



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM IMUNOLOGIA

**ESTUDO DO FENÓTIPO, ATIVAÇÃO CELULAR E
FONTE PRODUTORA DE IL-10 EM ASMÁTICOS
INFECTADOS PELO SCHISTOSOMA MANSONI**

RICARDO RICCIO OLIVEIRA

Salvador – BA
2005



Ricardo Riccio Oliveira

**Estudo do fenótipo, ativação celular e fonte produtora de
IL-10 em asmáticos infectados pelo *Schistosoma mansoni***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em
Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade
Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Imunologia.**

Professora Orientadora: Maria Ilma Andrade Santos Araujo

Salvador – Bahia

2005

Ficha catalográfica
Universidade Federal da Bahia - Faculdade de Medicina - Biblioteca

O48D Oliveira, Ricardo Riccio.

Estudo do fenótipo, ativação celular e fonte produtora de IL-10 em asmáticos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. / Ricardo Riccio Oliveira. – Salvador, 2006.

91 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Maria Ilma Andrade Santos Araujo.

Dissertação (Mestre em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

1. *Schistosoma mansoni* . 2. Asma Brônquica . 3. IL-10.
4. Helmintíases. I. Universidade Federal da Bahia II. Título.

CDU: 616.995.122(043.3)

FOLHA DE APROVAÇÃO





UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA





ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA
 ALUNO **RICARDO RICCIO OLIVEIRA**


Aos doze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e cinco, às 10:00 horas, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelas Professoras: Dra. **Maria Ilma Andrade Santos Araújo**, Orientadora; Dr. **Regis de Albuquerque Campos** e o Dr. **Jorge Clarêncio Souza Andrade**, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado, “**Estudo do Fenótipo, Ativação Celular e Fonte Produtora de IL-10 em Asmáticos Infectados pelo Schistosoma mansoni**” do pós-graduando **RICARDO RICCIO OLIVEIRA**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelas examinadoras. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação de Mestrado APROVADO, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pelo Mestrando e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 12 de dezembro de 2005.


 Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo
 Orientadora


 Dr. Regis de Albuquerque Campos
 Banca Examinadora


 Dr. Jorge Clarêncio Souza Andrade
 Banca Examinadora


 Ricardo Riccio Oliveira
 Mestrando


 Dr. Roberto José Meyer Nascimento
 Coordenador do PPGIm

DEDICATÓRIA

*A minha família pelo incentivo e apoio na realização deste sonho.
A Profa. Leda Alcântara, sem ela não teria chegado onde estou hoje.
A Dra. Maria Ilma Araujo por ter acreditado e incentivado.*

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Ilma Araujo, orientadora e amiga, fonte de conhecimentos, por acreditar e me incentivar na realização deste sonho.

A Profa. Lêda Maria Alcântara, mestre e amiga, por ter sempre acreditado e me incentivado na realização dos meus objetivos.

Ao Dr. Edgar Marcelino Carvalho pelo exemplo de pesquisador e pelos ensinamentos passados ao longo destes anos.

Ao Dr. Kenneth John Gollob por estar sempre acessível para discutir sobre os resultados deste trabalho.

A todos os colegas do nosso grupo de pesquisa, principalmente, Cecília, Charlton, Joanemile e Luciana, pelo companheirismo e a amizade no trabalho e nos momentos de lazer.

Aos colegas e funcionários do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos pelo entusiasmo em colaborar, tornando o ambiente de trabalho sempre muito agradável.

Aos professores, colegas e funcionários do Curso de Pós Graduação em Imunologia pelo convívio enriquecedor.

A bibliotecária da Faculdade de Medicina da UFBA, Delba Barros Santos Rosa, por ter colaborado com a ficha catalográfica.

A Secretaria de Saúde do município do Conde e aos pacientes envolvidos neste trabalho.

A minha família, pelo amor e apoio incondicionais.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vii
Lista de tabelas:	x
Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	xi
Resumo.....	xiii
Abstract	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1 Resposta imune na alergia e na asma.....	3
2.2 Resposta imune na infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	5
2.3 Associação entre atopia/alergia e helmintíases.....	8
2.4 Ativação celular na asma e na infecção pelo <i>S. mansoni</i>	12
2.5 Regulação da resposta imune na asma e infecção pelo <i>S. mansoni</i>	14
3. Justificativa.....	19
4. Hipótese.....	20
5. Objetivos	21
5.1 Objetivo geral.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. Metodologia e estratégia de ação.....	22
6.1 Seleção de indivíduos asmáticos de áreas endêmica e não endêmica em esquistossomose.....	22
6.1.1 Critérios de inclusão	23
6.1.2 Critérios de exclusão	23
6.2 Prevalência de alergia respiratória, parasitoses intestinais e carga parasitária em indivíduos residentes no Conde-BA	24
6.3 Desenho do estudo	25
6.4 Avaliação complementar	26
6.4.1 Exame parasitológico de fezes	26

6.5 Avaliação da resposta imune	26
6.5.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico:	26
6.5.2 Avaliação do fenótipo das CMSP <i>ex vivo</i> :.....	26
6.5.3 Avaliação da fonte produtora de IL-10:.....	31
6.6 Análise estatística.....	34
7. Considerações éticas	35
8. Resultados.....	36
8.1 Dados demográficos dos indivíduos avaliados.....	36
8.2 Fenótipo e marcadores de ativação de células T.....	36
8.3 Marcadores de ativação de monócitos.....	44
8.4 Receptor de IL-10 em monócitos.....	47
8.5 Fonte celular produtora de IL-10 em asmáticos	48
9. Sumário dos Resultados	52
10. Discussão.....	53
11. Conclusões.....	59
12. Perspectivas	60
13. Referências	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando as populações de linfócitos, região 1 (G1) e monócitos, região 2 (G2).....28
- Figura 2.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com isotipos controles. O diagrama representa um experimento.29
- Figura 3.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. Os histogramas demonstram a frequência de células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, PE e CY. O diagrama representa um experimento.....30
- Figura 4.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. O gráfico demonstra a seleção da população duplo positivo para as moléculas de superfície celular CD4 e CD25 através da janela G3. O diagrama representa um experimento.32
- Figura 5.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. O histograma demonstra a distribuição das células CD4⁺CD25⁺ selecionadas pela janela G3 quanto à presença de IL-10 intracelular. A população de células positivas está delimitada pela região M1. O diagrama representa um experimento (Figura 5A). A figura 5B representa um gráfico gerado a partir da região R6 da figura 5A, indicando que toda população produtora de IL-10 está na região de linfócitos.....33
- Figura 6.** Frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ na população de células CD3⁺ de asmáticos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni* (Asma / Helm / Sm, n=23), infectados por outros helmintos (Asma / Helm, n= 7) e não infectados (Asma, n=10), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA para comparação entre os três grupos, complementado pelo Tukey para análise das diferenças inter-grupo. (*p = 0,035, **p = 0,028).37
- Figura 7.** Frequência de células CD4⁺CD25⁺ na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados

(n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).38

Figura 8. Frequência de células CD4⁺ expressando CD28 na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=28), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=7), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).39

Figura 9. Frequência de células CD4⁺ expressando CTLA-4 na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (* $p = 0,019$).40

Figura 10. Frequência de células CD8⁺ expressando CD28 na população de células CD8⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=28), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=7), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (* $p = 0,004$, ** $p = 0,004$).41

Figura 11. Frequência de células CD8⁺ expressando CTLA-4 em células CD8⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (* $p = 0,05$).41

Figura 12. Frequência de expressão de CD40L em células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=13) e não infectados (n=6), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste t de Student ($p = 0,006$).42

Figura 13. Frequência de células CD14⁺ expressando CD80 na população de células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).44

Figura 14. Frequência de células CD14⁺ expressando CD86 na população de células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (* $p = 0,004$, ** $p = 0,022$).45

- Figura 15.** Média de intensidade de fluorescência de HLA-DR em células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (*p = 0,000, **p = 0,002).....46
- Figura 16.** Frequência de expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) em células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=12) e não infectados (n=10), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste t de Student (p = 0,004).
.....47
- Figura 17.** Frequência de células positivas para IL-10 intracelular, após estímulo com Der p1, de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=23), infectados por outros helmintos (n=5) e não infectados (n=8), por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (*¹p < 0,05, *²p < 0,01, *³p < 0,001, *⁴p < 0,001, *⁵p < 0,001 e *⁶p < 0,01).
.....48
- Figura 18.** Frequência da produção de IL-10 intracelular em sub-populações celulares específicas de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=17) na ausência de estímulo ou após estimulação com Der p1, analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (p < 0,0001). Não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre as culturas não estimuladas e estimuladas com Der p1 (p > 0,05, teste t de student).....49
- Figura 19.** Número de células produtoras de IL-10 em sub-populações celulares específicas de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=17) na ausência de estímulo ou após estimulação com Der p1, analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (p < 0,001). Não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre as culturas não estimuladas e estimuladas com Der p1 (p > 0,05, teste t de student).....50

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Dados demográficos dos indivíduos asmáticos avaliados.	36
Tabela 2. Expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos de indivíduos asmáticos (média ± DP).	43
Tabela 3. Expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos de indivíduos asmáticos (média ± DP).	46
Tabela 4. Produção de IL-10 por células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ de asmáticos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	50
Tabela 5. Produção de IL-10 por células TCD4 ⁺ CD25 ⁻ de asmáticos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	51
Tabela 6. Produção de IL-10 por células TCD8 ⁺ de asmáticos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	51
Tabela 7. Produção de IL-10 por células CD14 ⁺ de asmáticos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	51

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Fração V de albumina bovina
CD	Molécula de superfície celular (clusters of differentiation)
CD14	Marcador de superfície de monócitos/macrófagos
CD40L	Ligante do CD40
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTLA-4	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
CY	Cycrhome
Der p 1	Alérgeno 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FACS	Citometria de fluxo (flow cytometer cell sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Fator de transcrição de células regulatórias
FSC	Dispersão frontal
GITR	Receptor de TNF induzido por glicocorticóide
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
HLA-DR	Antígeno de histocompatibilidade leucocitária classe 2
ICOS	Molécula co-estimulatória da família de CD28
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG4	Imunoglobulina G4
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10

IL-10R	Receptor de IL-10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
ISAAC	International study of asthma and allergies in childhood
MHC	Molécula de histocompatibilidade
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NK	Células matadoras naturais
PBS	Tampão salina fosfato
PE	Ficoeritrina
rhIL-10	IL-10 recombinante humana
SSC	Dispersão lateral
TCD4 ⁺	Células T auxiliares
TCD8 ⁺	Células T citotóxicas
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
Th1	Linfócito T auxiliador 1
Th2	Linfócito T auxiliador 2
Th3	Linfócito T auxiliador 3
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tr1	Célula T regulatória tipo 1

RESUMO

Introdução e Objetivos: Alguns estudos vêm demonstrando que as infecções por helmintos são capazes de inibir a resposta ao teste cutâneo para aereolérgenos e modificar o curso clínico da asma, e que a IL-10, produzida em altos níveis em infecções pelo *Schistosoma mansoni*, é capaz de modular a resposta imune do tipo 2 envolvida na patogênese da asma. Os objetivos deste estudo foram avaliar a célula produtora de IL-10, o fenótipo celular e a expressão de moléculas co-estimulatórias em asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, comparando estes resultados com os obtidos de asmáticos infectados por outros helmintos e asmáticos não infectados.

Métodos e Resultados: O fenótipo celular (CD3, CD4, CD8 e CD14), a ativação celular (CD25 e HLA-DR), as moléculas co-estimulatórias (CTLA-4, CD28, CD40L, CD80 e CD86), *ex vivo*, e a citocina IL-10 foram avaliados pelo uso de anticorpos monoclonais por citofluorimetria. CMSP estimuladas por 20 horas *in vitro* com alérgeno (Der p1) foram avaliadas para a expressão intracelular de IL-10. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas (média \pm DP) e média de intensidade de fluorescência (MIF) para HLA-DR (média \pm DP). A frequência de CTLA-4 em células TCD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi $0,49 \pm 0,39\%$, em asmáticos infectados por outros helmintos foi $0,78 \pm 0,25\%$, enquanto que em asmáticos não infectados foi $0,89 \pm 0,56\%$ ($p < 0,05$). A expressão de CD28 nas células TCD4⁺ e do seu ligante CD80 em monócitos foi semelhante em todos os grupos, enquanto que a expressão do CD86 foi diferente entre os grupos ($95,90 \pm 3,47\%$, $89,66 \pm 6,35\%$ e $95,28 \pm 4,93\%$, respectivamente, $p < 0,05$). A expressão de CD25 em células TCD4⁺ também não diferiu significativamente entre os grupos ($7,45 \pm 2,84\%$, $6,84 \pm 2,36\%$ e $7,84 \pm 3,38\%$, respectivamente). Nos indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi observado que as células CD4⁺ foram as

principais produtoras de IL-10, sendo, em percentual, as células CD4⁺CD25⁺ as principais produtoras desta citocina. As células TCD8⁺ juntamente com as CD14⁺ também representaram importantes fontes de IL-10 nestes pacientes.

Conclusões: A principal diferença no estado de ativação celular entre asmáticos com ou sem a infecção pelo *S. mansoni* foi a maior frequência de células TCD4⁺ expressando CTLA-4, um marcador de ativação, em asmáticos não infectados. A modulação da resposta imune observada em indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, envolve mecanismos complexos, que incluem a produção de citocinas, a exemplo da IL-10, e participação de células regulatórias.

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Studies have shown that helminth infections inhibit skin-prick test to aeroallergen and modify the course of asthma, and that IL-10, produced in high levels during *S. mansoni* infection, is able to modulate the type 2 immune response involved in asthma pathology. The objectives of this study were to evaluate the source of IL-10, the cell phenotype and the expression of co-stimulatory molecules in asthmatics cells infected with *S. mansoni* and compare the results with those obtained from asthmatics infected with other helminths and uninfected asthmatics.

Methods and Results: The T cell phenotype (CD3, CD4, CD8 and CD14), the cell activation (CD25 and HLA-DR), co-stimulatory molecules (CTLA-4, CD28, CD40L, CD80 and CD86), *ex vivo*, and the cytokine IL-10 was evaluated using the specific monoclonal antibodies by flow cytometry. PBMCs stimulated for 20 hours *in vitro* with allergen (Der p1) were evaluated regarding intracellular expression of IL-10. The results were expressed in percentage of positive cells (mean \pm SD) and mean of intensity of fluorescence (MIF) for HLA-DR (mean \pm SD). The frequency of CTLA-4 on CD4⁺ T cells in infected asthmatics was $0.49 \pm 0.39\%$, while in asthmatics infected with other helminths was $0.78 \pm 0.25\%$ and in uninfected asthmatics was $0.89 \pm 0.56\%$ ($p < 0.05$). The expression of CD28 on CD4⁺ T cells and its ligand CD80 on monocytes were similar in the three groups, while the expression of CD86 differ between groups ($95.90 \pm 3.47\%$, $89.66 \pm 6.35\%$ and $95.28 \pm 4.93\%$, respectively, $p < 0.05$). The expression of CD25 on CD4⁺ T cells also did not differ significantly between groups ($7.45 \pm 2.84\%$, $6.84 \pm 2.36\%$ and $7.84 \pm 3.38\%$, respectively). In asthmatic individuals infected with *S. mansoni* it was observed that CD4⁺ T cells were the main source of IL-10, being the CD4⁺CD25⁺ cells those that

expressed higher proportion of this cytokine. The CD8⁺ T and CD14⁺ cells also represented important source of IL-10 in these patients.

Conclusion: The major difference in the cell activation status between asthmatics with or without *S. mansoni* infection was the higher frequency of CD4⁺ T cells expressing CTLA-4, an activation marker, in uninfected asthmatics. The modulation of the immune system observed in asthmatics infected with *S. mansoni* involves complex mechanisms including production of cytokines as IL-10 and regulatory cells.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas vem sendo observado aumento na prevalência de doenças alérgicas em países industrializados em relação aos países em desenvolvimento (Sears 1997), onde baixas condições sanitárias levam a uma maior prevalência de parasitoses intestinais e maior contato com outros agentes infecciosos e produtos bacterianos no ambiente.

Em trabalhos realizados na Venezuela, foram demonstrados baixa positividade aos testes cutâneos de alergia em população exposta à infecção por *Ascaris lumbricoides* havendo aumento da reatividade aos testes após o tratamento com anti-helmíntico (Hagel e cols. 1993; Lynch e cols. 1993).

Estudo realizado pelo Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (UFBA), demonstrou menor prevalência de testes cutâneos de alergia positivos em indivíduos infectados com alta carga parasitária de *Schistosoma mansoni*, residentes em área endêmica, quando comparados com indivíduos não infectados ou com baixa carga (Araujo e cols. 2000), residentes na mesma área. Foi também observado menor gravidade da asma nesta região quando a mesma foi comparada com asmáticos não infectados residentes em uma área rural e uma área urbana com as mesmas condições sócio-econômicas (Medeiros e cols. 2003).

Sabe-se que as citocinas do perfil de resposta do tipo T auxiliar (Th) 2, a exemplo da interleucina (IL) 4 e IL-5, estão envolvidas na patogênese da asma, e que a IL-10 é uma citocina capaz de inibir a resposta inflamatória alérgica (Royer e cols. 2001). O estudo do perfil de citocinas produzidos por células de asmáticos demonstrou que a produção de IL-4 e IL-5, em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e outros helmintos foi significativamente menor do que o encontrado nos asmáticos não infectados. Por outro lado, a produção de

IL-10 foi elevada nos asmáticos infectados e muito baixa ou ausente nos não infectados (Araujo e cols. 2004). Neste estudo a adição de IL-10 recombinante humano (rhIL-10) às culturas de células de asmáticos não infectados resultou em diminuição na produção de IL-5 após estímulo com antígeno de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1).

Além de macrófagos e células do tipo Th2, a IL-10 também é sintetizada por células T regulatórias, a exemplo de células Th3 ou T regulatória tipo 1 (Tr1). Estas células podem inibir diretamente a resposta a alérgenos ambientais ou produzirem as citocinas modulatórias IL-10 e / ou fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Wills-Karp e cols. 2001).

No presente estudo foi demonstrado que a principal fonte de IL-10 em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foram as células TCD4⁺CD25⁺. Foram avaliados também o fenótipo das células T e o grau de ativação destas células e dos monócitos, utilizando-se os anticorpos monoclonais específicos e citometria de fluxo. Foi demonstrado que a expressão de antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), um marcador de célula ativada, foi maior nos asmáticos não infectados.

Estes conhecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* poderá levar ao desenvolvimento de estratégias para o controle da asma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta imune na alergia e na asma

Tem sido observado considerável aumento na incidência de doenças atópicas em países industrializados nos últimos 30 anos e estima-se que ao menos 20% da população mundial está susceptível às doenças atópicas (Romagnani 1997). O aumento na prevalência da asma tem sido observado em todas as raças e faixas etárias e em ambos os gêneros (IOM 2000). Existe elevada morbidade associada às doenças alérgicas, a qual gera um grande custo financeiro com medicamentos que controlam os sintomas. Em 1997, por exemplo, o destinado para o tratamento da asma nos Estados Unidos foi estimado em 6 bilhões (Smith e cols. 1997).

A atopia, caracterizada por um aumento dos níveis de imunoglobulina (Ig) E específica para o alérgeno, além de aumento de eosinófilos e mastócitos, é a base de doenças alérgicas como a asma, rino-conjuntivite e o eczema atópico (Yazdanbakhsh e cols. 2002). A asma alérgica é uma doença crônica das vias aéreas que cursa com resposta inflamatória e hiperreatividade brônquica, envolvendo diversos tipos celulares, dos quais os mais importantes são as células Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos (Yssel e cols. 2001). A asma é caracterizada por episódios de obstrução reversível e intermitente das vias aéreas. O desencadeamento da doença está associado com a interação de aeroalérgenos com IgE, ligada a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos, resultando na liberação de mediadores solúveis como a histamina e leucotrienos (Platts-Mills e cols. 1996).

A interação de alérgenos do ambiente com o sistema imune inato por meio das células apresentadoras de antígeno e subsequente ativação de células T induz resposta do

tipo Th2 e produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, que interagem com seus receptores estimulando a síntese de IgE e o aumento do número de eosinófilos e mastócitos que, por sua vez, são capazes de promover a inflamação no trato respiratório (Holt e cols. 1999).

Após a indução da resposta imunológica, muitas células presentes na mucosa brônquica, a exemplo dos macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, células do músculo liso, células T, mastócitos e eosinófilos, são ativadas e envolvidas no processo inflamatório da asma. Porém, são os basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados, as células de maior importância na inflamação alérgica devido à liberação de proteínas catiônicas granulares de alta carga, como a proteína básica principal eosinofílica, proteína catiônica eosinofílica e mediadores pró-inflamatórios que, juntamente com radicais livre de oxigênio e citocinas, resultam em aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, contração da musculatura lisa, dano epitelial e hiperreatividade brônquica (Gleich e cols. 1993).

Embora a asma seja uma doença complexa e multifatorial, é bem conhecido o papel fundamental das células Th2 na imunopatogenia da mesma (Wills-Karp 1999). Estas células secretam IL-4 e IL-13 que induzem e mantêm a produção de IgE por células B, e IL-5 que induz o recrutamento, diferenciação e infiltração de eosinófilos na mucosa brônquica (Foster e cols. 1996). Além das ações acima referidas, a IL-4, que é também produzida por mastócitos ativados, é um fator de diferenciação para células Th2, perpetuando o processo inflamatório (Yssel e cols. 2001).

Além das células TCD4⁺ do tipo Th2, subpopulações de células Th1 ativadas que produzem interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) contribuem para a reação inflamatória associada ao dano tecidual na asma (Abbas e cols. 1996).

Estes dados, juntamente com estudo recente que demonstrou que a administração de células Th1 produtoras de IFN- γ em modelos murinos de inflamação alérgica causa uma intensa inflamação neutrofílica das vias aéreas, reforça a idéia de que a regulação do

sistema imune nas doenças inflamatórias não resultam de um simples desequilíbrio entre as presenças de subpopulações de células Th1 e Th2 (Hansen e cols. 1999; Randolph e cols. 1999). Mecanismos regulatórios capazes de modular o processo inflamatório na asma vêm sendo estudados e alguns trabalhos sugerem que infecções por helmintos resultam na modulação da resposta imune nas alergias. Embora doenças alérgicas e infecções por helmintos estejam associadas à estimulação da produção de células do tipo Th2, existem evidências de que a hipersensibilidade imediata e a inflamação alérgica podem ser moduladas pela presença da parasitoses, principalmente pelo *Schistosoma* (Lynch e cols. 1993; Araujo e cols. 2000; Nyan e cols. 2001; Cooper e cols. 2003). Isso abre perspectivas para o estudo de antígenos parasitários indutores de mecanismos anti-inflamatórios para o tratamento ou prevenção das doenças alérgicas.

2.2 Resposta imune na infecção pelo *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose humana pode ser causada por cinco diferentes espécies de trematódeos digenéticos: *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi*. A principal espécie responsável pela infecção no Brasil é *S. mansoni*, sendo o caramujo do gênero *Biomphalaria* o seu principal hospedeiro intermediário. A infecção ocorre quando a cercária, liberada pelo hospedeiro intermediário, penetra na pele durante o contato com a água contaminada. Uma vez no interior do hospedeiro humano a cercária evolui para esquistossômulo e migra para a região da veia porta do fígado, onde amadurecem até vermes adultos e iniciam a ovoposição.

Estima-se que pelo menos 200 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *Schistosoma*, e outras 600 milhões estejam sob risco de infecção por uma das cinco espécies que infectam o homem (WHO/TDR 2002). Apesar de uma das

principais regiões de transmissão da esquistossomose estar localizada na África sub-Saariana, com 85% do total dos casos de esquistossomose mundial (Chitsulo e cols. 2000), o Brasil, e principalmente a Bahia, também possui elevada transmissão de *Schistosoma* (Carmo 1999).

São reconhecidas duas formas clínicas nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, a forma aguda e a crônica, a qual induzem diferentes respostas imunológicas no hospedeiro, e distintas manifestações clínicas.

A esquistossomose aguda tem sido descrita como uma síndrome toxêmica que ocorre antes do aparecimento dos ovos nas fezes e surge geralmente entre 6 a 8 semanas após a infecção, associada a passagem dos esquistossômulos pelos pulmões (Lambertucci 1993; Rabello e cols. 1997; de Jesus e cols. 2002). Esta forma da esquistossomose é mais comum em indivíduos que não residem em áreas endêmicas, sugerindo que ocorre algum tipo de modulação na resposta de indivíduos que estão em constante exposição ao *S. mansoni*. A fase aguda cursa com uma marcante resposta pró-inflamatória, predominando a resposta do tipo T auxiliar 1 (Th1), sendo demonstrado altos níveis de TNF- α no plasma e, após o estímulo das células mononucleares de sangue periférico *in vitro* com antígenos do parasita, observa-se elevada produção de TNF- α , IL-1 e IL-6, além de IFN- γ (de Jesus e cols. 2002).

A progressão natural da doença gera uma resposta imune do tipo Th2 induzida pelos antígenos do ovo do *S. mansoni*, a qual é capaz de regular de forma negativa a produção e as funções efetoras dos mediadores liberados na fase aguda da doença, com a participação importante da IL-10 neste processo (Montenegro e cols. 1999). O papel da IL-10 na modulação da resposta Th1 específica para antígenos de verme adulto do *S. mansoni* foi demonstrada em experimento no qual a neutralização da IL-10 pelo uso de anticorpo monoclonal contra esta citocina, em culturas de células de sangue periférico, resultou em

restauração da produção de IFN- γ (Araujo e cols. 1996; Sabin e cols. 1996). Esta fase da doença é caracterizada por baixa produção de IFN- γ e elevados níveis de citocinas Th2, a exemplo da IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (Gazzinelli e cols. 1992; Williams e cols. 1994; Finkelman e cols. 1997). Embora o início da resposta Th2 pareça ter um papel crucial na modulação da resposta inflamatória da fase aguda, uma resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e morbidade da doença (Cheever e cols. 2000).

Como consequência da resposta Th2, ocorre aumento do número de eosinófilos, mastócitos e produção de IgE. Os antígenos parasitários funcionam como potentes alérgenos (Kennedy e cols. 1986; Fraser e cols. 1993) e isso poderia explicar os níveis elevados de IgE policlonal e IgG4 encontrados nos indivíduos infectados de área endêmica (Ottesen e cols. 1981; Jarrett e cols. 1982; Hussain e cols. 1992). Apesar da elevada produção de IgE e da presença de mastócitos e eosinófilos, em indivíduos cronicamente infectados pelo *Schistosoma* residentes em área endêmica não se observam fenômenos de anafilaxia, provavelmente devido a fatores moduladores da resposta imune induzidos pelo parasita, a exemplo da produção de IL-10.

2.3 Associação entre atopia/alergia e helmintíases

As infecções por helmintos e as alergias são condições altamente prevalentes em vários países do mundo. Muitos estudos têm avaliado a associação entre estas duas condições patológicas, uma vez que a prevalência de doenças atópicas vem aumentando nos países industrializados, onde uma progressiva melhora das condições sanitárias levou à redução de parasitoses intestinais e de outras doenças da infância (Asher e cols. 1998). Paradoxalmente, tem sido observado que as doenças alérgicas são menos frequentes em países onde a prevalência de helmintíases é elevada (Asher e cols. 1998). Além disso, Yemaneberhan e colaboradores observaram que, dentro de um mesmo país, existe uma maior prevalência de alergias nos centros urbanos, quando comparados com zonas rurais (Yemaneberhan e cols. 1997; Von Ehrenstein e cols. 2000).

Baseado nestas informações e no fato de indivíduos de países industrializados estarem menos susceptíveis a infecções devido a vacinações, uso de antibióticos e melhores condições sanitárias, foi criada a “Hipótese da Higiene” (Strachan 1989). Segundo esta hipótese, as crianças ao nascerem apresentam um padrão de resposta do tipo Th2 que vai sendo modificado pela exposição a agentes indutores da resposta do tipo Th1 encontrados no ambiente. Os indivíduos de países industrializados apresentam uma expansão da resposta Th2 e, conseqüentemente uma predisposição para doenças alérgicas, por possuírem uma estimulação insatisfatória da resposta do tipo Th1, devido à redução das infecções bacterianas e virais.

Uma outra hipótese para explicar a baixa prevalência de atopia em países em desenvolvimento e em áreas rurais seria a alta frequência de infecções parasitárias nestas regiões. Estudos realizados por Lynch e colaboradores na Venezuela têm demonstrado que em área endêmica para *A. lumbricoides* existe uma diminuição da reatividade aos testes

cutâneos de hipersensibilidade imediata, associado a elevados níveis de IgE total e baixos de IgE específica para aeroalérgenos (Lynch e cols. 1993). Além disso, foi constatado que o tratamento da população estudada com anti-helmíntico resultou em aumento da positividade ao teste de alergia e da produção de IgE específica para aeroalérgenos (Lynch e cols. 1993).

Classificando a população infectada por geohelmintos de acordo com a carga parasitária, Lynch e colaboradores (Lynch e cols. 1987) demonstraram que a baixa carga parasitária estava associada a maior reatividade cutânea a aeroalérgenos, enquanto que indivíduos com alta carga parasitária apresentavam menor reatividade cutânea, a despeito de elevados níveis de IgE específico para ácaros. Outros autores em trabalhos mais recentes vêm demonstrando resultados semelhantes. Em estudo realizado no Gabão, localizado na África, apenas 11% das crianças em idade escolar reagiram aos antígenos de ácaro de poeira domiciliar no teste cutâneo de leitura imediata, embora 32% apresentassem IgE específica para os referidos ácaros (van den Biggelaar e cols. 2000). Cooper e colaboradores, avaliando 2865 crianças em idade escolar residentes em uma área endêmica em geohelmintos no Equador, demonstraram baixa positividade ao teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos (Cooper e cols. 2003).

Em estudo realizado no Brasil foi demonstrado que em indivíduos residentes em área endêmica para esquistossomose, a frequência de positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata com aeroalérgenos foi significativamente menor nos indivíduos infectados com alta carga de *S. mansoni*, quando comparados com indivíduos não infectados ou com baixa carga parasitária residentes na mesma região (Araujo e cols. 2000).

A prevalência de doenças alérgicas entre indivíduos residentes em áreas endêmicas em infecções por helmintos comparada com indivíduos de área não endêmica é

um assunto controverso, havendo uma tendência a uma menor prevalência de asma entre os indivíduos com esquistossomose (Catapani e cols. 1997).

Um estudo realizado em populações de baixo nível sócio-econômico em três localidades do Estado da Bahia (duas áreas rurais, uma delas endêmica para esquistossomose e uma área urbana na periferia da cidade de Salvador) demonstrou não existir diferença significativa na prevalência de asma entre estas três áreas (Medeiros e cols. 2003). Entretanto, a gravidade da asma, avaliada por meio de parâmetros clínicos como uso de medicamentos anti-asmáticos, necessidade de atendimento médico e através de exames físicos, foi menor nos indivíduos residentes em área endêmica quando comparados com asmáticos residentes em área rural e urbana não endêmicas em esquistossomose (Medeiros e cols. 2003). Corroborando com estes dados, em estudo realizado na área endêmica no município do Conde-Bahia foi demonstrado que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentavam formas leves da asma e que após o tratamento com anti-helmíntico houve uma piora nas manifestações clínicas da doença (Almeida 2004).

Existem algumas hipóteses para explicar a baixa freqüência de positividade aos testes alérgicos e a menor gravidade da asma em indivíduos infectadas por helmintos, dentre elas a grande produção de IgE policlonal que inibiria a produção de IgE específica ou competiria com esta pela ligação nos receptores dos mastócitos (Godfrey 1975; Merrett e cols. 1976; Lynch e cols. 1987; Lynch e cols. 1993); altas concentrações da IgG4 antígeno-específica que poderia competir com a IgE pela ligação com o antígeno (Hussain e cols. 1992) e mecanismos regulatórios da resposta imune, a exemplo do desenvolvimento de células regulatórias e da produção elevada da IL-10 (Araujo e cols. 1996; King e cols. 1996) e TGF- β (Letterio e cols. 1998).

A hipótese de que níveis elevados de IgE interferiria na positividade aos testes cutâneos não foi confirmada em trabalhos que mostraram maior frequência de indivíduos produtores de IgE específica para aeroalérgeno dentre os respondedores a estes antígenos nos testes cutâneos de leitura imediata (Lynch e cols. 1993; van den Biggelaar e cols. 2000; Scrivener e cols. 2001). Além disso, em estudo realizado por Araujo e colaboradores, não foi observado diferença significativa nos níveis de IgE total e específica para *D. pteronyssinus* entre indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com baixa ou alta carga parasitária, que responderam diferentemente no teste cutâneo de hipersensibilidade imediata, ou seja, no grupo de indivíduos infectados com alta carga parasitária, houve uma menor positividade aos testes cutâneos (Araujo e cols. 2000).

O aumento da produção de IgG4 vem sendo apontado como um possível mecanismo envolvido na melhora clínica de pacientes atópicos durante imunoterapia específica com alérgenos (Ebner e cols. 1997; Platts-Mills e cols. 2001). Entretanto, em estudo recente realizado no Gabão, a ausência de reatividade cutânea para alérgenos em indivíduos parasitados por helmintos não foi associada com a elevação nos níveis de IgG4 (van den Biggelaar e cols. 2000).

Alguns estudos recentes (van den Biggelaar e cols. 2000; Araujo e cols. 2004) apontam para a possibilidade da IL-10, produzida em altos níveis por indivíduos infectados por helmintos, estar envolvida na modulação da resposta inflamatória na alergia. Outra possibilidade é a de que células regulatórias, por meio da expressão de IL-10 e / ou TGF- β , ou ainda pela expressão do CTLA-4, possa modular a resposta imune nos indivíduos atópicos infectados por helmintos. A expressão de outras moléculas co-estimulatórias, a exemplo de B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e ligante de CD40 (CD40L) também podem influenciar no estado de ativação celular em modelos de infecção por helmintos e interferir na resposta inflamatória nas alergias (MacDonald e cols. 2002).

2.4 Ativação celular na asma e na infecção pelo *S. mansoni*

A ativação das células T requer pelo menos dois sinais independentes. O primeiro é dado pela ligação do complexo peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ao receptor de células T e o segundo por um sinal co-estimulatório que é emitido pela ligação de moléculas B7 (B7.1 ou B7.2), presentes nas células apresentadoras de antígenos, com os seus receptores nas células T, a molécula CD28 (Bretscher e cols. 1970). Em células T virgens, CD28 é o único receptor para moléculas B7. Uma vez que as células T estejam ativadas, elas passam a exibir um receptor adicional, homólogo ao CD28, chamado CTLA-4 (CD152) (Walunas e cols. 1994). Este se liga às moléculas B7 com 20 vezes mais avidéz, apesar de ser menos abundante que o CD28, emitindo um sinal inibitório à célula T ativada, limitando a quantidade de produção do fator de crescimento de células T, a IL-2 (Mandelbrot e cols. 1999). Assim, a ligação de CTLA-4 às moléculas B7 é essencial para a limitação de resposta proliferativa das células T ativadas. Isso foi confirmado utilizando camundongos desprovidos do gene CTLA-4. Tais camundongos desenvolvem uma doença fatal caracterizada por massiva proliferação de linfócitos (Costello e cols. 1998).

Alguns estudos têm demonstrado que CTLA-4 tem papel importante na modulação da resposta inflamatória envolvida na asma. O tratamento com proteína de fusão contendo o domínio extracelular do CTLA-4 e a porção Fc da IgG1 humana (CTLA-4Ig) em modelo murino de asma sensível a ovoalbumina, reduziu a produção de IL-4 e IL-5 consideravelmente. Além disso, o uso de anticorpo anti-B7.2 tem efeitos similares, sugerindo que a interação do CD28 com B7.2 é importante no desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2 (Tsuyuki e cols. 1997). Em humanos também tem sido demonstrada a importância das moléculas CD28, CTLA-4 e B7.2 na resposta imune.

Recentemente foi realizado um estudo *in vitro* para avaliar a influência do antígeno solúvel de verme adulto de *S. mansoni*, PIII, na expressão de moléculas co-estimulatórias em indivíduos com esquistossomose crônica. Este antígeno previne a formação de granuloma e estimula a produção de IL-10 (Hirsch e cols. 1996; Hirsch e cols. 1997; Zouain e cols. 2001). Neste estudo foi observado que o antígeno PIII é capaz de diminuir a expressão de CD28 tanto em células CD4⁺ quanto em CD8⁺; aumentar a expressão de CTLA-4 em células CD8⁺ e aumentar a expressão de B7.2 em monócitos. Estes resultados sugerem que a interação entre B7.2 e CTLA-4 pode ser responsável pelo sinal negativo na formação do granuloma (Zouain e cols. 2004).

Outras moléculas co-estimulatórias envolvidas na resposta imune na esquistossomose e alergia incluem CD40 e CD40L. A síntese de IgE pelos linfócitos B é dependente de dois sinais de ativação celular. O primeiro deles é fornecido por IL-4 e IL-13 e o segundo é gerado quando CD40L, que é expresso na superfície de células T após exposição antigênica, se liga ao CD40 que, por sua vez, é encontrado na superfície de linfócitos B ou outras células apresentadoras de antígenos. Um estudo utilizando camundongos deficientes para CD40 ou CD40L demonstrou que estas duas moléculas têm importante participação na síntese de IgE, porém não interferem na indução da eosinofilia broncopulmonar após inalação sucessiva de *Aspergillus fumigatus* (Mehlhop e cols. 2000). Adicionalmente, CD40 está associado a aumento da reatividade das vias aéreas na ausência de estímulo antigênico, enquanto que o CD40L é necessário para a indução da hiperreatividade brônquica após estímulo antigênico (Mehlhop e cols. 2000). Em modelos de camundongos deficientes para o gene que codifica o CD40L, MacDonald e colaboradores demonstraram que a interação CD40/CD40L é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada durante a infecção pelo *S. mansoni*, e que a ausência do CD40L interfere na ativação dos linfócitos B. Estes, por sua vez,

apresentam reduzido estado de ativação demonstrado pela baixa expressão de MHC classe II (MacDonald e cols. 2002). Portanto, a interação CD40-CD40L é importante para o desenvolvimento da resposta Th2 na esquistossomose e no modelo de asma parece estar envolvido com a patogênese da doença.

2.5 Regulação da resposta imune na asma e infecção pelo *S. mansoni*

A IL-10, descrita inicialmente como fator de inibição da síntese de citocinas (CSFI) por Fiorentino e colaboradores (Fiorentino e cols. 1989), é produzida principalmente por macrófagos e células Th2 CD4⁺. É uma citocina com propriedade imunoregulatória, e à despeito do seu papel modulador ser predominantemente enfatizado na resposta do tipo Th1 (Sher e cols. 1991; Del Prete e cols. 1993), esta citocina possui também capacidade de modular a resposta do tipo Th2 (Del Prete e cols. 1993). Estudos conduzidos em áreas endêmicas em *S. mansoni* têm demonstrado que indivíduos esquistossomóticos crônicos produzem citocinas do tipo Th2, incluindo a IL-10, e não produzem, ou produzem em baixos níveis, IFN- γ (de Jesus e cols. 1993; Araujo e cols. 1994). Posteriormente foi demonstrado que a IL-10 regula a produção de IFN- γ na esquistossomose humana, sendo observado que a neutralização da IL-10 *in vitro* com o uso do anticorpo monoclonal anti-IL-10 restaura a linfoproliferação e a produção de IFN- γ em pacientes esquistossomóticos (Araujo e cols. 1996). Uma vez que a IL-10 pode promover uma diminuição da liberação de histamina e de outros mediadores pelos mastócitos (Royer e cols. 2001) e que a resposta imune a antígenos de *S. mansoni* leva à produção de IL-10, é possível que indivíduos residentes em área endêmica em esquistossomose, devido à estimulação crônica do sistema imunológico e desenvolvimento de mecanismos regulatórios, respondam menos aos testes cutâneos de alergia e apresentem menos

sintomas de asma. Esta hipótese é reforçada por estudos de Biggelaar e colaboradores (van den Biggelaar e cols. 2000), que mostrou redução da reatividade cutânea aos testes alérgicos com antígeno de *D. pteronyssinus* em crianças africanas infectadas com *S. haematobium* e um aumento de IL-10 em sobrenadante de cultura de células destes pacientes estimulados com antígenos do parasita.

Foi também demonstrado que células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* quando estimuladas com antígeno de *D. pteronyssinus in vitro* produzem níveis mais elevados de IL-10 e mais baixos de citocinas do tipo Th2, a exemplo da IL-4 e IL-5, quando comparados com asmáticos não infectados (Araujo e cols. 2004). Um outro estudo recente avaliou a relação entre atopia e infecções por geohelmintos em escolares no Equador (Cooper e cols. 2004). Os autores demonstraram que células de indivíduos atópicos infectados por *A. lumbricoides* produziam níveis mais baixos de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5), bem como menor liberação de histamina, quando estimuladas *in vitro* com antígenos do parasita, comparado-se com atópicos não infectados (Cooper e cols. 2004). Neste trabalho, os autores sugerem que TGF- β e, principalmente, IL-10 possam estar envolvidos na modulação da produção de citocinas do tipo Th2.

O TGF- β faz parte de um grupo de citocinas chamadas “superfamília do TGF- β ”, que está relacionada com a regulação do crescimento das células epiteliais, além da regulação da diferenciação, mobilidade, organização e apoptose destas células (Massague e cols. 1992). O TGF- β é uma proteína extracelular expressa virtualmente em todos os tipos celulares (Sporn e cols. 1986), o que inclui macrófagos, células matadoras naturais (NK), além de células T e B. Possui propriedades tanto pró- como anti-inflamatória, a depender da concentração e do ambiente (Wahl 1994). Os estudos iniciais avaliando o efeito do TGF- β na função do linfócitos humanos revelaram que esta citocina é capaz de inibir a proliferação de linfócitos dependente de IL-2 (Kehrl e cols. 1986). Tem sido demonstrado

que o TGF- β 1, uma das três isoformas do TGF- β encontradas em mamíferos, tem atividade inibitória de células inflamatórias como células T, células B, células dendríticas, mastócitos e eosinófilos, além de modificar a função de células estruturais como células do epitélio brônquico, fibroblastos e células do músculo liso dos brônquios (Wahl 1992; Hirst 2000; Holgate 2000). Além disso, recentemente foi demonstrado em modelos experimentais que o TGF- β é capaz de inibir a hiperreatividade e a inflamação das vias aéreas (Hansen e cols. 2000).

Além dos monócitos / macrófagos e das células Th2, que têm sido descritos como fontes importantes da produção de IL-10 e TGF- β , outro grupo de células descrito recentemente, as células T regulatórias, parece produzir estas citocinas em altos níveis e participar da regulação da resposta imune (Read e cols. 2001). Estas células podem estar envolvidas na modulação da resposta imune pela infecção por *S. mansoni*, em modelos experimentais de alergia e auto-imunidade.

As células T regulatórias são originadas por duas formas distintas. Uma delas surgem a partir do timo como um subtipo distinto de células T maduras com funções definidas (Smith e cols. 1997) e a outra a partir da diferenciação das células T virgens na periferia após o contato com elevadas concentrações de antígeno (Weiner 1997; Akdis e cols. 1998; Yssel e cols. 2001).

Já foram descritos pelo menos 4 tipos principais de células TCD4⁺ com capacidade de regular a resposta imune. São as células T auxiliares tipo 3 (Th3), células T regulatórias 1 (Tr1), células T matadoras naturais (TNK) e células TCD4⁺ expressando a molécula CD25 (CD4⁺CD25⁺) (Akbari e cols. 2003).

As células Th3 foram descritas inicialmente pelo grupo de Weiner e colaboradores (Chen e cols. 1994). Elas podem ser induzidas por antígenos orais nos linfonodos mesentéricos e produzem altos níveis de TGF- β e quantidades variáveis de IL-4 e IL-10.

Estas células são capazes de inibir o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental, sugerindo que são capazes de inibir o efeito patogênico de células T autoreativas (Chen e cols. 1994).

Roncarolo e colaboradores (Groux e cols. 1997) demonstraram que a ativação crônica das células TCD4⁺ humanas ou de camundongos, na presença de IL-10 leva a aumento da proporção de células Tr1. Este subtipo específico de células regulatórias tem baixa capacidade proliferativa e produz altos níveis de IL-10, baixos de IL-2 e não produz IL-4 (Groux e cols. 1997). Tem sido demonstrado que estas células regulam a resposta imune antígeno específica e inibe a função de células T autoreativas e células Th2 *in vivo* (Cottrez e cols. 2000; Katagiri e cols. 2002).

As células TNK compreendem uma população de células T que expressam em sua superfície marcadores característicos tanto de células NK quanto de células T e tem sido demonstrado que estas células possuem potente atividade regulatória em doenças autoimunes (Wilson e cols. 2003). As células TNK podem expressar tanto a molécula CD4 quanto ser duplamente negativa, dependendo da IL-5 para sua sobrevivência (Matsuda e cols. 2002). Elas possuem um repertório restrito de receptor de células T, apresentando a cadeia invariável V α 24-J α 15 em humanos, os quais reconhecem antígenos glicolipídicos que são apresentados por moléculas de MHC classe I não polimórfica como a proteína CD1 (Brossay e cols. 1998).

As células TCD4⁺CD25⁺ foram descritas por Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi e cols. 1995) como uma pequena fração das células TCD4⁺ (aproximadamente 10%). Há evidências de que células TCD4⁺CD25⁺ são células imunoregulatórias capazes de prevenir doenças autoimunes órgão-específicas (Sakaguchi e cols. 1995) e atopia (Curotto de Lafaille e cols. 2002). Apoiando esta teoria, indivíduos com ausência de

células TCD25⁺ (síndrome XLAAD/IPEX) desenvolvem alergia alimentar e eczema severo, além de altos níveis de IgE e eosinofilia (Umetsu e cols. 2003).

Existe discrepância nos resultados dos vários trabalhos que estudam as células TCD4⁺CD25⁺ em relação ao perfil de citocinas produzido. Alguns estudos demonstram que estas células não proliferam e não secretam qualquer citocina após estímulo *in vitro* (Groux 2001), enquanto outros têm relatado que as células TCD4⁺CD25⁺ transcrevem IL-4, IL-10 e TGF- β mais ativamente do que as células TCD4⁺CD25⁻ (Takahashi e cols. 1998).

Ainda não está muito claro se este subtipo celular promove a modulação da resposta imune pelo contato direto célula-célula, num processo dependente da sinalização via CTLA-4 e / ou com secreção de TGF- β (Umetsu e cols. 2003) ou num processo independente do contato celular, por meio de fatores solúveis como a IL-10 (Dieckmann e cols. 2002) e / ou TGF- β (Jonuleit e cols. 2002).

O estudo das células regulatórias CD4⁺CD25⁺ está sendo facilitado pelos novos marcadores que têm sido identificados, a exemplo do receptor de TNF induzido por glucocorticóide (GITR) (Shimizu e cols. 2002) e o *Foxp3*, um fator de transcrição específico de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Hori e cols. 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Diante dos dados de que indivíduos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, apresentam diminuição da produção de citocinas do tipo Th2, a exemplo da IL-4 e IL-5, em resposta a estimulação *in vitro* com o antígeno do ácaro *D. pteronyssinus* (Der p1) e de que a IL-10 parece participar desta regulação, fêz-se necessário a continuação destes estudos no sentido de melhor caracterizar os mecanismos moduladores da resposta inflamatória da asma em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

O estudo do fenótipo e do grau de ativação das células da resposta imune de indivíduos asmáticos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, associado aos dados já obtidos de caracterização da resposta por meio da avaliação da produção de citocinas, podem auxiliar no melhor entendimento da relação imunológica entre estas doenças, o que poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as alergias.

4. HIPÓTESE

Em indivíduos asmáticos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, existem mecanismos modulatórios da resposta imune, a exemplo das células regulatórias CD4⁺CD25⁺ que pela expressão de CTLA-4 ou outras moléculas co-estimulatórias ou ainda pela produção de IL-10 são capazes de inibir a resposta inflamatória na asma.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o fenótipo e o estado de ativação das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) em indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, além da fonte produtora de IL-10 nestes indivíduos.

5.2 Objetivos específicos

Em células de indivíduos asmáticos não infectados e infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, avaliar por citofluorimetria, *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com Der p1:

1. O fenótipo celular (CD3, CD4, CD8 e CD14);
2. A expressão de moléculas co-estimulatórias (CD28, CTLA-4, CD40L, CD80 e CD86) e ativação celular (HLA-DR e CD25);
3. A expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) na superfície de monócitos;
4. A célula produtora de IL-10 (CD4, CD25, CD8 e CD14).

6. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

6.1 Seleção de indivíduos asmáticos de áreas endêmica e não endêmica em esquistossomose

Este estudo foi desenvolvido no município do Conde-BA, localizado cerca de 250Km de Salvador. O grupo avaliado compreendeu cinco vilarejos, com um total de, aproximadamente, 1500 indivíduos entrevistados. A população não dispõe de condições sanitárias adequadas, expondo-se constantemente a infecções por parasitoses intestinais. A economia local é baseada na pesca no rio Itapicurú. Além disso, a água dos rios é também utilizada para lazer, banho e lavagem de roupas e utensílios.

Um questionário dirigido – “The International Study of Asthma and Allergies in Childhood” (ISAAC) – que avalia a existência de história pessoal de asma brônquica nos últimos 12 meses e presença de rinite alérgica, além de história familiar de atopia, patologias concomitantes, condições de habitação e poluentes intra-domiciliares, foi aplicado em amostras populacionais do município do Conde e em indivíduos asmáticos residentes em Salvador.

Foram selecionados indivíduos com asma leve de ambos os gêneros e idades entre 6 a 40 anos, que responderam positivamente aos quesitos relativos à história pessoal atual de asma brônquica, com história de sibilância nos últimos 12 meses para formar os grupos de estudo, a saber: GRUPO I - composto por 29 indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* residentes em área endêmica em esquistossomose e outras helmintíases no Conde; GRUPO II - compreendeu 7 indivíduos infectados por helmintos, exceto *S. mansoni*, residentes em Cangurito, um vilarejo do município do Conde endêmico em helmintos, mas onde não existe transmissão do *S. mansoni*; GRUPO III - formado por 14 indivíduos

asmáticos de Salvador não infectados por helmintos acompanhados pelo Ambulatório de Alergia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

6.1.1 Critérios de inclusão

- a) Idade entre 6 e 40 anos;
- b) Ambos os gêneros;
- c) Portador de asma leve intermitente;
- d) Infectados pelo *S. mansoni* para o Grupo I, por outros helmintos para o Grupo II e não infectado para o Grupo III.

6.1.2 Critérios de exclusão

Não foram admitidos no estudo:

- a) Indivíduos com asma grave ou moderada;
- b) Indivíduos com a forma hepato-esplênica da esquistossomose;
- c) Indivíduos com idade inferior a 6 anos ou superior a 40 anos;
- d) Indivíduos que tenham feito uso de uma das seguinte drogas:
 - Anti-histamínicos nas últimas 72 horas, corticosteróides e anti-leucotrienos nos últimos 30 dias da inclusão, pela possibilidade de interferir na avaliação da resposta imune;
 - e) Mulheres gestantes e aqueles que apresentem alguma condição que não permita estrita colaboração, por ocasião da inclusão no estudo;

Os indivíduos menores que 6 anos não foram incluídos no estudo pela dificuldade de se realizar prova de função pulmonar, feita por pneumologista antes da inclusão no estudo, para avaliar a gravidade da asma. Indivíduos acima de 40 anos não participaram do

estudo por apresentarem maior risco de desenvolver doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fator confundidor de gravidade da asma.

6.2 Prevalência de alergia respiratória, parasitoses intestinais e carga parasitária em indivíduos residentes no Conde-BA

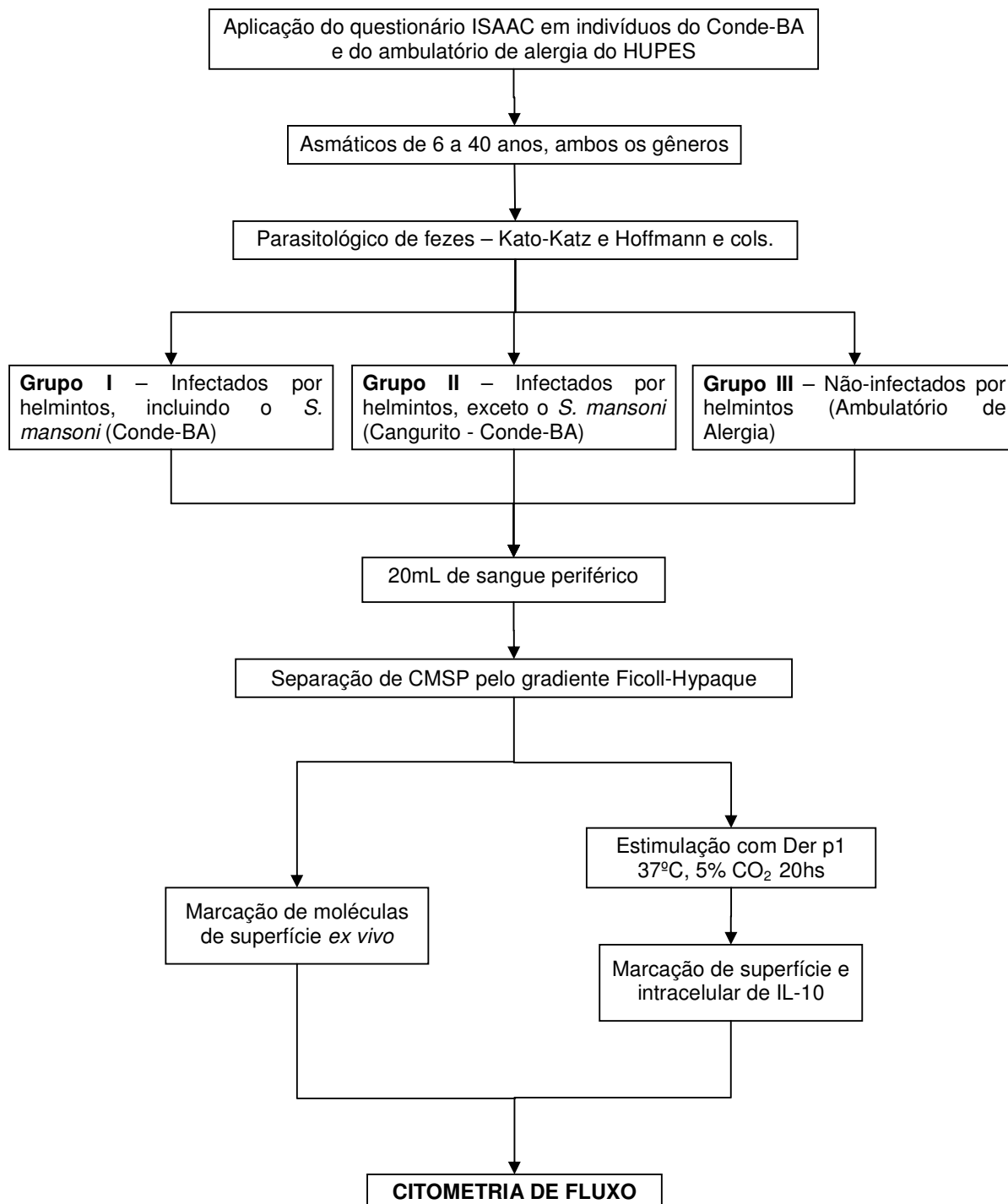
No total, foram avaliados 1064 indivíduos quanto à presença de asma, rinite e parasitoses intestinais no município do Conde. A prevalência de infecção por *S. mansoni* nesta população foi de 90,2%. A prevalência de outros helmintos como *A. lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e Ancilostomídeos foi de 79,7%, 77,2% e 35% respectivamente. Protozoários intestinais como *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* foram encontrados em torno de 50% da população.

Os indivíduos residentes no Conde foram também avaliados quanto à carga parasitária. O grau de infecção por *A. lumbricoides* foi bastante variável nesta população e 30% dos indivíduos tinham mais que 1000 ovos por grama de fezes, enquanto que 40% dos indivíduos estudados estavam altamente infectados por *S. mansoni* (mais que 400 ovos por grama de fezes).

A prevalência de asma e rinite na população avaliada pelo questionário ISAAC foi 14,4% e 20%, respectivamente. Dentre os asmáticos, a frequência de teste cutâneo positivo para Der p1 foi de 12%. Apesar da baixa prevalência de teste cutâneo positivo, IgE específica para Der p1 (0.035 kIU/L) foi positiva em 65,6% destes indivíduos.

Os pacientes com idade entre 6 e 40 anos que preenchiam os outros critérios de inclusão e que concordaram em participar do estudo foram incluídos obedecendo-se a ordem de comparecimento ao recrutamento.

6.3 Desenho do estudo



6.4 Avaliação complementar

6.4.1 Exame parasitológico de fezes

Os indivíduos selecionados para inclusão no estudo foram submetidos a exames parasitológicos de fezes (3 amostras), pela técnica da sedimentação espontânea de Hoffmann-Pons-Janer para a determinação de infecção parasitária por helmintos e protozoários intestinais, e pela técnica de Kato-Katz para avaliação da carga parasitária de helmintos (Katz e cols. 1970).

6.5 Avaliação da resposta imune

6.5.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico:

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para a concentração de 1×10^7 células/mL em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro AB⁺ humano normal inativado, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µL/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Foi adicionado 3×10^5 células/poço em placa de 96 poços com fundo em “U”, para realizar a avaliação da expressão de moléculas de superfície *ex vivo*, sem estímulo antigênico. Adicionalmente, foram incubadas 3×10^5 células/poço, em outra placa do mesmo tipo, por 20 horas a 37°C, 5% de CO₂, na presença ou ausência de estímulo com Der p1 para avaliação da fonte produtora de IL-10.

6.5.2 Avaliação do fenótipo das CMSP *ex vivo*:

Foram realizadas tripla marcação das células com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular específicos, conjugados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e / ou “cyrhome” (CY). Os

anticorpos monoclonais utilizados foram os marcadores de linfócitos T: CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD40L e CTLA-4 e os marcadores presentes em monócitos: CD14, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), HLA-DR e receptor de IL-10 (IL-10R).

Foram adicionadas 30µl da solução contendo as células a 1×10^7 células/mL em cada poço da placa de 96 poços com fundo em “U”. Em seguida foram acrescentados 20µl da solução contendo os anticorpos específicos diluídos em solução de diluição de anticorpos (tampão salina fosfato - PBS 1x, azida 1M e fração V de albumina bovina - BSA) e as placas foram incubadas, protegidas da luz por 15 minutos a 4°C. Foram feitas 3 lavagens sucessivas utilizando-se PBS 1x e solução de lavagem (PBS 1x, azida 1M e BSA) para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal, seguido de ressuspensão das células em 100µl de PBS 1x e 100µl de formaldeído a 4%. As placas foram mantidas a 4°C, protegidas da luz até o momento da aquisição em FACSCalibur (Becton Dickinson), realizado no período de 24 horas após o término da marcação.

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa “Cell Quest”. As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, procedeu-se a seleção das populações de linfócitos e monócitos por janelas nestas respectivas populações. Foram delimitadas duas regiões específicas no gráfico: região 1 (G1), correspondente a janela na área de linfócitos e região 2 (G2), na área de monócitos (Figura 1). Portanto, para a análise das características fenotípicas e expressão de IL-10 intracelular em linfócitos foi utilizada a região G1, enquanto que para monócitos, a região G2.

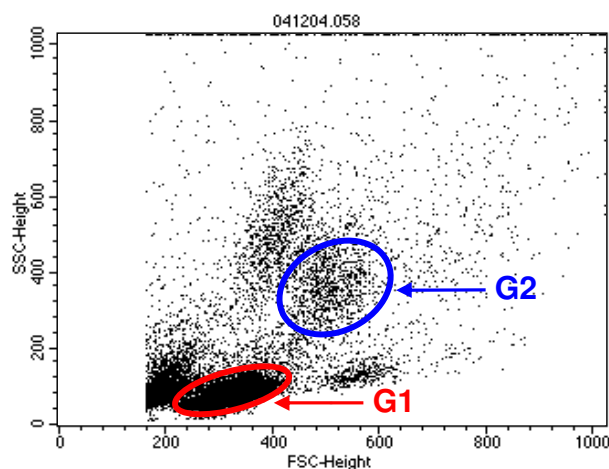


Figura 1. Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando as populações de linfócitos, região 1 (G1) e monócitos, região 2 (G2).

A amostra utilizada para compensação foi composta pelas mesmas células utilizadas nos experimentos, marcadas singularmente com anticorpos bastante fluorescentes, específicos para as células avaliadas e conjugadas com fluorocromos utilizados nos experimentos. Este procedimento foi realizado para se diferenciar entre a emissão de luz em um comprimento de onda não definida para a análise de determinado fluorocromo e a verdadeira presença da marcação, quando se usa mais de um fluorocromo na mesma célula. Este procedimento é realizado quando os fluorocromos emitem luz em espectros próximos (Raber 1988). As delimitações dos quadrantes foram realizadas de acordo com os isotipos controles e as populações negativas de cada marcação (Figura 2).

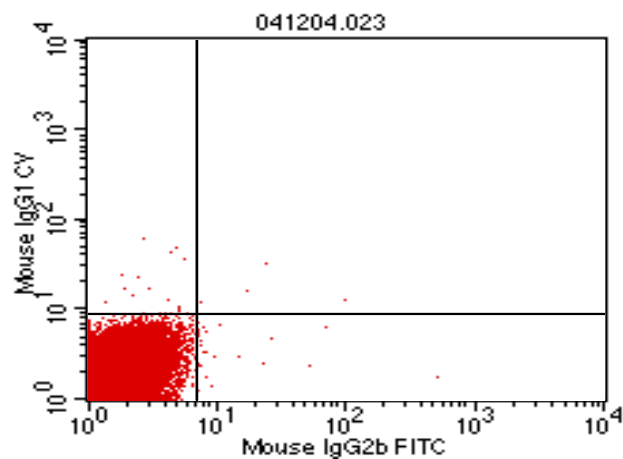


Figura 2. Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com isotipos controles. O diagrama representa um experimento.

A partir da delimitação das regiões, foi ajustada a expressão de células marcadas com os fluorocromos utilizados (Figura. 3A, B, C e D).

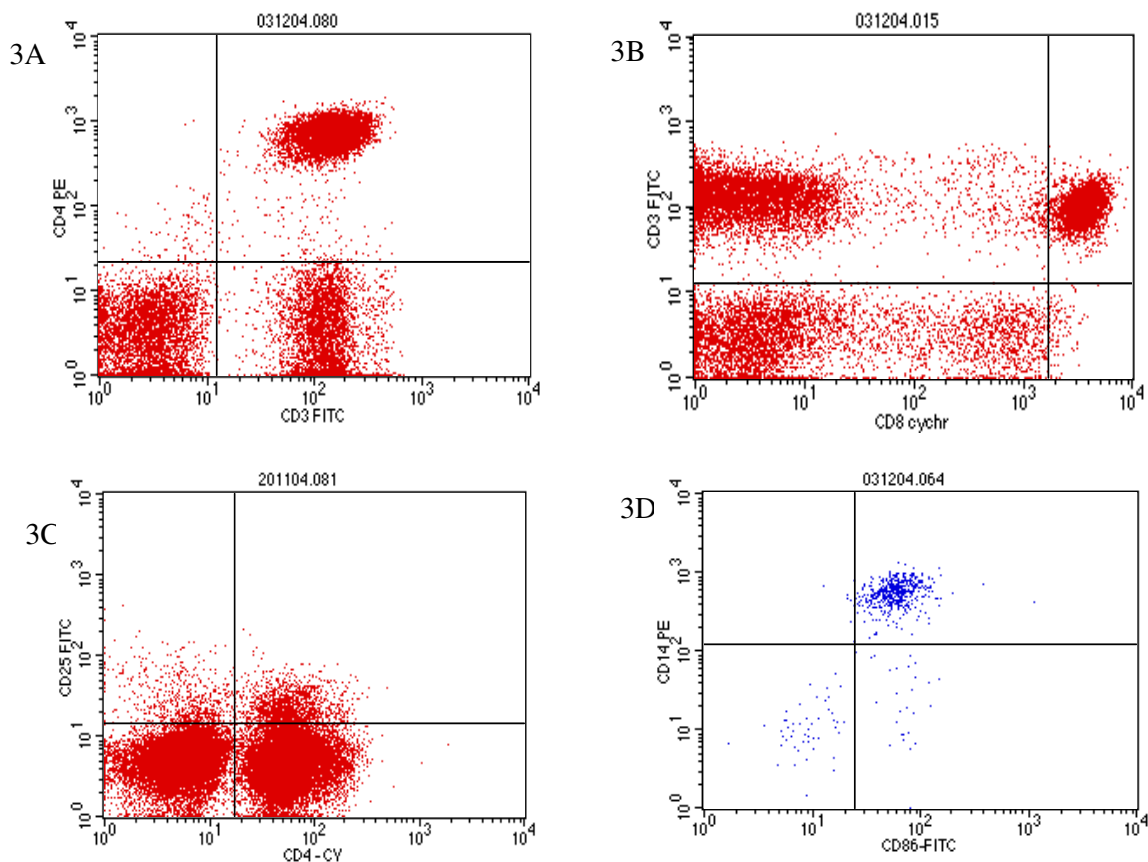


Figura 3. Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. Os histogramas demonstram a frequência de células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, PE e CY. O diagrama representa um experimento.

Com o objetivo de evitar a inclusão de células NK na análise de células que expressam CD8, os quadrantes no histograma foram posicionados de uma forma que selecionasse a população com elevada expressão de CD8 em sua superfície, desde que células NK apresentam baixa expressão desta molécula. (Figura 3B)

6.5.3 Avaliação da fonte produtora de IL-10:

Na placa de 96 poços foram adicionados 30µl da solução contendo as células, 20µl de Der p1 (concentração final 25µg/mL) e completado cada poço com 150µl de RPMI completo. Nos poços em que as células não foram estimuladas com antígenos, foi acrescentado 170µl de RPMI completo. As placas foram incubadas por 20 horas a 37°C, 5% de CO₂. Após ter completado 16 horas de incubação foi adicionado 20µl/poço de brefeldina diluída, sendo a placa devolvida para a estufa para completar as 20 horas restantes.

Após a incubação foi seguido o mesmo protocolo de marcação de superfície utilizado na avaliação *ex vivo*, bem como o mesmo procedimento de compensação para ajuste das populações celulares marcadas com os diferentes fluorocromos e delimitação da região negativa pelo isotipo controle. Os anticorpos monoclonais utilizados nesta etapa foram: CD4, CD8, CD25, CD14 e IL-10.

Para a avaliação da fonte produtora de IL-10 foi realizada, além da análise de dois parâmetros como feito na marcação *ex vivo*, uma análise mais refinada, avaliando a expressão de IL-10 no citoplasma da sub-população de células TCD4⁺CD25⁺. Para tal foi realizada marcação tripla utilizando-se os anticorpos específicos para as moléculas CD4, CD25 e IL-10. Posteriormente, foi delimitada a população duplo positiva para CD4 e CD25 pela utilização de uma janela (G3) (Figura 4).

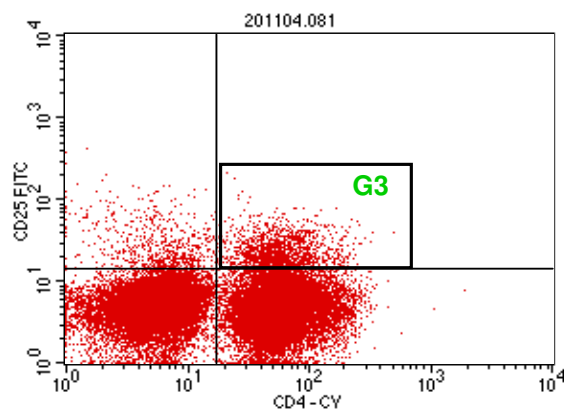


Figura 4. Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. O gráfico demonstra a seleção da população duplo positivo para as moléculas de superfície celular CD4 e CD25 através da janela G3. O diagrama representa um experimento.

Após a delimitação da população alvo foi avaliada a produção de IL-10 intracelular nesta sub-população específica pela utilização de um gráfico de pontos (Figura 5A). A população negativa foi determinada pela utilização do isotipo controle e a população positiva foi delimitada pela região R6. Para confirmar que a população de células avaliadas realmente eram linfócitos foi contruído um novo gráfico de pontos representando a população delimitada por R6, os quais estavam localizados na região de linfócitos no gráfico que avalia o tamanho e a complexidade celular (Figura 5B).

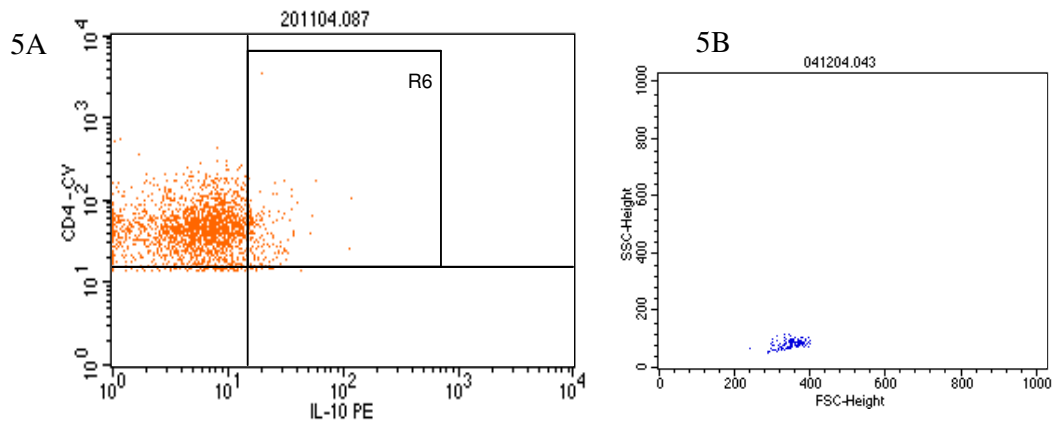


Figura 5. Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico. O gráfico de pontos demonstra a distribuição das células CD4⁺CD25⁺ selecionadas pela janela G3 quanto à presença de IL-10 intracelular. A população de células positivas está delimitada pela região R6. O diagrama representa um experimento (Figura 5A). A figura 5B representa um gráfico gerado a partir da região R6 da figura 5A, indicando que toda população produtora de IL-10 está na região de linfócitos.

6.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa “Statistical Package for Social Science” (SPSS[®]) versão 9. Os resultados do fenótipo das células e dos marcadores de ativação celular por citometria de fluxo foram expressos em percentagem de positividade do total de células ou percentagem de positividade dentro de um grupo celular específico. No caso da expressão de HLA-DR em monócitos, foi utilizada a intensidade de fluorescência (MIF), uma vez que, praticamente todos os monócitos são positivos para HLA-DR.

A proporção de células positivas para os diferentes marcadores foi expressa em percentagem e a comparação entre os três grupos foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student* ou o ANOVA e o Tukey, sendo considerado significativo um valor de $P < 0,05$.

7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e os seus participantes foram todos voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram termo de consentimento informado (Anexo). No caso de menores, o consentimento foi assinado por um dos responsáveis.

Os voluntários que participaram deste estudo doaram 20mL de sangue para avaliação imunológica e colheram amostras de fezes para realização de exames parasitológicos.

A coleta de sangue foi realizada por profissionais da área de saúde habilitados para tal. Os materiais utilizados na coleta de sangue foram descartáveis. A coleta de sangue não oferece riscos, a não ser a possibilidade de sangramento e formação de hematoma, o que é raro e pode ser contornado com compressão local.

Todos os indivíduos portadores de parasitoses intestinais foram tratados gratuitamente. Aqueles que apresentaram queixas de alergia foram devidamente orientados com relação a medidas de controle ambiental intradomiciliar, bem como com referência ao tratamento com drogas.

8. RESULTADOS

8.1 Dados demográficos dos indivíduos avaliados

A tabela 1 mostra as características demográficas dos indivíduos incluídos no estudo. Não houve diferença significativa em relação à idade e gênero entre os grupos avaliados. Apenas o primeiro grupo era infectado pelo *S. mansoni*.

Tabela 1. Dados demográficos dos indivíduos asmáticos avaliados.

	Infectados pelo <i>S. mansoni</i> (n = 29)	Infectados por outros helmintos (n = 7)	Não infectados (n = 14)
Idade em anos* (média ± DP)	13,07 ± 8,89	10,43 ± 2,44	16,00 ± 11,88
Gênero** (% masculino)	44,8%	42,9%	64,3%
Carga parasitária de <i>S. mansoni</i> (ovos / grama de fezes, média ± DP)	65 ± 102	0	0

* p > 0,05, ANOVA

** p > 0,05, Teste exato de Fisher

8.2 Fenótipo e marcadores de ativação de células T

a) Fenótipo das células T

A figura 6 mostra o fenótipo das células T em indivíduos asmáticos infectados por helmintos incluído o *S. mansoni*, asmáticos infectados por outros helmintos e não infectados. Houve diferença estatisticamente significativa na frequência de células TCD4⁺

($p = 0,044$, ANOVA) e $CD8^+$ ($p = 0,017$) entre os três grupos avaliados. O grupo de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* apresentou maior frequência de células $CD4^+$ ($p = 0,035$, Tukey), e menor de células $CD8^+$ ($p = 0,028$, Tukey) quando comparado com asmáticos não infectados.

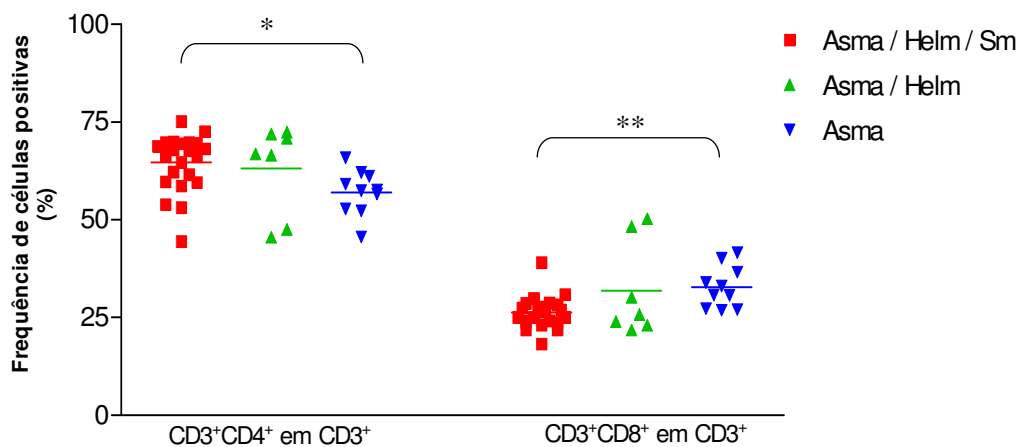


Figura 6. Frequência de células $CD4^+$ e $CD8^+$ na população de células $CD3^+$ de asmáticos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni* (Asma / Helm / Sm, $n=23$), infectados por outros helmintos (Asma / Helm, $n=7$) e não infectados (Asma, $n=10$), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA para comparação entre os três grupos, complementado pelo Tukey para análise das diferenças inter-grupo. (* $p = 0,035$, ** $p = 0,028$).

A frequência média de expressão de CD25 nas células TCD4⁺ foi de 7,4%, 6,8% e 7,8% para os grupos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e outros helmintos, asmáticos infectados apenas por geohelmintos e asmáticos não infectados, respectivamente. A expressão média de CD25 nas células CD8⁺ foi 0,5% para o grupo de infectados pelo *S. mansoni* e 1,4% para os asmáticos não infectados, enquanto que não foi avaliada no grupo de indivíduos infectados apenas por geohelmintos. Foi observada maior frequência de expressão da molécula CD25 nas células TCD4⁺ quando comparadas com as células TCD8⁺ ($p < 0,01$) em todos os grupos avaliados. Não foi observada diferenças significativas ($p > 0,05$, ANOVA) na frequência de células CD4⁺CD25⁺ entre os três grupos (Figura 7).

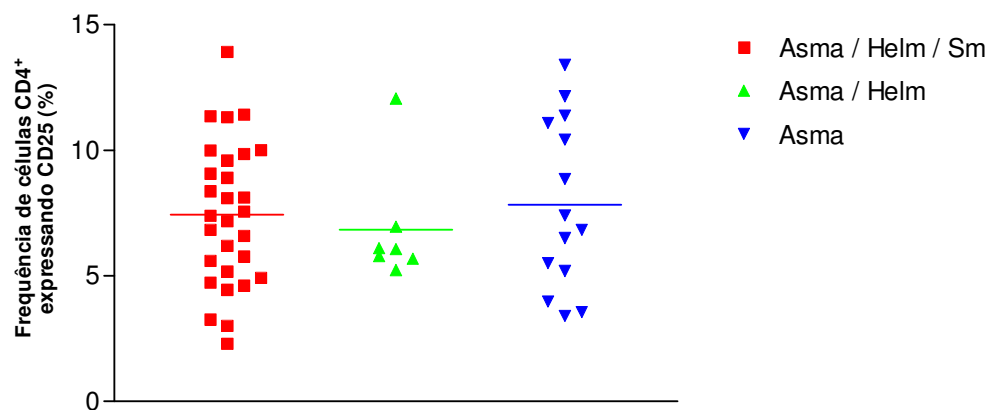


Figura 7. Frequência de células CD4⁺CD25⁺ na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).

b) Marcadores de ativação de células T

A expressão da molécula de superfície CD28 em células TCD4⁺ de asmáticos infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni* e não infectados é mostrado na figura 8. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA) na frequência de expressão da molécula CD28 em sua superfície. Em contrapartida, a expressão da molécula CTLA-4 foi mais elevada nas células TCD4⁺ de asmáticos não infectados quando comparada com as células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* ($p < 0.05$, ANOVA) (Figura 9).

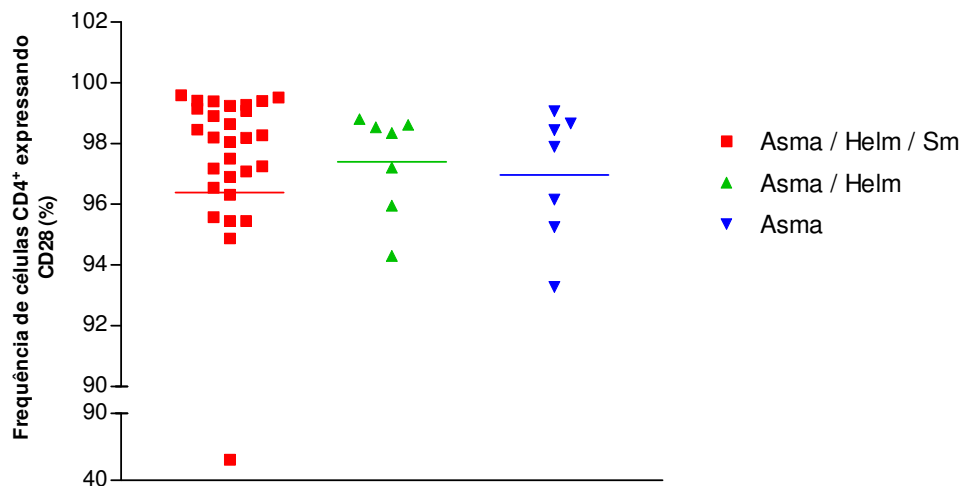


Figura 8. Frequência de células CD4⁺ expressando CD28 na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=28), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=7), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).

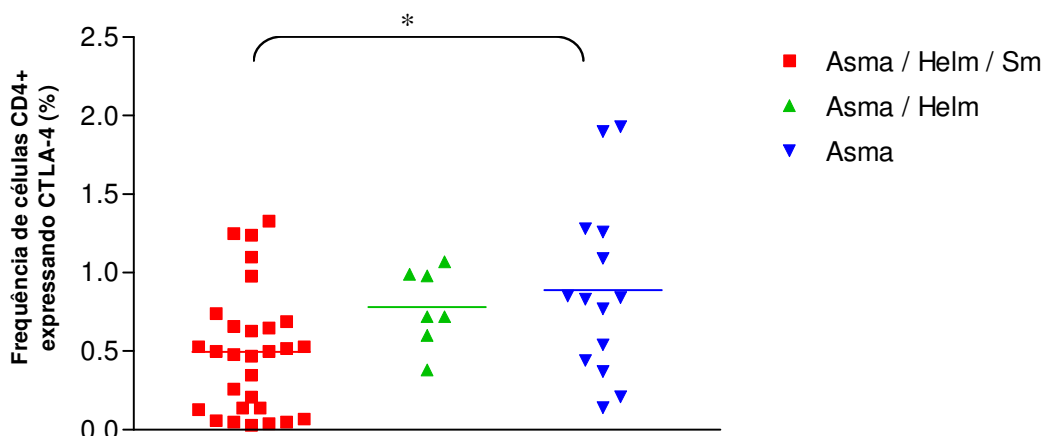


Figura 9. Frequência de células CD4⁺ expressando CTLA-4 na população de células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (*p = 0,019).

A expressão das moléculas CD28 e CTLA-4 também foi avaliada na superfície das células TCD8⁺. Foi observado que estas células de asmáticos infectados por outros helmintos apresentaram maior expressão da molécula CD28 (Figura 10) e tendência à menor expressão de CTLA-4 (Figura 11) na superfície das células TCD8⁺ quando comparado com os outros 2 grupos (p < 0,01 e p = 0,05, respectivamente; ANOVA).

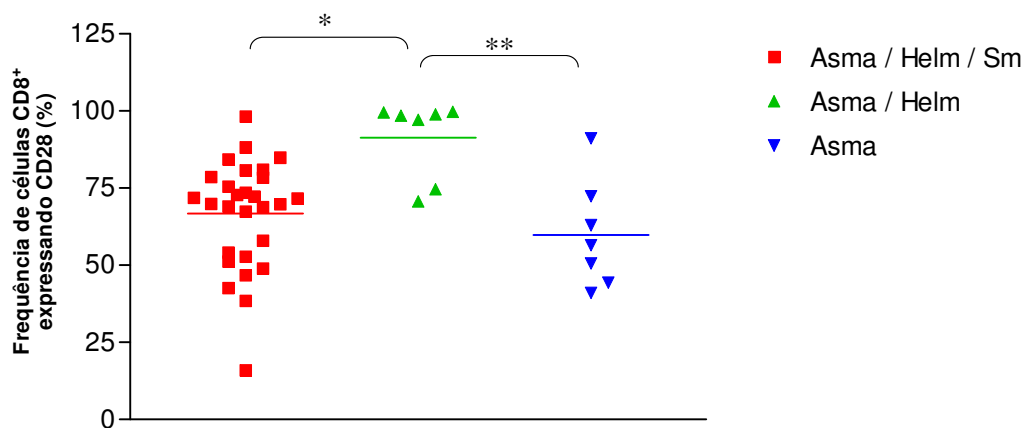


Figura 10. Frequência de células CD8⁺ expressando CD28 na população de células CD8⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=28), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=7), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (*p = 0,004, **p = 0,004).

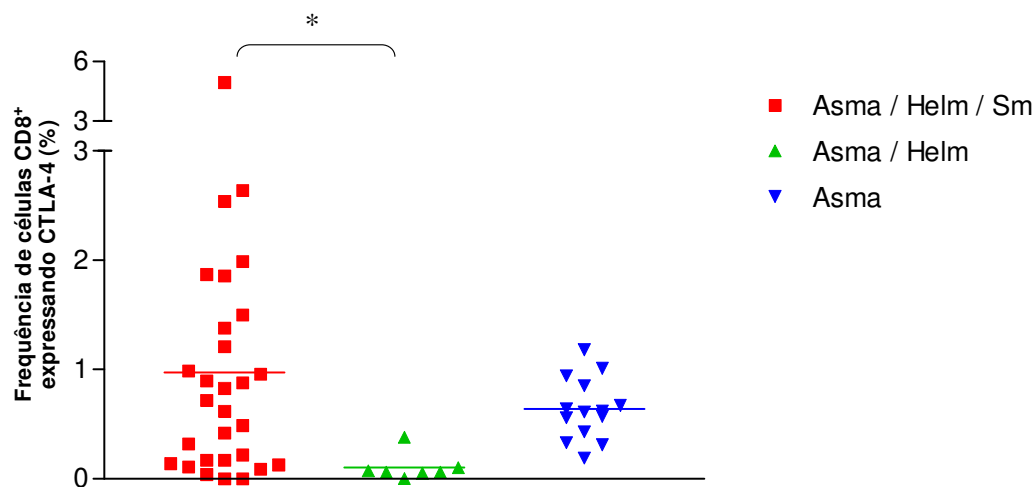


Figura 11. Frequência de células CD8⁺ expressando CTLA-4 em células CD8⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=14), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (*p = 0,05).

A expressão de CD40L na superfície de células T CD4⁺ foi avaliada apenas em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e asmáticos não infectados. Foi demonstrado que as células TCD4⁺ dos asmáticos não infectados apresentam menor expressão de CD40L quando comparado com as células dos indivíduos infectados ($p = 0,006$, teste t de student) (figura 12).

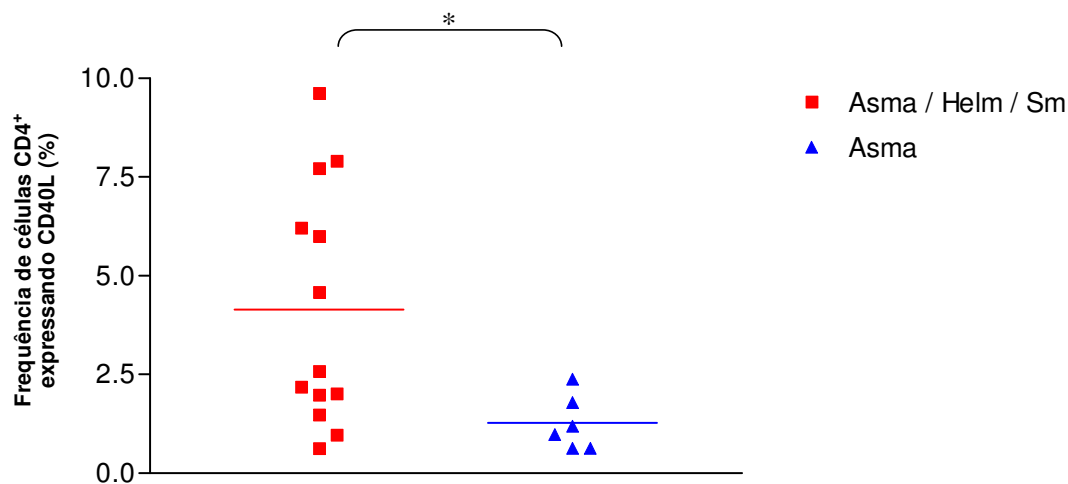


Figura 12. Frequência de expressão de CD40L em células CD4⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=13) e não infectados (n=6), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste t de Student ($p = 0,006$).

Tabela 2. Expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos de indivíduos asmáticos (média \pm DP).

	Asma / Helm / Sm	Asma / Helm	Asma
CD4 ⁺ CD28 ⁺	96,39 \pm 8,09%	97,40 \pm 1,70%	96,96 \pm 2,14%
CD8 ⁺ CD28 ⁺	66,71 \pm 17,63%	91,28 \pm 12,82%*	59,82 \pm 17,52%
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	0,49 \pm 0,39%**	0,78 \pm 0,25%	0,89 \pm 0,56%
CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺	0,97 \pm 1,09%	0,10 \pm 0,13%	0,64 \pm 0,28%
CD4 ⁺ CD40L ⁺	4,14 \pm 3,03%***	-	1,27 \pm 0,69%

* Grupo 2 diferiu do grupo 1 e do grupo 3 ($p < 0,01$, ANOVA).

** Grupo 1 diferiu do grupo 3 ($p < 0,05$, ANOVA).

*** Grupo 1 diferiu do grupo 3 ($p < 0,01$, teste t de student)

8.3 Marcadores de ativação de monócitos

As figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, a expressão de B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) na superfície de monócitos, definidos como células que expressam a molécula CD14 na sua superfície. Não houve diferença significativa na expressão de B7.1 entre os três grupos estudados ($p > 0,05$, ANOVA) (Figura 13), enquanto que a expressão de B7.2 na superfície dos monócitos foi menor nos asmáticos infectados por outros helmintos, quando comparados com os outros grupos ($p > 0,05$, ANOVA) (Figura 14).

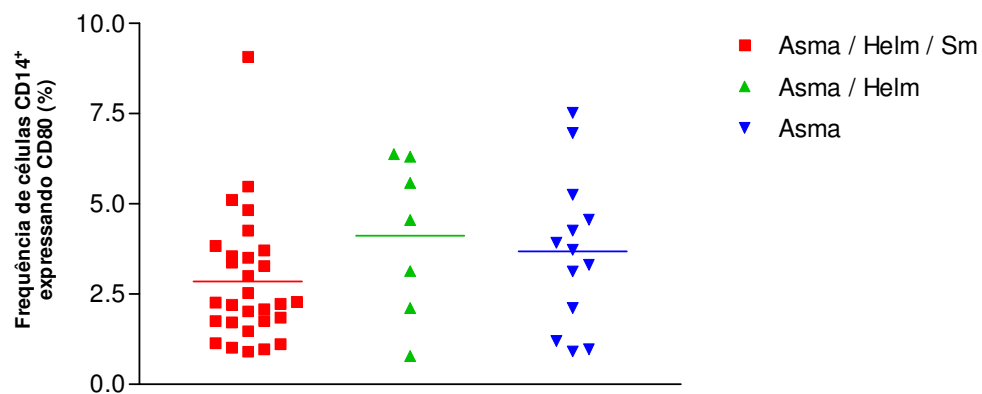


Figura 13. Frequência de células CD14⁺ expressando CD80 na população de células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p > 0,05$).

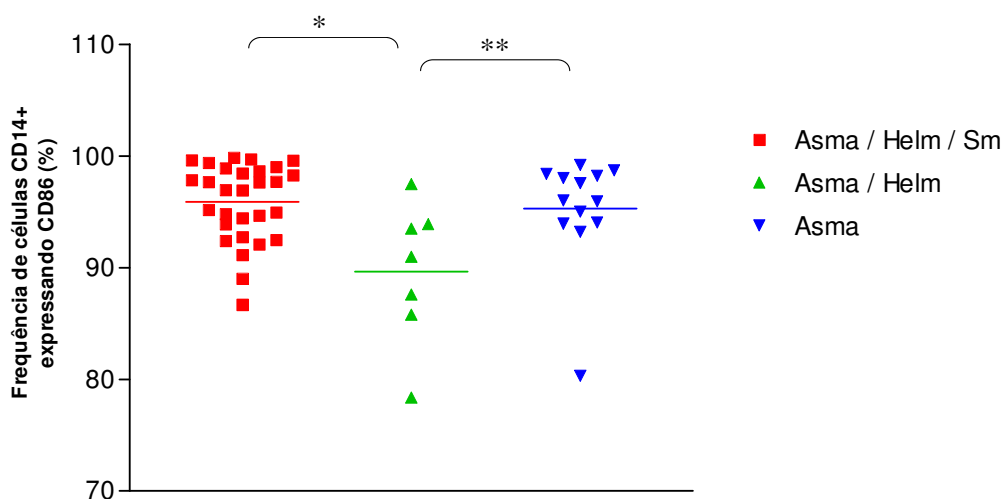


Figura 14. Frequência de células CD14⁺ expressando CD86 na população de células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (*p = 0,004, **p = 0,022).

A ativação de monócitos foi também avaliada pela medida da intensidade de fluorescência de MHC II utilizando o anticorpo monoclonal anti HLA-DR. Apesar de, praticamente, todas as células CD14⁺ expressarem a molécula HLA-DR na sua superfície em todos os grupos estudados (dado não apresentado), foi observado que a média da intensidade de fluorescência (MIF) foi menor nos monócitos de asmáticos não infectados por helmintos ($p < 0,05$, ANOVA) (Figura 15).

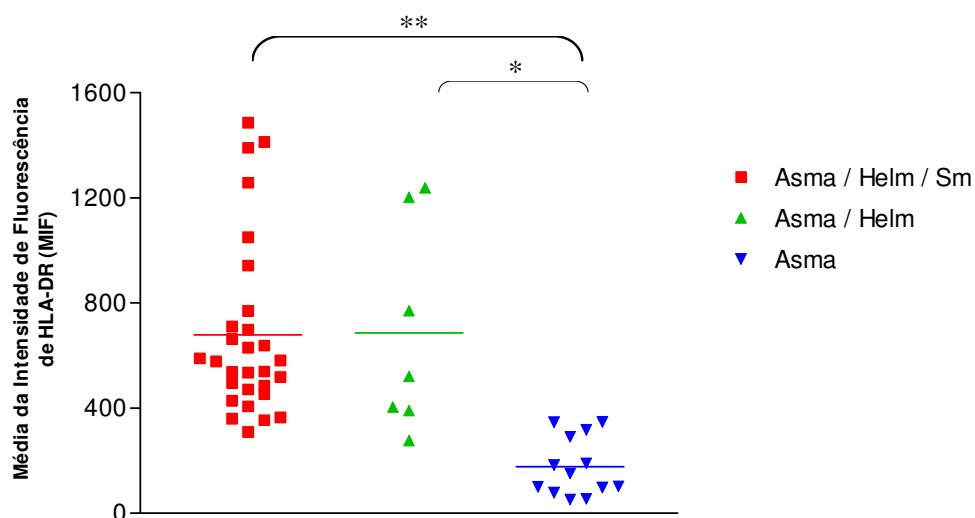


Figura 15. Média de intensidade de fluorescência de HLA-DR em células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=29), infectados por outros helmintos (n= 7) e não infectados (n=13), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA e Tukey (*p = 0,000, **p = 0,002).

Tabela 3. Expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos de indivíduos asmáticos (média ± DP).

	Asma / Helm / Sm	Asma / Helm	Asma
CD14 ⁺ CD80 ⁺	2,85 ± 1,75%	4,12 ± 2,17%	3,68 ± 2,11%
CD14 ⁺ CD86 ⁺	95,90 ± 3,47%	89,66 ± 6,35%*	95,28 ± 4,93%
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	679,2 ± 333,2 MIF	686,3 ± 395,5 MIF	178,2 ± 111,6 MIF**

* Grupo 2 diferiu do grupo 1 e do grupo 3 (p < 0,05, ANOVA).

** Grupo 3 diferiu do grupo 1 e do grupo 2 (p < 0,01, ANOVA).

8.4 Receptor de IL-10 em monócitos

A expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) foi avaliada na superfície de monócitos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados, sendo observado maior frequência nas células de indivíduos infectados ($p = 0,004$, teste t de student) (Figura 16).

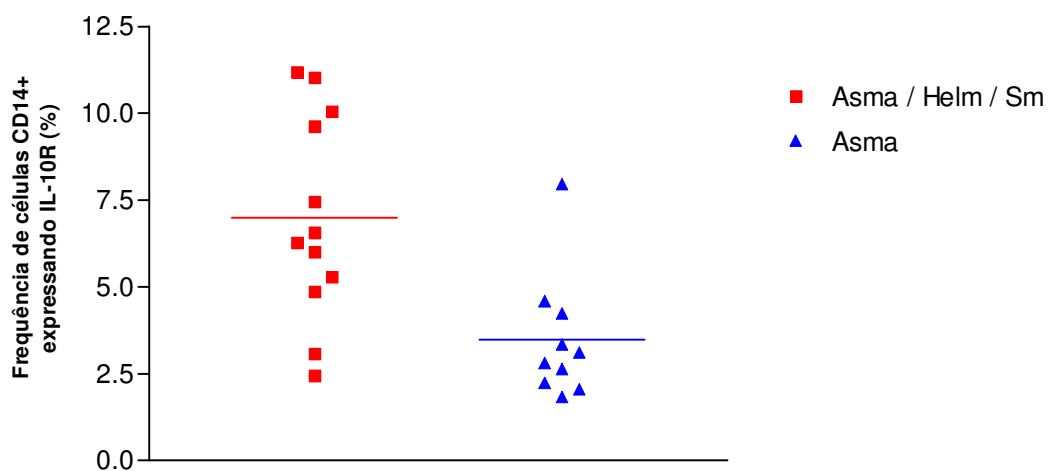


Figura 16. Frequência de expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) em células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=12) e não infectados (n=10), analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste t de Student ($p = 0,004$).

8.5 Fonte celular produtora de IL-10 em asmáticos

A figura 17 mostra a produção de IL-10 intracelular por células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, infectados por outros helmintos e não infectados. Em todos os três grupos estudados, as células CD14⁺ foram, percentualmente, as que produziram níveis mais elevados de IL-10 intracelular, quando comparados com as células TCD4⁺ e TCD8⁺, na presença de estímulo com Der p1 ($p < 0,05$, ANOVA).

A frequência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IL-10 em culturas de células estimuladas com o Der p 1 foi mais elevada dentre os asmáticos infectados pelo *S. mansoni* quando comparados com asmáticos infectados por outros helmintos e asmáticos não infectados ($p < 0,001$, ANOVA). Por outro lado, a frequência de células CD14⁺ produtoras de IL-10 em culturas estimuladas foi maior nos indivíduos asmáticos não infectados ($p < 0,01$, ANOVA).

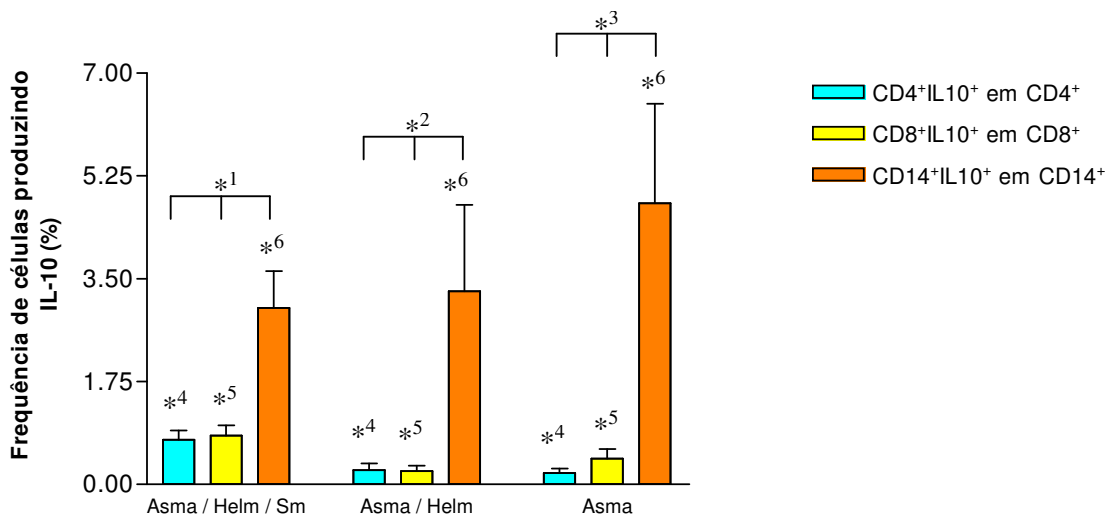


Figura 17. Frequência de células positivas para IL-10 intracelular, após estímulo com Der p1, de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=23), infectados por outros helmintos (n=5) e não infectados (n=8), por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA (*¹ $p < 0,05$, *² $p < 0,01$, *³ $p < 0,001$, *⁴ $p < 0,001$, *⁵ $p < 0,001$ e *⁶ $p < 0,01$).

Para avaliar a participação das sub-populações de células expressando CD25 na produção de IL-10 foram utilizadas células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* que, sabidamente, produz IL-10 e a análise feita conforme descrito na metodologia. A figura 18 mostra a frequência relativa (%) de células positivas para IL-10 na ausência ou presença de estímulo com Der p1 em cada uma das sub-populações avaliadas: CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻, CD8⁺ e CD14⁺. Foi observado que tanto na presença como na ausência de estímulo *in vitro*, as células CD4⁺CD25⁺ apresentaram maior produção de IL-10 intracelular, quando comparados com as demais populações celulares ($p < 0,01$, ANOVA) (Figura 18).

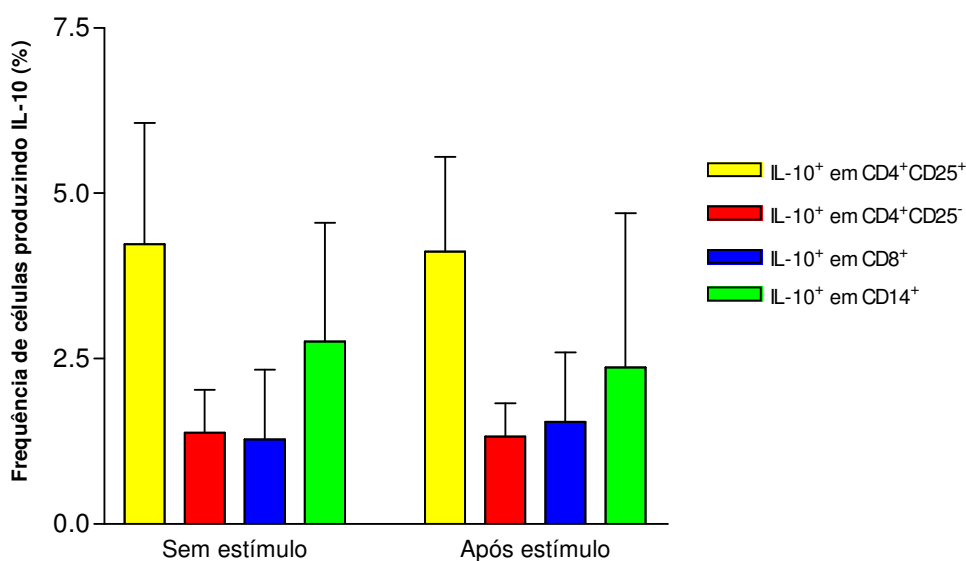


Figura 18. Frequência da produção de IL-10 intracelular em sub-populações celulares específicas de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=17) na ausência de estímulo ou após estimulação com Der p1, analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre as culturas não estimuladas e estimuladas com Der p1 ($p > 0,05$, teste t de student).

Em contrapartida, foi demonstrado que a maior quantidade de células, em termos absolutos, que produzem IL-10 são as células TCD4⁺CD25⁻, quando comparadas com as células CD4⁺CD25⁺, CD8⁺ e CD14⁺ ($p < 0,001$, ANOVA) (Figura 19 e tabelas 4, 5, 6 e 7).

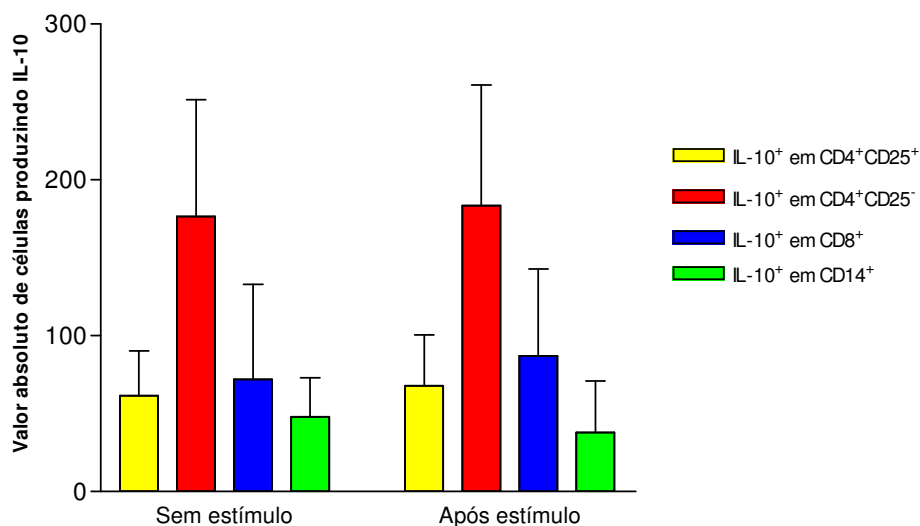


Figura 19. Número de células produtoras de IL-10 em sub-populações celulares específicas de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* (n=17) na ausência de estímulo ou após estimulação com Der p1, analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita através do teste ANOVA ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre as culturas não estimuladas e estimuladas com Der p1 ($p > 0,05$, teste t de student).

Tabela 4. Produção de IL-10 por células TCD4⁺CD25⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

	IL10 EM CD4 ⁺ CD25 ⁺					
	MEIO			DER P1		
	MÉDIA	SD	n	MÉDIA	SD	n
Eventos totais	38557	3447	12	38730	2942	16
Número de eventos selecionados na janela	1553	697	12	1692	520	16
Células produtoras de IL-10 (%)	4,23	1,83	12	4,12	1,43	16
Número de células produtoras de IL-10	61	29	12	68	33	16

Tabela 5. Produção de IL-10 por células TCD4⁺CD25⁻ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

	IL10 EM CD4 ⁺ CD25 ⁻					
	MEIO			DER P1		
	MÉDIA	SD	n	MÉDIA	SD	n
Eventos totais	38557	3447	12	38730	2942	16
Número de eventos selecionados na janela	13110	2053	12	13807	2700	16
Células produtoras de IL-10 (%)	1,38	0,64	12	1,32	0,50	16
Número de células produtoras de IL-10	177	75	12	183	77	16

Tabela 6. Produção de IL-10 por células TCD8⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

	IL10 EM CD8 ⁺					
	MEIO			DER P1		
	MÉDIA	SD	n	MÉDIA	SD	n
Eventos totais	38842	2897	12	37027	4066	14
Número de eventos selecionados na janela	5941	812	12	6054	1036	14
Células produtoras de IL-10 (%)	1,28	1,05	12	1,54	1,05	14
Número de células produtoras de IL-10	72	61	12	87	56	14

Tabela 7. Produção de IL-10 por células CD14⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

	IL10 EM CD14 ⁺					
	MEIO			DER P1		
	MÉDIA	SD	n	MÉDIA	SD	n
Eventos totais	37995	3325	17	38065	3421	17
Número de eventos selecionados na janela	2080	1125	17	2067	1550	17
Células produtoras de IL-10 (%)	2,76	1,79	17	2,37	2,33	17
Número de células produtoras de IL-10	48	25	17	38	33	17

9. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

1. Em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi observado uma maior frequência de células TCD4⁺, enquanto que nos asmáticos não infectados observou-se maior frequência de células TCD8⁺. Não houve diferença significativa na frequência de células TCD4⁺ expressando a molécula CD25 entre asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*;
2. A expressão de CD28 na superfície de células TCD4⁺ não diferiu entre os grupos avaliados, enquanto que a expressão desta molécula nas células TCD8⁺ foi maior nos asmáticos infectados por outros helmintos;
3. A expressão de CTLA-4 foi menor nas células TCD4⁺ de asmáticos infectados, quando comparados com asmáticos não infectados;
4. A expressão de CD40L na superfície de linfócitos TCD4⁺ foi maior em asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, comparado com asmáticos não infectados;
5. A expressão de HLA-DR em monócitos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e por outros helmintos foi maior em relação ao grupo de asmáticos não infectados;
6. A expressão de CD86 foi mais elevada do que a de CD80 nos monócitos tanto dos asmáticos infectados como nos não infectados e não houve diferença na expressão de CD86 entre os grupos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados;
7. Foi observada uma maior expressão de receptor de IL-10 em monócitos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, quando comparado como asmáticos não infectados;
8. Nos indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi observado que as células CD4⁺ foram as principais produtoras de IL-10, sendo, em percentual, as células CD4⁺CD25⁺ as principais produtoras desta citocina. As células TCD8⁺ juntamente com as CD14⁺ também representaram importantes fontes de IL-10 nestes pacientes.

10. DISCUSSÃO

A reação inflamatória alérgica envolvida na patogênese da asma é muito complexa e envolve uma variedade de citocinas e outras moléculas da resposta imune. Alguns estudos sugerem que a IL-10 tem papel protetor na asma, inibindo a resposta do tipo Th2 e a liberação de histamina pelos mastócitos (Araújo e cols. 2004; Royer e cols. 2003). Entretanto a IL-10 não deve representar o único mecanismo de modulação da resposta nas alergias e neste estudo foi comparado a expressão de moléculas relacionadas a ativação celular, a exemplo de HLA-DR e das moléculas co-estimulatórias CD28, CTLA-4, B7.1 e B7.2 entre os asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, infectados por outros helmintos e não infectados. Adicionalmente foi avaliada a expressão de receptor para IL-10 nos monócitos e a célula produtora desta citocina no grupo de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

Um grande número de moléculas co-estimulatórias tem sido identificado, contudo as mais importantes são as moléculas da família B7 (B7.1 e B7.2) nas células apresentadoras de antígenos e seus ligantes CD28 ou seu homólogo CTLA-4, expressos na superfície das células T. Neste trabalho foi observado que a infecção pelo *S. mansoni* ou por outros helmintos, apesar de ser capaz de modular a resposta imune nas alergias, não interfere na expressão da molécula co-estimulatória CD28 na superfície de linfócitos TCD4⁺. A importância do CD28 durante a resposta imune *in vivo* tem sido bem caracterizada em muitos sistemas, incluindo modelo murino de asma alérgica (Green 2000). O CD28 tem um papel crítico na ativação inicial e expansão clonal de células T ativadas, além de também ser necessário para a execução das funções efetoras no local do contato com o antígeno em modelo murino de asma (Kimzey e cols. 2004). Apesar da notável participação do CD28 na resposta imune na asma, não tem sido realizado estudos para

avaliar a frequência de expressão desta molécula na superfície de linfócitos TCD4⁺ em indivíduos asmáticos.

A expressão de CD28 em células TCD8⁺ na asma também foi avaliada neste estudo e não foi demonstrado diferença significativa na frequência destas células entre os grupos de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados. Em asmáticos infectados por helmintos, à exceção do *S. mansoni*, a frequência destas células foi maior quando comparado com asmáticos não infectados ou infectados pelo *S. mansoni*, apesar de todos eles apresentarem asma leve.

Recentemente foi observado que as células TCD8⁺ que não apresentam a molécula CD28 (CD8⁺CD28⁻) participam do processo de diferenciação das células TCD8⁺ efetoras na asma grave (Hamzaoui e cols. 2005), entretanto no presente estudo possivelmente por se tratar de asma leve foi observada a expressão desta molécula em células TCD8⁺ de todos os grupos avaliados, embora em menor extensão no grupo de infectados por helmintos a exceção de *S. mansoni*.

No presente estudo foi avaliado também a expressão de CTLA-4, molécula que compete com o CD28 pela ligação com o B7 expresso nas células apresentadoras de antígenos e foi demonstrado que células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* apresentam menor frequência de expressão de CTLA-4 na superfície de células TCD4⁺ quando comparados com asmáticos não infectados. Este dado sugere que a modulação da resposta imune na asma que ocorre em função da infecção pelo *S. mansoni* envolve mecanismos independentes da sinalização negativa fornecida pelo CTLA-4. A maior expressão de CTLA-4 em células de asmáticos não infectados pode representar tentativa de modulação da resposta Th2 nestes indivíduos e conseqüente controle da asma, o que faz sentido, desde que eles apresentam asma leve. Em concordância com esta idéia, têm sido demonstrada a participação do CTLA-4 na regulação da resposta imune na asma. A adição

de CTLA-4Ig ou anti-B7.2, mas não de B7.1 às culturas de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos estimuladas com Der p1 resultou na redução da produção de IL-5 (Djukanovic 2000). Além disso, em modelo murino de asma sensível à ovoalbumina o tratamento com CTLA-4 Ig foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-4 e IL-5 em resposta a alérgenos inalatórios, resultando em inibição da produção de IgE, redução do infiltrado eosinofílico nos pulmões e diminuição da hiperreatividade brônquica (Tsuyuki e cols. 1997). Enquanto que os mecanismos de regulação da resposta inflamatória alérgica nos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* pelo menos em parte envolve a IL-10, a regulação nos asmáticos não infectados parece depender da expressão de CTLA-4. Esta hipótese é apoiada pelo achado de que a IL-10 é produzida em altos níveis em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e em baixos níveis, ou indetectáveis nos asmáticos não infectados (Araujo e cols. 2004).

Em indivíduos infectados por helmintos, à exceção do *S. mansoni*, foi observada frequência intermediária na expressão de CTLA-4, quando comparado com asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados, sugerindo que a modulação da resposta imune por outros helmintos requer a molécula CTLA-4, desde que alguns deles, a exemplo do *Ascaris lumbricoides* induzem baixa produção de IL-10 (Cooper e cols. 2000; Geiger e cols. 2002)

Em concordância com os dados da literatura, que demonstram que a indução da resposta Th2 depende da presença do B7.2 (Kuchroo e cols. 1995), e que a asma e as infecções por helmintos cursam com a resposta Th2, foi observado neste estudo maior expressão de B7.2 do que B7.1 nos monócitos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, infectados por outros helmintos e não infectados.

Além da ligação do B7.1 ou B7.2 às moléculas CD28 ou CTLA-4, a interação CD40 / CD40L é um outro sinal co-estimulatório importante na resposta imune. No presente

estudo foi observado que indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, na ausência de estímulo *in vitro*, apresentaram maior frequência de expressão de CD40L na superfície das células T, quando comparado com asmáticos não infectados. Estudos em modelo experimental vêm demonstrando que camundongos deficientes de CD40 ou CD40L são incapazes de produzir IgE frente a estímulos antigênicos, refletindo o importante papel destas moléculas na troca de classe para IgE (Castigli e cols. 1994; Kawabe e cols. 1994; Xu e cols. 1994).

Apesar da diferença na frequência do CD40L entre os dois grupos, estudos anteriores demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis de IgE específica para Der p1 entre asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni* (Araujo e cols. 2000; Medeiros e cols. 2003). O aumento na expressão do CD40L nos asmáticos infectados não reflete na produção de IL-4, uma vez que células destes indivíduos expressam baixos níveis de RNA mensageiro para IL-4, quando comparado com asmáticos não infectados (Araujo e cols. 2004).

A fonte celular de IL-10 nos indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi também avaliada neste estudo e foi demonstrado que a principal célula produtora desta citocina é a TCD4+, seguida das células TCD8+ e depois das CD14+. Dentre as células TCD4+, as que expressavam a molécula CD25 foram, em termos percentuais, as que mais produziram IL-10.

Recentemente, tem sido descritas populações de células com propriedades regulatórias do processo alérgico e muitas delas são indutoras da produção de IL-10. Segundo Umetsu e colaboradores (Umetsu e cols. 2003), em vez do desenvolvimento de tolerância e células regulatórias em resposta a alérgenos, asmáticos produzem células Th2 possivelmente pela inadequada produção de IL-10 no momento da diferenciação das células.

A IL-10 tem um importante papel homeostático no controle de processos inflamatórios alérgicos. Ela é capaz de suprimir a produção de IL-5 por células Th0 e Th2 humanas (Schandene e cols. 1994; Zuany-Amorim e cols. 1996; Pretolani e cols. 1997; Araujo e cols. 2004), de induzir anergia prolongada específica para alérgenos em células T CD4⁺ humanas (Groux e cols. 1996; Adachi e cols. 1999), e de inibir a produção de GM-CSF e a expressão de CD40 por eosinófilos ativados, além de promover a morte destas células (Takanashi e cols. 1994; Ohkawara e cols. 1996). Em modelo experimental de asma, foi observado que tanto para o desenvolvimento quanto para a função das células T regulatórias é necessário a presença de IL-10 e da co-estimulação envolvendo ICOS, um membro da família CD28 (Akbari e cols. 2002). Além disso, células T regulatórias induzidas pela exposição das células dendríticas ao alérgeno produzem IL-10 e expressam altos níveis de ICOS ligante que, potencialmente, inibem o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica em modelo experimental de asma (Akbari e cols. 2002).

Enquanto que existem vários estudos avaliando as funções das células regulatórias nas alergias, pouco se conhece sobre as funções destas células nas infecções por helmintos. Certamente estas células devem participar da modulação da resposta imune no sentido de permitir a sobrevivência do hospedeiro e perpetuação do parasita. Em indivíduo com oncocercose disseminada, por exemplo, foi demonstrado que a IL-10 e o TGF- β , produzidas por células Th3, foram associados com a inibição da resposta proliferativa celular (Doetze e cols. 2000), e na esquistossomose experimental, células T regulatórias produtoras de IL-10, reduzem a morbidade e prolongam a sobrevivência do parasita (Hesse e cols. 2004; McKee e cols. 2004).

Além da avaliação da expressão de IL-10 pelas células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, foi também avaliado neste estudo a expressão do receptor desta citocina. Foi

demonstrado que monócitos de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, quando comparados com asmáticos não infectados, expressam maior frequência de receptor de IL-10 na superfície. Este dado reitera a hipótese de que a modulação da resposta imune nos asmáticos infectados envolve a IL-10, uma vez que além desta citocina ser produzida em altas concentrações (Araujo e cols. 2004), também ocorre o aumento na expressão do seu receptor, como demonstramos neste trabalho.

Avaliando a expressão de HLA-DR nos monócitos de indivíduos asmáticos foi observada maior expressão desta molécula nas células dos asmáticos infectados, sugerindo que a estimulação antigênica crônica com antígenos parasitários resulta em ativação dos monócitos, sem entretanto refletir na ativação de células T neste grupo de indivíduos. Trabalhos recentes têm demonstrado que indivíduos assintomáticos infectados cronicamente por *S. mansoni* apresentavam um aumento da porcentagem de células TCD8⁺HLA-DR⁺, enquanto que em indivíduos com a forma aguda da infecção havia um aumento da porcentagem de células TCD4⁺ HLA-DR⁺ (Martins-Filho e cols. 1999).

Mecanismos complexos envolvendo células regulatórias, citocinas e outras moléculas que interferem na ativação celular devem ter efeitos sinérgicos para a modulação do processo inflamatória na asma.

11. CONCLUSÕES

A modulação da resposta imune observada em indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, envolve a IL-10 produzida por vários tipos celulares, a exemplo das células TCD4⁺, TCD4⁺CD25⁺, TCD8⁺ e CD14⁺. Nos indivíduos com asma leve, o aumento na expressão de CTLA-4 poderá representar um mecanismo de modulação da resposta inflamatória alérgica. O conhecimento destes mecanismos pode resultar em desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas nas doenças alérgicas.

12. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento encorajam a continuação do estudo dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Os aspectos funcionais das células e moléculas envolvidos nestes mecanismos serão avaliados através de:

1. Efeito do bloqueio da IL-10 e TGF- β nas culturas de células mononucleares de asmáticos infectados sobre a expressão de moléculas de superfície de linfócitos T (CD25, CTLA-4, CD28 e CD40L), B (CD40) e monócitos (CD80, CD86, HLA-DR e IL-10R);

2. Efeito da adição de IL-10 recombinante humano (rhIL-10) e / ou rhTGF- β em cultura de células mononucleares de asmáticos não infectados sobre a produção de IL-4 e IL-5 e sobre a expressão da moléculas de superfície de linfócitos T (CD25, CTLA-4, CD28 e CD40L), B (CD40) e monócitos (CD80, CD86, HLA-DR e IL-10R);

3. Influência do tratamento com anti-helmínticos na expressão de moléculas de superfície de linfócitos T (CD25, CTLA-4, CD28 e CD40L), B (CD40) e monócitos (CD80, CD86, HLA-DR e IL-10R);

4. Avaliação da produção de IL-10 e TGF- β em cultura de células mononucleares de asmáticos infectados, depletadas de células TCD4⁺, CD4⁺CD25⁺, TCD8⁺ e CD14⁺;

5. Avaliação da expressão de *Foxp3* e GITR em células CD4⁺CD25⁺ de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e asmáticos não infectados.

13. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Adachi, M., N. Oda, F. Kokubu and K. Minoguchi (1999). "IL-10 induces a Th2 cell tolerance in allergic asthma." Int Arch Allergy Immunol **118**(2-4): 391-4.
- Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2002). "Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity." Nat Med **8**(9): 1024-32.
- Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2003). "Role of regulatory T cells in allergy and asthma." Curr Opin Immunol **15**(6): 627-33.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich and K. Blaser (1998). "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." J Clin Invest **102**(1): 98-106.
- Almeida, M. C. F. d. (2004). Influência do tratamento das helmintíases na gravidade da asma. Departamento de Medicina. Salvador, Universidade Federal da Bahia.
- Araujo, M. I., O. Bacellar, A. Ribeiro-de-Jesus and E. M. Carvalho (1994). "The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis." Braz J Med Biol Res **27**(7): 1619-25.
- Araujo, M. I., A. R. de Jesus, O. Bacellar, E. Sabin, E. Pearce and E. M. Carvalho (1996). "Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis." Eur J Immunol **26**(6): 1399-403.
- Araujo, M. I., B. Hoppe, M. Medeiros, Jr., L. Alcantara, M. C. Almeida, A. Schriefer, R. R. Oliveira, R. Kruschewsky, J. P. Figueiredo, A. A. Cruz and E. M. Carvalho (2004). "Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma." J Infect Dis **190**(10): 1797-1803.
- Araujo, M. I., A. A. Lopes, M. Medeiros, A. A. Cruz, L. Sousa-Atta, D. Sole and E. M. Carvalho (2000). "Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection." Int Arch Allergy Immunol **123**(2): 145-8.
- Asher, M. I. and S. K. Weiland (1998). "The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee." Clin Exp Allergy **28 Suppl 5**: 52-66; discussion 90-1.

- Bretscher, P. and M. Cohn (1970). "A theory of self-nonsel self discrimination." Science **169**(950): 1042-9.
- Brossay, L., M. Chioda, N. Burdin, Y. Koezuka, G. Casorati, P. Dellabona and M. Kronenberg (1998). "CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution." J Exp Med **188**(8): 1521-8.
- Carmo, E. (1999). Morbidade e mortalidade por esquistossomose mansônica na região Nordeste do Brasil. Istituto de Saúde Coletiva. Salvador, Universidade Federal da Bahia.
- Castigli, E., F. W. Alt, L. Davidson, A. Bottaro, E. Mizoguchi, A. K. Bhan and R. S. Geha (1994). "CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12135-9.
- Catapani, W. R., P. L. Pinto, V. Amato-Neto and E. Mendes (1997). "Prevalence of allergic diseases in patients with schistosomiasis mansoni." J Allergy Clin Immunol **100**(1): 142.
- Cheever, A. W., K. F. Hoffmann and T. A. Wynn (2000). "Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men." Immunol Today **21**(9): 465-6.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor and L. Savioli (2000). "The global status of schistosomiasis and its control." Acta Trop **77**(1): 41-51.
- Cooper, P. J., M. E. Chico, M. Bland, G. E. Griffin and T. B. Nutman (2003). "Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador." Am J Respir Crit Care Med **168**(3): 313-7.
- Cooper, P. J., M. E. Chico, C. Sandoval, I. Espinel, A. Guevara, M. W. Kennedy, J. F. Urban Jr, G. E. Griffin and T. B. Nutman (2000). "Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response." J Infect Dis **182**(4): 1207-13.
- Cooper, P. J., M. E. Chico, C. Sandoval and T. B. Nutman (2004). "Atopic phenotype is an important determinant of immunoglobulin E-mediated inflammation and expression of T helper cell type 2 cytokines to ascaris antigens in children exposed to ascariasis." J Infect Dis **190**(7): 1338-46.

- Costello, R. T., F. Mallet, D. Sainty, D. Maraninchi, J. A. Gastaut and D. Olive (1998). "Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition." Eur J Immunol **28**(1): 90-103.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, R. L. Coffman and H. Groux (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." J Immunol **165**(9): 4848-53.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2002). "CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy." Curr Opin Immunol **14**(6): 771-8.
- de Jesus, A. M., R. P. Almeida, O. Bacellar, M. I. Araujo, C. Demeure, J. C. Bina, A. J. Dessen and E. M. Carvalho (1993). "Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis." Eur J Immunol **23**(1): 152-8.
- de Jesus, A. R., A. Silva, L. B. Santana, A. Magalhaes, A. A. de Jesus, R. P. de Almeida, M. A. Rego, M. N. Burattini, E. J. Pearce and E. M. Carvalho (2002). "Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni." J Infect Dis **185**(1): 98-105.
- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-60.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz and G. Schuler (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." J Exp Med **196**(2): 247-53.
- Djukanovic, R. (2000). "The role of co-stimulation in airway inflammation." Clin Exp Allergy **30 Suppl 1**: 46-50.
- Doetze, A., J. Satoguina, G. Burchard, T. Rau, C. Loliger, B. Fleischer and A. Hoerauf (2000). "Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift." Int Immunol **12**(5): 623-30.
- Ebner, C., U. Siemann, B. Bohle, M. Willheim, U. Wiedermann, S. Schenk, F. Klotz, H. Ebner, D. Kraft and O. Scheiner (1997). "Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to

- allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen." *Clin Exp Allergy* **27**(9): 1007-15.
- Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause and J. F. Urban, Jr. (1997). "Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models." *Annu Rev Immunol* **15**: 505-33.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* **170**(6): 2081-95.
- Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Matthaei and I. G. Young (1996). "Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model." *J Exp Med* **183**(1): 195-201.
- Fraser, E. M., J. F. Christie and M. W. Kennedy (1993). "Heterogeneity amongst infected children in IgE antibody repertoire to the antigens of the parasitic nematode *Ascaris*." *Int Arch Allergy Immunol* **100**(3): 283-6.
- Gazzinelli, G. and D. G. Colley (1992). "Human immune responses during schistosomiasis mansoni." *Rev Soc Bras Med Trop* **25**(2): 125-34.
- Geiger, S. M., C. L. Massara, J. Bethony, P. T. Soboslay, O. S. Carvalho and R. Correa-Oliveira (2002). "Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients." *Parasite Immunol* **24**(11-12): 499-509.
- Gleich, G. J., C. R. Adolphson and K. M. Leiferman (1993). "The biology of the eosinophilic leukocyte." *Annu Rev Med* **44**: 85-101.
- Godfrey, R. C. (1975). "Asthma and IgE levels in rural and urban communities of The Gambia." *Clin Allergy* **5**(2): 201-7.
- Green, J. M. (2000). "The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway. Implications for inflammatory lung disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**(3): 261-4.
- Groux, H. (2001). "An overview of regulatory T cells." *Microbes Infect* **3**(11): 883-9.
- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." *J Exp Med* **184**(1): 19-29.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.

- Hagel, I., N. R. Lynch, M. Perez, M. C. Di Prisco, R. Lopez and E. Rojas (1993). "Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection." Parasite Immunol **15**(6): 311-5.
- Hamzaoui, A., N. Chaouch, H. Grairi, J. Ammar and K. Hamzaoui (2005). "Inflammatory Process of CD8(+) CD28(-) T Cells in Induced Sputum From Asthmatic Patients." Mediators Inflamm **2005**(3): 160-6.
- Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." J Clin Invest **103**(2): 175-83.
- Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2000). "CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation." J Clin Invest **105**(1): 61-70.
- Hesse, M., C. A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Prufer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A. W. Cheever, E. M. Shevach and T. A. Wynn (2004). "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells." J Immunol **172**(5): 3157-66.
- Hirsch, C. and A. M. Goes (1996). "Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro." Parasitology **112 (Pt 6)**: 529-35.
- Hirsch, C., C. S. Zouain, J. B. Alves and A. M. Goes (1997). "Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm." Parasitology **115 (Pt 1)**: 21-8.
- Hirst, S. J. (2000). "Airway smooth muscle as a target in asthma." Clin Exp Allergy **30 Suppl 1**: 54-9.
- Holgate, S. T. (2000). "Epithelial damage and response." Clin Exp Allergy **30 Suppl 1**: 37-41.
- Holt, P. G., C. Macaubas, P. A. Stumbles and P. D. Sly (1999). "The role of allergy in the development of asthma." Nature **402**(6760 Suppl): B12-7.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.

- Hussain, R., R. W. Poindexter and E. A. Ottesen (1992). "Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass." J Immunol **148**(9): 2731-7.
- IOM (2000). "Clearing the Air, Asthma and Indoor Air Exposures." National Academy Press.
- Jarrett, E. E. and H. R. Miller (1982). "Production and activities of IgE in helminth infection." Prog Allergy **31**: 178-233.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop and A. H. Enk (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.
- Katagiri, K., J. Zhang-Hoover, J. S. Mo, J. Stein-Streilein and J. W. Streilein (2002). "Using tolerance induced via the anterior chamber of the eye to inhibit Th2-dependent pulmonary pathology." J Immunol **169**(1): 84-9.
- Katz, N., P. M. Coelho and J. Pellegrino (1970). "Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces." J Parasitol **56**(5): 1032-3.
- Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto and H. Kikutani (1994). "The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **1**(3): 167-78.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med **163**(5): 1037-50.
- Kennedy, M. W. and F. Qureshi (1986). "Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode *Ascaris*." Immunology **58**(3): 515-22.
- Kimzey, S. L., P. Liu and J. M. Green (2004). "Requirement for CD28 in the effector phase of allergic airway inflammation." J Immunol **173**(1): 632-40.
- King, C. L., A. Medhat, I. Malhotra, M. Nafeh, A. Helmy, J. Khaudary, S. Ibrahim, M. El-Sherbiny, S. Zaky, R. J. Stupi, K. Brustoski, M. Shehata and M. T. Shata (1996). "Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity." J Immunol **156**(12): 4715-21.

- Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi and L. H. Glimcher (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." Cell **80**(5): 707-18.
- Lambertucci, J. R. (1993). "Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **35**(5): 399-404.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." Annu Rev Immunol **16**: 137-61.
- Lynch, N. R., I. Hagel, M. Perez, M. C. Di Prisco, R. Lopez and N. Alvarez (1993). "Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum." J Allergy Clin Immunol **92**(3): 404-11.
- Lynch, N. R., R. I. Lopez, M. C. Di Prisco-Fuenmayor, I. Hagel, L. Medouze, G. Viana, C. Ortega and G. Prato (1987). "Allergic reactivity and socio-economic level in a tropical environment." Clin Allergy **17**(3): 199-207.
- Lynch, N. R., M. Perez, R. I. Lopez and K. J. Turner (1987). "Measurement of anti-Ascaris IgE antibody levels in tropical allergic patients, using modified ELISA." Allergol Immunopathol (Madr) **15**(1): 19-24.
- MacDonald, A. S., E. A. Patton, A. C. La Flamme, M. I. Araujo, C. R. Huxtable, B. Bauman and E. J. Pearce (2002). "Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction." J Immunol **168**(9): 4643-9.
- Mandelbrot, D. A., A. J. McAdam and A. H. Sharpe (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." J Exp Med **189**(2): 435-40.
- Martins-Filho, O. A., J. R. Cunha-Melo, J. R. Lambertucci, A. M. Silveira, D. G. Colley, G. Gazzinelli and R. Correa-Oliveira (1999). "Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules." Dig Dis Sci **44**(3): 570-7.
- Massague, J., S. Cheifetz, M. Laiho, D. A. Ralph, F. M. Weis and A. Zentella (1992). "Transforming growth factor-beta." Cancer Surv **12**: 81-103.
- Matsuda, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh and M. Kronenberg (2002). "Homeostasis of V alpha 14i NKT cells." Nat Immunol **3**(10): 966-74.

- McKee, A. S. and E. J. Pearce (2004). "CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development." J Immunol **173**(2): 1224-31.
- Medeiros, M., Jr., J. P. Figueiredo, M. C. Almeida, M. A. Matos, M. I. Araujo, A. A. Cruz, A. M. Atta, M. A. Rego, A. R. de Jesus, E. A. Taketomi and E. M. Carvalho (2003). "Schistosoma mansoni infection is associated with a reduced course of asthma." J Allergy Clin Immunol **111**(5): 947-51.
- Mehlhop, P. D., M. van de Rijn, J. P. Brewer, A. B. Kisselgof, R. S. Geha, H. C. Oettgen and T. R. Martin (2000). "CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(5): 646-51.
- Merrett, T. G., J. Merrett and J. B. Cookson (1976). "Allergy and parasites: the measurement of total and specific IgE levels in urban and rural communities in Rhodesia." Clin Allergy **6**(2): 131-4.
- Montenegro, S. M., P. Miranda, S. Mahanty, F. G. Abath, K. M. Teixeira, E. M. Coutinho, J. Brinkman, I. Goncalves, L. A. Domingues, A. L. Domingues, A. Sher and T. A. Wynn (1999). "Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens." J Infect Dis **179**(6): 1502-14.
- Nyan, O. A., G. E. Walraven, W. A. Banya, P. Milligan, M. Van Der Sande, S. M. Ceesay, G. Del Prete and K. P. McAdam (2001). "Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities." Clin Exp Allergy **31**(11): 1672-8.
- Ohkawara, Y., K. G. Lim, Z. Xing, M. Glibetic, K. Nakano, J. Dolovich, K. Croitoru, P. F. Weller and M. Jordana (1996). "CD40 expression by human peripheral blood eosinophils." J Clin Invest **97**(7): 1761-6.
- Ottesen, E. A., R. W. Poindexter and R. Hussain (1981). "Detection, quantitation, and specificity of antiparasite IgE antibodies in human schistosomiasis mansoni." Am J Trop Med Hyg **30**(6): 1228-37.
- Platts-Mills, T., J. Vaughan, S. Squillace, J. Woodfolk and R. Sporik (2001). "Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study." Lancet **357**(9258): 752-6.

- Platts-Mills, T. A. and L. M. Wheatley (1996). "The role of allergy and atopy in asthma." Curr Opin Pulm Med **2**(1): 29-34.
- Pretolani, M. and M. Goldman (1997). "IL-10: a potential therapy for allergic inflammation?" Immunol Today **18**(6): 277-80.
- Rabello, A. L., M. M. Garcia, R. A. Pinto da Silva, R. S. Rocha and N. Katz (1997). "Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment." Clin Infect Dis **24**(3): 304-8.
- Raber, M. N. (1988). "Clinical applications of flow cytometry." Oncology (Williston Park) **2**(3): 35-43, 47.
- Randolph, D. A., C. J. Carruthers, S. J. Szabo, K. M. Murphy and D. D. Chaplin (1999). "Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma." J Immunol **162**(4): 2375-83.
- Read, S. and F. Powrie (2001). "CD4(+) regulatory T cells." Curr Opin Immunol **13**(6): 644-9.
- Romagnani, S. (1997). "Atopic allergy and other hypersensitivities interactions between genetic susceptibility, innocuous and/or microbial antigens and the immune system." Curr Opin Immunol **9**(6): 773-5.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, J. J. Guillosson, J. P. Kantelip and M. Arock (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." Clin Exp Allergy **31**(5): 694-704.
- Sabin, E. A., M. I. Araujo, E. M. Carvalho and E. J. Pearce (1996). "Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*." J Infect Dis **173**(1): 269-72.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Schandene, L., C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, R. Devos, M. de Boer and M. Goldman (1994). "B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10." J Immunol **152**(9): 4368-74.
- Scrivener, S., H. Yemaneberhan, M. Zebenigus, D. Tilahun, S. Girma, S. Ali, P. McElroy, A. Custovic, A. Woodcock, D. Pritchard, A. Venn and J. Britton (2001). "Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure

- on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study." Lancet **358**(9292): 1493-9.
- Sears, M. R. (1997). "Epidemiology of childhood asthma." Lancet **350**(9083): 1015-20.
- Sher, A., D. Fiorentino, P. Caspar, E. Pearce and T. Mosmann (1991). "Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection." J Immunol **147**(8): 2713-6.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol **3**(2): 135-42.
- Smith, D. H., D. C. Malone, K. A. Lawson, L. J. Okamoto, C. Battista and W. B. Saunders (1997). "A national estimate of the economic costs of asthma." Am J Respir Crit Care Med **156**(3 Pt 1): 787-93.
- Sporn, M. B., A. B. Roberts, L. M. Wakefield and R. K. Assoian (1986). "Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure." Science **233**(4763): 532-4.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." Bmj **299**(6710): 1259-60.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-80.
- Takanashi, S., R. Nonaka, Z. Xing, P. O'Byrne, J. Dolovich and M. Jordana (1994). "Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils." J Exp Med **180**(2): 711-5.
- Tsuyuki, S., J. Tsuyuki, K. Einsle, M. Kopf and A. J. Coyle (1997). "Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness." J Exp Med **185**(9): 1671-9.
- Umetsu, D. T., O. Akbari and R. H. Dekruyff (2003). "Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma." J Allergy Clin Immunol **112**(3): 480-7; quiz 488.
- van den Biggelaar, A. H., R. van Ree, L. C. Rodrigues, B. Lell, A. M. Deelder, P. G. Kremsner and M. Yazdanbakhsh (2000). "Decreased atopy in children infected

- with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10." Lancet **356**(9243): 1723-7.
- Von Ehrenstein, O. S., E. Von Mutius, S. Illi, L. Baumann, O. Bohm and R. von Kries (2000). "Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers." Clin Exp Allergy **30**(2): 187-93.
- Wahl, S. M. (1992). "Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure." J Clin Immunol **12**(2): 61-74.
- Wahl, S. M. (1994). "Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly." J Exp Med **180**(5): 1587-90.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." Immunity **1**(5): 405-13.
- Weiner, H. L. (1997). "Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases." Annu Rev Med **48**: 341-51.
- WHO/TDR (2002). Strategic Direction for Research: Schistosomiasis.
- Williams, M. E., S. Montenegro, A. L. Domingues, T. A. Wynn, K. Teixeira, S. Mahanty, A. Coutinho and A. Sher (1994). "Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens." J Infect Dis **170**(4): 946-54.
- Wills-Karp, M. (1999). "Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness." Annu Rev Immunol **17**: 255-81.
- Wills-Karp, M., J. Santeliz and C. L. Karp (2001). "The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis." Nat Rev Immunol **1**(1): 69-75.
- Wilson, S. B. and T. L. Delovitch (2003). "Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity." Nat Rev Immunol **3**(3): 211-22.
- Xu, J., T. M. Foy, J. D. Laman, E. A. Elliott, J. J. Dunn, T. J. Waldschmidt, J. Elsemore, R. J. Noelle and R. A. Flavell (1994). "Mice deficient for the CD40 ligand." Immunity **1**(5): 423-31.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner and R. van Ree (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science **296**(5567): 490-4.
- Yemaneberhan, H., Z. Bekele, A. Venn, S. Lewis, E. Parry and J. Britton (1997). "Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia." Lancet **350**(9071): 85-90.

- Yssel, H., S. Lecart and J. Pene (2001). "Regulatory T cells and allergic asthma." Microbes Infect **3**(11): 899-904.
- Zouain, C. S., P. L. Falcao, T. S. Goes, M. F. Leite and A. M. Goes (2004). "Schistosoma mansoni PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans." Immunol Lett **91**(2-3): 113-8.
- Zouain, C. S., S. Gustavson, S. C. Oliveira, V. Azevedo, J. B. Alves and A. M. Goes (2001). "The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in Schistosoma mansoni P24-immunized mice." Vaccine **19**(9-10): 11218-24.
- Zuany-Amorim, C., C. Creminon, M. C. Nevers, M. A. Nahori, B. B. Vargaftig and M. Pretolani (1996). "Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity." J Immunol **157**(1): 377-84.

14. ANEXO

SERVIÇO DE IMUNOLOGIA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente estudo tem a finalidade de avaliar a associação entre a asma e a infecção por helmintos e você está sendo selecionado para participar deste estudo, na condição de voluntário.

Esta participação, implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de alergia e parasitoses, que consistem em: responder a um questionário com perguntas sobre alergias, submeter-se a exames clínicos, além da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

Serão colhidas amostras de 20mL de sangue venoso, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Pretendemos dosar no sangue a presença de algumas proteínas que podem se elevar ou não nas doenças alérgicas e parasitárias. Quando da marcação do dia do exame, o voluntário receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais, você será tratado gratuitamente e, no caso de observarmos a presença de doença alérgica, você receberá instruções para o tratamento da mesma.

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Maria Ilma Araujo, coordenadora do projeto, médica do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua Augusto Viana, s/n – Canela, telefone (071)237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Ambulatório Magalhães Neto, na pessoa do Dr. Antônio Barata, no endereço Rua Padre Feijó, 240

- Canela. Caso você decida deixar de participar do estudo em qualquer momento, mesmo depois de assinar este consentimento, você continuará, sem prejuízos, sendo acompanhado pelo Serviço de Imunologia.

Afirmo que compreendi o que está escrito acima e concordo em participar deste projeto de pesquisa, voluntariamente.

_____, ____/____/____.

Assinatura: _____ Ficha n.º: _____

Nome: _____