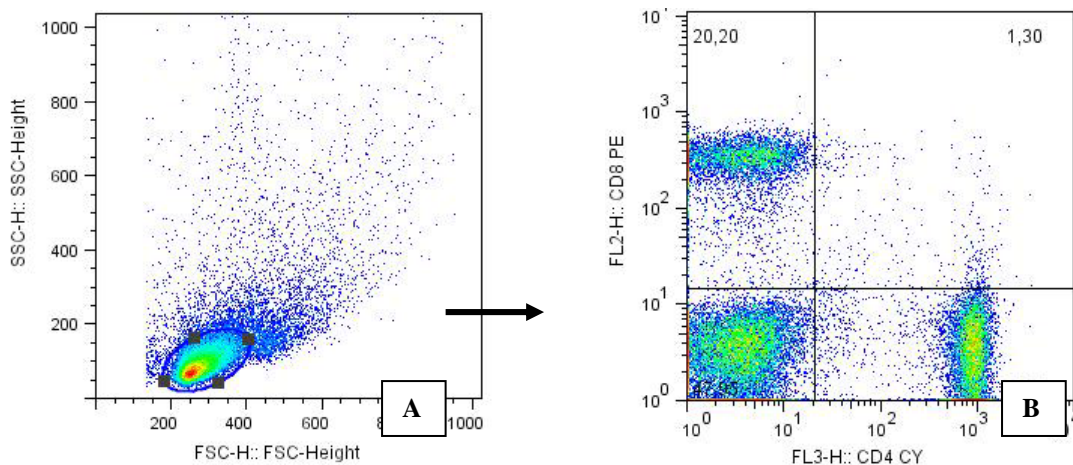


Figura 6. Estratégia utilizada para análise da expressão de moléculas de interesse nos linfócitos do baço. A figura (A) representa um gráfico de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) que demonstra o perfil celular dos esplenócitos, e em destaque a população de linfócitos. A figura (B) representa a detecção de fluorescência de FL-2 (CD8-PE) versus FL-3 (CD4-CY) dentro da população de linfócitos.

12. Ensaio imunoenzimático para medida de anticorpos séricos específicos

A quantificação dos anticorpos específicos totais presentes no soro dos camundongos foi realizada através da técnica de ELISA. Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc) foram incubadas *overnight* a 4°C com solução de SEA ou SWAP (2 µg/poço) em tampão carbonato pH 9,6. Após lavagem com salina-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS-caseína 0,25% e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionados os soros dos camundongos em diluição seriada em PBS-caseína (fator de diluição 0,5), durante uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas, por uma hora a 37°C, com uma solução de anticorpos de cabra anti-Ig de camundongo conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology). Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas, ao abrigo da luz, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H₂O₂ e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5, até o

desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. A reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ($\lambda=492\text{nm}$) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

O valor de cada amostra de soro foi expresso como ELISA* (ELISA-score), obtido através do somatório das densidades ópticas das 4 diluições (1/100 a 1/800). Os resultados expressos nos gráficos representam a média de cada grupo experimental \pm erro padrão.

13. Ensaio imunoenzimático para medida de isotipos de IgG séricas específicas

Os isotipos de IgG específica para SEA e SWAP também foram medidos por ELISA. A metodologia foi similar ao descrito no item anterior, porém na etapa de adição de anticorpos de cabra anti-Ig de camundongo conjugados à peroxidase, foram utilizados anticorpos de cabra para detecção de cada isotipo (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3) de camundongo ligados à peroxidase (Southern Biotechnology).

14. Ensaio imunoenzimático para medida de IgE sérica total

Para detecção dos níveis de IgE sérica total, as placas de 96 poços foram incubadas *overnight* a 4°C com solução de anticorpos de cabra anti-IgE de camundongo (Southern Biotechnology) diluídos em tampão carbonato pH 9,6. Após lavagem com salina-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS-caseína 0,25% e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, os soros foram adicionados e a placa foi mantida durante duas horas à temperatura ambiente. Foi utilizada como padrão positivo IgE de camundongo purificada (Southern Biotechnology) e PBS como controle negativo da placa (branco). Em seguida, adicionou-se solução do anticorpo de rato anti-IgE de camundongo marcado com biotina (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram então incubadas com solução de estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology) durante uma hora à temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas, ao abrigo da luz, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H₂O₂ e 0,4 mg/ml de OPD em tampão citrato pH 5, até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. A reação foi interrompida pela adição de

20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorvância ($\lambda=492\text{nm}$) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Os resultados foram expressos graficamente como médias da concentração de IgE no soro \pm erro padrão.

15. Ensaio Imunoenzimático para medida da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura celular

As placas foram sensibilizadas com 100µl de solução contendo anticorpos monoclonais purificados reativos contra INF- γ , IL-10, IL-4 e IL-5 (BD Pharmingen) diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnigth* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-Tween 0,05% e bloqueadas com PBS-caseína por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes da cultura celular (100µl) e as placas foram incubadas *overnigth* a 4°C. Alguns poços receberam diluições seriadas de cada citocina purificada com concentrações conhecidas, para construção de uma curva padrão, a partir da qual pode ser determinada a concentração de cada amostra. As placas foram novamente lavadas e então incubados por uma hora à temperatura ambiente com 100µl de solução contendo anticorpos monoclonais de camundongo específicos para INF- γ , IL-10, IL-4 e IL-5 (BD Pharmingen) marcados com biotina em solução de PBS-caseína. Após nova lavagem, uma solução contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology) foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas, ao abrigo da luz, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H₂O₂ e 0,4 mg/ml de OPD em tampão citrato pH 5, até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escura. A reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorvância ($\lambda=492\text{nm}$) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Os resultados foram expressos graficamente como médias da concentração de cada citocina \pm erro padrão.

16. Quantificação indireta de eosinófilos pela peroxidase eosinofílica (EPO):

A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia no fígado. Para tanto, para cada 100 mg de tecido foi adicionado 1.9 mL de PBS (pH 7.2), em seguida, o tecido foi homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 10 minutos e o sobrenadante, desprezado. O precipitado foi submetido à lise hipotônica por adição de 1.5 mL de salina 0,2%, seguido pela adição de 1.5 mL de salina 1,6% e glicose 5%. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000g por 10 minutos, o sobrenadante novamente desprezado e o precipitado ressuspensão em 1.9 mL de PBS (pH 7.4), contendo HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide; Sigma) 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, o homogenato foi então congelado 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 12.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase, por ensaio enzimático.

O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc), onde cada poço recebeu 75µl de amostra ou PBS (branco) e 75µl de substrato (4mg de OPD, 2 µl de H₂O₂ em 10ml de tampão Tris-HCl - 0,075mM pH 8) e quando se desenvolveu uma coloração amarelo-escura a reação foi interrompida pela adição de 50 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ($\lambda=492\text{nm}$) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Os resultados expressos nos gráficos representam a média de cada grupo experimental \pm erro padrão.

17. Cálculos estatísticos

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software Prism 5 (GraphPad Software). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Newman-Keuls, em nível de significância = 0,05, para verificar diferenças estatísticas entre os grupos.

RESULTADOS

1. Suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*

Diante dos dados epidemiológicos de áreas endêmicas para esquistossomose, que sugerem uma relação entre intensidade de infecção e idade, torna-se necessário esclarecer de que forma o envelhecimento influencia a suscetibilidade à infecção. Como nessas áreas a parasitose e o envelhecimento se sobrepõem, uma conclusão definitiva sobre o efeito da senescência sobre a infecção demanda o uso do modelo murino que, além de excluir variáveis como padrões de contato com a água, co-infecções e até mesmo tratamento, permite quantificar a carga parasitária diretamente, e não apenas pela contagem de ovos nas fezes que é uma medida indireta da parasitemia.

Neste estudo, utilizamos camundongos fêmeas de 2 meses de idade, que são adultos jovens, e camundongos de 15 meses de idade, que são fêmeas senis, visto que nessa idade as alterações características da imunosenescência já são marcantes.

Os animais foram submetidos a um protocolo de infecção (*Figura 4*) para avaliar a suscetibilidade tanto a infecção quanto a reinfecção pelo *S. mansoni*. Inicialmente trabalhamos com a dose de infecção de 20 cercárias para a primoinfecção, na tentativa de simular uma carga mais natural, e que não resultasse na morte precoce dos animais. Após 8 semanas de infecção, os animais foram submetidos a uma nova exposição cercariana, para avaliar se haveria relação entre a aquisição de imunidade e a idade dos animais. Os resultados apresentados na *tabela I* mostram que não houve diferença na suscetibilidade à infecção entre os grupos jovem e velho, pois a média de vermes recuperada da infecção inicial (vermes adultos) não foi diferente. Além disso, nenhum dos grupos desenvolveu resistência a uma nova infecção visto que a média de vermes imaturos recuperados dos animais reinfecionados não foi inferior à do grupo controle reinfecção. Isto pode ser claramente visualizado pela análise da porcentagem de redução de vermes imaturos que foi muito pequena ou negativa.

A ausência de resistência à reinfecção nos causou surpresa, visto que a “imunidade concomitante” já é bem descrita na literatura e já foi testada e comprovada por diversas metodologias e autores (*Dean, 1983*). Entretanto, um trabalho de Colley e Freeman mostra que algumas linhagens de camundongo requerem uma carga imunizante maior para se desenvolver resistência à reinfecção, e este é o caso dos camundongos C57BL/6 (*Colley e Freeman, 1980*).

Tabela I
Carga parasitária de vermes adultos e imaturos determinada após perfusão.

Grupo (n)	Vermes recuperados ($\bar{x} \pm EP$)		% redução imaturos	Diferença Estatística
	Adultos	Imaturos		
	Primoinfecção (20 cercárias)	Reinfecção (70 cercárias)		
Jovem	Controle primoinfecção(7)	4.8 ± 0.8	–	não
	Controle reinfecção (7)	–	13.3 ± 2.1	15%
	Reinfecção (4)	4.7 ± 1.8	11.3 ± 4.1	não
Velho	Controle primoinfecção(4)	4 ± 1.2	–	não
	Controle reinfecção (6)	–	10.43 ± 1.9	-7%
	Reinfecção (4)	3.7 ± 0.3	11.3 ± 3.2	não

Dados representam a média \pm EP do número total de vermes.

% redução = $\frac{CR - R}{R}$; R = média vermes imaturos do grupo Reinfecção;
 CR = média vermes imaturos do grupo Controle reinfecção

Diante disso, resolvemos então aumentar a dose da primoinfecção, utilizando 50 cercárias ao invés de somente 20. Os animais foram infectados por via subcutânea e, antes da reinfecção, foi feita a contagem de ovos nas fezes para se confirmar a infecção e estimar a oviposição nessa fase.

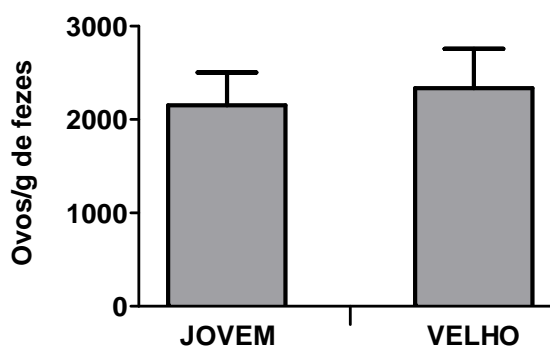


Figura 7. Avaliação do número de ovos/g de fezes dos animais 8 semanas após a primoinfecção com 50 cercárias de *S. mansoni*. Oito semanas após a infecção, amostras de fezes foram coletadas e o número de ovos de *S. mansoni* foi estimado. As barras representam a média \pm erro padrão do número de ovos/g de fezes de cada camundongo do grupo, n=8.

Vinte e cinco dias após a reinfecção os animais foram perfundidos e, como demonstrado na *Tabela II*, mais uma vez não houve diferença na recuperação de vermes adultos, o que já podia ser atestado na 8ª semana p.i. devido à similaridade na taxa de eliminação de ovos nas fezes (*Figura 7*). Contudo houve redução na recuperação de vermes imaturos, indicando a aquisição de resistência à reinfecção em ambos os grupos.

Tabela II
Carga parasitária de vermes adultos e imaturos determinada após perfusão

Grupo		Vermes recuperados ($\bar{x} \pm EP$)		% redução imaturos	Diferença estatística
		Adultos Primoinfecção (50 cercárias)	Imaturos Reinfecção (70 cercárias)		
Jovem	Controle primoinfecção(6)	12.1 ± 2.3	–	–	não
	Controle reinfecção (8)	–	13.1 ± 2.1	79%	sim
	Reinfectado (7)	16 ± 2.9	2.8 ± 0.7		
Velho	Controle primoinfecção(5)	14.2 ± 3.1	–	–	não
	Controle reinfecção (8)	–	13.9 ± 1.4	78%	sim
	Reinfectado (4)	16.5 ± 2.2	3 ± 0.3		

Dados representam a média \pm EP do número total de vermes.

% redução = $\frac{CR - R}{R}$; R = média vermes imaturos do grupo Reinfectado;
CR = média vermes imaturos do grupo Controle reinfecção

A quantidade de ovos encontrados no fígado e intestino de animais jovens e velhos infectados com 20 (*Tabela III*) ou 50 cercárias (*Tabela IV*) não foi diferente (grupos controle primoinfecção). A reinfecção também não alterou a deposição de ovos nos tecidos em nenhuma das faixas etárias.

Não foi observada perda de peso na oitava semana de infecção comparando-se os animais jovens e velhos aos seus respectivos controles não-infectados (*Figura 8*). Já a mortalidade, neste estudo, é um parâmetro de difícil interpretação, pois os animais velhos controles não-infectados também morrem no decorrer do experimento, e torna-se difícil dissociar-se a morte “natural” por envelhecimento do óbito causada pela doença.

Tabela III

Número de ovos no fígado e intestino após 12 semanas de infecção (20 cercárias)

Grupo (n)	Ovos recuperados ($\bar{x} \pm EP$)		Diferença Estatística	
	Fígado	Intestino		
Jovem	Controle primoinfecção(7)	27780 \pm 4430	5010 \pm 2143	não
	Reinfectado (4)	42160 \pm 4853	4240 \pm 1537	
Velho	Controle primoinfecção(4)	36390 \pm 5389	5420 \pm 2320	
	Reinfectado (4)	33720 \pm 5886	5300 \pm 2094	

Dados representam a média \pm EP do número total de ovos/órgão.**Tabela IV**

Número de ovos no fígado e intestino após 12 semanas de infecção (50 cercárias)

Grupo (n)	Ovos recuperados ($\bar{x} \pm EP$)		Diferença Estatística	
	Fígado	Intestino		
Jovem	Controle primoinfecção(7)	221250 \pm 19289	25119 \pm 6215	não
	Reinfectado (4)	230307 \pm 38359	29035 \pm 3923	
Velho	Controle primoinfecção(4)	231167 \pm 19833	23023 \pm 7560	
	Reinfectado (4)	177625 \pm 26177	19760 \pm 4392	

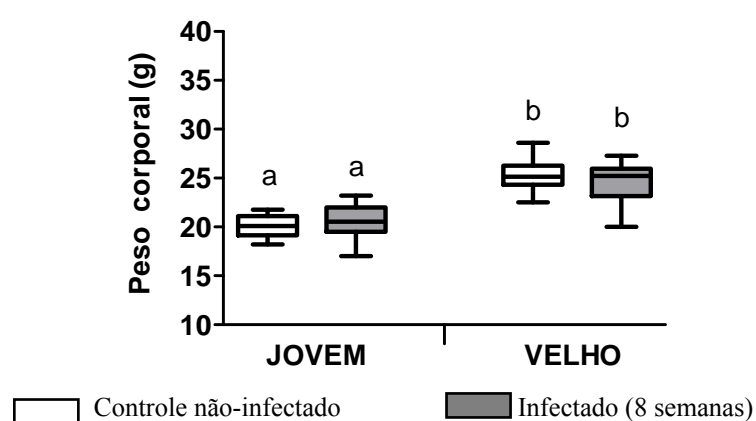
Dados representam a média \pm EP do número total de ovos/órgão.

Figura 8. Avaliação do peso corporal dos animais 8 semanas após a primoinfecção com 50 cercárias de *S. mansoni*. O peso dos animais infectados foi comparado com os respectivos controles não-infectados. Gráficos mostram a mediana (barra horizontal), distância interquartilica (caixa), valor máximo e mínimo (barras verticais) do peso corporal dos camundongos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $n=8$.

2. Resposta imune humoral à infecção

Os relatos da literatura sobre o declínio da função de células B em idosos (Weng, 2006) e sobre a relação entre idade, intensidade de infecção e as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* (Dunne et al., 1988), estimularam a investigação da resposta imune humoral no nosso modelo de reinfecção.

A medida de imunoglobulinas por ELISA demonstra que camundongos velhos normais possuem maior título de IgE sérica total e que, ao contrário do jovens, a infecção não desencadeia aumento nos níveis deste isotipo (Figura 9).

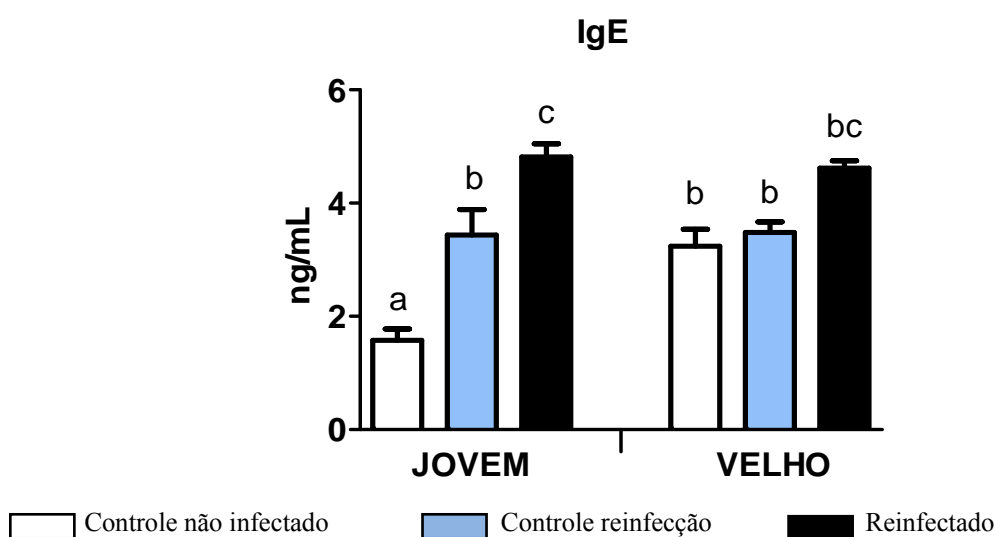


Figura 9 Níveis de IgE total em camundongos jovens e velhos. Imunoglobulinas IgE foram dosados, por ELISA, no soro de camundongos jovens e velhos controles e infectados pelo *S. mansoni*. As barras representam a média \pm erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, (n = 4 a 7).

Avaliando os anticorpos específicos para antígenos do parasito (SEA e SWAP), vimos que jovens e velhos produzem níveis maiores comparados aos respectivos controles da reinfecção. Entretanto, quando comparados velhos e jovens, verificamos que os primeiros possuem títulos mais baixos de anti-SEA e anti-SWAP do que os jovens após a reinfecção (Figura 10).

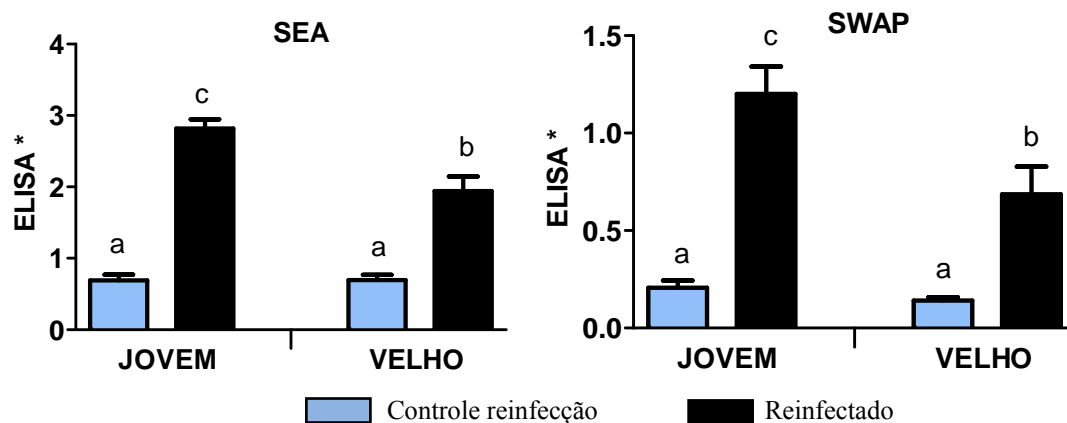
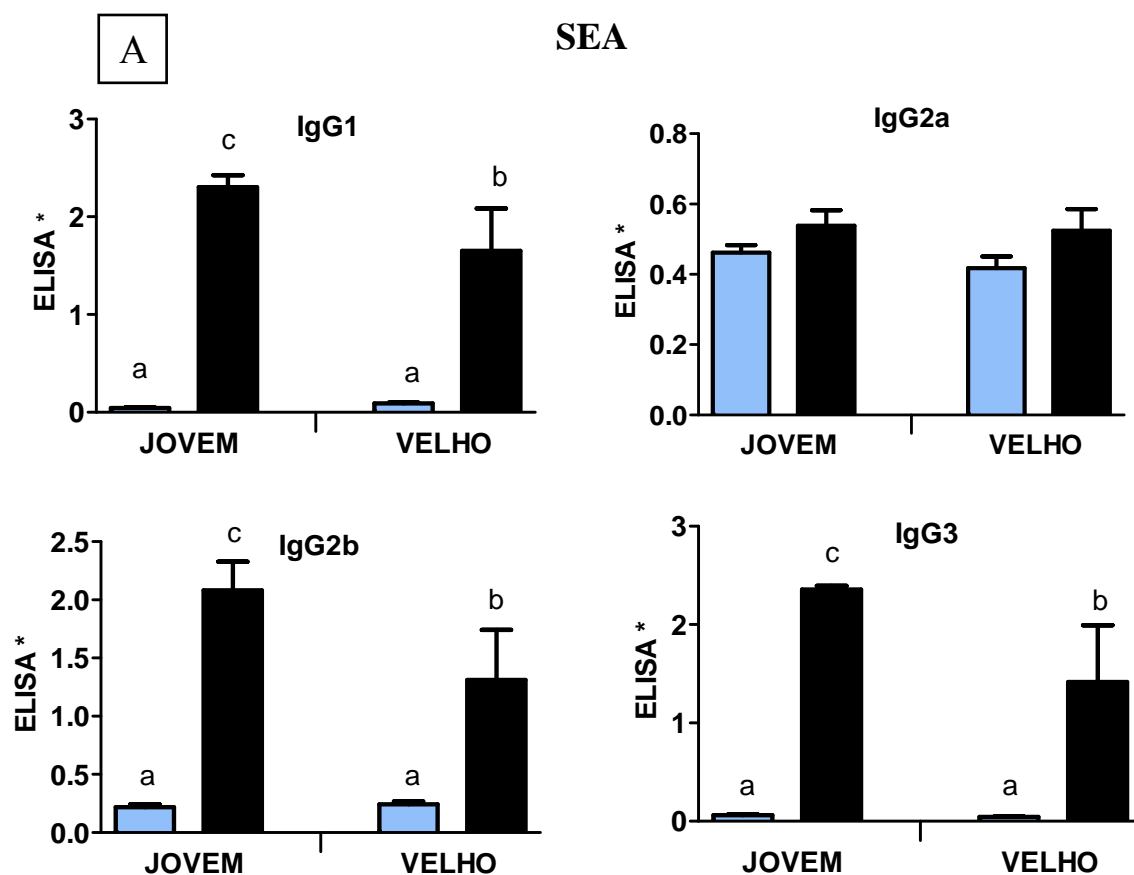


Figura 10 Produção de anticorpos específicos para antígenos do parasito. Anticorpos específicos para SEA (A) e SWAP (B) foram dosados, por ELISA, no soro de camundongos jovens e velhos infectados. As barras representam a média \pm erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, (n=4 a7).

Esse resultado e a existência de evidências de que a composição de isotipos de anticorpos anti-*Schistosoma* pode desempenhar uma influência marcante na expressão da imunidade protetora ou na patologia (Dunne et al., 1993) nos induziu a verificar as subclasses de IgG envolvidas na resposta à reinfeção.



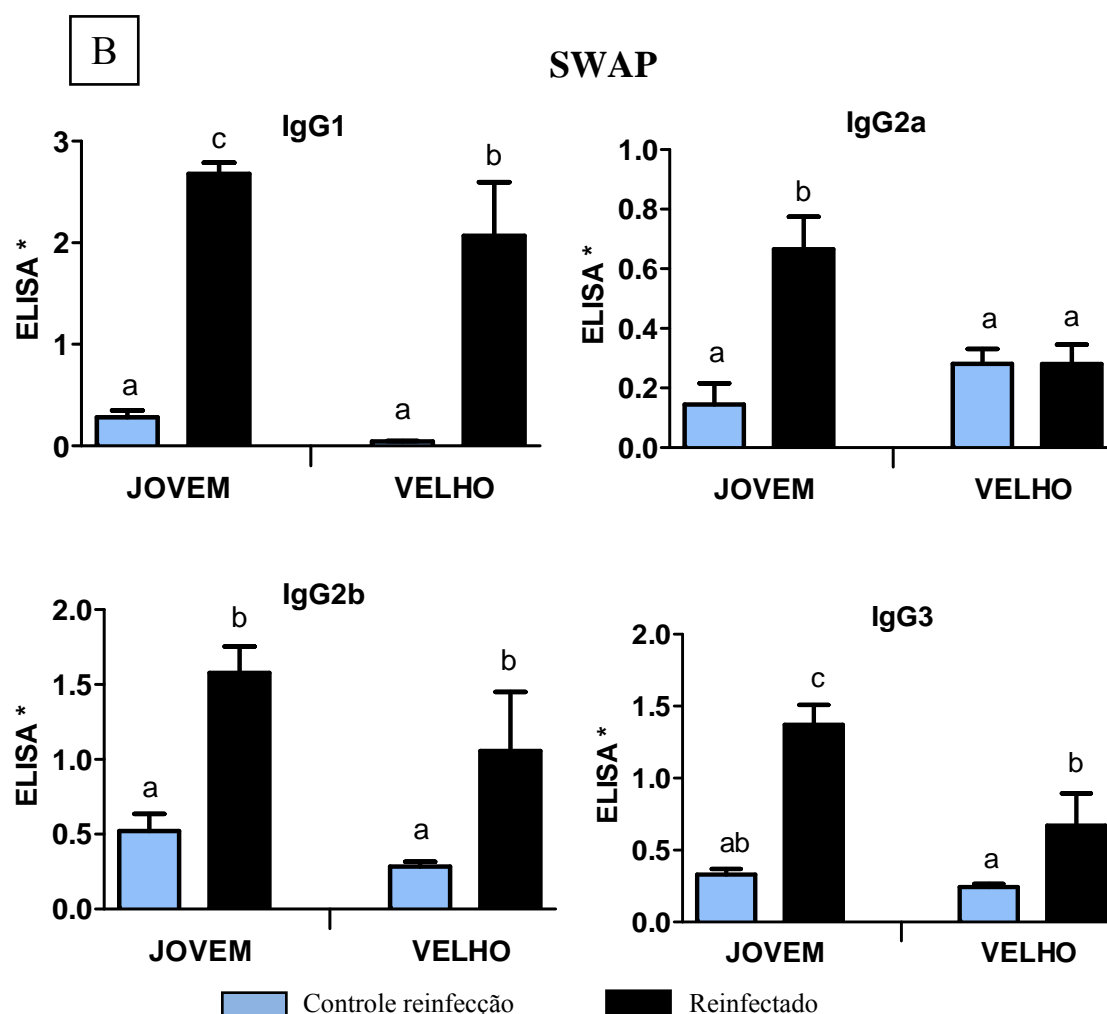


Figura 11 Níveis de isotipos de igG anti-SEA e anti-SWAP em camundongos jovens e velhos infectados com *S. mansoni*. Isotipos dos anticorpos IgG específicos para SEA (A) e SWAP (B) foram dosados, por ELISA, no soro de camundongos jovens e velhos infectados pelo *S. mansoni*. As barras representam a média \pm erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, ($n = 4$ a 7).

Com relação aos anticorpos anti-SEA, com exceção do isotipo IgG2a, jovens e velhos reinfecados produzem níveis maiores comparados aos respectivos controles da reinfecção. Porém, tanto IgG1 quanto IgG2b e IgG3 são mais abundantes nos jovens reinfecados que nos velhos reinfecados (*Figura 11a*).

Para os antígenos do verme adulto (SWAP), o mesmo resultado pode ser observado na *Figura 11b*, com exceção da maior produção também de IgG2a, mas apenas nos jovens reinfecados, comparados aos respectivos controles.

3. Resposta imune celular à infecção

A imunosenescência é caracterizada por uma alteração no perfil das células T periféricas e pelo padrão alterado de ativação e de produção de citocinas, principalmente frente a estímulos, como imunizações e infecções.

Avaliamos a frequência de alguns tipos celulares que estão alterados na imunosenescência e que poderiam estar envolvidos na ativação frente à infecção pelo *S. mansoni*.

As figuras 12-15 evidenciam que o padrão de reatividade à infecção é diferente entre jovens e velhos. Pela análise da figura 12, vimos que há redução na frequência de células T CD4⁺, mas não de CD8⁺, no baço de camundongos jovens e velhos infectados. A população de células B1 no baço, que é caracterizada pela expressão de CD5, não sofreu alteração entre os grupos. Já a frequência de linfócitos B2 mostrou-se aumentada nos velhos reinfetados quando comparados ao controle não-infectado.

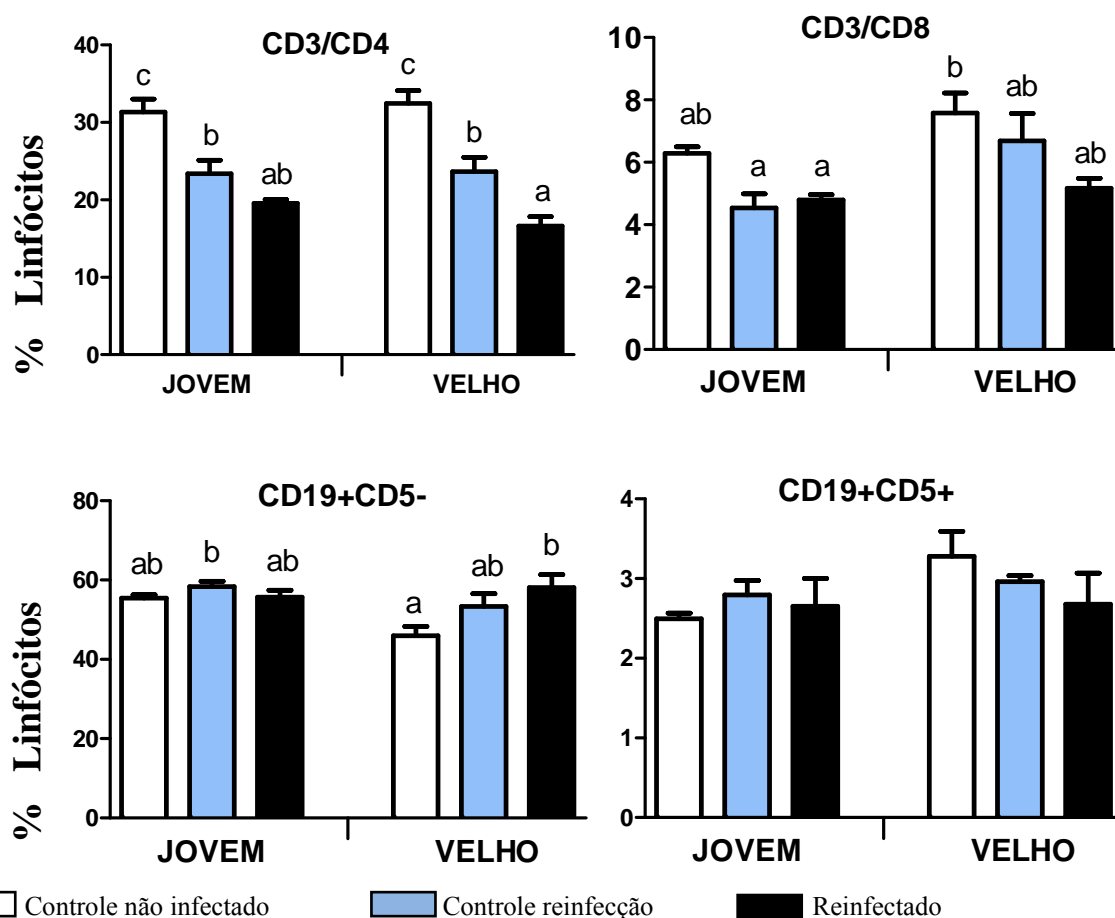


Figura 12. Frequência de linfócitos T e B em camundongos jovens e velhos infectados com *S. mansoni*. Esplenócitos foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação ao número total de linfócitos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, ($n = 4$ a 7).

A *figura 13* mostra que animais velhos normais apresentam menor porcentagem de células virgens, caracterizadas pela expressão da molécula de adesão CD62L, que jovens normais. A reinfecção leva a uma diminuição na frequência dessas células em ambos os grupos. A frequência de tais células é também menor nos velhos reinfecados que nos jovens reinfecados. Quando avaliamos as células com perfil de ativação e memória, vemos um padrão que se repete para linfócitos CD4 CD62L⁻; CD44⁺ e CD69⁺. Os velhos normais já apresentam aumento na frequência de células expressando essas moléculas, quando comparado aos jovens normais, mas a reinfecção não aumenta a frequência destas células, como ocorre nos camundongos jovens.

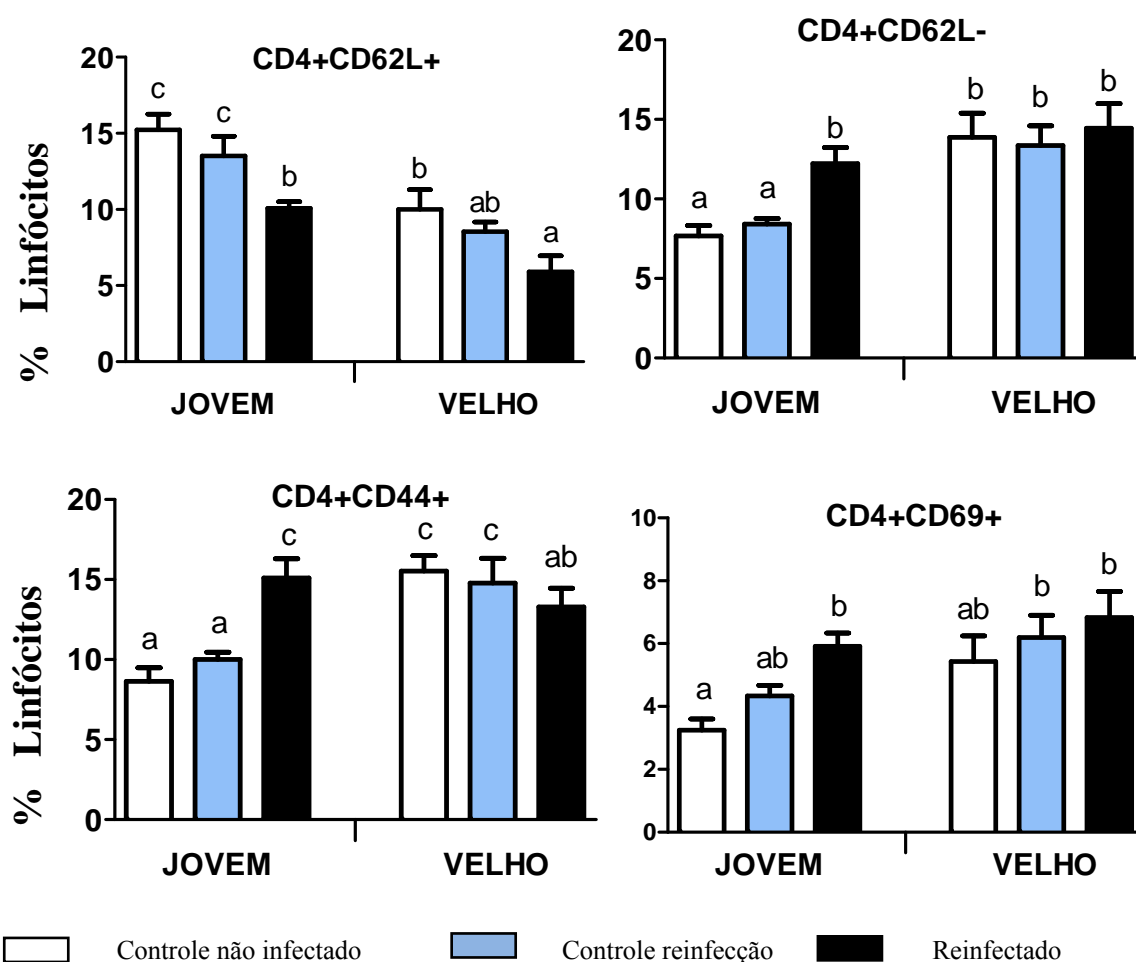


Figura 13. Frequência de linfócitos T virgens e ativados em camundongos jovens e velhos infectados com *S. mansoni*. Esplenócitos foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação ao número total de linfócitos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, ($n = 4$ a 7).

Recentemente, surgiu um grande interesse pelo estudo do papel das células reguladoras em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo infecções por parasitos (*Wohlfert e Belkaid, 2008*). Comin e colaboradores identificaram que uma frequência aumentada nas Tregs (células T $CD4^+CD25^+foxP3^+$ e $CD4^+LAP^+$) está associada à maior suscetibilidade à esquistossomose em indivíduos idosos de áreas endêmica (*Comin et al., 2008*). No nosso estudo, nota-se uma diminuição de Tregs no baço de animais jovens infectados, mas em velhos infectados a frequência permanece inalterada com a infecção (*Figura 14*).

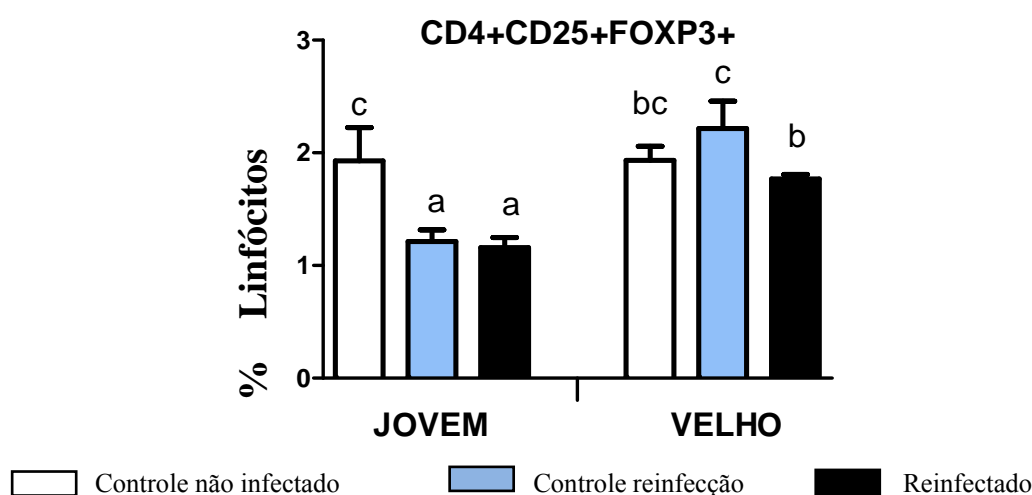


Figura 14. Frequência de linfócitos T reguladores no baço de camundongos jovens e velhos infectados com *S. mansoni*. Esplenócitos foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de moléculas por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm erro padrão da frequência de células em relação ao número total de linfócitos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, ($n = 4$ a 7).

As células NK e NKT, que podem ser identificadas pela expressão de CD49, tem sido consideradas como populações que tem sua atividade conservada durante a senescência. Além disso, existem relatos na literatura de um possível papel dessas populações no curso da infecção pelo *S. mansoni* (*Mallevaey et al., 2007*). Diante disso, resolvemos avaliar a frequência dessas células no nosso modelo experimental de reinfeção.

A proporção de células NKT ($CD3^+CD49^+$) não variou entre os grupos, porém verificamos uma maior frequência de células NK ($CD3^-CD49^+$) no baço de velhos normais, quando comparados aos velhos reinfestados e aos grupos de jovens (*Figura 15*).

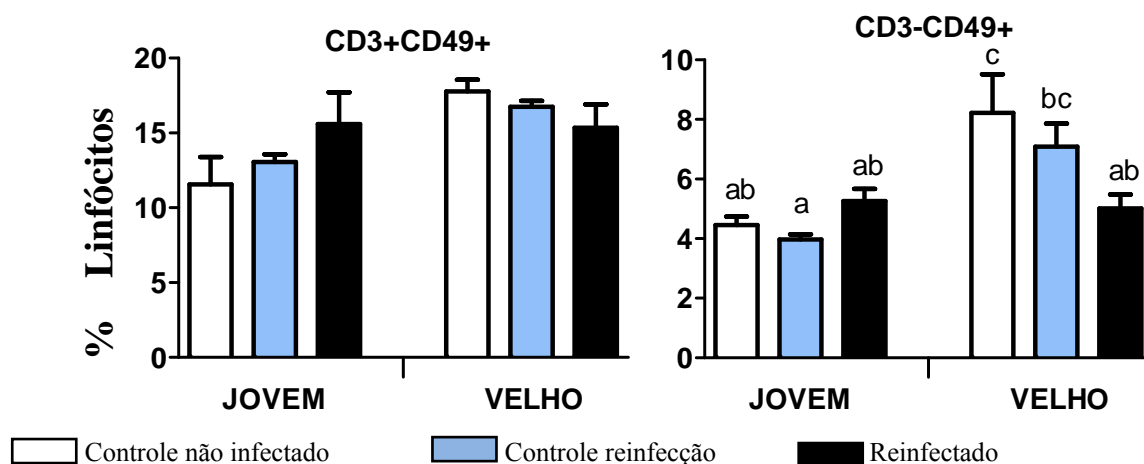


Figura 15. Frequência de células NK e NKT no baço de camundongos jovens e velhos controles e infectados com *S. mansoni*. Esplenócitos foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD3 e CD49 na superfície celular por citometria de fluxo. Barras representam a média \pm erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação ao número total de linfócitos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre grupos ($n=4a7$).

4. Produção de citocinas

As citocinas são componentes cruciais da resposta imune na esquistossomose. O balanço destes mediadores muitas vezes é fundamental na determinação do estabelecimento da imunidade protetora ou suscetibilidade e no controle ou exacerbação da patologia durante a infecção. Por esse motivo, foram medidos os níveis das principais citocinas envolvidas nesse processo, que são a IL-4, a IL-5, o IFN- γ e a IL-10.

Primeiramente, avaliamos o perfil de produção de citocinas após estímulo *in vitro* de esplenócitos com o antígeno SWAP. Não foi detectada diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura celular. Os velhos reinfectados apresentaram menor concentração de IL-4, enquanto que os jovens reinfectados produziram níveis mais altos de IL-5 que o grupo jovem controle. A produção de IFN- γ foi maior nos grupos controle-reinfecção, quando comparados com os reinfectados, tendo os jovens níveis mais altos que os velhos (*Figura 16*).

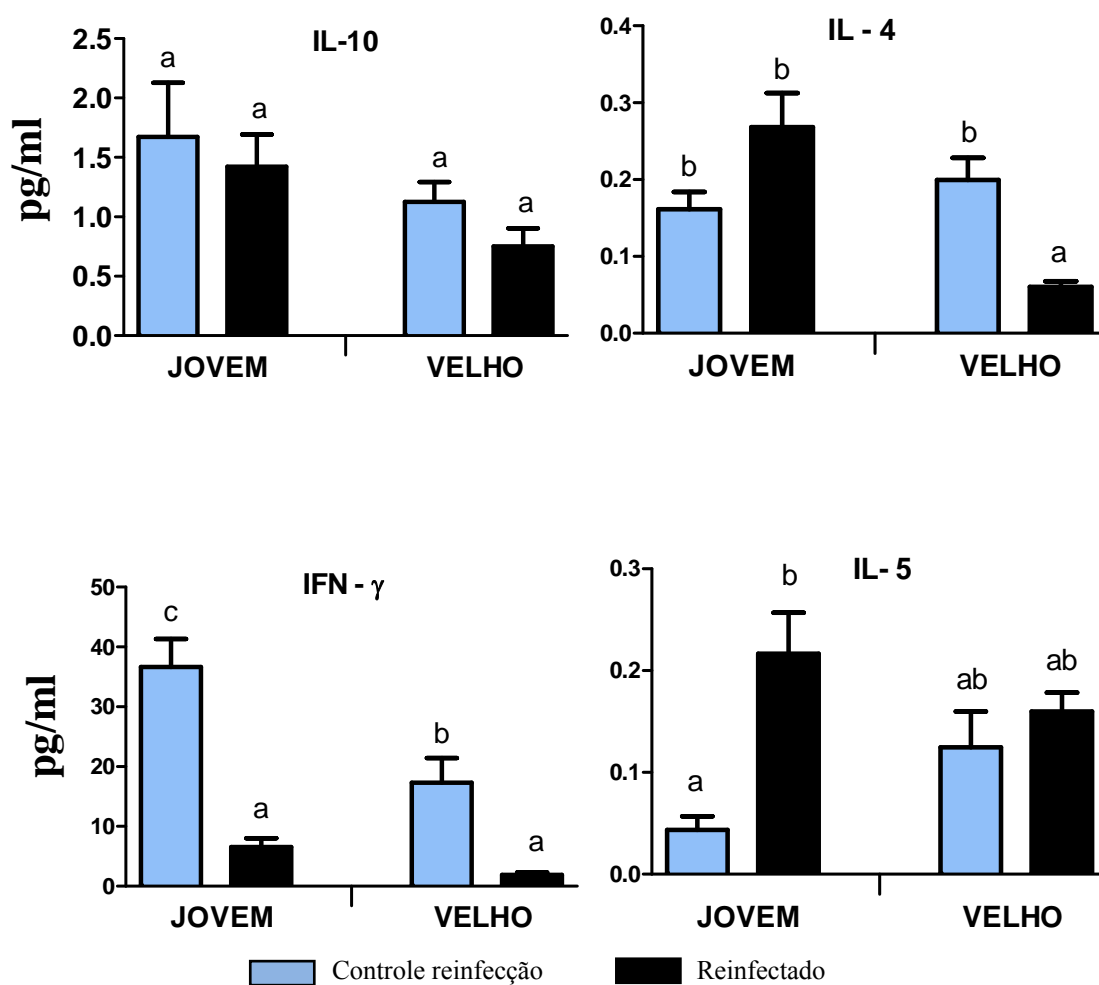


Figura 16. Perfil de produção de citocinas após estímulo in vitro de esplenócitos com SWAP. As células esplênicas foram incubadas por 72h com estímulo de SWAP e, do sobrenadante dessa cultura, foram medidos os níveis de citocinas por ELISA. As barras representam a média da concentração \pm erro padrão de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, ($n = 4$ a 7).

5. Atividade eosinofílica

A literatura destaca uma estreita associação entre atividade eosinofílica e a resposta a infecções helmínticas. Diversos estudos já demonstraram o papel dessa célula em mecanismos de morte do *S. mansoni*.

A peroxidase eosinofílica (EPO) é uma enzima com atividade citotóxica e que pode indicar indiretamente a atividade dessas células em tecidos. Com o intuito de associar a participação de eosinófilos no processo inflamatório hepático e na resistência à reinfecção, a EPO foi medida em extratos do fígado de camundongos jovens e velhos normais e infectados.

Os níveis de EPO aumentaram nos grupos reinfectados, sem diferença entre as idades. No entanto, em camundongos recentemente infectados (controle-reinfecção), a atividade eosinofílica no fígado já se apresentava aumentada nos animais jovens, mas não nos velhos. (Figura 17)

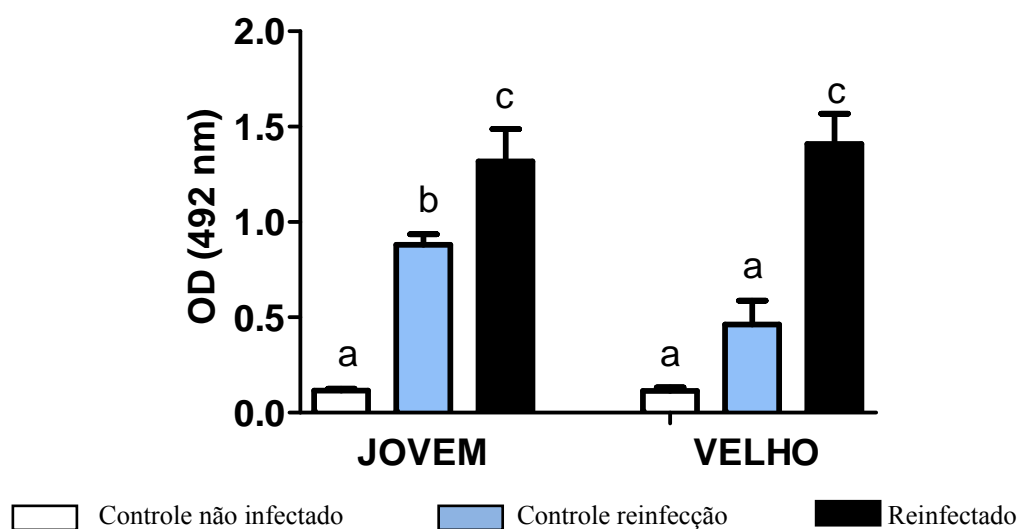


Figura 17 Quantificação indireta de eosinófilos pela peroxidase eosinofílica (EPO). A atividade de EPO foi quantificada no fígado de camundongos jovens e velhos controles e infectados com *S. mansoni*. Barras representam a média \pm erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre grupos ($n = 4$ a 7).

DISCUSSÃO

Durante o envelhecimento, o sistema imune torna-se menos eficiente em proteger o organismo de infecções patogênicas devido a complexas mudanças coletivamente denominadas imunosenescência. Essa condição, em algumas situações, contribui para a morbidade e a mortalidade associadas a infecções. A senescência se acompanha de um aumento na incidência ou na reativação de doenças infecciosas assim como na suscetibilidade a doenças auto-imunes e câncer (*Pawelec et al., 2002*).

Vários trabalhos relatam modificações no desenvolvimento de doenças parasitárias ao longo do processo de envelhecimento no que diz respeito a sua gravidade e intensidade (*Haswell-Elkins et al., 1991; Ndhlovu et al., 1996; Kightlinger et al., 1998*).

A diminuição da prevalência e intensidade de infecção com o avançar da idade em áreas endêmicas para esquistossomose sugere a existência de mecanismos de aquisição de imunidade devido ao estímulo antigênico crônico. Contudo, vários aspectos dessa relação são questionados na literatura, podendo-se destacar possíveis diferenças na frequência de contato com a água (*Warren, 1973*), e até mesmo diferenças nas taxas de penetração das cercárias devido a modificações da densidade dérmica (*Lewert e Mandlowitz, 1963*).

Neste trabalho, procuramos esclarecer se a senescência altera a suscetibilidade à infecção e reinfecção por *Schistosoma mansoni*. Os resultados aqui apresentados eliminam a hipótese de que as alterações na constituição da pele dos animais velhos influenciam na infectividade das cercárias, pois a suscetibilidade de camundongos jovens e idosos à primoinfecção, determinada pela média de esquistossômulos que alcançaram o fígado após a infecção percutânea, não foi diferente em jovens e velhos.

A literatura disponibiliza uma vasta coleção de estudos que buscam esclarecer o fenômeno da imunidade concomitante na esquistossomose. Diversos achados experimentais mostram que a presença de vermes adultos induz uma resposta imunoprotetora contra as formas imaturas do verme. Neste contexto, é importante considerar a migração e o desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo.

No camundongo, a penetração das cercárias se dá em 20 minutos, no máximo, e os esquistossômulos permanecem na pele por quatro a cinco dias. No sexto dia após a infecção, a maior parte dos esquistossômulos já se encontra nos pulmões, tendo migrado pela circulação sanguínea. Em torno do 20º dia, quase todos os vermes remanescentes já se encontram nos vasos intra-hepáticos e nesse local ocorrerá a cópula e maturação em adultos. Um mês após a penetração das cercárias, os vermes acasalados já aparecem nos vasos mesentéricos e pouco

tempo depois já se detectam ovos nas fezes do hospedeiro (*Carvalho, 2008*). Durante essa longa jornada até seu habitat final, os parasitos encontram barreiras físicas e a imunidade protetora do hospedeiro, o que ocasiona a morte de muitos dos vermes que haviam penetrado em seu organismo. Os fenômenos envolvidos nesse mecanismo de proteção anti-infecciosa até hoje não são totalmente esclarecidos e são coletivamente chamados de “fases de atrito”. A eliminação dos vermes e o sítio onde ocorre depende da exposição prévia do hospedeiro ao parasito, podendo então se manifestar a imunidade adquirida à reinfecção.

A linhagem do hospedeiro e do parasito, o intervalo entre a primeira e a segunda exposição e a carga parasitária da infecção inicial são variáveis que influenciam o desenvolvimento da imunidade à reinfecção em camundongos (*Dean, 1983*).

O C57BL/6 é uma linhagem que requer uma carga parasitária maior para se tornar parcialmente resistente à novas infecções (*Colley e Freeman, 1980*). Por isso, neste estudo, a carga parasitária decorrente da infecção com 20 cercárias (cerca de 4 vermes) não foi capaz de desencadear mecanismos de imunidade protetora nos animais. Já a infecção com 50 cercárias, que levou a uma carga média de 15 vermes, induziu a redução no estabelecimento de novos vermes tanto em animais jovens quanto em velhos.

Uma corrente na literatura defende que essa aparente imunidade observada em animais previamente expostos se deve a desvios vasculares na circulação porta-hepática, causados por alterações patológicas da própria infecção. Segundo essa hipótese, vermes imaturos de uma segunda infecção teriam dificuldade em localizar os vasos da circulação porta-hepática e acabariam sendo levados pelo fluxo sanguíneo, através de varizes, até locais inapropriados para seu desenvolvimento. Esta seria, portanto, uma “resistência anatômica” não relacionada à imunidade (*Wilson et al., 1983*).

Todavia, o fato de que a transferência de soro de animais infectados, a injeção intravenosa de ovos do parasito, e até mesmo a transferência de casais de vermes adultos diretamente para as veias mesentéricas leva a certa resistência à reinfecção reforçam a hipótese de que ocorre a participação de mecanismos da imunidade na geração de resistência. Além disso, Gerken e Mota-Santos demonstraram que a pele é também um sítio de eliminação de esquistossômulos por meio da degranulação de mastócitos em animais reinfectedos, o que não se relaciona às citadas alterações vasculares hepáticas (*Gerken e Da Mota-Santos, 1987*).

Como em nossos experimentos a senescência não modificou a capacidade de eliminação de esquistossômulos numa segunda exposição, alguns mecanismos possivelmente envolvidos na imunidade concomitante, como a ativação de mastócitos, eosinófilos e

neutrófilos, que podem atuar nos diferentes “sítios de atrito” ao parasito, devem estar preservados em camundongos velhos.

Recentemente, as causas e implicações da imunidade concomitante passaram a ser examinadas sob uma perspectiva evolutiva (*Brown e Grenfell, 2001*), segundo a qual uma possível vantagem para os vermes adultos (e, presumivelmente, para as cercárias que se tornarão adultas) seria a manipulação da resposta imunológica de seus hospedeiros, prevenindo as futuras infecções por outras cercárias e assim previndo a competição pela cópula ou por microambientes preferenciais no hospedeiro. Entretanto, essa visão é excessivamente determinista do ponto de vista biológico além de tratar o sistema imune como mero coadjuvante da interação parasito-hospedeiro.

Estudos utilizando camundongos velhos demonstraram que há mudanças significativas na seleção do repertório, maturação de afinidade e atividade de imunoglobulinas na senescência (*Song et al., 1997*). A diminuição de progenitores de linfócitos B na medula e concomitante acúmulo de células de memória levam ao comprometimento da diversidade clonal, podendo resultar em deficiência na qualidade da resposta humoral (*Weng, 2006*).

A resposta imune humoral à infecção pelo *Schistosoma* sofre modificações na senescência. Assim como em estudos anteriores do nosso grupo (*Foschetti, 2007*), detectamos níveis mais altos de IgE em animais velhos normais quando comparados com os jovens. De forma interessante, os níveis de IgE não se alteram após a infecção nos velhos, diferentemente do que ocorre nos jovens infectados, em que possivelmente a produção de IgE específica para antígenos do verme seja responsável pela elevação dos níveis dessa imunoglobulina.

A resposta de anticorpos específicos para SEA e SWAP é menor em animais velhos reinfetados do que em jovens reinfetados, o que pode estar relacionado com relatos de Eaton e colaboradores mostrando que, em camundongos velhos, ocorre redução na atividade auxiliar de linfócitos T CD4 pela queda de expressão de CD40L, molécula envolvida na interação de células T e B e relacionada à ativação e indução da troca de isotipo (*Eaton et al., 2004*).

Em humanos, tem sido proposto que um balanço entre IgE e IgG4 define o grau de resistência frente à infecção. Esses isotipos possuem efeitos antagônicos, uma vez que IgG4 compete como um anticorpo bloqueador para a função protetora mediada por IgE (*Jiz et al., 2009*). Acredita-se que anticorpos IgE estão diretamente envolvidos na morte de

esquistossômulos, *in vitro*, em associação com populações de células efectoras, tais como macrófagos, eosinófilos e plaquetas (Capron *et al.*, 1977; Joseph *et al.*, 1983).

Entretanto, em camundongos, essa relação entre o papel de cada isotipo na proteção anti-helmíntica não é tão clara. Nossos resultados não permitem sugerir o papel de cada isotipo na resposta à reinfecção, pois com exceção de IgG2a, há um grande aumento na produção de todos IgGs nos animais reinfectedos. Porém, os velhos reinfectedos, mais uma vez, produziram níveis mais baixos de anticorpos específicos quando comparados com os jovens reinfectedos. A menor produção de anticorpos parasito-específicos aqui observadas corrobora os dados de Speziali e colaboradores que mostram que apesar dos níveis totais de imunoglobulinas séricas no soro e a frequência de células produtoras de anticorpos no baço e na medula estarem aumentados em camundongos velhos, a produção de anticorpos específicos após desafio com um antígeno solúvel está reduzida quando comparada aos animais jovens (Speziali *et al.*, 2009). Portanto, a menor frequência de células virgens e o acúmulo de linfócitos T ativados podem representar uma barreira para novas interações e desenvolvimento de resposta imune a novos antígenos.

O baço é o maior órgão linfóide interposto entre a circulação sistêmica e a portal, apresenta-se como um importante sítio de resposta aos antígenos circulantes, sendo um órgão onde ocorre a proliferação de linfócitos e a maturação de monócitos (Tischendorf, 1985). Juntamente com o fígado, o baço é um dos órgãos diretamente afetados pela esquistossomose. Avaliamos, nesse órgão, as frequências de diferentes populações linfocitárias e o perfil de reatividade dessas células.

Mecanismos imunológicos de remodelagem durante o processo de imuno-senescência podem contribuir para a resistência à infecção em indivíduos idosos. Dados recentes do nosso grupo mostram, por exemplo, que a redução na frequência e atividade de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD4⁺LAP⁺) e o aumento na frequência e atividade de células da imunidade inata, como as células NK CD56low, estão associados à ausência de infecção por *S. mansoni* em idosos de área endêmica (Comin *et al.*, 2008). Os resultados aqui apresentados mostram que a frequência de células Treg nos camundongos jovens infectados está diminuída, enquanto que, nos velhos normais, há uma maior porcentagem de células NK (CD3⁻CD49⁺). Esses perfis distintos de reatividade reforçam a hipótese da imunosenescência como um processo de remodelagem funcional e não um mero declínio funcional do sistema imune.

Tem sido descrito que células NK estão envolvidas na maturação dos linfócitos B, na secreção de imunoglobulinas e na mudança de isotipo independente de linfócitos T (*Blanca et al., 2001*). Segundo Colonna-Romano e colaboradores, há um aumento na produção de imunoglobulinas e de células NK durante a senescência, sugerindo a participação dessas células na regulação da produção de anticorpos em idosos (*Colonna-Romano et al., 2003*). No nosso modelo, os altos níveis de IgE observados nos velhos normais podem ter sido estimulados pelo aumento da secreção de IL-4 por células NK presentes no baço. A sinalização via IL-4 é um dos fatores responsáveis pela mudança de classe para IgE nos linfócitos B (*Jeannin et al., 1998*).

A respeito das células T, os resultados confirmam dados da literatura que descrevem diminuição na frequência de células virgens e aumento de linfócitos T ativadas e de memória em velhos normais. Camundongos jovens reinfetados apresentaram um típico aumento na frequência de células T ativadas enquanto os animais velhos, que já possuíam uma maior proporção de linfócitos ativados não alteraram a frequência dessas células após a reinfecção.

Esses resultados estão intimamente associados a um recente trabalho do nosso grupo onde demonstramos que animais jovens e velhos infectados possuem número equivalente de granulomas hepáticos e carga parasitária similar. Entretanto, granulomas de camundongos jovens são maiores na fase aguda e sofrem redução no seu volume durante a fase crônica. Por outro lado, os granulomas de animais velhos são menores que os de jovens na fase aguda e não modificam de tamanho com a passagem para fase crônica. Além disto, esse trabalho também mostra que os linfócitos T e B ativados são predominantes no fígado de animais velhos e esse padrão não se altera com a infecção. A produção de citocinas IL-10, IFN-g e IL-4 tão se mostra mais elevada nos camundongos velhos não infectados e a infecção não altera esse padrão. Assim, nos camundongos jovens, observamos a formação da reação granulomatosa na fase aguda com aumento de linfócitos T ativados e produção de citocinas inflamatórias no fígado seguida de imuno-modulação tanto das células, dos mediadores inflamatórios e do próprio granuloma na fase crônica. Os camundongos velhos, ao contrário, desenvolvem uma reduzida resposta inflamatória aos ovos de *S. mansoni* na fase aguda e mantem essa menor resposta ao longo da fase crônica. (*Speziali E, 2010*).

Devido ao fato dos linfócitos de camundongos velhos estarem constitutivamente ativados, é provável que respostas inflamatórias a novos antígenos sejam inibidas por encontrarem o sistema imune altamente populado por células efetoras.

No estágio inicial da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, observa-se uma reatividade caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ . Com a evolução para a fase crônica, ocorre uma alteração importante no padrão de resposta imune para um perfil do tipo 2 com predomínio de citocinas como IL-4 e IL-5. Quando avaliamos o perfil de síntese de citocinas por esplenócitos de camundongos jovens estimulados por SWAP, percebemos essa típica polarização de resposta já bem descrita na literatura. Na fase inicial da infecção (grupo controle-reinfecção) há uma alta produção de IFN- γ enquanto o nível de IL-5 está baixo. Porém, com o progresso da infecção (grupo reinfestado) o padrão se inverte, e a IL-5 se eleva. Contudo, os animais velhos não seguem esse padrão de evolução da resposta imune inflamatória. Na fase inicial da infecção, os velhos produzem menos IFN- γ quando comparado ao grupo jovem correspondente, e mais IL-4 do que na fase mais tardia da infecção. Esse diferente padrão de produção de citocinas pode também estar associado com a ausência do processo de imunomodulação que relatamos nos velhos (*Speziali E. , 2010*).

Na esquistossomose o papel da IL-4 já foi bastante explorado. Trabalhos mostram que o tratamento com anti-IL-4 leva a uma diminuição da fibrose hepática apesar de pouca interferência no tamanho dos granulomas nesse órgão (*Cheever et al., 1994; Eltoun et al., 1995*). Entretanto, a adição exógena dessa citocina leva a um aumento do tamanho dos granulomas hepáticos (*Yamashita e Boros, 1992*). Portanto, os níveis reduzidos de IL-4 podem também ser responsáveis pelo tamanho moderado do granuloma nos animais velhos.

Outro componente inflamatório importante do granuloma esquistossomótico e da resposta sistêmica à infecção por *S. mansoni* são os eosinófilos. Essas células podem representar 40-50% da composição do infiltrado inflamatório que compõe o granuloma esquistossomótico. Assim, torna-se importante avaliar o papel dessa população celular na formação do granuloma no jovem e no velho. A quantificação da peroxidase eosinofílica no fígado (parâmetro indireto de avaliação da presença de eosinófilos no órgão) não revelou diferenças na participação de eosinófilos na atividade inflamatória durante a fase mais avançada de infecção (grupo reinfestado). Entretanto, na fase inicial da infecção (grupo controle-reinfecção) os jovens tiveram maior atividade desta enzima, sugerindo que a chegada dos vermes aos vasos hepáticos pode causar maior inflamação nesses animais.

Confirmando os dados anteriormente encontrados na análise da resposta inflamatória de camundongos C57Bl/6 infectados com *S. mansoni*, mostramos, nesse estudo, que camundongos C57BL/6 infectados pelo mesmo parasito apresentam dinâmica de formação de granulomas e de resposta imune sistêmica alterada.

A resposta inflamatória reduzida em camundongos velhos pode estar associada ao estado de ativação crônico do sistema imune dos animais velhos que os torna refratários à estimulação por novos antígenos e, no caso da infecção por *S. mansoni*, diminui a polarização de citocinas durante a fase aguda e crônica de infecção. Diante de um quadro em que a resposta imune é a principal responsável pela patogênese, um estado de maior “tolerância” à infecção pode representar uma vantagem adaptativa.

A menor reatividade apresentada pelos velhos poderia ser responsável pela perda de imunidade protetora, porém nossos dados mostram que esses animais são capazes de desenvolver a imunidade concomitante. Mecanismos da imunidade inata, que não foram aqui avaliados e mostram-se preservados durante a senescência, podem estar envolvidos na morte dos esquistossômulos em animais imunes.

Pretendemos, posteriormente, esclarecer quais os elementos celulares e estruturais responsáveis pela redução na resposta granulomatosa gerada pelos ovos do parasito no fígado de animais velhos e também identificar se a senescência altera os sítios e fatores envolvidos na eliminação de vermes em uma reinfecção pelo *Schistosoma mansoni*.

CONCLUSÃO

- Nossos dados sugerem que o envelhecimento está associado a uma resposta inflamatória diminuída aos antígenos do parasito em camundongos C57BL/6, resultando em títulos mais baixos de anticorpos específicos.
- Apesar de apresentarem resposta imune humoral específica diminuída, os animais velhos são igualmente susceptíveis à infecção por *S. mansoni* e também são capazes de gerar uma resposta imune protetora frente a uma reinfeção.
- Na linhagem C57BL/6, o envelhecimento é caracterizado por um aumento nos níveis basais de IgE, porém com reatividade a novos antígenos reduzida.
- Camundongos velhos apresentam linfócitos constitutivamente ativados e a infecção pelo *S. mansoni* altera mais sutilmente a atividade do seu sistema imune.
- Possivelmente, a menor polarização de citocinas durante a fase aguda e crônica de infecção em camundongos velhos contribui para a alteração da dinâmica de formação/involução de granulomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A. Warren Ks: *Mild Prolonged Schistosomiasis in Mice: Alterations in Host Response with Time and the Development of Portal Fibrosis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.58, Jan, p.53-7. 1964.

ARAUJO, M. I., A. R. DE JESUS, *et al.* *Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis*. **Eur J Immunol**, v.26, n.6, Jun, p.1399-403. 1996.

ARRANZ, E., S. O'MAHONY, *et al.* *Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts*. **Gut**, v.33, n.7, Jul, p.882-6. 1992.

BARRAT, F., H. HAEGEL, *et al.* *Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL/6 mice during aging*. **Res Immunol**, v.146, n.1, Jan, p.23-34. 1995.

BASSILY, S., Z. FARID, *et al.* *Low-dose niridazole in the treatment of Schistosoma mansoni*. **Ann Trop Med Parasitol**, v.73, n.3, Jun, p.295-6. 1979.

BAUER, M. E. *Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system*. **Stress**, v.8, n.1, Mar, p.69-83. 2005.

BERZINS, S. P., A. P. ULDRICH, *et al.* *Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks*. **Trends Mol Med**, v.8, n.10, Oct, p.469-76. 2002.

BINA. *A evolução natural da esquistossomose em uma área endêmica. Aspectos peculiares da infecção por Schistosoma mansoni*. Salvador: Centro editorial e didático da Universidade Federal da Bahia 1984.

BLANCA, I. R., E. W. BERE, *et al.* *Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells*. **J Immunol**, v.167, n.11, Dec 1, p.6132-9. 2001.

BOGLIOLO, L. [*Anatomical bases of hepatosplenic schistosomiasis mansoni (the hepatosplenic form of schistosomiasis) & their clinical applications.*]. **Resen Clin Cient**, v.27, n.3-4, Mar-Apr, p.86-93. 1958.

BROWN, S. P. e B. T. GRENFELL. *An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defence.* **Proc Biol Sci**, v.268, n.1485, Dec 22, p.2543-9. 2001.

BUTTERWORTH, A. E., M. CAPRON, *et al.* *Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses.* **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.79, n.3, p.393-408. 1985.

CAPRON, A., M. CAPRON, *et al.* [*In vitro study of immunologic phenomena in human and experimental schistosomiasis. I. Comparative in vitro study of the lethal activity of immune serums on the immature and adult forms of Schistosoma mansoni*]. **Int J Parasitol**, v.4, n.6, Dec, p.613-23. 1974.

CAPRON, A., J. P. DESSAINT, *et al.* *Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules.* **Nature**, v.253, n.5491, Feb 6, p.474-5. 1975.

CAPRON, A., G. RIVEAU, *et al.* *Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update.* **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.90, n.2, Mar-Apr, p.235-40. 1995.

CAPRON, M., D. CAMUS, *et al.* *Immunological studies in human schistosomiasis. II. Antibodies cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomules.* **Am J Trop Med Hyg**, v.26, n.2, Mar, p.248-53. 1977.

CARNEIRO-SANTOS, P., O. MARTINS-FILHO, *et al.* *Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human Schistosomiasis mansoni.* **Parasite Immunol**, v.22, n.6, Jun, p.267-77. 2000.

CARVALHO, O. S. Z., P. M. LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose. Uma visão interdisciplinar.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2008. 1124 p.

CHEEVER, A. W., M. E. WILLIAMS, *et al.* *Anti-IL-4 treatment of Schistosoma mansoni-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis.* **J Immunol**, v.153, n.2, Jul 15, p.753-9. 1994.

CHITSULO, L., D. ENGELS, *et al.* *The global status of schistosomiasis and its control.* **Acta Trop**, v.77, n.1, Oct 23, p.41-51. 2000.

COLLAZIOL, D., C. LUZ, *et al.* *Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing.* **Mech Ageing Dev**, v.125, n.3, Mar, p.219-27. 2004.

COLLEY, D. G., I. S. BARSOUM, *et al.* *Immune responses and immunoregulation in relation to human schistosomiasis in Egypt. III. Immunity and longitudinal studies of in vitro responsiveness after treatment.* **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.80, n.6, p.952-7. 1986.

COLLEY, D. G. e G. L. FREEMAN, JR. *Differences in adult Schistosoma mansoni worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice. I. CBA/J and C57BL/6 mice.* **Am J Trop Med Hyg**, v.29, n.6, Nov, p.1279-85. 1980.

COLONNA-ROMANO, G., M. BULATI, *et al.* *B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression.* **Mech Ageing Dev**, v.124, n.4, Apr, p.389-93. 2003.

COMIN, F., E. SPEZIALI, *et al.* *Ageing and immune response in chronic human schistosomiasis.* **Acta Trop**, v.108, n.2-3, Nov-Dec, p.124-30. 2008.

COMIN, F., E. SPEZIALI, *et al.* *Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis.* **Clin Exp Immunol**, v.149, n.2, Aug, p.274-84. 2007.

CORREA-OLIVEIRA, R., T. A. MOTA-SANTOS, *et al.* *Schistosoma mansoni: in vitro and in vivo killing of antibody-coated schistosomula.* **Am J Trop Med Hyg**, v.31, n.5, Sep, p.991-8. 1982.

CUTRIM, R. N., P. P. CHIEFFI, *et al.* *Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhao, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993.* **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.40, n.3, May-Jun, p.165-71. 1998.

DALTON, P. R. e D. POLE. *Water-contact patterns in relation to Schistosoma haematobium infection*. **Bull World Health Organ**, v.56, n.3, p.417-26. 1978.

DAYNES, R. A., B. A. ARANEO, *et al.* *Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative*. **J Immunol**, v.150, n.12, Jun 15, p.5219-30. 1993.

DEAN, D. A. *Schistosoma and related genera: acquired resistance in mice*. **Exp Parasitol**, v.55, n.1, Feb, p.1-104. 1983.

DESSEIN, A. J., M. BEGLEY, *et al.* *Human resistance to Schistosoma mansoni is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen*. **J Immunol**, v.140, n.8, Apr 15, p.2727-36. 1988.

DOUGHTY, B. L. e S. M. PHILLIPS. *Delayed hypersensitivity granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs in vitro. I. Definition of the model*. **J Immunol**, v.128, n.1, Jan, p.30-6. 1982.

DUNNE, D. W., A. M. GRABOWSKA, *et al.* *Human antibody responses to Schistosoma mansoni: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum*. **Eur J Immunol**, v.18, n.1, Jan, p.123-31. 1988.

DUNNE, D. W., B. A. RICHARDSON, *et al.* *The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of Schistosoma mansoni schistosomula by eosinophils*. **Parasite Immunol**, v.15, n.3, Mar, p.181-5. 1993.

DUSTIN, M. L., R. ROTHLEIN, *et al.* *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. **J Immunol**, v.137, n.1, Jul 1, p.245-54. 1986.

EATON, S. M., E. M. BURNS, *et al.* *Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses*. **J Exp Med**, v.200, n.12, Dec 20, p.1613-22. 2004.

- EHRCHEN, J., A. SINDRILARU, *et al.* Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to *Leishmania major* infection. **Infect Immun**, v.72, n.9, Sep, p.5106-14. 2004.
- ELTOUM, I. A., T. A. WYNN, *et al.* Suppressive effect of interleukin-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared with those around eggs laid in infected mice. **Infect Immun**, v.63, n.7, Jul, p.2532-6. 1995.
- ERNST, D. N., W. O. WEIGLE, *et al.* The age-associated increase in IFN-gamma synthesis by mouse CD8+ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. **J Immunol**, v.151, n.2, Jul 15, p.575-87. 1993.
- FALCAO, P. L., L. C. MALAQUIAS, *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. **Parasite Immunol**, v.20, n.10, Oct, p.447-54. 1998.
- FARIA, A. M., S. M. DE MORAES, *et al.* Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. **Neuroimmunomodulation**, v.15, n.4-6, p.365-79. 2008.
- FIDEL, P. L., JR. e D. L. BOROS. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. IV. Antigen-induced suppressor T cells down-regulate proliferation and IL-2 production. **J Immunol**, v.145, n.4, Aug 15, p.1257-64. 1990.
- FINKELMAN, F. D., J. HOLMES, *et al.* Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v.8, p.303-33. 1990.
- FLORES VILLANUEVA, P. O., H. REISER, *et al.* Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. **J Immunol**, v.153, n.11, Dec 1, p.5190-9. 1994.
- FORSEY, R. J., J. M. THOMPSON, *et al.* Plasma cytokine profiles in elderly humans. **Mech Ageing Dev**, v.124, n.4, Apr, p.487-93. 2003.

FOSCHETTI, D. A. *Afinidades Imunológicas entre o Envelhecimento e o Estresse Crônico*. (Dissertação de Mestrado) Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FRANCESCHI, C., M. BONAFE, *et al.* *Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space*. **Vaccine**, v.18, n.16, Feb 25, p.1717-20. 2000a.

FRANCESCHI, C., M. BONAFE, *et al.* *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence*. **Ann N Y Acad Sci**, v.908, Jun, p.244-54. 2000b.

FRANCESCHI, C., D. MONTI, *et al.* *Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing*. **Nephrol Dial Transplant**, v.11 Suppl 9, p.18-25. 1996.

FRANCESCHI, C., S. VALENSIN, *et al.* *The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives*. **Exp Gerontol**, v.35, n.6-7, Sep, p.879-96. 2000c.

FUJIHASHI, K. e J. R. MCGHEE. *Mucosal immunity and tolerance in the elderly*. **Mech Ageing Dev**, v.125, n.12, Dec, p.889-98. 2004.

FULFORD, A. J., M. WEBSTER, *et al.* *Puberty and Age-related Changes in Susceptibility to Schistosome Infection*. **Parasitol Today**, v.14, n.1, Jan, p.23-6. 1998.

GAZZINELLI, A., J. BETHONY, *et al.* *Exposure to Schistosoma mansoni infection in a rural area of Brazil. I: water contact*. **Trop Med Int Health**, v.6, n.2, Feb, p.126-35. 2001.

GERKEN, S. E. e T. A. DA MOTA-SANTOS. *[Schistosoma mansoni: cutaneous resistance in mice with primary infection]*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.29, n.3, May-Jun, p.148-54. 1987.

GHOSH, J. e R. A. MILLER. *Rapid tyrosine phosphorylation of Grb2 and Shc in T cells exposed to anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD45 stimuli: differential effects of aging*. **Mech Ageing Dev**, v.80, n.3, Jun 9, p.171-87. 1995.

GLOBERSON, A. e R. B. EFFROS. *Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged*. **Immunol Today**, v.21, n.10, Oct, p.515-21. 2000.

GROSSMANN, A., J. A. LEDBETTER, *et al.* *Aging-related deficiency in intracellular calcium response to anti-CD3 or concanavalin A in murine T-cell subsets*. **J Gerontol**, v.45, n.3, May, p.B81-6. 1990.

HARMAN, D. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. **J Gerontol**, v.11, n.3, Jul, p.298-300. 1956.

HASLER, P. e M. ZOUALI. *Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity*. **Cell Immunol**, v.233, n.2, Feb, p.102-8. 2005.

HASWELL-ELKINS, M. R., D. B. ELKINS, *et al.* *Distribution patterns of *Opisthorchis viverrini* within a human community*. **Parasitology**, v.103 Pt 1, Aug, p.97-101. 1991.

HAYFLICK, L. *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. **Exp Cell Res**, v.37, Mar, p.614-36. 1965.

HOBBS, M. V., W. O. WEIGLE, *et al.* *Interleukin-10 production by splenic CD4+ cells and cell subsets from young and old mice*. **Cell Immunol**, v.154, n.1, Apr 1, p.264-72. 1994.

HOBBS, M. V., W. O. WEIGLE, *et al.* *Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice*. **J Immunol**, v.150, n.8 Pt 1, Apr 15, p.3602-14. 1993.

IBGE. *Projeção da População do Brasil por sexo e idade 1980-2050*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: 93 p. 2008.

JEANNIN, P., S. LECOANET, *et al.* *IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10*. **J Immunol**, v.160, n.7, Apr 1, p.3555-61. 1998.

JOSEPH, M., C. AURIAULT, *et al.* *A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes*. **Nature**, v.303, n.5920, Jun 30, p.810-2. 1983.

JIZ, M., J. F. FRIEDMAN, *et al.* Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG4. **Infect Immun**, v.77, n.5, May, p.2051-8. 2009.

KATZ, N. e S. V. PEIXOTO. [Critical analysis of the estimated number of *Schistosomiasis mansoni* carriers in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.3, May-Jun, p.303-8. 2000.

KIGHTLINGER, L. K., J. R. SEED, *et al.* *Ascaris lumbricoides* intensity in relation to environmental, socioeconomic, and behavioral determinants of exposure to infection in children from southeast Madagascar. **J Parasitol**, v.84, n.3, Jun, p.480-4. 1998.

KING, C. L., A. MEDHAT, *et al.* Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. **J Immunol**, v.156, n.12, Jun 15, p.4715-21. 1996.

KING, C. L., J. XIANLI, *et al.* Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v.158, n.1, Jan 1, p.294-300. 1997.

KURASHIMA, C. e M. UTSUYAMA. Age-related changes of cytokine production by murine helper T cell subpopulations. **Pathobiology**, v.65, n.3, p.155-62. 1997.

LENZI, H. L., J. A. LENZI, *et al.* Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v.20, n.3-4, p.433-5. 1987.

LEWERT, R. M. e S. MANDLOWITZ. Innate Immunity to *Schistosoma Mansoni* Relative to the State of Connective Tissue. **Ann N Y Acad Sci**, v.113, Dec 30, p.54-62. 1963.

LIGHTHART, G. J., J. X. CORBERAND, *et al.* Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. **Mech Ageing Dev**, v.28, n.1, Nov, p.47-55. 1984.

LIMA, M. S., G. GAZZINELLI, *et al.* Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. Evidence for antiidiotypic T lymphocyte responsiveness. **J Clin Invest**, v.78, n.4, Oct, p.983-8. 1986.

LINTON, P. J. e K. DORSHKIND. *Age-related changes in lymphocyte development and function*. **Nat Immunol**, v.5, n.2, Feb, p.133-9. 2004.

LISTI, F., G. CANDORE, *et al.* *A study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence*. **Ann N Y Acad Sci**, v.1089, Nov, p.487-95. 2006.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, *et al.* *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J Biol Chem**, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

MAIZELS, R. M., A. BALIC, *et al.* *Helminth parasites--masters of regulation*. **Immunol Rev**, v.201, Oct, p.89-116. 2004.

MALLEVAEY, T., J. FONTAINE, *et al.* *Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis*. **Infect Immun**, v.75, n.5, May, p.2171-80. 2007.

MATHEW, R. C. e D. L. BOROS. *Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in Schistosoma mansoni infection*. **Infect Immun**, v.54, n.3, Dec, p.820-6. 1986.

MEDHAT, A., M. SHEHATA, *et al.* *Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to Schistosoma haematobium adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment*. **J Infect Dis**, v.178, n.2, Aug, p.512-9. 1998.

MILLER, R. A. *Calcium and the aging immune system*. **Neurobiol Aging**, v.8, n.4, Jul-Aug, p.368-70. 1987.

MOREL, C. M. *Reaching maturity - 25 years of the TDR*. **Parasitol Today**, v.16, n.12, Dec, p.522-8. 2000.

NDHLOVU, P., H. CADMAN, *et al.* *Age-related antibody profiles in Schistosoma haematobium infections in a rural community in Zimbabwe*. **Parasite Immunol**, v.18, n.4, Apr, p.181-91. 1996.

MU, X. Y. e M. L. THOMAN. *The age-dependent cytokine production by murine CD8+ T cells as determined by four-color flow cytometry analysis*. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.54, n.3, Mar, p.B116-23. 1999.

NIKOLICH-ZUGICH, J. *T cell aging: naive but not young*. **J Exp Med**, v.201, n.6, Mar 21, p.837-40. 2005.

OLOVNIKOV, A. M. *[Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]*. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v.201, n.6, p.1496-9. 1971.

ONU. World Population Prospects: the 2008 revision: Organização das Nações Unidas 2008.

PARRA, J. C., M. S. LIMA, *et al.* *Immune responses during human schistosomiasis mansoni*. XV. *Anti-idiotypic T cells can recognize and respond to anti-SEA idiotypes directly*. **J Immunol**, v.140, n.7, Apr 1, p.2401-5. 1988.

PATEL, H. R. e R. A. MILLER. *Age-associated changes in mitogen-induced protein phosphorylation in murine T lymphocytes*. **Eur J Immunol**, v.22, n.1, Jan, p.253-60. 1992.

PAWELEC, G., Y. BARNETT, *et al.* *T cells and aging, January 2002 update*. **Front Biosci**, v.7, May 1, p.d1056-183. 2002.

PAWELEC, G., K. HIROKAWA, *et al.* *Altered T cell signalling in ageing*. **Mech Ageing Dev**, v.122, n.14, Sep 30, p.1613-37. 2001.

PAWELEC, G., E. MARIANI, *et al.* *Longevity in vitro of human CD4+ T helper cell clones derived from young donors and elderly donors, or from progenitor cells: age-associated differences in cell surface molecule expression and cytokine secretion*. **Biogerontology**, v.1, n.3, p.247-54. 2000.

PEARCE, E. J., P. CASPAR, *et al.* *Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v.173, n.1, Jan 1, p.159-66. 1991.

PEARCE, E. J. e A. S. MACDONALD. *The immunobiology of schistosomiasis*. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.7, Jul, p.499-511. 2002.

PELLEGRINO, J. e A. F. SIQUEIRA. [A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs.]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v.8, n.4, Oct, p.589-97. 1956.

PESSOA. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987. 399-421 p.

PESSOA, S. Trematódeos parasitas do sistema sanguíneo - *Schistosoma mansoni*. In: (Ed.). *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. Trematódeos parasitas do sistema sanguíneo - *Schistosoma mansoni*, p.p.399-421

SANTIAGO, A. F., R. M. FERNANDES, *et al.* *Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice*. **Cell Immunol**, v.253, n.1-2, May-Jun, p.5-10. 2008.

SAÚDE, M. D.: Brasil 2009.

SAVIOLI, L., E. RENGANATHAN, *et al.* *Control of schistosomiasis--a global picture*. **Parasitol Today**, v.13, n.11, Nov, p.444-8. 1997.

SHER, A., R. L. COFFMAN, *et al.* *Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni**. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.1, Jan, p.61-5. 1990.

SHI, J. e R. A. MILLER. *Tyrosine-specific protein phosphorylation in response to anti-CD3 antibody is diminished in old mice*. **J Gerontol**, v.47, n.5, Sep, p.B147-53. 1992.

SMITHERS, S. R. e R. J. TERRY. *Immunity in schistosomiasis*. **Ann N Y Acad Sci**, v.160, n.2, Oct 6, p.826-40. 1969.

SNAPPER, C. M. e W. E. PAUL. *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production*. **Science**, v.236, n.4804, May 22, p.944-7. 1987.

SOLANA, R. e G. PAWELEC. *Molecular and cellular basis of immunosenescence*. **Mech Ageing Dev**, v.102, n.2-3, May 15, p.115-29. 1998.

SOLANA, R., G. PAWELEC, *et al.* *Aging and innate immunity*. **Immunity**, v.24, p491-4. 2006.

SONG, H., P. W. PRICE, *et al.* *Age-related changes in antibody repertoire: contribution from T cells*. **Immunol Rev**, v.160, Dec, p.55-62. 1997.

SPEZIALI, E., J. BETHONY, *et al.* *Production of interferon-gamma by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis*. **Mediators Inflamm**, v.13, n.5-6, Dec, p.327-33. 2004.

SPEZIALI, E., A. F. SANTIAGO, *et al.* *Specific immune responses but not basal functions of B and T cells are impaired in aged mice*. **Cell Immunol**, v.256, n.1-2, p.1-5. 2009.

SPEZIALI E. , A. C. H. M. T.-C. A. *Ageing Down-Modulates Liver Inflammatory Immune Responses to Schistosome Infection in Mice*. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2010.

STADECKER, M. J. *The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis*. **Parasitol Today**, v.8, n.6, Jun, p.199-204. 1992.

STEVENS, T. L., A. BOSSIE, *et al.* *Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells*. **Nature**, v.334, n.6179, Jul 21, p.255-8. 1988.

STRAUB, R. H., L. E. MILLER, *et al.* *Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence*. **J Neuroimmunol**, v.109, n.1, Sep 1, p.10-5. 2000.

STURROCK, R. F., R. KIMANI, *et al.* *Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.77, n.3, p.363-71. 1983.

SZEWCZUK, M. R., R. J. CAMPBELL, *et al.* *Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes*. **J Immunol**, v.126, n.6, Jun, p.2200-4. 1981.

TAKEOKA, Y., S. Y. CHEN, *et al.* *The murine thymic microenvironment: changes with age.* **Int Arch Allergy Immunol**, v.111, n.1, Sep, p.5-12. 1996.

THOMAN, M. L. *Early steps in T cell development are affected by aging.* **Cell Immunol**, v.178, n.2, Jun 15, p.117-23. 1997.

TIMM, J. A. e M. L. THOMAN. *Maturation of CD4+ lymphocytes in the aged microenvironment results in a memory-enriched population.* **J Immunol**, v.162, n.2, Jan 15, p.711-7. 1999.

TIMO-IARIA, C. *O Envelhecimento.* **ACTA FISIÁTRICA**, v.10, n.3, p.114-120. 2003.

TISCHENDORF, F. *On the evolution of the spleen.* **Experientia**, v.41, n.2, Feb 15, p.145-52. 1985.

VON, L. *Studies on Granuloma Formation. Iii. Antigen Sequestration and Destruction in the Schistosome Pseudotubercle.* **Am J Pathol**, v.45, Jul, p.75-94. 1964.

WARREN, K. S. *Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology?* **J Infect Dis**, v.127, n.5, May, p.595-609. 1973.

WARREN, K. S., E. O. DOMINGO, *et al.* *Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity.* **Am J Pathol**, v.51, n.5, Nov, p.735-56. 1967.

WARREN, K. S., A. A. MAHMOUD, *et al.* *Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California: duration of infection, presence of disease, therapeutic management.* **Am J Trop Med Hyg**, v.23, n.5, Sep, p.902-9. 1974.

WEINSTOCK, J. V. *The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host.* **Immunol Invest**, v.21, n.5, Aug, p.455-75. 1992.

WEKSLER, M. E. e P. SZABO. *The effect of age on the B-cell repertoire.* **J Clin Immunol**, v.20, n.4, Jul, p.240-9. 2000.

WENG, N. P. *Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt?* **Immunity**, v.24, n.5, May, p.495-9. 2006.

WHO. *Neglected tropical diseases*: World Health Organization 2010.

WILKINS, H. A., U. J. BLUMENTHAL, *et al.* *Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis.* **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.81, n.1, p.29-35. 1987.

WILSON, R. A., P. S. COULSON, *et al.* *A significant part of the 'concomitant immunity' of mice to Schistosoma mansoni is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing.* **Parasite Immunol**, v.5, n.6, Nov, p.595-601. 1983.

WOHLFERT, E. e Y. BELKAID. *Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections.* **J Clin Immunol**, v.28, n.6, Nov, p.707-15. 2008.

WYLER, D. J., H. P. EHRLICH, *et al.* *Fibroblast stimulation in schistosomiasis. VII. Egg granulomas secrete factors that stimulate collagen and fibronectin synthesis.* **J Immunol**, v.138, n.5, Mar 1, p.1581-6. 1987.

YAMASHITA, T. e D. L. BOROS. *IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni.* **J Immunol**, v.149, n.11, Dec 1, p.3659-64. 1992.

