

Avanços da Pesquisa em Imunologia na Bahia

30 anos de contribuição do Programa de
Pós-Graduação em Imunologia da UFBA

Silvia Lima Costa
(Organizadora)



Coleção E-Livro

**Avanços da Pesquisa em
Imunologia na Bahia**
30 Anos de contribuição do Programa de
Pós-Graduação em Imunologia da UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Reitor

João Carlos Salles Pires da Silva

Vice-reitor

Paulo Cesar Miguez de Oliveira

Assessor do Reitor

Paulo Costa Lima

EDITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Diretora

Flávia Goullart Mota Garcia Rosa

Conselho Editorial

Alberto Brum Novaes

Angelo Szaniecki Perret Serpa

Caiuby Alves da Costa

Charbel Ninõ El-Hani

Cleise Furtado Mendes

Evelina de Carvalho Sá Hoisel

José Teixeira Cavalcante Filho

Maria do Carmo Soares de Freitas

Maria Vidal de Negreiros Camargo

EDUFBA

Rua Barão de Jeremoabo, s/n Campus de Ondina

40170-115 Salvador-BA

Tel: (71) 3283-6160/6164

edufba@ufba.br

www.edufba.ufba.br

Silvia Lima Costa
Organizadora

**Avanços da Pesquisa em
Imunologia na Bahia**
30 Anos de contribuição do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia da UFBA

Salvador
EDUFBA
2019

2019, Autores.

Direitos para esta edição cedidos à EDUFBA.

Feito o depósito legal.

Grafia atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, em vigor no Brasil desde 2009.

Projeto Gráfico

Angela Garcia Rosa e Josias Almeida Jr.

Capa e Editoração

Josias Almeida Jr.

Revisão e Normalização

Tikinet

Sistema de Bibliotecas – SIBI/UFBA

A946 Avanços da pesquisa em Imunologia na Bahia: 30 anos de contribuição do Programa de Pós-Graduação em Imunologia da UFBA / Sílvia Lima Costa, organizadora. _ Salvador: EDUFBA, 2019.

Trata-se de uma obra eBook no formato epub.

Modo de acesso: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/30950>

ISBN 978-85-232-1963-5 (Coleção E-livro)

1. Pesquisa imunológica - Bahia. I. Costa, Sílvia Lima (org.)

CDU – 577.27:167

Elaborada por Geovana Soares Lira
CRB-5: BA-001975/O

Editora filiada à


ASOCIACION DE EDITORIALES
UNIVERSITARIAS DE AMERICA
LATINA Y EL CARIBE


Associação Brasileira
das Editoras Universitárias


Câmara Bahiana do Livro

Sumário

Apresentação	7
Estudo da resposta imune associada ao vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): avanços e contribuição do PPGIM	9
Hepatite C crônica e autoimunidade: autoanticorpos não órgão-específicos e crioglobulinas	31
Infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i> : resposta imune associada à patogênese e proteção do hospedeiro	43
Periodontite crônica: resposta imune contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>	71
Receptores <i>toll like</i> (TLR) e a resposta imune na atopia e asma brônquica	87
Impacto de polimorfismos em genes imunorregulatórios na asma e atopia	117
Produtos naturais e seus derivados: propriedades farmacológicas e potencial aplicação no tratamento da asma alérgica	139
Infecção de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em humanos	157
Regulação Neuroendócrina do sistema imune nas leishmanioses	163
Aspectos da interação neurônio-glia, sob a ótica da resposta inflamatória a um protozoário intracelular	189
Flavonoides como potenciais agentes anti-tumorais e imunomoduladores para tratamento de tumores gliais malignos	203
Bioprospecção farmacológica de flavonoides como agentes imunomoduladores e neuroprotetores para doenças neurodegenerativas: uma emergente linha de pesquisa do PPGIM	221

Tópicos avançados em bioética e biossegurança – ICSC52: história da criação, constante adaptação e atualização do componente curricular obrigatório aos cursos de mestrado e doutorado em imunologia no PPGIM – UFBA	263
Sobre os autores	281

Apresentação

O Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI_m) desde sua implantação em 1989 (Mestrado) e 1998 (Doutorado), até o presente, tem cumprido a sua missão de formar mestres e doutores na área de Imunologia visando a inserção de egressos em ensino de graduação/pós-graduação, em pesquisa, em serviços especializados em Imunologia e em áreas correlatas. O corpo docente é formado por professores e pesquisadores com titulação diversificada e multidisciplinar (Imunologia, Bioquímica, Biologia, Farmacologia, Parasitologia, Neurociências, Biofísica, Genética, Hematologia, Gastroenterologia, Infectologia, Odontologia), reunindo profissionais que convergem pesquisa para foco em Imunologia Básica ou Aplicada, bem como, para áreas afins à imunologia, atuando nas linhas de Pesquisa do Programa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Imunodeficiência e Imunopatologia, Imunogenética Genômica e Proteômica, Imunologia Aplicada, e Neuroimunologia/Neuroimunoendocrinologia. Neste e livro traremos uma retrospectiva de estudo das diferentes linhas de pesquisa tradicionais e mais recentemente implantadas, incluindo avanços no entendimento da resposta imune a doenças infecciosas e parasitárias, como por exemplo causadas pelo vírus linfotrópico de células t humanas tipo 1 (HTLV-1), e vírus da hepatite C crônica e sua relação com autoimunidade, infecção e resposta imune ao *Coninebacterium pseudotuberculosis*, resposta imune associada ao *Schistosoma mansoni*, ao *Neospora caninum*, e à Leishmanias. Também serão abordados aspectos relacionadas à compreensão de marcadores genéticos e resposta imune associada a processos fisiopatológicos da asma e atopia, resposta imune associada ao crescimento de tumores cerebrais gliais malignos e estabelecimento de doenças neurodegenerativas, assim como o avanço no entendimento de possíveis alvos terapêuticos e desenvolvimento de fármacos para estas patologias. Finalmente traremos uma reflexão sobre Bioética e Biosegurança, importantes aspectos relacionados à pesquisa em humanos e animais.

Estudo da resposta imune associada ao vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): avanços e contribuição do PPGIM

Silvane Maria Braga Santos, Edgar Marcelino De Carvalho

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito, sendo inicialmente associado a uma leucemia de células T em adultos. Em seguida, foi isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T e somente depois associado a doenças neurológicas. (Osame et al., 1986; Poiesz et al., 1980; Uchiyama, Yodoi, Sagawa, Takatsuki, & Uchino, 1977) Similar a outros retrovírus, o HTLV-1 é envelopado e constituído por duas fitas de ácido ribonucleico (RNA), que utiliza a enzima transcriptase reversa para transcrever o RNA viral em ácido desoxirribonucleico (DNA) proviral e integrar-se no genoma da célula hospedeira. O genoma do HTLV-1 possui 9032 pares de base e, além das regiões comuns a outros retrovírus, possui uma área que codifica produtos gênicos únicos do vírus. Nas extremidades do genoma, observam-se as longas terminações repetidas (LTR, 5' e 3') – e, no centro, regiões que codificam um grupo de genes estruturais (gag, pol e env), além da área pX, que codifica produtos gênicos específicos do HTLV-1 (tax e rex). O principal deles é o gene tax, que ativa a transcrição das LTR, aumentando a replicação viral e a expressão de vários genes celulares na célula hospedeira.

Pelo fato de pertencerem à mesma família, os retrovírus, muitas vezes o HTLV-1 é confundido com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Embora apresentem as mesmas formas de transmissão, várias características biológicas diferem um do outro. Ao contrário do HIV, o HTLV-1 apresenta uma taxa de replicação muito lenta, e a infecção é caracterizada por um estímulo persistente que leva à proliferação linfocitária. Na infecção pelo HTLV-1, somente uma minoria dos indivíduos infectados desenvolve a doença (3-5%), e nem sempre se observa imunossupressão.

Epidemiologia

Estima-se que de 10 a 20 milhões de pessoas no mundo são portadoras do HTLV-1. (Gessain & Cassar, 2012) A infecção é endêmica do sudeste do Japão, do Caribe, da região central da África, da Oceania e do Oriente Médio. A América do Sul também é considerada na lista, com registros de casos na Colômbia, no Equador, no Peru, na Bolívia na Argentina, no Chile e no Brasil. Aqui, a distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 é bastante heterogênea: o vírus está presente em quase todos os estados brasileiros, com estimativa de 2,5 milhões de indivíduos infectados, tornando o país um dos com maior número de casos. (Carneiro-Proietti, Catalan-Soares, Proietti, & Interdisciplinary HTLV-I/II Research Group [GIPH], 2002) Estudos realizados em doadores de sangue de diversas capitais brasileiras mostraram maior soroprevalência do HTLV-1 nas regiões Norte e Nordeste (Catalan-Soares, Carneiro-Proietti, Proietti, & Interdisciplinary HTLV Research Group, 2005); a cidade de Salvador, na Bahia, registra, entre doadores de sangue, uma das mais elevadas prevalências do HTLV-1, com média de 1,35%. (Galvão-Castro et al., 1997) Esse valor é ainda maior na população geral: um estudo multicêntrico registrou que 1,8% dela está infectada, de modo que cerca de 40.000 pessoas podem ser portadoras do vírus. (Dourado, Alcantara, Barreto, Teixeira, & Galvão-Castro, 2003)

Os mecanismos mais comuns de transmissão do HTLV-1 são: o contato sexual com troca de fluidos corporais, sendo mais frequentemente transmitida do homem para a mulher; a via perinatal (da mãe para o filho), predominantemente por meio da amamentação, podendo ocorrer também durante o parto; pela via parenteral; por transfusão

sanguínea; e pelo contato com e/ou compartilhamento de objetos contaminados com sangue (seringas, agulhas, alicates de unha etc.).

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é feito inicialmente com testes sorológicos que detectam anticorpos contra o vírus utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa). Existe a necessidade da realização de dois testes de Elisa com resultado positivo para continuar a investigação. A confirmação é feita pelo teste de *Western blot*, capaz de discriminar se a infecção se dá pelo HTLV-1 ou HTLV-2. Em alguns casos, esses procedimentos não são suficientes para o diagnóstico, sendo então necessário recorrer a testes moleculares, nos quais a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), capaz de detectar o material genético proviral, é a mais utilizada.

Interação do HTLV-1 com o sistema imune

O HTLV-1 é um retrovírus com capacidade de infectar vários tipos celulares, sendo os linfócitos T CD4 e T CD8 considerados os principais alvos desse agente. Recentemente, foi demonstrado que, além dos linfócitos T, os linfócitos B, os monócitos, as células *natural killer* e as células dendríticas também são facilmente infectadas pelo HTLV-1. (Jones, Petrow-Sadowski, Huang, Bertolette, & Ruscetti, 2008; Richardson, Edwards, Cruickshank, Rudge, & Daigleish, 1990) Uma vez infectadas, as células T incorporam o HTLV-1 em seu genoma e a proteína viral Tax altera as vias de ativação e morte celular, levando a uma ativação celular persistente e a uma resposta exacerbada das células hospedeiras. Os efeitos da Tax incluem ativação de grupos específicos de genes celulares e repressão de outros e promoção do ciclo celular.

A Tax é a mais importante proteína viral. Além de ser alvo da resposta imune, é essencial para a replicação do vírus e imortalização das células T. Ela induz a proliferação da célula hospedeira, aumentando a transcrição de vários genes celulares (IL-1, IL-2, IL-15, GMC-SF etc.) e diminui a apoptose. Como consequência, o que se observa, mesmo na ausência de estímulos exógenos, é a propagação espontânea de linfócitos T *in vitro* e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α). Essa ativação persistente das células do sistema imune se traduz no encontro de altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1 e

de uma frequência elevada de linfócitos T citotóxicos (LTC) específicos para Tax. (Hanon et al., 2000; Nagai et al., 2001)

Principais doenças associadas ao HTLV-1

O HTLV-1 é, reconhecidamente, o principal agente etiológico da leucemia de células T do adulto (ATL) e da mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). (Osame et al., 1986; Uchiyama et al., 1977) Embora a HAM/TSP e a ATL sejam os principais males associados ao HTLV-1, outras doenças inflamatórias – como a polimiosite, a poliartrite, a uveíte e a dermatite infecciosa em crianças – também têm sido relacionadas à infecção pelo vírus. (Edlich, Hill, & Williams, 2003)

ATL

A ATL, inicialmente descrita no Japão, está associada à transmissão vertical (aleitamento materno) e é caracterizada por uma linfoproliferação maligna devido ao crescimento clonal de células T CD4 infectadas. De maneira geral, os pacientes com ATL apresentam infiltração grave de células leucêmicas em vários órgãos e curta sobrevida. A ATL ocorre predominantemente em adultos após longo período de latência, com igual frequência entre homens e mulheres e idade média, para o início da doença, de 55 anos. Clinicamente a ATL é classificada em: *aguda* – de evolução rápida para o óbito (leucemia aguda), corresponde a aproximadamente 65% dos casos; *crônica* – caracterizada por intensa linfocitose, com os indivíduos apresentando maior sobrevida e correspondendo a mais ou menos 5% dos casos; *linfomatosa* – caracterizada por linfadenomegalia sem linfocitose, presente em 25% dos casos, e definida por intensa hipercalcemia e comprometimento dos linfonodos; e *forma indolente* ou *smoldering* – presente em aproximadamente 5% dos casos, com os indivíduos não apresentando linfocitose e tendo maior sobrevida. Vale ressaltar que qualquer uma dessas formas pode evoluir para a condição aguda, letal.

Os principais sintomas e sinais clínicos observados em um paciente com ATL são febre, dor abdominal, icterícia, perda de peso, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, hipercalcemia, infecções oportunistas

e lesões de pele (nódulos, placas ou lesões generalizadas). Uma importante característica laboratorial é o encontro de linfócitos atípicos, denominados de células em flor (*flowers cells*). Os mecanismos patogênicos da ATL ainda não são bem esclarecidos – entretanto, estudos indicam que a proteína viral Tax, em decorrência de sua capacidade transativadora, desempenha papel importante na patogênese da doença, levando a um descontrole da proliferação celular no qual se observa expansão oligo ou monoclonal de células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1, com fenótipo de células maduras e ativadas (CD4+CD25+).

HAM/TSP

Características clínicas

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica de início lento e insidioso, caracterizada por incapacidade neurológica. Ela acomete principalmente adultos acima de 40 anos, sendo mais frequente em mulheres do que em homens. A doença é caracterizada por rigidez e incapacidade dos membros (superiores e inferiores), que progride posteriormente para uma espasticidade muscular anormal. No processo de evolução da doença, são descritas constipação intestinal e diminuição da libido e da potência sexual. (Araújo & Silva, 2006)

Aspectos patogênicos

A HAM/TSP tem como característica marcante o comprometimento da medula torácica inferior, na qual se observa um intenso processo inflamatório, com predominância de linfócitos T CD4+ e CD8+, e um movimento de desmielinização. Sua patogênese está relacionada à invasão das células infectadas no sistema nervoso central (SNC) e indução de resposta inflamatória local e crônica. Apesar dos avanços, nem todos os mecanismos responsáveis pela patogênese da HAM/TSP são conhecidos. Várias hipóteses foram propostas para explicar o papel do HTLV-1 no desenvolvimento da doença: a mais aceita é a do dano circundante ou *bystanter*, que propõe que os linfócitos T CD4+ infectados e os linfócitos T CD8+ específicos para a Tax atravessariam a barreira hematoencefálica e produziram grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, levando a um processo de intensa inflamação e destruição tecidual. (Nagai & Osame, 2003; Osame, 2002)

Durante esse processo, ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , a IFN- γ e a IL-1, capazes de induzir, em diferentes tipos celulares e, principalmente, nas células endoteliai, a expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1. Elas são responsáveis por facilitar o contato das células sanguíneas e, assim, permitir a entrada de linfócitos ativados para o SNC. (Rieckmann, Altenhofen, Riegel, Baudewig, & Felgenhauer, 1997) Outras moléculas reconhecidas pelo envolvimento no recrutamento de células da resposta imune para os sítios inflamatórios são as quimiocinas. Estudos demonstram que essas moléculas são também responsáveis pela ativação da expressão de moléculas de adesão. Diversos trabalhos evidenciam o envolvimento das quimiocinas do tipo Th1 na patogênese de doenças inflamatórias e neurológicas. Na infecção pelo HTLV-1, observa-se aumento nas concentrações das quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL-9 e CXCL-10) no soro de pacientes com HAM/TSP quando comparados com portadores do HTLV-1 e controles. (Guerreiro et al., 2006) Ando et al. (2013) demonstraram que astrócitos presentes na medula de pacientes com HAM/TSP são responsáveis pela grande produção de CXCL10 no líquido e no soro. Adicionalmente, descreveram que células T CD4+ e IFN- γ + são responsáveis pelo aumento da concentração dessa quimiocina no líquido e no soro dos pacientes.

Determinantes de risco

Estudos indicam que tanto fatores virais quanto genéticos do hospedeiro influenciam na apresentação clínica da infecção e estão associados ao risco para HAM. Entre os fatores virais, foi documentado que alterações na estrutura do HTLV-1 (substituições de nucleotídeos no gene tax) estariam associadas ao risco para HAM. (Furukawa et al., 2000) Outro importante fator de risco é a carga proviral do HTLV-1, ou seja, a porcentagem de células mononucleares do sangue periférico que carregam o provírus do HTLV-1. Vários estudos apontam a associação entre a alta carga proviral e o desenvolvimento de HAM/TSP; a carga proviral, tanto no sangue periférico quanto no líquido, de pacientes com HAM/TSP é significativamente mais elevada do que a dos portadores, constituindo, assim, importante pré-requisito para o desenvolvimento da HAM/TSP. (Grassi et al., 2011; Nagai et al., 1998; Olindo et al.,

2005) O aumento da carga proviral é também observado em outras doenças associadas ao HTLV-1 como a dermatite infectiva. (Nascimento, 2009)

Estudos adicionais demonstraram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP, mas que apresentam alterações neurológicas isoladas, disfunção erétil ou manifestações urinárias, principalmente de bexiga hiperativa, têm carga proviral mais elevada do que os portadores assintomáticos. (Santos et al., 2012; Tanajura et al., 2015; Tannus et al., 2013) Trabalhos recentes demonstram que a carga proviral e o risco de HAM/TSP são diretamente influenciados pela eficiência da resposta imune celular contra o HTLV-1. Assim, uma resposta eficiente dos LTC CD8+ específicos para Tax manteria a população de células infectadas em equilíbrio, reduzindo a carga proviral, enquanto em uma resposta celular pouco eficiente a carga viral continuaria alta e os LTC, constantemente estimulados, produziram citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que participariam do processo patogênico da HAM/TSP. (Bangham, 2000) Como a resposta dos LTC apresenta variação individual, sugeriu-se também que fatores genéticos do hospedeiro poderiam estar implicados no controle da carga proviral e, portanto, influenciariam na susceptibilidade ou resistência à HAM/TSP. Os primeiros estudos genéticos foram realizados numa população japonesa, na qual se verificou que alelos específicos do HLA classe I (HLA-A*-02 e HLA-Cw*-08) teriam papel protetor, pois estavam associados à redução da carga proviral nos portadores assintomáticos e a uma menor chance de desenvolvimento de HAM/TSP. (Jeffery et al., 1999) Esses estudos não são conclusivos, e, para confirmar a participação de fatores genéticos do hospedeiro no desenvolvimento da HAM/TSP, outras investigações genéticas devem ser realizadas.

Outras doenças associadas ao HTLV-1

O HTLV-1 também tem sido associado a condições infecciosas, como a dermatite infectiva em crianças, a estrogiloidíase disseminada, a tuberculose e a sarna norueguesa. (Brites, Weyll, Pedroso, & Badaro, 2002; M.F. Oliveira et al., 2005; Porto, Muniz, Oliveira Júnior, & Carvalho, 2002; Verdonck et al., 2007) Como a maioria desses estudos foi realizada com uma casuísta pequena, continuam sendo necessários

trabalhos para comprovar a participação do HTLV-1 na etiologia dessas doenças.

De maneira geral, a infecção pelo HTLV-1 tem sido descrita como de baixa morbidade, algo devido principalmente ao argumento de que mais de 90% dos indivíduos infectados não desenvolvem a doença, sendo considerados como portadores assintomáticos do vírus. Um estudo desenvolvido no Serviço de Imunologia (SIM) descreveu, entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem diagnóstico de HAM/TSP, elevada frequência de manifestações neurológicas, artropatia, distúrbios urinários, disfunção erétil, gengivite, periodontite e síndrome seca quando estes foram comparados com indivíduos saudáveis, não infectados. (Caskey et al., 2007) Este artigo iniciou uma série de outros estudos (Castro et al., 2007; P. Oliveira et al., 2010; Poetker et al., 2011; Santos et al., 2012; Tanajura et al., 2015) que sugerem que a infecção pelo HTLV-1 possui espectro mais amplo do que o descrito na literatura (Figura 1).

5. Importância da resposta imune celular no controle da infecção pelo HTLV-1

A eficiência da resposta imune celular do hospedeiro diante da expressão de Tax é reconhecida como importante fator para o desenvolvimento da HAM/TSP. (Hanon et al., 2000) O envolvimento das células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1 foi descrito em estudos que mostravam aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IFN- γ , a TNF- α , a GM-CSF e a IL-1, pelas células T CD4+ de pacientes com HAM/TSP. (Nishiura et al., 1996) Carvalho et al. (2001), analisando o perfil de citocinas produzidas no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1, demonstrou que, quando comparadas com controles saudáveis, as células de indivíduos infectados apresentavam produção espontânea de citocinas tanto do tipo 1 (IFN- γ e TNF- α) como do tipo 2 (IL-5 e IL-10), secretadas principalmente por células T CD4+. Estudos adicionais comparando a resposta imune de portadores assintomáticos com a de pacientes com HAM/TSP demonstraram que, embora ambos os grupos apresentem grande variabilidade na produção espontânea de IFN- γ , os últimos mostram maior linfoproliferação e concentrações exageradas

dessa citocina, e que uma proporção significativa dos portadores assintomáticos apresentam padrão de resposta imune similar ao observado nos pacientes com mielopatia. (Santos et al., 2004) Os trabalhos descritos anteriormente confirmam o padrão de resposta imune do tipo 1 e sugerem a participação das citocinas pró-inflamatórias na patogênese da HAM/TSP. (Furukawa et al., 2003)

Uma resposta imune celular é dependente tanto das células T CD4+ como da atividade citotóxica dos LTC CD8+. Os LTC cronicamente ativados desempenham papel fundamental no reconhecimento e lise das células infectadas pelo HTLV-1. Assim, uma resposta eficiente dos LTC suprimiria a frequência de células expressando Tax e, consequentemente, reduziria a carga proviral do HTLV-1 de modo que essas células exerceriam papel protetor e diminuiriam o risco da HAM/TSP (Bangham & Osame, 2005); por outro lado, uma resposta imune intensa e exacerbada dessas células poderia contribuir para o dano tecidual observado no SNC dos pacientes com a doença. (Jacobson, 2002) Embora ainda não totalmente esclarecido, o encontro de elevada frequência de LTC específicos para o HTLV-1 no líquido e sangue periférico dos pacientes com HAM/TSP e a correlação direta entre frequência de LTC e produção de citocinas inflamatórias, como a IFN- γ , a TNF- α , a IL-15 e a IL-2, reforçam o papel dessa população de linfócitos na patogênese da HAM/TSP. (Azimi, Mariner, Jacobson, & Waldmann, 2000)

Mecanismos regulatórios da resposta imune contra o HTLV-1

A intensa produção de citocinas pró-inflamatórias está relacionada à reação inflamatória persistente observada na HAM/TSP. Dessa forma, o controle da resposta exagerada das células T contra o HTLV-1 é um mecanismo muito desejado, e pode ser resultado da atividade de células com ação regulatória. Um estudo avaliando subpopulações de células T com fenótipo regulatório (CD4+CD25+foxp3+) demonstrou que a ativação persistente da resposta imune, induzida por Tax, diminuía a expressão de células com função supressora e aumentava a população de células T CD4+ capazes de exacerbar o processo patogênico da HAM/TSP. (Yamano et al., 2009) Esses achados corroboram

outro estudo, que demonstrou a dificuldade de modulação da resposta imune dos pacientes com HAM/TSP quando comparados com portadores assintomáticos. A adição de citocinas e anticitocinas à cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1, na tentativa de redução da intensa produção espontânea de IFN- γ , mostrou que o L-10 e a adição simultânea de anti-IL-2 e anti-IL-15 eram capazes de reduzir a produção de IFN- γ somente nas culturas dos indivíduos assintomáticos (Santos et al., 2006), sugerindo ausência de modulação da resposta imune na HAM/TSP. A Figura 2 esquematiza os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese e na regulação da resposta imune na HAM/TSP.

Descrição da história natural da infecção pelo HTLV-1

A descrição da história natural da infecção pelo HTLV-1 na Bahia tem sido estudada numa coorte de indivíduos infectados pelo vírus e acompanhados no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1 do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos (Com-Hupes) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Desde 2004, mais de 500 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (com e sem HAM/TSP) são acompanhados nesse ambulatório, encaminhados de bancos de sangue ou clínicas específicas. Eles realizam avaliação clínica geral e exames específicos com os profissionais que compõem a equipe multidisciplinar (clínicos, infectologista, neurologistas, urologista, psicólogos, dermatologistas, dentistas, fisioterapeuta etc.) no momento de ingresso na coorte, a cada 12 meses ou quando houver desenvolvimento de um desfecho clínico. Nesses períodos são coletados, além dos dados clínicos e epidemiológicos, amostras de sangue para determinação da carga proviral e avaliação imunológica. Neste estudo de coorte, a piora dos sintomas neurológicos e o desenvolvimento de bexiga hiperativa ou HAM/TSP são considerados os principais desfechos clínicos.

Avanços no estudo da infecção pelo HTLV-1: mitos e verdades

A colaboração com a equipe do Serviço de Imunologia do Com-Hupes/UFBA possibilitou a obtenção de informações sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1 de indivíduos acompanhados no ambulatório multidisciplinar de HTLV-1 do Ambulatório Magalhães Neto. Com a disponibilidade dessas informações, foi possível realizar coletas de amostras para os alunos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI_m) desenvolverem suas pesquisas. Apesar de os dados da literatura descreverem que mais de 90% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores) não desenvolvem a doença, a maioria dos estudos realizados pelos alunos do PPGI_m, sob coordenação de seus orientadores, sugere que uma frequência elevada desses portadores apresenta alterações clínicas e imunológicas superiores ao que está descrito na literatura. Adicionalmente, os estudos imunológicos desenvolvidos nesse período apontam para a importância da exacerbação da resposta imune, com produção exagerada de citocinas e quimiocinas, além de alta carga proviral, como fator de risco para o desenvolvimento da principal doença ligada ao vírus, a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Embora as contribuições para o melhor entendimento dos aspectos patogênicos das doenças relacionadas ao HTLV-1 estudadas até o momento sejam relevantes, muitos questionamentos ainda persistem. O ambulatório de HTLV-1 do Com-Hupes acompanha a coorte de indivíduos infectados pelo vírus, na busca pela descrição da história natural da infecção, além de prestar uma importante assistência aos pacientes, e dá suporte às pesquisas desenvolvidas pelos alunos do PPGI_m. Adiante estão listadas as principais informações adquiridas de estudos clínicos e imunológicos obtidos até o momento. A ideia é que mitos relacionados à infecção pelo HTLV-1 sejam desfeitos e informações atuais, obtidas em nossa casuística, sejam apresentadas.

Mitos

1. 95% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 são considerados portadores assintomáticos do vírus, não desenvolvendo doença;

2. a infecção pelo HTLV-1 está associada a doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, polimiosites etc.

Verdades

1. Somente 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem HAM/TSP, ATL ou dermatite infectiva;
2. não procede a informação de que 95% dos indivíduos infectados são assintomáticos;
3. em torno de 30% dos portadores do HTLV-1, considerados assintomáticos, descrevem queixas de fraqueza dos membros (inferiores e superiores), dormência, artralgia, nocturia, disfunção erétil, gengivite, periodontite crônica e síndrome da boca seca (sicca síndrome);
4. sintomas urinários, principalmente de bexiga hiperativa, têm sido frequentemente observados nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que não preenchem os critérios para HAM/TSP;
5. há relatos de manifestações neurológicas (maior frequência de sinais e sintomas de dormência das pernas, urgência, incontinência, hiperreflexia, fraqueza das pernas e sinal de Babinski) entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP;
6. na Bahia, não tem sido observada associação do HTLV-1 com doenças autoimunes;
7. estudos clínicos e imunológicos têm confirmado a associação das manifestações neurológicas e dos sintomas urinários com a infecção pelo HTLV-1;
8. elevação da carga proviral e alta produção de citocinas pró-inflamatórias são marcadores de HAM/TSP, dermatite infectiva e bexiga hiperativa;
9. doenças relacionadas ao HTLV-1 ocorrem numa frequência muito alta (aproximadamente 60%) entre indivíduos infectados, de modo que os portadores assintomáticos do HTLV-1 representam uma minoria entre eles;
10. o controle da infecção pelo HTLV-1 tem sido negligenciado devido principalmente ao conceito errôneo de que é uma infecção de baixa morbidade.

Estratégias terapêuticas

Apesar dos avanços no estudo da resposta imune associada ao HTLV-1, estes não foram adequadamente aplicados na busca de alternativas terapêuticas capazes de controlar a infecção. Até o momento não existe uma terapêutica específica e eficaz, com capacidade de destruir o vírus e conter a infecção pelo vírus. Vários estudos foram realizados, utilizando glicocorticoides (prednisona, hidrocortisona etc.), interferon- α (similar ao usado na hepatite C), alguns inibidores de transcriptase reversa – como zidovudine e lamivudine –, inibidores de TNF- α (pentoxifilina, rolipran, talidomida etc.) e até anticorpos monoclonais – como a anti-IL-2 e anti-IL-2R (anti-Tac). Como a resposta imune é crítica na patogênese da HAM/TSP, as estratégias terapêuticas nas quais se busca a supressão da atividade, inibição da migração das células infectadas para a medula espinhal e redução do processo inflamatório crônico parecem constituir a melhor alternativa. É importante salientar que muitos dos ensaios terapêuticos realizados (randomizado, duplo cego e placebo controlado) não foram controlados, e foram feitos com número pouco expressivo de casos. Nenhuma droga utilizada está oficialmente aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), órgão responsável pelo controle de medicamentos – de forma que, até este momento, não se tem consenso sobre o melhor esquema terapêutico a ser utilizado. (Nakamura, 2009)

A conduta terapêutica atual baseia-se em minimizar os sintomas relacionados às doenças associadas, principalmente a HAM/TSP, de modo que a reabilitação física, o controle da bexiga neurogênica com profilaxia das infecções do trato urinário, o controle da disfunção erétil, o uso de drogas anti-espásticas, a prevenção da obstipação e o tratamento da dor neuropática têm sido as alternativas utilizadas no manejo dos pacientes com mielopatia.

Impacto social e medidas de controle e prevenção do HTLV-1

No Brasil, o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é feito comumente nos serviços de transfusão de sangue desde que a triagem sorológica para HTLV-1 foi instituída como obrigatória, em 1993. Alternativamente

o diagnóstico é realizado em setores especializados no atendimento de pacientes com problemas neurológicos ou leucemias. A abordagem a ser utilizada para passar o resultado do exame ao paciente deve ser cuidadosa, inicialmente por causa do grande desconhecimento com relação ao vírus, e depois por causa da forte associação do HTLV com o HIV, o que inevitavelmente pode estigmatizar o indivíduo. O ideal é que campanhas de esclarecimento, somadas ao aconselhamento do doador com sorologia positiva, sejam realizadas para orientação sobre mecanismos de transmissão, prognóstico, possibilidade de tratamento e doenças associadas. A informação sobre a baixa frequência de desenvolvimento destas (4-5%) deve ser sempre reforçada, para que o resultado positivo não leve à incerteza sobre o curso da infecção e interfira na qualidade de vida do paciente. Informações sobre o aparecimento de doenças relacionadas (bexiga hiperativa e disfunção erétil) e a necessidade de acompanhamento por uma equipe multidisciplinar deve ser enfatizada. Para que não se crie expectativa quanto ao tratamento, informações sobre a inexistência de tratamento específico para o HTLV-1 devem ser também repassadas.

O controle da infecção pelo vírus deve ser iniciado pela prevenção da infecção, na qual as campanhas de esclarecimento à população e o aconselhamento dos indivíduos infectados se constituam numa prioridade. Individualmente os indivíduos devem ser esclarecidos quanto à necessidade do sexo seguro, com uso de preservativo e não compartilhamento de agulhas e seringas. Deve ser reforçada a impossibilidade de doação de sangue e amamentação após diagnóstico da infecção pelo HTLV-1.

Centros de acompanhamento na Bahia

Em Salvador (Bahia), os indivíduos com sorologia positiva para o vírus detectados em banco de sangue são encaminhados para o ambulatório multidisciplinar de HTLV do Ambulatório Magalhães Neto do Com-Hupes, da UFBA, ou são direcionados para o Centro de HTLV da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública. Adicionalmente, esses pacientes podem ser acompanhados nas clínicas neurológicas e dermatológicas onde o diagnóstico clínico e laboratorial foi realizado. Ao ser encaminhado para um desses locais, o indivíduo deve estar ciente que

deverá ser inicialmente submetido a avaliações por diversos profissionais (clínico, infectologista, hematologista, neurologista, urologista, dermatologista, oftalmologista etc.) e retornar em um prazo estipulado, mesmo não apresentando manifestações evidentes.

Conclusões

O PPGIm muito tem contribuído, nestes últimos 25 anos, em sua missão de formar profissionais qualificados, capazes de colaborar para o crescimento do ensino superior no país. As parcerias e colaborações estabelecidas, principalmente com o SIM do Com-Hupes, estimularam o desenvolvimento das pesquisas científicas e, assim, formaram técnica e intelectualmente mestres e doutores com capacidade de atuar em diversas áreas, a exemplo dos avanços observados no estudo da resposta imune na infecção pelo HTLV-1. Estes avanços são traduzidos nas inúmeras publicações de professores e alunos desse programa, citados neste capítulo.

Referências

- Ando, H., Sato, T., Tomaru, U., Yoshida, M., Utsunomiya, A., Yamauchi, J., et al. (2013). Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*, 136(Pt 9), 2876-2887.
- Araújo, A. Q., & Silva, M. T. (2006). The HTLV-1 neurological complex. *The Lancet: Neurology*, 5(12), 1068-1076.
- Azimi, N., Mariner, J., Jacobson, S., & Waldmann, T. A. (2000). How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *AIDS*, 16(16), 1717-1722.
- Bangham, C. R. (2000). The immune response to HTLV-I. *Current Opinion in Immunology*, 12(4), 397-402.
- Bangham, C. R., & Osame, M. (2005). Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*, 24(39), 6035-6046.
- Brites, C., Weyll, M., Pedroso, C., & Badaro, R. (2002). Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *AIDS*, 16(9), 1292-1293.

Carneiro-Proietti, A. B., Catalan-Soares, B., Proietti, F. A., & Interdisciplinary HTLV-I/II Research Group (GIPH). (2002). Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *Journal of Biomedical Science*, 9(6 Pt 2), 587-595.

Carvalho, E. M., Bacellar, O., Porto, A. F., Braga, S., Galvão-Castro, B., & Neva, F. (2001). Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 27(1), 1-6.

Caskey, M. F., Morgan, D. J., Porto, A. F., Giozza, S. P., Muniz, A. L., Orge, G. O., et al. (2007). Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS*, 23(3), 365-371.

Castro, N. M., Rodrigues Júnior, W., Freitas, D. M., Muniz, A., Oliveira, P., & Carvalho, E. M. (2007). Urinary symptoms associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection: evidence of urinary manifestations in large group of HTLV-I carriers. *Urology*, 69(5), 813-818.

Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A. B., Proietti, F. A., & Interdisciplinary HTLV Research Group. (2005). Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(3), 926-931.

Dourado, I., Alcantara, L. C., Barreto, M. L., Teixeira M. G., & Galvão-Castro, B. (2003). HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 34(5), 527-531.

Edlich, R. F., Hill, L. G., & Williams, F. M. (2003). Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 13(2), 127-140.

Furukawa, Y., Saito, M., Matsumoto, W., Usuku, K., Tanaka, Y., Izumo, S., et al. (2003). Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(7), 1116-1125.

Furukawa, Y., Yamashita, M., Usuku, K., Izumo, S., Nakagawa, M., & Osame, M. (2000). Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(5), 1343-1349.

Galvão-Castro, B., Loures, L., Rodrigues, L. G., Sereno, A., Ferreira Júnior, O. C., Franco, L. G., et al. (1997). Distribution of human T-lymphotropic virus

type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, 37(2), 242-243.

Gessain, A., & Cassar, O. (2012). Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology*, 3, 388.

Grassi, M. F., Olavarria, V. N., Kruschewsky, R. A., Mascarenhas, R. E., Dourado, I., Correia, L. C., et al. (2011). Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *Journal of Medical Virology*, 83(7), 1269-1274

Guerreiro, J. B., Santos, S. B., Morgan, D. J., Porto, A. F., Muniz, A. L., Ho, J. L., et al. (2006). Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(2), 296-301.

Hanon, E., Hall, S., Taylor, G. P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., et al. (2000). Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 95(4), 1386-1392.

Jacobson, S. (2002). Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(Suppl. 2), S187-S192.

Jeffery, K. J., Usuku, K., Hall, S. E., Matsumoto, W., Taylor, G. P., Procter, J., et al. (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3848-3853.

Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., & Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature Medicine*, 14(4), 429-436.

Nagai, M., Kubota, R., Greten, T. F., Schneck, J. P., Leist, T. P., & Jacobson, S. (2001). Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(2), 197-205.

Nagai, M., & Osame, M. (2003). Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *Journal of Neurovirology*, 9(2), 228-235.

Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., et al. (1998). Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP

patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of Neurovirology*, 4(6), 586-593.

Nakamura, T. (2009). HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathologica*, 47(2), 182-194.

Nascimento, M.C., Primo, J., Bittencourt, A., Siqueira, I., Oliveira M.F., Meyer, R., et al. (2009). Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(3), 455-462.

Nishiura, Y., Nakamura, T., Ichinose, K., Shirabe, S., Tsujino, A., Goto, H., et al. (1996). Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 227-233.

Olindo, S., Lezin, A., Cabre, P., Merle, H., Saint-Vil, M., Edimonana Kaptue, M., et al. (2005). HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *Journal of the Neurological Sciences*, 237(1-2), 53-59.

Oliveira, M. F., Brites, C., Ferraz, N., Magalhães, P., Almeida, F., & Bittencourt, A. L. (2005). Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 40(11), e90-e96.

Oliveira, P., Castro, N. M., Muniz, A. L., Tanajura, D., Brandão, J. C., Porto, A. F., et al. (2010). Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. *Urology*, 75(5), 1100-1103.

Osame, M. (2002). Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of Neurovirology*, 8(5), 359-364.

Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., et al. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *The Lancet*, 1(8488), 1031-1032.

Poetker, S. K., Porto, A. F., Giozza, S. P., Muniz, A. L., Caskey, M. F., Carvalho, E. M., et al. (2011). Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *Journal of Clinical Virology*, 51(1), 54-58.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., & Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77(12), 7415-7419.

Porto, M. A., Muniz, A., Oliveira Júnior, J, & Carvalho, E. M. (2002). Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a espongiloidíase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(6), 641-649.

Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P., & Dalgleish, A. G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of Virology*, 64(11), 5682-5687.

Rieckmann, P., Altenhofen, B., Riegel, A., Baudewig, J., & Felgenhauer, K. (1997). Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 41(3), 326-333.

Santos, S. B., Oliveira, P., Luna, T., Souza, A., Nascimento, M., Siqueira, I., et al. (2012). Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal of Medical Virology*, 84(11), 1809-1817.

Santos, S. B., Porto, A. F., Muniz, A. L., Luna, T., Nascimento, M. C., Guerreiro, J. B., et al. (2006). Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*, 13(3), 145-151.

Santos, S. B., Porto, A. F., Muniz, A. L., Jesus A. R., Magalhães, E., Melo, A., et al. (2004). Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases*, 4(1), 7.

Tanajura, D., Castro, N., Oliveira, P., Neto, A., Muniz, A., Carvalho, N. B., et al. (2015). Neurological manifestations in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected individuals without HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a longitudinal cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 61(1), 49-56.

Tannus, M., Costa, D. T., Castro, N. M., Oliveira, P., Carvalho, N., Andrade, R., et al. (2013). Immunologic response and proviral load in human T-lymphotropic virus type 1 infected individuals with erectile dysfunction. *Urology*, 81(6), 1261-1264.

Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., & Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50(3), 481-492.

Verdonck, K., Gonzalez, E., Henostroza, G., Nabeta, P., Llanos, F., Cornejo, H., et al. (2007). HTLV-1 infection is frequent among out-patients with pulmonary tuberculosis in northern Lima, Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(10), 1066-1072.

Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., et al. (2009). Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PloS One*, 4(8), e6517.

Figura 1 – Espectro atual das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1

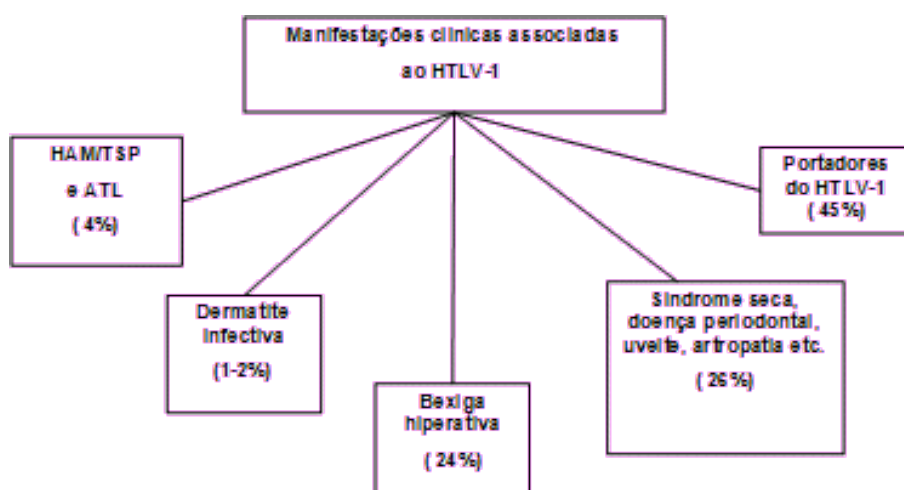
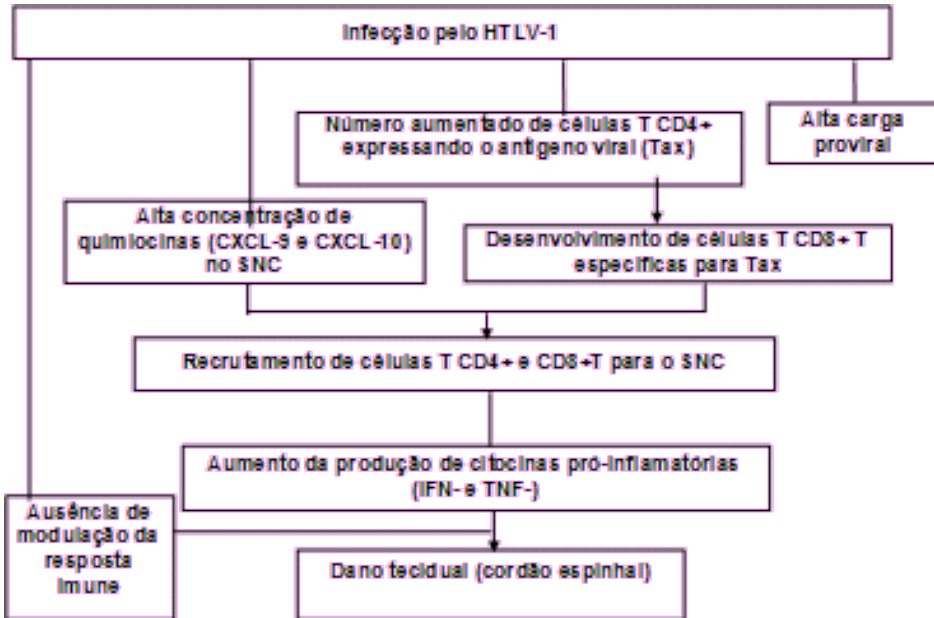


Figura 2 – Mecanismos envolvidos na patogênese e regulação da resposta imune na HAM/TSP



Hepatite C crônica e autoimunidade: autoanticorpos não órgão-específicos e crioglobulinas

Ajax Mercês Atta, Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Introdução

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) constitui-se como a principal causa das doenças do fígado no mundo. A inexistência de uma vacina e a evasão do vírus à resposta imune são aspectos que ainda desafiam a comunidade científica. Além de hepatopatias, o VHC provoca manifestações extra-hepáticas nos pacientes cronicamente infectados. Nesta revisão, apresentamos as principais características dessa infecção viral e os resultados dos estudos, realizados no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (Lapim) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sobre autoimunidade em pacientes portadores de hepatite C crônica no estado.

Aspectos virológicos

Identificado em 1989 (Choo et al., 1989), o VHC é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, com 9,6 kb de comprimento e polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae* do gênero *Hepacivirus*. É transmitido predominantemente por via parenteral, sendo o homem seu único hospedeiro natural; o VHC possui seis genótipos e mais de uma centena de subtipos. Sua estrutura proteica é representada por uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que, após processamento por proteases virais e celulares, origina

10 proteínas, sendo três destas estruturais (core, E1, E2) e cinco não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), além de um peptídeo pequeno (P7). (Chevaliez & Pawlotsky, 2012)

O VHC é um vírus hepatotrópico cuja infecção necessita da interação de sua proteína estrutural E2 do envelope com a molécula CD81, uma tetraspanina da membrana dos hepatócitos. Em adição à CD81, o *scavenger receptor class B type* (I SR-B1), também chamado de CLA-1, interagiria com a proteína E2, facilitando a entrada do vírus no hepatócito. Mais recentemente, duas outras proteínas de junção têm sido implicadas nesse processo de infecção viral: a claudina-I e a ocludina, sendo a última também capaz de interagir com proteínas do envelope viral. Além dessas moléculas, tem sido documentada a interação do VHC com a partícula lipídica de baixa densidade (LDL), a qual facilitaria a entrada desse vírus ao se ligar ao receptor de LDL (LDL-R) e à SR-B1. (Dubuisson & Cosset, 2014; Popescu & Dubuisson, 2009)

Epidemiologia

A infecção crônica pelo VHC acomete entre 130 e 170 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, país onde a infecção tem sido estimada de baixa prevalência, abaixo de 2%, a hepatite C é causada principalmente pelo vírus do genótipo G1 (G1a e G1b), seguindo-se as contaminações causadas pelos genótipos 3 e, menos frequentemente, pelo VHC genótipo 2. (Hajarizadeh, Grebely, & Dore, 2013) De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2011), 10.321 casos confirmados de hepatite C tinham sido notificados em 2010, sendo verificada esta distribuição regional: 2,2% no Norte, 3,5% no Centro-Oeste, 6,2% no Nordeste, 24,8% no Sul e 63,2% no Sudeste. Dados do Inquérito Nacional de Hepatites Virais demonstraram que a soroprevalência do anticorpo anti-VHC está em torno de 1,23% (Martins, Narciso-Schiavon, & Schiavon, 2011).

História natural da infecção

Na história natural da hepatite C, existem duas etapas clínicas distintas, representadas pela fase aguda – geralmente subclínica ou assintomática, na qual a minoria dos indivíduos infectados se cura

espontaneamente – e a fase crônica – que corresponde a uma infecção persistente do VHC por mais de seis meses, demonstrada pela presença do RNA do vírus no sangue, e que acomete cerca de 54-86% dos indivíduos infectados. De extrema importância epidemiológica e clínica, a infecção crônica pelo VHC pode evoluir em cerca de 15-56% dos pacientes não tratados com cirrose e carcinoma hepatocelular, este último com incidência anual estimada de 1-5%. (Maasoumy & Wedemeyer, 2012) Tal evolução torna-se altamente relevante diante da inexistência de uma vacina contra o vírus e possibilidade de ineficiência do tratamento antiviral em alguns pacientes. Embora não existam diferenças clínicas nas infecções causadas pelos diferentes genótipos de VHC, existem variações quanto a distribuição mundial, formas de transmissão, progressão da doença e resistência à terapia antiviral, sendo o genótipo 1 desse vírus mais resistente ao tratamento com interferon- α /ribavirina.

Resposta imune

A infecção pelo VHC repercute no sistema imune inato e adaptativo. A fase aguda da infecção, geralmente assintomática em cerca de 70% dos pacientes é caracterizada inicialmente pela presença de viremia, demonstrada pela presença do RNA viral de sete a 21 dias após a infecção, variando de acordo com a carga viral infectante e o aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT). De 32 a 46 dias após a viremia, ocorre a soroconversão com produção de anticorpos IgM e IgG, principalmente dirigidos para as proteínas estruturais do core e do envelope viral (E1 e E2). A persistência viral, demonstrada pela presença no sangue do RNA-VHC após seis meses de infecção, caracteriza a infecção crônica e tem sido associada com polimorfismos no gene IL28B, que codifica o interferon- λ 3. Assim, pacientes que possuem genótipos não favoráveis de IL28B (rs12979860 CT ou alelos TT) seriam aqueles que evoluiriam para a infecção crônica, enquanto os que apresentam genótipos favoráveis (alelos CC) curariam espontaneamente a infecção pelo VHC. (Thomas et al., 2009)

Na infecção crônica pelo VHC, a persistência desse vírus estaria relacionada a vários fatores, dentre os quais sua constante mutação, apresentação antigênica inadequada por células com essa função, produção de anticorpos não neutralizantes pelo hospedeiro, resposta imune

fraca ou ausente de células TCD4⁺, incapacidade de células TCD8⁺ se proliferarem e secretarem citocinas antivirais – como IFN- γ –, citotoxicidade e produção diminuída de IFN- γ por células NK e atividade supressora de células T regulatórias. (Fierro et al. 2014; Thimme, Binder, Bartenschlager, 2012)

Em estudo recente, verificamos que pacientes cronicamente infectados pelo VHC apresentavam diminuída proporção de células TCD8⁺ e células NK, esta última normalizando após 12 semanas de tratamento antiviral com IFN- α /ribavirina em pacientes com resposta virológica precoce. Em contraste, uma aumentada proporção de células BCD19⁺ e inalterada proporção de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ foram observadas nos pacientes sem tratamento antiviral. (Oliveira, 2015)

O tipo de resposta imune predominante na infecção crônica pelo VHC tem atraído o interesse de pesquisadores desde a caracterização da hepatite C como entidade clínica distinta entre as hepatites virais. Contudo, ainda existem controvérsias sobre o padrão imunológico presente na hepatite C crônica. (Bergamini et al., 2001; Fan et al., 1998)

A participação da resposta imune de linfócitos Th17 na hepatite C crônica só tem sido estudada mais recentemente. Nesse segmento, investigamos esse tipo de resposta em pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC, determinando os níveis séricos das citocinas envolvidas em sua indução (TGF- β e IL-6), bem como daquelas produzidas por células Th17 (IL-17A, IL-17F e IL-22) e daquelas cuja produção é estimulada por esses linfócitos (IL-8 e GM-CSF). As relações entre os níveis desses mediadores imunológicos e os aspectos clínicos e virológicos apresentados pelos pacientes investigados foram também considerados. Ao final do estudo foi demonstrado que os pacientes infectados pelo VHC não apresentavam alterações nos níveis séricos de IL-17A. Contudo, diferenças foram observadas nos seus níveis de IL-17F e IL-8 quando comparados aos controles sadios, sendo as quantidades de IL-17F maiores nos pacientes com elevação dos níveis de ALT. As quantidades de IL-8 foram maiores nos pacientes com carga viral baixa, enquanto os níveis de IL-6 foram mais altos naqueles que apresentam atividade necroinflamatória moderada no fígado. Uma relação entre IL-17F e IL-22 foi observada nos dois grupos investigados, sendo menor nos pacientes infectados com o VHC. Assim, nossos achados sugeriram

associação de IL-17F e IL-8 com o dano hepático e o controle da infecção. (Sousa et al., 2012)

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção crônica pelo VHC é realizado inicialmente pela demonstração de anticorpos IgG contra proteínas estruturais e não estruturais virais, usando-se geralmente testes de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), seguido pelo teste confirmatório de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), qualitativo para detecção do RNA do VHC. Com vistas ao tratamento, seja pelo uso de IFN- α peguillado associado à ribavirina ou pelo emprego de inibidores de proteases, torna-se necessária a identificação do genótipo do VHC infectante e a determinação da sua carga viral. (Ghany, Strader, Thomas, Seeff, & American Association for the Study of Liver Diseases [AASLD], 2009; Irshad, Mankotia, & Irshad, 2013)

Manifestações clínicas

A infecção crônica pelo VHC provoca hepatopatias e manifestações clínicas extra-hepáticas. Entre as primeiras, observadas em material de biópsia hepática, estão a presença de atividade necroinflamatória e fibrose no fígado. Esta última, quando avançada, apresenta-se difusa, com formação de nódulos e frequentemente acompanhada de necrose, sendo classificada como cirrose, a qual tem sido associada com o hepatocarcinoma e tumores das vias biliares. A classificação das alterações histológicas na hepatite C segue as recomendações do protocolo Metavir (Bedossa & Poynard, 1996). Embora o padrão ouro para o diagnóstico das alterações hepáticas seja o exame histológico de material obtido de biópsia hepática, métodos não invasivos têm sido usados em situações de risco do paciente à punção do fígado. Entre estes, o exame de elastografia transitória hepática usando o aparelho FibroScan tem sido uma alternativa importante, com a qual a fibrose do fígado pode ser avaliada de forma satisfatória. Adicionalmente, têm sido propostos métodos laboratoriais não invasivos de investigação da fibrose hepática, baseados

numa combinação de resultados de testes laboratoriais hematológicos e bioquímicos de rotina, com ampla possibilidade de implantação em serviços de hepatologia com menor capacidade instalada. Entre estes, destacam-se o sistema FibroTest, o índice AST to Platelet Ratio (Apri) e o Fibrosis-4 (FIB-4). (World Health Organization [WHO], 2014)

Autoimunidade e hepatite C

A hepatite C crônica pode estar ligada a importantes manifestações extra-hepáticas, principalmente aquelas associadas com a presença de autoimunidade nos pacientes, caracterizadas pela produção de autoanticorpos não órgão-específicos – *non-organ-specific autoantibodies* (NOSA) – e crioglobulinas, complexos imunes que se precipitam abaixo de 37 °C, sendo formados por anticorpos IgG anti-VHC, IgM anti-IgG (fator reumatoide), pelo antígeno do core do VHC e pelo componente C1q do complemento. Tais manifestações, que têm sido descritas desde a década de 1990 em vários países (Abuaf et al., 1993; Ferri et al., 1994), vem sendo objeto de pesquisas no Lapim da Faculdade de Farmácia da UFBA, com a colaboração do Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES), na última década, contribuindo para seu melhor conhecimento em pacientes brasileiros.

Por intermédio de estudos financiados pelo Ministério da Saúde, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), tem sido demonstrado que a maioria dos pacientes portadores de hepatite C crônica sem tratamento atendidos em dois centros de referência do estado da Bahia e incluídos em nossas pesquisas possuem algum biomarcador laboratorial autoimune, como crioglobulinemia, e/ou autoanticorpos de diferentes especificidades. Embora uma importante prevalência de crioglobulinemia possa ser encontrada nos pacientes investigados (65%), a presença de glomerulonefrite, ou vasculite neles tem sido raramente relatada, diferindo dos achados de outros grupos fora do Brasil.

NOSA provavelmente resultantes da reatividade cruzada de anticorpos dirigidos para epítomos virais com estruturas semelhantes presentes em autoantígenos (mimetismo molecular) são frequentemente achados em pacientes cronicamente infectados pelo VHC. Em pacientes

residentes na Bahia, os NOSA mais frequentemente encontrados foram os anticorpos IgM anti-IgG (fator reumatoide), antimúsculo liso e antinucleares. (Sousa-Atta, Margarida, Pereira, Paraná, & Atta, 2006) Um estudo posterior permitiu a observação de que anticorpos IgA anti- β 2 glicoproteína I podiam ser encontrados em significativa prevalência nos portadores de hepatite C, sem associação com a síndrome de anticorpos antifosfolípides (SAF). (Atta et al., 2008) Aparentemente, tanto fatores ambientais como a descendência africana desses indivíduos poderiam influenciar a presença desses anticorpos. (Cucurull et al. 1999)

A investigação do perfil de citocinas de pacientes portadores de hepatite C crônica com manifestações de autoimunidade demonstrou que esses indivíduos possuíam níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e *B-cell activating factor* (Baff) semelhantes aos dos controles sadios. Entretanto, pacientes com crioglobulinemia possuíam níveis aumentados de IL-2, IL-5 e Baff em relação àqueles sem. Portadores do VHC soropositivos para fator reumatoide tinham níveis séricos mais baixos de IFN- γ em comparação com aqueles sem esses autoanticorpos. Por outro lado, níveis séricos mais altos de IL-2, IL-5 e Baff foram detectados em pacientes positivos para anticorpos IgA anti- β 2 glicoproteína I, enquanto aqueles com positividade para autoanticorpos antinucleares apresentaram níveis mais elevados de IL-2. As citocinas IL-4 e IL-10 não foram associadas a qualquer manifestação de autoimunidade. Concluiu-se, neste estudo, que a autoimunidade na hepatite C crônica pode ser principalmente representada por elevações nos níveis séricos de IL-2, IL-5 e Baff. (Atta, Oliveira, Sousa, Paraná, & Atta, 2010)

Prolactina e ferritina são moléculas bioativas que têm sido associadas com a produção de anticorpos e doenças autoimunes. A prolactina, além da sua importância como hormônio envolvido na lactação, pode ser considerada um importante mediador imunológico, sendo inclusive produzida por linfócitos, devido a sua capacidade de induzir a produção de citocinas como IL-1 e IFN- γ e a expressão do receptor de IL-2, de regular negativamente a seleção de linfócitos B autorreativos e de estimular a produção de autoanticorpos. (Orbach & Shoefeld, 2007) Por sua vez, a ferritina, além de estar envolvida na estocagem do ferro no organismo, participa da inflamação aguda e poderia regular negativamente a resposta imune de linfócitos T e B. (Zandman-Goddard & Shoefeld, 2007) Embora essa proteína tenha sido proposta como biomarcador da

atividade do lúpus eritematoso sistêmico, outros estudos têm atribuído a ela a atividade supressora sobre a hipersensibilidade tipo IV e a produção de autoanticorpos, bem como a ação inibitória sobre a capacidade fagocítica de granulócitos e a produção de IL-10 por células T regulatórias CD4⁺CD25⁺. (Gray, Arosio, & Hersey, 2002)

Em uma pesquisa conduzida por nosso grupo, verificamos que a hiperprolactinemia poderia ser encontrada em cerca de 10% dos portadores de hepatite C crônica; já a prevalência de hiperferritinemia foi mais significativa, ocorrendo em 38% dos indivíduos com essa infecção viral. Embora a hiperprolactinemia tenha sido associada com a infecção com VHC G3 e os níveis de ferritina correlacionados com os níveis de ALT, nem a hiperprolactinemia e nem a hiperferritinemia foram ligadas a crioglobulinemia ou presença de NOSA. Assim, as manifestações de autoimunidade observadas na hepatite C não têm envolvimento de prolactina ou ferritina. (Sousa et al., 2011)

Aspectos moleculares da inflamação

A infecção crônica pelo VHC leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , a IL-6 e a TNF- α . Tais mediadores imunológicos induzem a formação de proteínas inflamatórias, também conhecidas como proteínas de fase aguda. Contudo, as trocas nos níveis séricos de vários desses biomarcadores inflamatórios em pacientes com hepatite C com alterações histopatológicas no fígado ou crioglobulinemia, ou infectados com diferentes genótipos do VHC, ainda merecem maior atenção. Uma investigação realizada no Lapim sobre os níveis séricos de algumas dessas proteínas demonstrou a presença de baixos níveis de α 1-glicoproteína ácida (AGP), complemento C3 e haptoglobina (Hp) nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, enquanto seus níveis de proteína C-reativa (PCR) e complemento C4 estavam inalterados. Em contraste, um aumento nos níveis de ferritina e α 1-antitripsina podia ser demonstrado nesses indivíduos. Os níveis séricos de ALT se correlacionaram inversamente com as quantidades de Hp e AGP, enquanto os níveis de ferritina mostraram correlação positiva com os níveis de ALT. Os pacientes que tinham atividade necroinflamatória do fígado apresentaram níveis séricos mais baixos de PCR, C3 e C4 e quantidades mais baixas de AGP foram demonstradas nos indivíduos

com fibrose avançada. Entretanto, as alterações nos níveis das proteínas de fase aguda estudadas não tiveram relação com a presença de crioglobulinemia, assim como não foram detectadas diferenças nas análises multivariadas desses biomarcadores inflamatórios nas infecções causadas pelos genótipos G1 ou G3 do VHC infectante. (Atta, Cabral, Santos, Paraná, & Atta, 2012)

Infecção pelo VHC e linfoproliferação

A crioglobulinemia mista e o linfoma não-Hodgkin de células B (B-NHL) são as principais manifestações extra-hepáticas da hepatite C crônica associadas a linfoproliferação. Embora a primeira seja classificada como uma desordem linfoproliferativa benigna, existem relatos de que pacientes portadores de crioglobulinemias podem evoluir para B-NHL. Entretanto, tem sido demonstrado em vários estudos que, nos pacientes tratados eficientemente com drogas antivirais, existe o desaparecimento dos biomarcadores associados, com a ativação clonal de linfócitos e a regressão de alguns tipos de linfomas ligados à infecção crônica pelo VHC. (Zignego, Giannini, & Gragnani, 2012)

Recentemente, pesquisamos em pacientes com infecção crônica pelo VHC, portadores de crioglobulinemia, a presença no soro de cadeias leves livres de imunoglobulinas – *free-light chain* (FLC) – kappa e lambda, bem como investigamos a existência de imunoglobulina monoclonal na composição das crioglobulinas produzidas por técnica de imunofixação. Como resultado dessa investigação, verificamos que os pacientes com crioglobulinemia apresentavam níveis mais altos de cadeias kappa e lambda livres em relação aos pacientes sem crioglobulinas, sem existir, entretanto, diferença na relação kappa/lambda desses indivíduos. Pacientes com fibrose hepática avançada tinham um aumento nessa relação. Existiu associação forte entre os níveis de cadeias kappa e lambda e os níveis séricos de IgA, IgG e IgM. Um padrão imunológico predominante de crioglobulinemia mista (IgG, IgA, IgM e cadeia kappa) foi verificado nas crioglobulinas desses indivíduos. Assim, foi concluído que, nos pacientes crioglobulinêmicos investigados, existia resposta imune policlonal vigorosa de linfócitos B, resultante da persistente estimulação imune presente nesses indivíduos. (Oliveira et al., 2014)

Referências

- Abuaf, N., Lunel, F., Giral, P., Borotto, E., Laperche, S., Poupon, et al. (1993). Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *Journal of Hepatology*, 18(3), 359-364.
- Atta, A. M., Estevam, P., Paraná, R., Pereira, C. M., Leite, B. C., & Sousa-Atta, M. L. (2008). Antiphospholipid antibodies in Brazilian hepatitis C virus carriers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(6), 489-492.
- Atta, A. M., Oliveira, I. S., Sousa, G. M., Paraná, R., & Atta, M. L. (2010). Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and non-organ-specific autoantibodies. *Microbial Pathogenesis*, 48(2), 53-56.
- Atta, M., Cabral, M., Santos, G., Paraná, R., & Atta, A. (2012). Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: association with liver histopathology, HCV genotype and cryoglobulinemia. *Inflammation Research*, 61(10), 1101-1106.
- Bedossa, P., & Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C: the METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, 24, 289-293.
- Bergamini, A., Bolacchi, F., Cerasari, G., Carvelli, C., Faggioli, E., Cepparulo, M., et al. (2001). Lack of evidence for the Th2 predominance in patients with chronic hepatitis C. *Clinical and Experimental Immunology*, 123, 451-458.
- Brasil. (2011). Ministério da Saúde. *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções*. Brasília, DF.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. M. (2012). Virology of hepatitis C virus infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 26(4), 381-389.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362.
- Cucurull, E., Gharavi, A. E., Diri, E., Mendez, E., Kapoor, D., & Espinoza, L. R. (1999). IgA anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I are the most prevalent isotypes in African American patients with systemic lupus erythematosus. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318(1), 55-60.
- Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *Journal of Hepatology*, 61(Suppl. 1), S3-S13.
- Fan, X. G., Liu, W. E., Li, C. Z., Wang, Z. C., Luo, L. X., Tan, D. M., et al. (1998). Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators of Inflammation*, 7(4), 295-297.

Ferri, C., Longombardo, G., La Civita, L., Greco, F., Lombardini, F., Cecchetti, R., et al. (1994). Hepatitis C virus chronic infection as a common cause of mixed cryoglobulinaemia and autoimmune liver disease. *Journal of Internal Medicine*, 236(1), 31-36.

Fierro, N. A., Gonzalez-Aldaco, K., Torres-Valadez, R., Martinez-Lopez, E., Roman, S., & Panduro, A. (2014). Immunologic, metabolic and genetic factors in hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(13), 3443-3456.

Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L., Seeff, L. B., & American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 49(4), 1335-1374.

Gray, C. P., Arosio, P., & Hersey, P. (2002). Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood*, 99(9), 3326-3334.

Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology*, 10(9), 553-562.

Irshad, M., Mankotia, D. S., & Irshad, K. (2013). An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 19(44), 7896-7909.

Maasoumy, B., & Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 26, 401-412.

Martins, T., Narciso-Schiavon, J. L., & Schiavon, L. L. (2011). Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 57, 107-112.

Oliveira, I.S. (2015). *Resposta imune celular de portadores de hepatite C antes e na 12ª semana de tratamento com interferon-alfa e ribavirina* (Tese de doutoramento não publicada). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Oliveira, I. S., Cabral, M. S., Jesus, L. S., Paraná, R., Atta, A. M., & Sousa-Atta, M. L. (2014). Serum levels of immunoglobulin free light chains in patients with chronic hepatitis C presenting cryoglobulinemia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(6), 638-642.

Orbach, H., & Shoenfeld, Y. (2007). Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6, 537-542.

Popescu, C. I., & Dubuisson, J. (2009). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*, 102(1), 63-74.

- Sousa, G. M., Oliveira, R. C., Pereira, M. M., Paraná, R., Sousa-Atta, M. L., & Atta, A. M. (2011). Autoimmunity in hepatitis C virus carriers: involvement of ferritin and prolactin. *Autoimmunity Reviews*, 10(4), 210-213.
- Sousa, G. M., Oliveira, I. S., Andrade, L. J., Sousa-Atta, M. L., Paraná, R., & Atta, A. M. (2012) Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. *Cytokine*, 60(1), 138-142.
- Sousa-Atta, M. L. B., Margarida, P. E., Pereira, C. M., Paraná, R., & Atta, A. M. (2006). Autoimmune aspects of hepatitis C in Bahia (Brazil). *Journal of Clinical Rheumatology*, 12(2, Suppl.), S6.
- Thimme, R., Binder, M., & Bartenschlager, R. (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 663-683.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., et al. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), 798-801.
- World Health Organization (WHO). (2014). *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection*. Geneva.
- Zandman-Goddard, G., & Shoenfeld, Y. (2007). Ferritin in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6(7), 457-463.
- Zignego, A. L., Giannini, C., & Gragnani, L. (2012). HCV and lymphoproliferation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 980942.

Infecção pelo *Schistosoma mansoni*: resposta imune associada à patogênese e proteção do hospedeiro

Luciana Santos Cardoso, Jamille Souza Fernandes, Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida, Jordana Batista Santana, Diego Mota Lopes, Ricardo Riccio Oliveira, Edgar M. Carvalho, Maria Ilma Araujo

Introdução

A esquistossomose é uma doença crônica que afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo mundo. Estima-se que 700 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por esse helminto. (Iarotski & Davis, 1981; Steinmann, Keiser, Bos, Tanner, & Utzinger, 2006) No Brasil, estima-se que 25 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção. (Brasil, 2009) A patologia hepática na esquistossomose resulta da resposta imune a antígenos parasitários derivados do ovo do *S. mansoni*, que são depositados nos espaços periportais, levando a quadros variáveis de fibrose. (Bica, Hamer, & Stadecker, 2000; Chiaramonte et al., 2003; Warren, 1968) O granuloma formado ao redor do ovo age como uma barreira que previne a dispersão dos antígenos. A forma grave, caracterizada pela fibrose periportal, ocorre em cerca de 5% dos indivíduos infectados que vivem nas áreas endêmicas. (Bina & Prata, 2003; Henri et al., 2002)

Nosso grupo vem avaliando a resposta imune na esquistossomose, há cerca de 15 anos, em três áreas endêmicas no interior da Bahia, a saber, Caatinga do Moura, município localizado na Chapada Diamantina, Água Preta, no sul da Bahia, e Conde, no litoral norte do estado. Temos avaliado fatores associados à patogênese da esquistossomose crônica, com a documentação de que citocinas do tipo Th2 estão envolvidas

no desenvolvimento da fibrose hepática periportal. Outros mecanismos ligados à patogênese na esquistossomose incluem o subtipo dos monócitos, tendo essa célula papel importante no processo inflamatório associado ao desenvolvimento de fibrose periportal. Alterações no controle da resposta imune parecem estar associadas a essa forte resposta inflamatória.

Existem dados na literatura associando a infecção por helmintos, particularmente pelo *S. mansoni*, à regulação da resposta inflamatória nas doenças alérgicas e autoimunes, e muito se tem estudado sobre os mecanismos imunológicos envolvidos nessa regulação. Dessa forma, nosso grupo tem avaliado a gravidade da asma e a resposta imune em indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, além de estudar o papel de antígenos desse parasita candidatos à vacina na modulação da resposta inflamatória em doenças mediadas tanto pela resposta do tipo Th2, a exemplo da asma, quanto pela Th1, a exemplo da leishmaniose e da infecção pelo vírus linfotrópico da célula T humana (HTLV-1).

Imunopatogênese da fibrose periportal secundária à esquistossomose

As manifestações clínicas na esquistossomose aguda e crônica são bastantes distintas e associadas a diferentes mecanismos de imunopatogênese. (Burke et al., 2009; Jesus et al., 2002; Lambertucci, 1993) Na fase crônica, três formas clínicas são bem caracterizadas: a intestinal e hepatointestinal (menos graves) e a forma mais grave, denominada hepatoesplênica. (Bina, 1997; Bina & Prata, 2003) Entre 5 a 10% dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* evoluem para a forma grave da doença, a qual é caracterizada por fibrose periportal e hipertensão portal, ascite e varizes esofágicas e gástricas, que podem complicar com hemorragias digestivas e óbito. (Bina & Prata, 2003; Henri et al., 2002)

Durante o curso natural da infecção pelo *S. mansoni*, a resposta imune progride por três fases. Na primeira, de três a cinco semanas após o início da infecção, ela é predominantemente do tipo Th1/inflamatória, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-1. Essa resposta tem sido associada à destruição de esquistossômulos no pulmão devido à ativação de macrófagos pelo IFN- γ . (Jesus

et al., 2002; Lambertucci, Rayes, Barata, Teixeira, & Gerspacher-Lara, 1997; Wynn et al., 1998) Conforme os parasitas amadurecem e iniciam a ovoposição, entre a quinta e a sexta semana, a resposta é polarizada para o tipo Th2, que é caracterizado principalmente pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13. (Araújo et al., 1996; Corrêa-Oliveira et al., 1998; Gazzinelli & Colley, 1992) Na fase crônica da doença, por volta da 12ª semana, na qual os vermes continuam com a produção de ovos, a resposta Th2 é modulada e associada a uma maior participação das células regulatórias – e, conseqüentemente, maior produção de IL-10 e TGF- β . (Pearce & MacDonald, 2002) Estudos têm mostrado que a resposta Th2 é induzida principalmente por produtos secretados pelos ovos do *S. mansoni*, a exemplo das glicoproteínas ômega-1 e IPSE/alfa-1. (Cass et al., 2007; Mathieson & Wilson, 2010)

A patogênese da infecção pelo *S. mansoni* é predominantemente causada pela resposta imune do hospedeiro aos antígenos do ovo. (Bica et al., 2000; Chiaramonte et al., 2003; Warren, 1968) Vários estudos têm mostrado que a gravidade da doença é consequência da fibrose causada pela reação granulomatosa em torno dos ovos do *S. mansoni*, que estão presos nos pequenos vasos do fígado. Quando o ovo emerge da fêmea do verme adulto, ele é imaturo e não provoca nenhuma reação nos tecidos; após cerca de cinco a seis dias, o miracídio diferencia-se e inicia a eliminação de secreções líticas e antigênicas por meio de microporos presentes na casca de ovo. (Andrade, 2009) Essas secreções são compostas por proteínas, enzimas proteolíticas e hidrolíticas e polissacarídeos. Conseqüentemente, os granulomas formados funcionam como barreiras que previnem a dispersão dos antígenos dos ovos do *S. mansoni*. Entretanto, com a chegada contínua dos ovos, o processo inflamatório pode evoluir para fibrose grave, o que leva à interrupção do fluxo sanguíneo normal do sistema venoso para os sinusoides, resultando em hipertensão portal, que é seguida pela hepatoesplenomegalia, formação de varizes esofágicas e gástricas que podem romper espontaneamente e levar a óbito por hemorragia. (Baptista & Andrade, 2005; Wynn, 2007)

Alguns estudos têm avaliado o perfil de citocinas e a expressão de moléculas pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP). em indivíduos residentes em uma área endêmica em esquistossomose. Esses estudos classificaram os indivíduos por ultrassonografia de acordo com a gravidade da doença: grau 0 (sem fibrose), grau I (fibrose

incipiente), grau II (fibrose moderada) e grau III (fibrose grave). Estudos mostraram que as citocinas IL-5 (Jesus et al., 2004; Souza et al., 2012) e IL-13 (Jesus et al., 2004) produzidas pelas CMSP estão associadas ao grau II e III de fibrose hepática. A IL-5 tem sido vinculada à formação do granuloma em volta dos ovos no fígado, uma vez que essa citocina participa do crescimento e ativação dos eosinófilos, e essas células contribuem para a fonte de mediadores profibróticos, como a IL-13. (Reiman et al., 2006) Dessa forma, a IL-5 pode participar do remodelamento tecidual e da fibrose na esquistossomose. (Reiman et al., 2006) Quanto à IL-13, estudos em modelo experimental têm mostrado o papel importante dessa citocina no desenvolvimento da fibrose, uma vez que o bloqueio dos receptores de IL-4 e IL-13 preveniram o desenvolvimento do granuloma e da fibrose hepática nos camundongos. (Chiaramonte, Cheever, Malley, Donaldson, & Wynn, 2001) No caso de humanos, vem sendo sugerida a correlação entre os altos níveis de IL-13 e o desenvolvimento do grau mais avançado de fibrose. (Jesus et al., 2004)

Quanto ao possível papel protetor do IFN- γ na fibrose hepática, este ainda é controverso. Alguns estudos têm sugerido que o IFN- γ têm atividades antifibróticas, uma vez que age inibindo a produção de proteínas da matriz extracelular, aumenta a atividade de colagenase no tecido hepático e modula a resposta Th2. (Borish & Steinke, 2003; Wynn & Cheever, 1995); os baixos níveis de IFN- γ também têm sido associados à fibrose hepática. (Booth et al., 2004) Outros estudos, porém, não observaram nenhuma associação dos níveis de IFN- γ com os diferentes graus de fibrose periportal. (Jesus et al., 2004; Souza et al., 2012)

Além da produção das citocinas pelas CMSP, tem sido documentado o grau de ativação e regulação dos linfócitos e expressão de receptores e citocinas nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal. Dentre as moléculas de ativação dos linfócitos T, o CD28 é uma importante molécula coestimulatória, ela é expressa constitutivamente e se liga ao CD80 e ao CD86 nas células apresentadoras de antígenos (CAA). Tem sido mostrado que indivíduos com graus mais elevados de fibrose (grau II e III) apresentam frequência elevada de células T CD4⁺, expressando CD28 em relação aos indivíduos com grau I de fibrose (Cardoso et al., 2013), o que sugere que essas células podem estar associadas ao desenvolvimento das formas mais graves da esquistossomose. Além disso, outra molécula envolvida

na ativação, a CTLA-4, também se liga ao CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos tendo sua expressão rapidamente aumentada depois da ativação das células T e fornecendo um sinal de *feedback* negativo limitando a resposta imune. (Brunet et al., 1987) Indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram frequências diminuídas de células TCD4⁺, expressando CTLA-4 em relação a indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose (Cardoso et al., 2013), sugerindo que essas células são essenciais no controle do processo inflamatório associado à fibrose periportal durante a esquistossomose crônica. Em um modelo experimental de infecção pelo *S. mansoni*, foi demonstrado que células expressando CTLA-4 podem controlar a morbidade pela diminuição da resposta imune Th2 e do número de eosinófilos. (Walsh, Smith, & Fallon, 2007) Quanto às células envolvidas na regulação, os linfócitos TCD4⁺CD25^{high} tem importante papel supressor na resposta imune por inibirem a proliferação celular e a secreção de citocinas pelas células T efectoras. As células T regulatórias CD4⁺CD25^{high} podem agir via contato célula-célula (Baecher-Allan, Brown, Freeman, & Hafler, 2001) ou pela síntese de citocinas regulatórias, como a IL-10 e a TGF-β. (Saito, Sasaki, & Sakai, 2005) Semelhante aos dados observados relativos ao CTLA-4, Cardoso et al. (2013) também verificaram que os indivíduos com fibrose moderada a grave apresentam frequências diminuídas de células T CD4⁺ expressando CD25^{high} em relação a indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose, sugerindo que essas células podem estar associadas ao controle da morbidade na esquistossomose crônica. Há evidências que mostram também frequência elevada de células T CD4⁺CD25^{high} em pacientes com a forma intestinal, que é a menos grave da doença. (Saito et al., 2005)

Os monócitos, por sua vez, participam no desenvolvimento da fibrose através de vários mecanismos, incluindo secreção de citocinas e geração de produtos relacionados ao estresse oxidativo. (Marra, Aleffi, Galastri, & Provenzano, 2009) Dependendo do seu estado de diferenciação e de sinais locais, monócitos e macrófagos são capazes de secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas e anti-inflamatórias, além de fatores de crescimento. (Bataller & Brenner, 2005) Os monócitos humanos foram classificados em três subpopulações, de acordo com a expressão de CD14 e CD16: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺).

(Ziegler-Heitbrock et al., 2010) Um estudo realizado pelo nosso grupo (Fernandes et al., 2014) com culturas de CMSP de indivíduos com esquistossomose avaliou as diferentes subpopulações de monócitos em relação à expressão de citocinas e receptores e sua associação com os diferentes níveis de fibrose periportal (Figura 1).

Tem sido demonstrada maior expressão de moléculas pró-fibróticas, como o receptor α de IL-4 (IL-4R α) e o TGF- β , nas três subpopulações de monócitos nos indivíduos com fibrose moderada a grave em relação a indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose, respectivamente, sugerindo participação dessas moléculas no processo de fibrogênese. (Fernandes et al., 2014) Em modelo experimental, as citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis por induzir a ativação alternativa de monócitos por meio da ligação com o receptor α de IL-4. A sinalização pelo IL-4R α induz a expressão de arginase, enzima responsável pela conversão de L-arginina em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, portanto, no desenvolvimento da fibrose. (Hesse et al., 2001) Estudos envolvendo um modelo experimental em *S. mansoni* têm demonstrado que a responsividade pelo IL-4R α é importante para a formação do granuloma e sobrevivência do hospedeiro durante a infecção por esse helminto. (Herbert et al., 2004; Jankovic et al., 1999) Quanto ao TGF- β , trata-se de uma citocina responsável por múltiplos processos biológicos, como a inflamação, a fibrose e o reparo tecidual. (Blobe, Schiemann, & Lodish, 2000; Li, Wan, Sanjabi, Robertson, & Flavell, 2006) Ela induz à proliferação de fibroblastos e produção de colágeno; sua produção é aumentada no local da fibrose, o que sugere seu papel potencial no estabelecimento desta. (Border & Noble, 1994; Fine & Goldstein, 1987; Verrecchia & Mauviel, 2007)

Entretanto, outros estudos não observaram diferença significativa nos níveis séricos de TGF- β (Souza et al., 2012) e nos sobrenadantes de CMSP entre os grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. (Alves Oliveira et al., 2006; Jesus et al., 2004) Assim como fizeram com as moléculas pró-fibróticas, Fernandes et al. (2014) também observaram expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com fibrose moderada a grave, comparados aos

indivíduos sem fibrose, indicando a participação dessas citocinas na progressão da fibrose periportal em humanos. (Fernandes et al., 2014)

A IL-6 está envolvida numa variedade de papéis importantes na resposta imune, desde a indução de resposta inflamatória de fase aguda até a fibrogênese, uma vez que também induz a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno, bem como a síntese do inibidor de metaloproteinase 1 (TIMP-1). (Barnes, Anderson, & Moots, 2011; Duncan & Berman, 1991; Lotz & Guerne, 1991; Mihara, Moriya, & Ohsugi, 1996) Um estudo em modelo experimental relatou aumento da produção de IL-6 durante o curso de infecção pelo *S. mansoni*, bem como a formação do granuloma hepático, o que poderia indicar a participação dessa citocina na resposta inflamatória granulomatosa. (Khalil et al., 1996) Em relação ao TNF, também têm sido documentados níveis elevados dela em sobrenadantes de CMSP nos indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparados a indivíduos sem fibrose. (Souza et al., 2012) Outros estudos observaram que altos níveis dessa citocina produzidos por CMSP estimulados com antígenos de *Schistosoma* são significativamente associados à presença da fibrose periportal. (Booth et al., 2004; Henri et al., 2002; Mwatha et al., 1998)

Além de papéis pró-fibróticos e inflamatórios, monócitos/macrófagos são também fundamentais para a regressão da fibrose, uma vez que podem também degradar proteínas da matriz extracelular e exercer ações anti-inflamatórias. (Fallowfield et al., 2007; Zimmermann & Tacke, 2011) A IL-12, por exemplo, é uma citocina conhecida por favorecer respostas do tipo Th1, e os efeitos que ela exerce na fibrose são acompanhados pela substituição do padrão Th2 para o Th1, sendo considerada uma citocina antifibrótica por inibir a síntese de colágeno em fibroblastos. (Wynn et al., 1995) Foi demonstrado que a expressão de IL-12 em três subpopulações de monócitos foi menor nos indivíduos com fibrose moderada a grave em relação a indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose (Fernandes et al., 2014), sugerindo que, neles, a resposta Th1 é insuficiente para controlar o processo de desenvolvimento da condição. Em modelo experimental, tem sido mostrado que adição de IL-12 é capaz de prevenir a inflamação granulomatosa e a fibrose hepática na esquistossomose. (Mentink-Kane et al., 2011; Wynn, Eltoun, Oswald, Cheever, & Sher, 1994; Wynn et al., 1995) Além disso, tem sido documentado que a manutenção da resposta Th1 é necessária

para a redução do tamanho do granuloma e prevenção da fibrose hepática. (Hoffmann, Caspar, Cheever, & Wynn, 1998)

O papel da citocina regulatória IL-10 na fibrose periportal secundária à esquistossomose vem sendo questionado. Os níveis de IL-10 em sobrenadante de culturas de CMSP nos indivíduos com fibrose periportal têm sido discordantes na literatura:alguns autores encontraram níveis elevados dessa citocina em indivíduos com fibrose periportal grave quando comparada com os outros graus (Jesus et al., 2004; Magalhães et al., 2004), enquanto outros descobriram níveis mais baixos de IL-10 nos indivíduos com fibrose moderada a grave. (Alves Oliveira et al., 2006) Existem ainda estudos que não encontraram diferenças significativas nos níveis dessa citocina em CMSP (Souza et al., 2012) ou na expressão de IL-10 nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose. (Fernandes et al., 2014) Entretanto, estudos em modelo experimental em esquistossomose têm mostrado que a fibrose foi consistentemente aumentada em camundongos deficientes em IL-10 e IL-12, simultaneamente, sugerindo que ambas as citocinas interagem para inibir o desenvolvimento de fibrose. (Hoffmann, Cheever, & Wynn, 2000; Mentink-Kane et al., 2011)

Esses dados indicam que a imunopatogênese da fibrose periportal secundária à esquistossomose está associada a uma maior participação de moléculas pró-fibróticas e pró-inflamatórias, em combinação com a baixa participação de moléculas regulatórias, sugerindo que a patologia na esquistossomose humana está ligada à falta de mecanismos modulatórios.

Infecção pelo *Schistosoma mansoni* na modulação das atopia e da asma

Diversos estudos têm associado a infecção por helmintos, a exemplo do *Schistosoma mansoni*, à prevenção de doenças que cursam com a resposta imune exacerbada, a exemplo das doenças alérgicas (Araújo et al., 2004; Medeiros Júnior et al., 2003; Pacífico et al., 2009) e autoimunes. (Cooke et al., 1999; Elliott, Summers, & Weinstock, 2007; La Flamme, Ruddenklau, & Bäckström, 2003; Saunders et al., 2007; Sewell et al., 2003; Summers et al., 2003) Essa proteção resultaria da

indução de mecanismos regulatórios pelos helmintos como mecanismo de sobrevivência nos tecidos do hospedeiro e não seria parasito-específica, já que, uma vez liberadas as moléculas regulatórias, estas seriam capazes de inibir a resposta inflamatória associada à patogênese dessas doenças. (Elliott et al., 2007; Loke & Lim, 2015)

Os primeiros estudos nessa área foram conduzidos por Lynch e colaboradores na Venezuela onde observaram baixa prevalência de positividade ao teste cutâneo para aeroalérgenos em escolares residentes em uma área endêmica para *Ascaris lumbricoides*, com a documentação, também, de que o tratamento anti-helmíntico aumentou a frequência de positividade ao teste de alergia e a produção de IgE específica para alérgenos. (Lynch, Palenque, Hagel & Di Prisco, 1997; Lynch et al., 1987) Esses e outros estudos em áreas endêmicas para geo-helmintos levantaram a hipótese de que infecções por esses parasitas poderiam estar associadas a uma proteção contra a atopia. (Cooper et al., 2003)

Baseado nessa hipótese, nosso grupo de pesquisa tem investigado a influência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* no desenvolvimento da atopia, inicialmente em uma área endêmica localizada no município baiano de Caatinga do Moura. Foi então observada maior frequência de positividade ao teste cutâneo para aeroalérgenos no grupo de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* quando comparados ao grupo de indivíduos não infectados, demonstrando forte associação inversa entre a infecção pelo helminto e a presença de atopia. (Araújo et al., 2000) Mesmo em indivíduos asmáticos expostos a altos níveis de aeroalérgenos, quando infectados pelo *S. mansoni*, observa-se menor positividade ao teste cutâneo para aeroalérgenos quando comparados a indivíduos asmáticos não infectados. (Medeiros Júnior et al., 2004)

A asma é uma doença inflamatória crônica associada à hiperresponsividade das vias aéreas e obstrução do fluxo aéreo intrapulmonar, reversível espontaneamente ou mediante tratamento, que resulta em episódios recorrentes de dispneia, sibilos, opressão torácica e tosse (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia [SBPT], 2012). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que mais 235 milhões de pessoas são acometidas pela asma (World Health Organization [WHO], 2013); o Brasil, por sua vez, figura entre os países com as mais altas taxas de prevalência, apresentando índices acima dos 10%. (Barreto et al., 2014; To et al., 2012) Apenas no ano de 2013,

ocorreram mais de 100 mil internações pela doença no país, o que gerou um gasto de mais R\$ 62 milhões pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Para avaliar o impacto da infecção pelo *S. mansoni* na gravidade da asma, nosso grupo realizou um estudo prospectivo com um ano de acompanhamento, comparando indivíduos asmáticos infectados provenientes de área endêmica e indivíduos asmáticos não infectados de outras duas áreas não endêmicas com as mesmas condições socioeconômicas. Como resultado, os indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* apresentaram menor gravidade da doença quando comparados aos asmáticos não infectados. (Medeiros Júnior et al., 2003)

Posteriormente, foram avaliados os efeitos do tratamento anti-helmíntico na gravidade da asma por meio de um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, em outra área endêmica de *S. mansoni*, localizada na zona rural de Água Preta, no município de Gandu. Foi, então, observado que os indivíduos asmáticos que foram tratados repetidamente com praziquantel e albendazol apresentaram piora significativa da asma após o sexto mês de tratamento, reforçando a hipótese do papel protetor desempenhado pelas infecções helmínticas na asma e na atopia. (Almeida, Lima et al., 2012)

Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar, por mecanismos imunológicos, a proteção gerada por infecções helmínticas contra os processos atópicos, sendo uma das mais aceitas a indução de moléculas e células reguladoras da resposta imune, como a citocina IL-10 e as células T regulatórias. (Adachi, Oda, Kokubu, & Minoguchi, 1999; Akdis & Blaser, 2001; Araújo, Hoppe, Medeiros Júnior & Carvalho, 2004; Figueiredo et al., 2013; Finlay, Walsh, & Mills, 2014; Macaubas et al., 1999; Pitrez et al., 2015; Van den Biggelaar et al., 2000)

Assim, foram investigados os efeitos da infecção pelo *S. mansoni* e outros helmintos na resposta imune de indivíduos com asma infectados, residentes em uma área endêmica em *S. mansoni* no município do Conde (BA), em um estudo *in vitro*. Este estudo avaliou a produção de citocinas por CMSP estimuladas com o antígeno 1 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p1*), comparando-a com a resposta de asmáticos não infectados provenientes do Ambulatório de Alergia do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foi observado que a produção de citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-5 por células de asmáticos infectados

pelo *S. mansoni* e outros helmintos foi significativamente menor do que a encontrada 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, mostrando um padrão de resposta regulatório nos primeiros e do tipo Th2 nos últimos. (Araújo et al., 2004)

Os resultados desse estudo apontam a IL-10 como uma citocina-chave no controle da resposta inflamatória na asma, uma vez que houve maior produção dela e, ao mesmo tempo, menor produção de citocinas Th2 por CMSP de indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni*. Nesse trabalho, o tratamento anti-helmíntico foi seguido de redução na produção de IL-10 em resposta ao *Der p1*, sendo posteriormente acompanhada por piora dos sintomas de asma. Foi ainda observado que a adição de IL-10 exógena às culturas de CMSP de indivíduos asmáticos não infectados levou a uma redução na produção de IL-5 em resposta ao *Der p1*. (Araújo et al., 2004)

Em outros estudos de resposta imune *in vitro*, utilizando culturas de CMSP de indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* estimuladas com *Der p1*, pudemos observar que os monócitos desses indivíduos apresentam maior expressão da molécula de apresentação de antígeno HLA-DR, bem como expressam mais IL-10 e seu receptor, quando comparados aos monócitos de indivíduos asmáticos não infectados. (Oliveira et al., 2009) Foi observado também que as células T CD4⁺CD25⁺ e os monócitos foram as principais fontes produtoras de IL-10. Adicionalmente, os linfócitos de asmáticos infectados apresentaram maior expressão de CTLA-4 em comparação com os linfócitos de asmáticos não infectados. (Oliveira et al., 2009) Esses achados, além de corroborarem estudos anteriores quanto à alta produção de IL-10 *in vitro* por indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, elucidaram as principais fontes produtoras dessa citocina e sugeriram que a modulação da resposta alérgica observada nesses indivíduos pode envolver a participação de vias de coestimulação mediadas pela molécula CTLA-4, que desempenha papel *sine qua non* na regulação e controle das respostas inflamatórias conduzidas por células T.

O efeito protetor da infecção pelo *S. mansoni* na asma alérgica, observado em humanos, também foi demonstrado em um modelo murino de inflamação das vias aéreas induzida por ovoalbumina num estudo de colaboração do nosso grupo com pesquisadores da Universidade

Federal de Minas Gerais (UFMG). Demonstramos que tanto os camundongos infectados quanto os que foram tratados com ovos de *S. mansoni* apresentaram redução no número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e nos níveis de IL-4, IL-5 e IgE específica no pulmão quando comparados aos camundongos não tratados e não infectados, o que mostrou que tanto o tratamento com ovos quanto a infecção pelo *S. mansoni* são capazes de controlar a resposta Th2 inflamatória observada na asma alérgica em modelo murino. (Pacífico et al., 2009) Diferente do que foi observado em humanos, essa proteção parece ter sido exercida por células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nos camundongos, num mecanismo independente de IL-10, uma vez que o bloqueio do receptor para essa citocina não alterou o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar. Não obstante, os animais que sofreram depleção das células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ apresentaram aumento no número de eosinófilos, algo similar ao observado nos espécimes não infectados. (Pacífico et al., 2009)

Uma vez que tem sido demonstrado que a infecção pelo *S. mansoni* é capaz de regular a resposta inflamatória na asma, a identificação e caracterização de antígenos derivados desse helminto, com potencial regulatório, pode fornecer ferramentas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessa e de outras doenças de base imunológica.

Antígenos do *S. mansoni* com potencial de regular doenças alérgicas e infecciosas

Desde que evidências de que a infecção pelo *S. mansoni* é capaz de modular a resposta inflamatória exacerbada na asma e, consequentemente, reduzir sua gravidade têm sido acumuladas, nosso grupo de pesquisa vem se dedicando a avaliar o potencial de antígenos do *S. mansoni* modularem a resposta inflamatória nessa doença e em outras que cursam com a ativação excessiva da resposta imune.

Inicialmente avaliamos o efeito da adição dos antígenos recombinantes P24, Sm22.6 e Sm14, bem como da fração do antígeno do verme adulto, PIII, sobre a produção de IL-10 na cultura de CMSP de indivíduos com asma leve infectados pelo *S. mansoni*. Observamos que a adição

de todos esses antígenos foi capaz de induzir altos níveis de IL-10 nos indivíduos asmáticos infectados, bem como nos asmáticos que nunca tinham sido expostos à infecção pelo *S. mansoni*. (Cardoso et al., 2006)

No grupo de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni*, a adição dos antígenos Sm22.6, Sm29 e PIII em culturas estimuladas com o alérgeno Der p1 foi capaz de aumentar a produção de IL-10 e reduzir os níveis de IL-5 alérgeno-específica. (Cardoso et al., 2011) Ao investigarmos as fontes produtoras de IL-10 por citometria de fluxo, observamos que as principais foram os monócitos e as células TCD4⁺CD25⁺. (Cardoso et al., 2011)

Um estudo recente avaliando o efeito da adição do antígeno Sm29 e Sm29-TSP2 às culturas de CMSP de indivíduos com asma grave e asma leve e intermitente mostrou que a adição dos antígenos Sm29 e Sm29-TSP2 aumentou a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} e reduziu a frequência de linfócitos T ativados CD4⁺CD25^{low} e CD4⁺CD69⁺. (Almeida, Fernandes et al., 2017) Os antígenos Sm29 e Sm29-TSP2 aumentaram ainda os níveis de IL-10 no sobrenadante das culturas de ambos os grupos de asmáticos. (Almeida, Fernandes et al., 2017)

Em um estudo utilizando o modelo murino de inflamação das vias aéreas induzida por ovoalbumina, ao avaliarmos o efeito da imunização com os antígenos Sm29, Sm22.6 e PIII, observamos que os camundongos imunizados com os antígenos do *S. mansoni* apresentaram redução nos níveis de IL-4 e IL-5, bem como no número de células totais e de eosinófilos no lavado broncoalveolar. (Cardoso et al., 2010) Além disso, os camundongos imunizados apresentaram menores níveis de peroxidase eosinofílica no pulmão e de IgE específica para ovoalbumina no soro. Apesar de os três antígenos terem se mostrado capazes de modular a inflamação alérgica das vias aéreas, apenas o Sm22.6 levou ao aumento dos níveis de IL-10. Não obstante, todos foram capazes de levar ao aumento na frequência de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ que, na ausência de IL-10, podem ter desempenhado papel central no controle da resposta inflamatória observada nos camundongos imunizados com os antígenos do *S. mansoni*. (Cardoso et al., 2010)

Tem sido demonstrado que a infecção pelo *Schistosoma mansoni* bem como produtos do parasita são também capazes de modular a resposta inflamatória do tipo Th1, envolvida em algumas doenças autoimunes, a exemplo do diabetes tipo I, da artrite e da psoríase. (Atochina &

Harn, 2006; Cooke et al., 1999; La Flamme et al., 2003; Sewell, Reinke, Hogan, Sandor, & Fabry, 2002)

Algumas doenças parasitárias também decorrem da exacerbação da resposta imune do eixo Th1/inflamatória: é o caso da leishmaniose tegumentar americana (LTA). A resposta imune celular do tipo Th1, com produção de IFN-g, é importante para a eliminação da *Leishmania sp* pela estimulação macrofágica, que resulta em elevada síntese de radicais de oxigênio e de nitrogênio além da produção de TNF por essas células. (Bacellar et al., 2002) Por outro lado, essa resposta, quando exacerbada, está associada à destruição tecidual na leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM). (Bacellar et al., 2002) Os eventos iniciais na infecção pela *Leishmania sp*, envolvendo os macrófagos e as células dendríticas na produção de citocinas e na apresentação de antígenos do parasita para células T, devem influenciar na resposta do hospedeiro e no curso da infecção. (Saint-Vis et al., 1998) Portanto, o ambiente celular, associado ao perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, é importante para controlar a multiplicação parasitária sem causar danos ao hospedeiro. (Belkaid, 2003; Carvalho et al., 2005) Existe produção limitada de IL-10 na LC (Bacellar et al., 2002) – desse modo, o uso de antígenos de *S. mansoni* capazes de induzir a produção dessa citocina poderia beneficiar os pacientes. Dessa maneira, Bafica et al. (2011) demonstraram que a adição de antígenos de *S. mansoni* em culturas de PBMC de pacientes com LC estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), foi capaz de diminuir a produção de citocinas inflamatórias (TNF e INF- γ) e aumentar a produção de IL-10 por essas células. Adicionalmente, esses antígenos são capazes de diminuir a ativação de monócitos, reduzindo a expressão de HLA-DR e CD80 e aumentar a expressão de moléculas regulatórias, a exemplo de CTLA-4 e Foxp3 nas CD25^{high}, em células T auxiliares (CD4). (Bafica et al., 2012)

Uma vez que, na leishmaniose, as células dendríticas são importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, e que antígenos de *S. mansoni* são capazes de modular a exacerbação dos processos inflamatórios nas doenças imunomediadas, esses antígenos foram testados quanto à capacidade de modularem as funções das células dendríticas de pacientes com a doença em resposta a infecção pela *Leishmania* e ao antígeno solúvel da *Leishmania*. (Lopes, Oliveira et al., 2019) O Sm29, uma glicoproteína localizada no tegumento do verme adulto, foi capaz de aumentar

a expressão *in vitro* de mediadores anti-inflamatórios, como a citocina e o receptor de IL-10, sobre células dendríticas derivadas de monócitos (MoDC) de pacientes com leishmaniose cutânea. (Lopes, Fernandes et al., 2014; Lopes, Oliveira et al., 2019) A IL-10 auxilia no controle da ativação de células mediadoras do desenvolvimento da lesão na leishmaniose. (Ji, Masterson, Sun, & Soong, 2005; Powrie, Corrêa-Oliveira, Mauze & Coffman, 1994) Na LM, observou-se diminuição na intensidade da expressão do receptor de IL-10 na lesão quando comparada à de pacientes com LC, o que levaria a uma baixa resposta a IL-10. (Faria et al., 2005)

O processo de maturação e ativação é uma etapa importante para as células dendríticas por torná-las aptas a apresentarem antígenos às células T, bem como aumentar sua capacidade de produzir citocinas. O antígeno Sm29 foi capaz de aumentar, *in vitro*, a frequência de MoDC expressando os marcadores de maturação e ativação CD83, CD80 e CD86 em pacientes com leishmaniose cutânea (Lopes, Fernandes et al., 2014; Lopes, Oliveira et al., 2019), o que favorece a ativação dessas células e, conseqüentemente, a apresentação antigênica. Diante disso, seria desejável que houvesse equilíbrio na resposta imune, na qual os macrófagos, principais células responsáveis pela eliminação parasitária, continuassem capazes de destruir as leishmanias sem, contudo, permitir uma ativação exacerbada. Nesse contexto, as MoDCs, estimuladas com o antígeno Sm29, poderiam fornecer a regulação necessária para o controle do processo inflamatório.

Outro agente infeccioso cuja patologia está relacionada à presença de resposta imune exacerbada é o HTLV-1. Nosso grupo tem realizado estudos na tentativa de identificar se antígenos do *Schistosoma spp* são capazes de alterar, *in vitro*, a produção de citocinas e o perfil nas CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Estudos têm mostrado que a infecção por esse vírus induz altos níveis de produção *in vitro* das citocinas IFN- γ e TNF nos indivíduos infectados, quando comparada às culturas de células de doadores negativos para HTLV-1. (Carvalho et al., 2001; Santos et al., 2004) Os antígenos do *Schistosoma spp* utilizados no estudo realizado por Lima et al. (2013), mostraram-se capazes de modular negativamente a resposta imune exacerbada do tipo Th1/inflamatória, reduzindo a produção de IFN- γ e TNF *in vitro* em uma alta porcentagem de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Esse trabalho mostrou ainda

aumento da produção de IL-10, citocina esta produzida principalmente pelas células Treg e monócitos, induzida pelos antígenos do *Schistosoma spp* em portadores do HTLV-1. (Lima et al., 2013)

Adicionalmente ao papel das citocinas na infecção pelo HTLV-1, a presença das quimiocinas CXCL9/CXCL10 está associada ao aumento no recrutamento de células inflamatórias no tecido medular espinhal, contribuindo para a patogênese da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (Guerreiro et al., 2006). Nosso grupo mostrou que a estimulação com antígenos do *Schistosoma* sp Sm29, ShTSP2 e PIII foram capazes de reduzir *in vitro* os níveis de CXCL9 em sobrenadantes de CMSP de indivíduos com HAM/TSP. (Lima et al., 2017)

Em conclusão, os resultados dos estudos aqui relacionados, além de esclarecerem importantes aspectos da imunopatogênese da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, pela *Leishmania sp* e pelo HTLV-1, vêm demonstrando o potencial de antígenos do *S. mansoni* em modular a resposta inflamatória associada a lesão tecidual nessas patologias. Tentativas de identificar antígenos do *S. mansoni* com essas propriedades regulatórias vêm sendo realizadas e mostram resultados promissores.

Referências

Adachi, M., Oda, N. Kokubu, F., & Minoguchi, K. (1999). IL-10 induces a Th2 cell tolerance in allergic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 118(2-4), 391-394.

Akdis, C. A., & Blaser, K. (2001). Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. *Microbes and Infection*, 3(11), 891-898.

Almeida, M. C., Lima, G. S., Cardoso, L. S., Souza R. P., Campos, R. A., Cruz, A. A., et al. (2012). The effect of antihelminthic treatment on subjects with asthma from an endemic area of schistosomiasis: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 296856.

Almeida, T. V. V., Fernandes, J. S., Lopes, D. M., Andrade, L. S, Oliveira, S. C., Carvalho, E. M., et al. (2017). *Schistosoma mansoni* antigens alter activation markers and cytokine profile in lymphocytes of patients with asthma. *Acta Tropica*, 166, 268-227.

- Alves Oliveira, L. F., Moreno, E. C., Gazzinelli, G., Martins-Filho, O. A., Silveira, A. M., Gazzinelli, A., et al. (2006). Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. *Infection and Immunity*, 74(2):, 1215-1221.
- Andrade, Z. A. (2009). Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31(11):, 656-663.
- Araújo, M. I., Jesus, A. R., Bacellar, O., Sabin, E., Pearce, E., & Carvalho, E. M. (1996). Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, 26(6), 1399-1403.
- Araújo, M. I., Hoppe, B., Medeiros Júnior, M., Alcântara, L., Almeida, M. C., Schriefer, A., et al. (2004). Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(10), 1797-1803.
- Araújo, M. I., Hoppe, B. S., Medeiros Júnior, M., & Carvalho, E. M. (2004). *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5, Supl. 1), 27-32.
- Araújo, M. I., Lopes, A. A., Medeiros, M., Cruz, A. A., Sousa-Atta, L., Solé, D., et al. (2000). Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *International Archives of Allergy and Immunology*, 123(2), 145-148.
- Atochina, O., & Harn, D. (2006). Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/fsn mice by helminth glycans. *Experimental Dermatology*, 15(6), 461-468.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., et al. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70(12), 6734-6740.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology*, 167(3), 1245-1253.
- Báfica, A. M., Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Loukas, A., Góes, A., Oliveira, R. R., et al. (2012). Changes in T-cell and monocyte phenotypes in vitro by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 520308.
- Báfica, A. M., Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Loukas, A., Varela, G. T., Oliveira, R. R., et al. (2011). *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(7), 856-863.

- Baptista, A. P., & Andrade, Z. A. (2005). Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 183-185.
- Barnes, T. C., Anderson, M. E., & Moots, R. J. (2011). The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *International Journal of Rheumatology*, 2011, 721608.
- Barreto, M. L., Ribeiro-Silva, R. C., Malta, D. C., Oliveira-Campos, M., Andreazzi, M. A., & Cruz, A. A. (2014). Prevalência de sintomas de asma entre escolares do Brasil: Pesquisa Nacional em Saúde do Escolar (PeNSE 2012). *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 17(Supl. 1), 106-115.
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209-218.
- Belkaid, Y. (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(6), 875-885.
- Bica, I., Hamer, D. H., & Stadecker, M. J. (2000). Hepatic schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(3), 583-604, viii.
- Bina, J. C. (1997). Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão. *Revista de Patologia Tropical*, 26, 69-128.
- Bina, J. C., & Prata, A. (2003). Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), 211-216.
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P., & Lodish, H. F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine*, 342(18), 1350-1358.
- Booth, M., Mwatha, J. K., Joseph, S., Jones, F. M., Kadzo, H., Ireri, E., et al. (2004). Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *Journal of Immunology*, 172(2), 1295-1303.
- Border, W. A., & Noble, N. A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 331(19), 1286-1292.
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2, Suppl.), S460-S475.
- Brasil. (2009). Ministério da Saúde. *Guia de vigilância epidemiológica*. Brasília, DF.

Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., et al. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily: CTLA-4. *Nature*, 328(6127), 267-270.

Burke, M. L., Jones, M. K., Gobert, G. N., Li, Y. S., Ellis, M. K., & McManus, D. P. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 31(4), 163-176.

Cardoso, L. S., Barreto, A. S. R., Fernandes, J. S., Oliveira, R. R., Souza, R. P., Carvalho, E. M., et al. (2013). Impaired lymphocyte profile in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 710647.

Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Góes, A. M., Oliveira, R. R., Pacífico, L. G., Marinho, F. V., et al. (2010). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(2), 266-274.

Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Pacífico, L. G., Góes, A. M., Oliveira, R. R., Fonseca, C. T., et al. (2006). *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(Supl. 1), 339-343.

Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Souza, R. P., Góes, A. M., Oliveira, R. R., Alcântara, L. M., et al. (2011). *Schistosoma mansoni* antigens modulate allergic response in vitro in cells of asthmatic individuals. *Drug Development Research*, 72, 538-548.

Carvalho, E. M., Bacellar, O., Porto, A. F., Braga, S., Galvão-Castro, B., & Neva, F. (2001). Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 27(1), 1-6.

Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., et al. (2005). Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 61(4), 337-342.

Cass, C. L., Johnson, J. R., Califf, L. L., Xu, T., Hernandez, H. J., Stadecker, M. J., et al. (2007). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(2), 84-93.

Chiaromonte, M. G., Cheever, A. W., Malley, J. D., Donaldson, D. D., & Wynn, T. A. (2001). Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology*, 34(2), 273-282.

- Chiaromonte, M. G., Mentink-Kane, M., Jacobson, B. A., Cheever, A. W., Whitters, M. J., Goad, M.E., et al. (2003). Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(6), 687-701.
- Cooke, A., Tonks, P., Jones, F. M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A. J., et al. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology*, 21(4), 169-176.
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Rodrigues, L. C., Ordonez, M., Strachan, D., Griffin, G. E., et al. (2003). Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(5), 995-1000.
- Corrêa-Oliveira, R., Malaquias, L. C., Falcão, P. L., Viana, I. R. C., Bahia-Oliveira, L. M. G., Silveira, A. M. S., et al. (1998). Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), 171-177.
- Duncan, M. R., & Berman, B. (1991). Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *The Journal of Investigative Dermatology*, 97(4), 686-692.
- Elliott, D. E., Summers, R. W., & Weinstock, J. V. (2007). Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 457-464.
- Fallowfield, J. A., Mizuno, M., Kendall, T. J., Constandinou, C. M., Benyon, R. C., Duffield, J. S., et al. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *Journal of Immunology*, 178(8), 5288-5295.
- Faria, D. R., Gollob, K. J., Barbosa Júnior, J., Schriefer, A., Machado, P. R. L., Romano-Silva, M. A., et al. (2005). Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(12), 7853-7859.
- Fernandes, J. S., Araújo, M. I., Lopes, D. M., Souza, R. P., Carvalho, E. M., & Cardoso, L. S. (2014). Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 703653.
- Figueiredo, C. A., Barreto, M. L., Alcantara-Neves, N. M., Rodrigues, L. C., Cooper, P. J., Cruz, A. A., et al. (2013). Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze

in an urban tropical population in Brazil. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(6), 1683-1690.

Fine, A., & Goldstein, R. H. (1987). The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(8), 3897-3902.

Finlay, C. M., Walsh, K. P., & Mills, K. H. (2014). Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunology Reviews*, 259(1), 206-230.

Gazzinelli, G., & Colley, D. G. (1992). Human immune responses during schistosomiasis mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25(2), 125-134.

Guerreiro, J. B., Santos, S. B., Morgan, D. J., Porto, A. F., Muniz, A. L., Ho, J. L., et al. (2006). Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(2), 296-301.

Henri, S., Chevillard, C., Mergani, A., Paris, P., Gaudart, J., Camilla, C., et al. (2002). Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *Journal of Immunology*, 169(2), 929-936.

Herbert, D. R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., et al. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20(5), 623-635.

Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., et al. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of Immunology*, 167(11), 6533-6344.

Hoffmann, K. F., Caspar, P., Cheever, A. W., & Wynn, T. A. (1998). IFN- γ , IL-12, and TNF- α are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *Journal of Immunology*, 161(8), 4201-4210.

Hoffmann, K. F., Cheever, A. W., & Wynn, T. A. (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 164(12), 6406-6416.

- Jesus, A. R., Magalhães, A., Miranda, D. G., Miranda, R. G., Araújo, M. I., Jesus, A. A., et al. (2004). Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, 72(6), 3391-3397.
- Jesus, A. R., Silva, A., Santana, L. B., Magalhães, A., Jesus, A. A., Almeida, R. P., et al. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1), 98-105.
- Iarotski, L. S., & Davis, A. (1981). The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire survey. *Bulletin of the World Health Organization*, 59(1), 115-127.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Ward, J. M., Cheever, A. W., et al. (1999). Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *Journal of Immunology*, 163(1), 337-342.
- Ji, J., Masterson, J., Sun, J., & Soong, L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Immunology*, 174(11), 7147-7153.
- Khalil, R. M., Hültner, L., Mailhammer, R., Luz, A., Moeller, J., Mohamed, A. A., et al. (1996). Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Immunology*, 89(2), 256-261.
- La Flamme, A. C., Ruddenklau, K., & Bäckström, B. T. (2003). Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and Immunity*, 71(9), 4996-5004.
- Lambertucci, J. R. (1993). Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35, 399-404.
- Lambertucci, J. R., Rayes, A. A., Barata, C. H., Teixeira, R., & Gerspacher-Lara, R. (1997). Acute schistosomiasis: report on five singular cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(5), 631-635.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 24, 99-146.
- Lima, L. M., Santos, S. B., Oliveira, R. R., Cardoso, L. S., Oliveira, S. C., Góes, A. M., et al. (2013). *Schistosoma* antigens downmodulate the in

- vitro* inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. *Neuroimmunomodulation*, 20(4), 233-238.
- Lima, L. M., Cardoso, L. S., Santos, S. B., Oliveira, R. R., Oliveira, S. C., Góes, A. M., et al. (2017). *Schistosoma* antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals. *Acta Tropica*, 167, 157-162.
- Loke, P., & Lim, Y. A. (2015). Helminths and the microbiota: parts of the hygiene hypothesis. *Parasite Immunology*, 37(6), 314-323.
- Lopes, D. M., Fernandes, J. S., Cardoso, T. M. S., Bafica, A. M. B., Oliveira, S. C., Carvalho, E. M., et al. (2014). Dendritic cell profile induced by *Schistosoma mansoni* antigen in cutaneous leishmaniasis patients. *BioMed Research International*, 2014, 743069.
- Lopes, D. M., Oliveira, S. C., Page, B., Carvalho, L. P., Carvalho, E. M. & Cardoso, L. S. (2019). *Schistosoma mansoni* rSm29 antigen induces a regulatory phenotype on dendritic cells and lymphocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 9, 3122.
- Lotz, M., & Guerne, P. A. (1991). Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *The Journal of Biological Chemistry*, 266(4), 2017-2020.
- Lynch, N. R., Lopez, R. I., Di Prisco-Fuenmayor, M. C., Hagel, I., Medouze, L., Viana, G., et al. (1987). Allergic reactivity and socio-economic level in a tropical environment. *Clinical Allergy*, 17(3) 199-207.
- Lynch, N. R., Palenque, M., Hagel, I., & Di Prisco, M. C. (1997). Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(1), 50-54.
- Macaubas, C., Sly, P. D., Burton, P., Tiller, K., Yabuhara, A., Holt, B. J., et al. (1999). Regulation of T-helper cell responses to inhalant allergen during early childhood. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(9), 1223-1231.
- Magalhães, A., Miranda, D. G., Miranda, R. G., Araújo, M. I., Jesus, A. A., Silva, A., et al. (2004). Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5, Supl. 1), 21-26.
- Marra, F., Aleffi, S., Galastri, S., & Provenzano, A. (2009). Mononuclear cells in liver fibrosis. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), 345-358.
- Mathieson, W., & Wilson, R. A. (2010). A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International Journal for Parasitology*, 40(5), 617-628.

Medeiros Júnior, M., Almeida, M. C., Figueiredo, J. P., Atta, A. M., Mendes, C. M. C., Taketomi, E. A., et al. (2004). Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15(2), 142-147.

Medeiros Júnior, M., Figueiredo, J. P., Almeida, M. C., Matos, M. A., Araújo, M. I., Cruz, A. A., et al. (2003). *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(5), 947-951.

Mentink-Kane, M. M., Cheever, A. W., Wilson, M. S., Madala, S. K., Beers, L. M., Ramalingam, T. R., et al. (2011). Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology*, 141(6), 2200-2209.

Mihara, M., Moriya, Y., & Ohsugi, Y. (1996). IL-6-soluble IL-6 receptor complex inhibits the proliferation of dermal fibroblasts. *International Journal of Immunopharmacology*, 18(1), 89-94.

Mwatha, J. K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G. G., Ouma, J. H., Mumo, J., et al. (1998). High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, 160(4), 1992-1999.

Oliveira, R. R., Gollob, K. J., Figueiredo, J. P., Alcântara, L. M., Cardoso, L. S., Aquino, C. S., et al. (2009). *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. *Microbes and Infection*, 11(2), 223-229.

Pacífico, L. G., Marinho, F. A., Fonseca, C. T., Barsante, M. M., Pinho, V., Sales-Júnior, P. A., et al. (2009). *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. *Infection and Immunity*, 77(1), 98-107.

Pearce, E. J., & MacDonald, A. S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews: Immunology*, 2(7), 499-511.

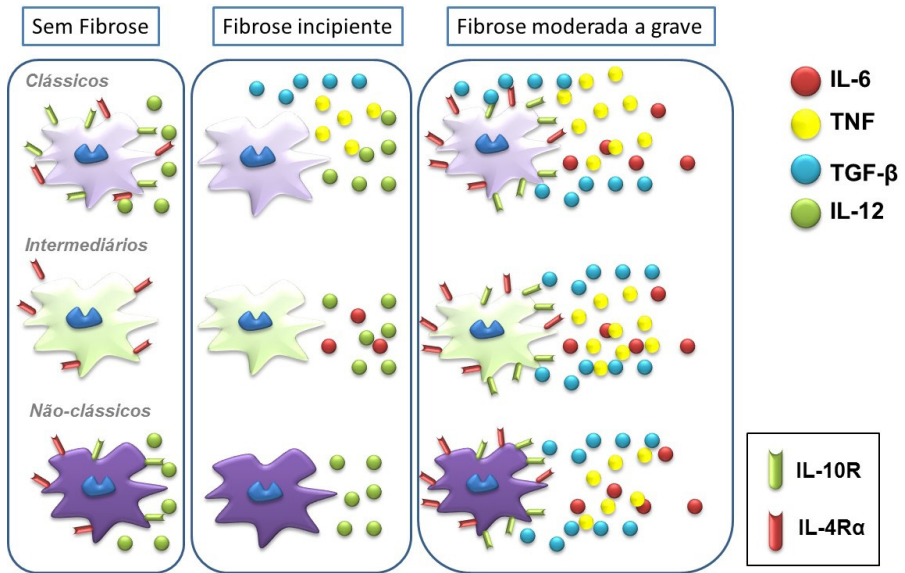
Pitrez, P. M., Gualdi, L. P., Barbosa, G. L., Sudbrack, S., Ponzi, D., Cao, R. G., et al. (2015). Effect of different helminth extracts on the development of asthma in mice: The influence of early-life exposure and the role of IL-10 response. *Experimental Parasitology*, 156, 95-103.

Powrie, F., Corrêa-Oliveira, R., Mauze, S., & Coffman, R. L. (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(2), 589-600.

- Reiman, R. M., Thompson, R. W., Feng, C. G., Hari, D., Knight, R., Cheever, A. W., et al. (2006). Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and Immunity*, 74(3), 1471-1479.
- Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Aït-Yahia, S., et al. (1998). The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *Journal of Immunology*, 160(4), 1666-1676.
- Saito, S., Sasaki, Y., & Sakai, M. (2005). CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 65(2), 111-20.
- Santos, S. B., Porto, A. F., Muniz, A. L., Jesus, A. R., Magalhães, E., Melo, A., et al. (2004). Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases*, 4, 7.
- Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A., & Lawrence, C. E. (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal Helminth infection. *Infection and Immunity*, 75(1), 397-407.
- Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M., et al. (2003). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology*, 15(1), 59-69.
- Sewell, D. L., Reinke, E. K., Hogan, L. H., Sandor, M., & Fabry, Z. (2002). Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunology Letters*, 82(1-2), 101-110.
- Souza, R. P., Cardoso, L. S., Lopes, G. T. V., Almeida, M. C. F., Oliveira, R. R., Alcântara, L.M., et al. (2012). Cytokine and chemokine profile in individuals with different degrees of periportal fibrosis due to *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 394981.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet: Infectious Diseases*, 6(7), 411-425.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Qadir, K., Urban Junior, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2003). *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(9), 2034-2041.
- To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A. S., Bateman, E. D., Cruz, A. A., et al. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, 12, 204.

- Van den Biggelaar, A. H., Van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G., et al. (2000). Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *The Lancet*, 356(9243): 1723-1727.
- Verrecchia, F., & Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(22), 3056-3062.
- Walsh, C. M., Smith, P., & Fallon, P. G. (2007). Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunology*, 29(6), 293-308.
- Warren, K. S. (1968). Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 44(3), 280-294.
- World Health Organization (WHO). (2013). *Asthma*. Recuperado em 15 fevereiro, 2019, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>
- Wynn, T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 524-529.
- Wynn, T. A., & Cheever, A. W. (1995). Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, 7(4), 505-511.
- Wynn, T. A., Cheever, A. W., Jankovic, D., Poindexter, R. W., Caspar, P., Lewis, F. A., et al. (1995). An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*, 376(6541), 594-596.
- Wynn, T. A., Cheever, A. W., Williams, M. E., Hieny, S., Caspar, P., Kühn, R., et al. (1998). IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *Journal of Immunology*, 160(9), 4473-4480.
- Wynn, T. A., Eltoun, I., Oswald, I. P., Cheever, A. W., & Sher, A. (1994). Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(5), 1551-1561.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-e80.
- Zimmermann, H. W., & Tacke, F. (2011). Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(6), 509-536.

Figura 1 – Figura representativa da expressão de citocinas e receptores nos monócitos de pacientes esquistossomóticos com diferentes graus de fibrose periportal



Periodontite crônica: resposta imune contra *Porphyromonas gingivalis*

Soraya Castro Trindade, Paulo Cirino de Carvalho-Filho,
Isaac Suzart Gomes-Filho, Michelle Miranda Lopes Falcão,
Márcia Tosta Xavier, Roberto José Meyer Nascimento

Introdução

As doenças periodontais compreendem uma série de alterações que ocorrem nos tecidos que circundam as unidades dentárias, resultantes de uma resposta inflamatória a microrganismos presentes no biofilme dentário que pode permanecer confinada aos tecidos gengivais ou progredir para os tecidos de sustentação dos dentes – o que configura a periodontite. Quando não tratada, pode levar à perda inexorável do dente. (Gemmell & Seymour, 2004) Os aspectos clínicos da periodontite incluem perda de inserção clínica e de osso alveolar, presença de bolsa periodontal, inflamação e sangramento gengival. (Armitage, 1999)

A periodontite é uma doença multifatorial, com participação significativa do hospedeiro e de fatores ambientais e bacterianos. No entanto, é a resposta inflamatória do hospedeiro que leva à maior parte da destruição dos tecidos periodontais. De acordo com o processo de progressão dessa doença, ela pode ainda se apresentar com diferentes graus de extensão. A periodontite agressiva e localizada está associada à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ao passo que a forma crônica e generalizada se relaciona a diversas bactérias, incluindo a *Porphyromonas gingivalis*, a *Tannerella forsythia* e a *Treponema denticola*. Desse modo, a grande diversidade microbiana na cavidade bucal, em conjunto com a complexa resposta do hospedeiro, com elementos da imunidade inata e

adaptativa, leva à inflamação crônica e consequente perda óssea. (Huang & Gibson, 2014)

Recentes estudos metagenômicos e mecanísticos são consistentes com um novo modelo de patogênese periodontal, que propõe o início da doença por uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, não apenas por um seletivo grupo de bactérias conhecido como “periodontopatógenos”. Algumas bactérias encontradas em baixa quantidade na microbiota têm efeito em toda comunidade e, por serem componentes críticos para o desenvolvimento da disbiose, são conhecidas como patógenos-chave. (Hajishengallis & Lamont, 2014) O exemplo mais bem documentado é o da *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo Gram-negativo, anaeróbico estrito e assacarolítico da família *Bacteroidaceae* que tem sido implicado na periodontite humana. (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998)

Embora o envolvimento bacteriano na etiologia da periodontite esteja bem estabelecido, reconhece-se que apenas a presença de bactérias patogênicas não é suficiente para causar a doença. O conceito atual de etiologia multifatorial das doenças periodontais inclui o hospedeiro como componente fundamental (Figura 1). Os patógenos-chave relacionados ao início e à progressão da periodontite, especialmente o *Porphyromonas gingivalis*, promovem o recrutamento e a ativação de células do hospedeiro, como monócitos/macrófagos, linfócitos, fibroblastos e outros tipos, induzindo o desequilíbrio na produção de mediadores inflamatórios e moléculas contrarregulatórias (Chitrapriya, Rao, & Lavu, 2015; Dezerega et al., 2010; Papathanasiou et al., 2014; Schenkein et al., 2010) em resposta à exposição aos seus componentes.

Diante da complexidade e da relevância do tema, a interação entre componentes celulares de *Porphyromonas gingivalis* e a resposta imune do hospedeiro na patogênese da periodontite crônica vêm sendo objeto de investigação no Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), em parceria com outras instituições de ensino superior – como a Universidade Estadual de Feira de Santana (Brasil) e a Universidade de Wroclaw (Polônia) –, ao longo da última década. Assim, este capítulo tem por objetivo apresentar uma revisão sobre o referido tópico, além de propor um modelo de periodontite crônica que torne mais clara a complexa relação

patógeno-hospedeiro existente na manutenção da condição inflamatória crônica da periodontite.

Antígenos de *Porphyromonas gingivalis* induzem morte ou proliferação das células de defesa do hospedeiro?

A morte da célula do hospedeiro talvez seja o resultado potencial mais esperado da sua interação com o parasita. (Hirano & Ruebner, 1966 apud Fink & Cookson, 2005) Entretanto, a *Porphyromonas gingivalis* parece possuir diversos mecanismos que envolvem inibição e/ou estimulação de moléculas responsáveis pela manutenção ou proliferação de células do hospedeiro, o que pode perpetuar o processo inflamatório nos tecidos periodontais.

A atividade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico diante de estímulos de microrganismos orais tem sido estudada desde a década de 1970. Utilizando a técnica de incorporação com timidina tritiada, maior reatividade de linfócitos de indivíduos com periodontite estimulados com extratos de microrganismos Gram-negativos (Lang & Smith, 1977) ou de biofilme autólogo (Church & Dolby, 1978) foi demonstrada. Entretanto, resultados de estudos subsequentes foram contraditórios, mostrando a capacidade que a *Treponema denticola*, a *Capnocytophaga ochracea* e a *Porphyromonas gingivalis* têm de suprimir a resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico. (Gemmell, Feldner, & Seymour, 1992; Shenker & Slots, 1989)

Mais recentemente, Trindade et al. (2012a) demonstraram que o lipopolissacarídeo (LPS) e a proteína recombinante HmuY da *Porphyromonas gingivalis*, ambos purificados, inibem a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano. Entretanto, essa capacidade inibitória não é observada quando as células são cultivadas com o extrato total contendo antígenos somáticos da bactéria. No extrato, LPS e HmuY estão, provavelmente, em concentração relativa menor do que nos experimentos em que são adicionados puros; esses fatores de virulência podem, ainda, estabelecer interações diversas com outros componentes bacterianos na célula, resultando em capacidade inibitória não significativa. Vale ressaltar que essas moléculas, em

estado livre ou na célula bacteriana, podem apresentar modificações estruturais em consequência de se encontrarem em ambientes bastante distintos. Ambas são moléculas de superfície, interagindo com estruturas de parede e membrana, o que não se repete no extrato e tampouco nas moléculas purificadas. Cabe salientar que LPS e HmuY são dois importantes fatores de virulência do patógeno: o primeiro, uma endotoxina componente da parede celular externa da bactéria (Wang & Ohura, 2002); o segundo, um importante heme-ligante que tem como função a captação de ferro para sua sobrevivência. (Olczak, Sroka, Potempa, & Olczak, 2008)

A morte celular, por outro lado, pode ser discutida e caracterizada em dois aspectos principais: apoptose e necrose. A apoptose pode ser descrita como um processo autônomo, ativo e programado de morte celular que não induz inflamação; já a necrose pode ser entendida como uma morte celular passiva, acidental, podendo resultar de estímulos ambientais, com liberação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios. (Fink & Cookson, 2005)

Diversos fatores de supressão ou inibição de apoptose têm sido apresentados, demonstrando a dependência de genes que codificam proteínas anti e pró-apoptóticas no equilíbrio desse processo. (Carvalho-Filho, 2015; Carvalho-Filho et al., 2013; Urnowey et al., 2006) Pode-se observar danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) associados a apoptose e expressão de p53 e Bcl-2 (Tonetti, Cortellini, & Lung, 1998), Fas, Fas ligante e caspase-3 ativa em tecidos gengivais, quando há um desafio crônico bacteriano. (Bascones, Gamonal, Gomez, Silva, & Gonzales, 2004)

Moléculas inibidoras de morte celular chamadas PD-1 (Figueira et al., 2009), receptoras do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (Trail) e de inibidores de caspase-3 (Lucas, Bartold, Dharmapatni, Holding, & Haynes, 2010), estão presentes em lesões periodontais crônicas e podem estar envolvidas na inibição de apoptose. Segundo Yao et al. (2010), a indução de um fenótipo pró-sobrevivência pode impedir a morte programada da célula hospedeira e ajudar na sobrevivência da *P. gingivalis* dentro das células epiteliais. Esse mecanismo, pelo qual a bactéria pode bloquear as vias de apoptose, ocorre pela manipulação da via JAK/Stat, que controla as vias intrínsecas mitocondriais de morte nas células. Yilmaz et al. (2008) demonstraram que a *P. gingivalis* pode inibir

a apoptose de células epiteliais gengivais pela ligação de ATP a receptores P2X. Também, um homólogo da molécula nucleosídeo-difosfato-cinase (NDK) de *P. gingivalis* promove a sobrevivência de células do hospedeiro por hidrólise de ATP extracelular e prevenção de apoptose por intermédio de P2X.

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* também pode evitar a apoptose de neutrófilos HL60. Entretanto, esse processo pode ser restaurado com a adição de IL-10, o que pode explicar o mecanismo para o desenvolvimento da inflamação periodontal destrutiva. (Murray & Wilton, 2003)

A capacidade, *in vitro*, de alguns componentes celulares da *Porphyromonas gingivalis* em modular a resposta imune do hospedeiro foi demonstrada por meio de indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos (Trindade et al., 2012a), células epiteliais gengivais humanas (Brozovic et al., 2006) e fibroblastos. (Sheets, Potempa, Travis, Fletcher, & Casiano, 2006) Essa indução pode ocorrer tanto pela via dependente (Urnowey et al., 2006) quanto pela via independente de caspase. (Sheets et al., 2006) O cultivo de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) humanas com antígenos somáticos de *P. gingivalis* ou seu LPS purificado pode resultar tanto em apoptose clássica quanto em formas de morte caracterizadas por liberação de conteúdo celular inflamatório no microambiente, como apoptose tardia e necrose. (Trindade et al., 2012a)

A proteína HmuY da *Porphyromonas gingivalis* também parece atuar no processo de morte celular programada nas CMSP. Essas células, em contato com a proteína em cultura, parecem ser incapazes de completar o processo de apoptose, desencadeando, da mesma forma, apoptose tardia e necrose, o que pode prolongar o processo de destruição tecidual. (Trindade et al., 2012a) Além disso, em CMSP de indivíduos com periodontite crônica, a proteína diminui a expressão de genes relacionados com apoptose, como Fas, Fas ligante, Trail, Bak1, Casp9 e Apaf1 (Carvalho-Filho, 2015), enquanto induz em cultura a produção de altos níveis de Bcl-2, resultando em inibição da apoptose por permitir a maior sobrevivência de linfócitos T CD3+, o que prolongaria o quadro inflamatório crônico na periodontite. (Carvalho-Filho et al., 2013)

Resposta imune humoral contra antígenos de *Porphyromonas gingivalis*

As imunoglobulinas são glicoproteínas, com função de anticorpo, presentes nos fluidos biológicos, e estão associadas a diferentes funções *in vivo* e *in vitro*. As diferentes classes de imunoglobulinas apresentam diversas concentrações nos diferentes fluidos, assim como distintas funções biológicas, que podem interferir em uma dada patogênese, uma vez que a imunoglobulina pode lesar o patógeno ou facilitar a lesão tecidual por sua atividade opsonizante e capacidade de ativar o sistema do complemento.

Testes de titulação de anticorpos imunoglobulina G (IgG) no sangue contra patógenos periodontais podem ser úteis para avaliar a gravidade da infecção e os efeitos do tratamento. (Kudo et al., 2012) A resposta de anticorpo para diferentes cepas de periodontopatógenos pode discriminar entre pacientes com periodontite agressiva localizada, periodontite agressiva generalizada, periodontite crônica e saúde periodontal. (Trindade et al., 2008)

A IgG parece ser o isótipo mais frequente no soro de indivíduos com periodontite crônica. A resposta humoral em portadores dessa doença é caracterizada por níveis séricos expressivos de IgG específica contra antígenos de *P. gingivalis* (Franca et al., 2007; Trindade et al., 2008, 2012b), cujo peso molecular pode variar de 20 kDa a 128 kDa (Franca et al., 2007; Trindade et al., 2008), demonstrando amplo repertório de reconhecimento. Além disso, a intensidade do reconhecimento de antígenos de *Porphyromonas gingivalis* por IgG nos indivíduos doentes está diretamente relacionada a piores condições clínicas apresentadas por eles, com profundidades de sondagem de bolsas e perda de inserção clínica mais proeminentes (Franca et al., 2007), além de maior percentual de sítios comprometidos. (Trindade et al., 2007a, 2007b).

As subclasses de IgG principalmente envolvidas no reconhecimento são IgG1 e IgG4. A resposta humoral diante do estímulo de antígenos somáticos presentes no extrato sonicado e em uma fração semipurificada de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 parece ser distinta entre indivíduos com periodonto saudável, gengivite, periodontite agressiva ou periodontite crônica, sendo que estes últimos apresentam níveis mais elevados de IgG1 e IgG4 (Trindade et al., 2008), principalmente

em condições clínicas mais desfavoráveis da doença. (Trindade et al., 2007a, 2007b) Além disso, os níveis séricos de IgG2, contra a mesma fração semipurificada, estão correlacionados a maiores índices de sangramento à sondagem, enquanto níveis maiores de IgG3 correlacionam-se com condições clínicas compatíveis com a periodontite crônica moderada. (Trindade et al., 2007a)

Uma resposta imune humoral forte, com produção de diferentes isótipos de imunoglobulinas contra antígenos isolados de *P. gingivalis*, tem sido demonstrada. Fatores de virulência, como as gingipaínas, um grupo de cisteína-proteinases específicas de arginina ou lisina – também conhecidas como RgpA, RgpB e Kgp (Li & Collyer, 2011) –, conseguem induzir em indivíduos com diagnóstico de periodontite uma resposta sérica de IgG, sendo que a subclasse IgG2, contra o complexo proteinase-adesina RgpA-Kgp, está associada ao aumento da gravidade da doença. (O'Brien-Simpson et al., 2000) Outro fator de virulência de *P. gingivalis*, as fímbrias, importantes para a colonização bacteriana (Moreno & Contreras, 2013), parecem estimular a produção de IgA no fluido gengival. (Condorelli et al., 1998) O LPS de *P. gingivalis*, por sua vez, tem a capacidade de induzir a produção de IgA salivar, e o nível salivar de IgA contra esse LPS pode estar relacionado à maior gravidade de destruição periodontal em indivíduos com diagnóstico de periodontite crônica. (Pudakalkatti & Baheti, 2015)

Por fim, HmuY, uma proteína responsável pela captação de ferro na forma de heme por *P. gingivalis*, tem se mostrado uma molécula imunogênica, com indução de resposta sérica específica de IgG, particularmente IgG1, em indivíduos com periodontite crônica. Essa glicoproteína é promissora na investigação de indivíduos com esse tipo de doença periodontal, já que aqueles sem a moléstia não foram capazes de produzir os mesmos níveis dessa imunoglobulina em resposta a HmuY quando os soros foram testados por *Western blotting*. (Trindade et al., 2012b)

Resposta imune celular contra antígenos de *Porphyromonas gingivalis*

A proliferação de linfócitos diante de desafios provenientes do biofilme dentário depende da cooperação celular, com a participação de macrófagos, células de Langerhans, linfócitos T e linfócitos B. (Turvey & Broide, 2010; Van Dyke & Van Winkelhoff, 2013) Dependendo da maneira como o sistema imune está sendo desafiado, a composição do infiltrado inflamatório nos diferentes compartimentos da lesão periodontal pode variar – mas é sabido que tanto as células T quanto as células B estão presentes nos tecidos com periodontite. (Younes et al., 2009) Além da proporção entre essas duas subpopulações de linfócitos, é importante conhecer seu estado de ativação (Amunulla et al., 2008), já que diferentes espécies bacterianas apresentam capacidades distintas de ativação dessas células. (Huang & Gibson, 2014)

Fatores derivados de bactérias estimulam uma reação inflamatória local e a ativação do sistema imune inato. Na resposta imune inata, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares detectam o agente invasor por intermédio de receptores de reconhecimento. Proteases e outras moléculas estruturais das bactérias interagem com receptores tipo Toll (TLR), CD14, proteínas de domínio de ligação a nucleotídeos de oligomerização (Node) e proteínas G (Madianos, Bobetsis, & Kinane, 2005), iniciando, assim, a via de sinalização. Essa ação dispara o gatilho de sinalização intracelular da resposta inflamatória (Zelkha, Freilich, & Amar, 2010), o que leva à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. (Turvey & Broide, 2010) Em seguida, a ativação de linfócitos T inicia a imunidade adaptativa com resposta Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias (Treg), enquanto os linfócitos B participam desse processo com a produção de anticorpos. (Di Benedetto, Gigante, Colucci, & Grano, 2013)

A ativação policlonal de linfócitos B promove a produção de anticorpos de baixa afinidade, resultando em deficiência na eliminação da bactéria e persistência da destruição tecidual. (Berglundh, Donati, & Zitzmann, 2007) Entretanto, os linfócitos B se transformam em plasmócitos na presença de linfócitos T CD4⁺, e essa interação pode potencializar a resposta contra o patógeno, resultando em uma resposta mais elaborada, com troca de classe e maturação por afinidade (Matthews,

Zheng, DiMenna, & Chaudhuri, 2014), além da produção de citocinas. (Ohlrich, Cullinan, & Seymour, 2009)

Nesse contexto, as células mononucleares humanas respondem a estímulos antigênicos de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente o LPS e a proteína HmuY, com aumento na produção das citocinas pró-reabsortivas IL-1b e IL-6 (Trindade et al., 2012b; Trindade et al., 2013). A presença de antígenos somáticos de *P. gingivalis*, além dos citados anteriormente, inibe a produção de IL-8, uma quimiocina cuja função principal é o recrutamento de neutrófilos. Destarte, a incapacidade de atrair neutrófilos para o local da infecção pode facilitar a sobrevivência do patógeno e determinar o início da doença. (Bondy-Carey et al., 2013; Bostanci et al., 2013)

Existem relatos da participação de IL-33 (Köseoğlu, Hatipoğlu, Sağlam, Enhoş, & Esen, 2015; Malcolm et al., 2015), IL-17 (Awang et al., 2014; Cheng, Hughes, & Taams, 2014) e IL-18 (Banu et al., 2015; Chitrapriya et al., 2015; Sánchez-Hernández et al., 2011; Yee, Kim, Alpagot, Duzgunes, Konopka, 2012; Yoshinaka et al., 2014) na destruição periodontal. Entretanto, o estudo dessa relação ainda é incipiente, e alguns trabalhos não encontraram associação positiva entre os níveis dessas citocinas nos tecidos periodontais e a periodontite. (Buduneli, Özçaka, & Nalbantsoy, 2012; Papathanasiou et al., 2014) Tardif, Ross e Rouabhia (2004) verificaram expressão de mRNA e produção aumentada de IL-1beta, mas não de IL-18, por fibroblastos gengivais após estimulação com LPS de *P. gingivalis*, sugerindo que a IL-18 não participa desse mecanismo.

O microambiente da lesão periodontal também pode conter IL-10, que tem efeito em vários tipos celulares, incluindo células T, células B, macrófagos, células NK, mastócitos e neutrófilos. Esses efeitos incluem modulação negativa da produção de IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- α e inibição da fagocitose. (Murray & Wilton, 2003) Treg (Cardoso et al., 2008; Nakajima et al., 2005) e células Th17 (Ohyama et al., 2009; Schenkein et al., 2010) têm sido demonstradas nos tecidos periodontais, aumentando sua importância na imunorregulação da doença periodontal. As implicações clínicas desses estudos podem ser vistas na identificação da expressão gênica de citocinas Th1/Th2 e Treg/Th17 no sangue periférico e em transcriptomas salivares, que agora estão sendo testados como possíveis marcadores de suscetibilidade à doença. (Ohlrich et al., 2009)

Considerações finais

Porphyromonas gingivalis, o principal agente etiológico na periodontite, é componente importante do microbioma oral e colonizador altamente adaptado e capaz de se evadir dos sistemas de defesa do hospedeiro e interferir nas relações entre outras espécies que compõem a microbiota localizada no biofilme periodontal – induzindo, dessa forma, a um processo inflamatório crônico, com perfil de pró-sobrevivência celular e consequente dano tecidual, observado em indivíduos com periodontite crônica. Moléculas isoladas e purificadas de *P. gingivalis* têm papel importante na imunopatogênese da periodontite crônica, atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. A proteína HmuY, utilizada pela bactéria para a captação de ferro, por ser altamente específica, torna-se alvo promissor para estratégias terapêuticas e/ou diagnóstico em sítios refratários, assim como, para o acompanhamento da terapia de manutenção em indivíduos portadores de periodontite crônica. Entretanto, são necessários mais estudos que demonstrem o papel imunomodulador de HmuY nessa doença.

Referências

- Amunulla, A., Venkatesan, R., Hamakrishnan, H., Arun, K. V., Sudarsan, S., Talwar, A. (2008). Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 12, 45-50.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1-6.
- Awang, R. A., Lappin, D. F., MacPherson, A., Riggio, M., Robertson, D., Hodge, P., et al. (2014). Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17a and IL-17e in periodontal immunity. *Inflammation Research*, 63(12), 1001-1012.
- Banu, S., Jabir, N. R., Mohan, R., Manjunath, N. C., Kamal, M. A., Kumar, K. R., et al. (2015). Correlation of toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. *Journal of Periodontology*, 86, 431-439.
- Bascones, A., Gamonal, J., Gomez, M., Silva, A., & Gonzalez, M. A. (2004). New knowledge of the pathogenesis of periodontal disease. *Quintessence International*, 35(9), 706-716.

- Berglundh, T., Donati, M., & Zitzmann, N. (2007). B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontology 2000*, 45, 51-66.
- Bondy-Carey, J. L., Galicia, J., Bagaitkar, J., Potempa, J. S., Potempa, B., Kinane, D. F., et al. (2013). Neutrophils alter epithelial response to porphyromonas gingivalis in a gingival crevice model. *Molecular Oral Microbiology*, 28(2), 102-113.
- Bostanci, N., Thurnheer, T., Aduse-Opoku, J., Curtis, M. A., Zinkernagel, A. S., & Belibasakis, G. N. (2013). *Porphyromonas gingivalis* regulates TREM-1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains. *PLoS One*, 8(10), e75784.
- Brozovic, S., Sahoo, R., Barve, S., Shiba, H., Uriarte, S., Blumberg, R. S., et al. (2006). *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology*, 152(3), 797-806.
- Buduneli, N., Özçaka, Ö., & Nalbantsoy, A. (2012). Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 83(3), 362-368.
- Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Moreira, A. P., Júnior, W. M., Rossi, M. A., & Silva, J. S. (2008) Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), 311-318.
- Carvalho-Filho, P. C. (2015). *Produção de citocinas e expressão de mRNA por células mononucleares de sangue periférico sob estímulo de rHmuY de Porphyromonas gingivalis na periodontite crônica* (Tese de doutorado não publicada). Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Carvalho-Filho, P. C., Trindade, S. C., Olczak, T., Sampaio, G. P., Oliveira-Neto, M. G., Santos, H. A., et al. (2013). *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. *BMC Microbiology*, 13, 206.
- Cheng, W. C., Hughes, F. J., & Taams, L. S. (2014). The presence, function and regulation of IL-17 and TH17 cells in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(6), 541-549.
- Chitrapriya, M. N., Rao, S. R., & Lavu, V. (2015). Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(1), 14-17.
- Church, H., & Dolby, A. E. (1978). The relationship between the dose of dentogingival plaque and the in vitro lymphoproliferative response in subjects with periodontal disease. *Journal of Oral Pathology*, 7(5), 318-325.

- Condorelli, F., Scalia, G., Calì, G., Rossetti, B., Nicoletti, G., & Lo Bue, A. M. (1998). Isolation of porphyromonas gingivalis and detection of immunoglobulin a specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8), 2322-2325.
- Dezerega, A., Pozo, P., Hernández, M., Oyarzún, A., Rivera, O., Dutzan, N., et al. (2010). Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 81(2), 267-276.
- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S., & Grano, M. (2013). Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 503754.
- Figueira, E. A., Rezende, M. L., Torres, S. A., Garlet, G. P., Lara, V. S., Santos, C. F., et al. (2009). Inhibitory signals mediated by programmed death-1 are involved with T-cell function in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 80(11), 1833-1844.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73, 1907-1916.
- Franca, M., Moura-Costa, L., Meyer, R. J., Trindade, S. C., Tunes Uda, R., & Freire, S. M. (2007). Humoral immune response to antigens of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in chronic periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*, 15(3), 213-219.
- Gemmell, E., Feldner, B., & Seymour, G. J. (1992). CD45RA and CD45RO positive CD4 cells in human peripheral blood and periodontal disease tissue before and after stimulation with periodontopathic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 7, 84-88.
- Gemmell, E., & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 35, 21-41.
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2014). Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Immunology*, 44(2), 328-338.
- Huang, N., & Gibson, F. C. (2014). Immuno-pathogenesis of periodontal disease: current and emerging paradigms. *Current Oral Health Reports*, 1(2), 124-132.
- Köseoğlu, S., Hatipoğlu, M., Sağlam, M., Enhoş, S., & Esen, H. H. (2015). Interleukin- 33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50, 525-534.

- Kudo, C., Naruishi, K., Maeda, H., Abiko, Y., Hino, T., Iwata, M., et al. (2012). Assessment of the plasma/serum igg test to screen for periodontitis. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1190-1195.
- Lang, N. P., & Smith, F. N. (1977). Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease: I. Populations of varying severity of disease. *Journal of Periodontal Research*, 12(4), 298-309.
- Li, N., & Collyer, C. A. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: complex domain structures confer diverse functions. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 1(1), 41-58.
- Lucas, H., Bartold, P. M., Dharmapatni, A. A., Holding, C. A., & Haynes, D. R. (2010). Inhibition of apoptosis in periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89(1), 29-33.
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., Kinane, & D. F. (2005) Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 57-71.
- Malcolm, J., Awang, R. A., Oliver-Bell, J., Butcher, J. P., Campbell, L., Adrados Planell, A., et al. (2015). IL-33 exacerbates periodontal disease through induction of RANKL. *Journal of Dental Research*, 94(6), 968-975.
- Matthews, A. J., Zheng, S., DiMenna, L. J., & Chaudhuri, J. (2014). Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Advances in Immunology*, 122, 1-57.
- Moreno, S., & Contreras, A. (2013). Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. *Fundación Juan Jose Carraro*, 37, 16-27.
- Murray, D. A., & Wilton, J. M. (2003). Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of h160-derived neutrophils in vitro. *Infection and Immunity*, 71(12), 7232-7235.
- Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G. J., et al. (2005). Regulatory t-cells infiltrate periodontal disease tissues. *Journal of Dental Research*, 84(7), 639-643.
- O'Brien-Simpson, N. M., Black, C. L., Bhogal, P. S., Cleal, S. M., Slakeski, N., Higgins, T. J., et al. (2000). Serum immunoglobulin G (IGG) and IGG subclass responses to the RGPA-KGP proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *Infection and Immunity*, 68(5), 2704-2712.
- Ohlrich, E. J., Cullinan, M. P., & Seymour, G. J. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54(Suppl. 1), S2-S10.

Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Kuhara, A., Nishimura, F., Nakasho, K., Yamanegi, K., et al. (2009). The involvement of IL-23 and the TH17 pathway in periodontitis. *Journal of Dental Research*, 88(7), 633-638.

Olczak, T., Sroka, A., Potempa, J., & Olczak, M. (2008). *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR: further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Archives of Microbiology*, 183(3), 197-210.

Papathanasiou, E., Teles, F., Griffin, T., Arguello, E., Finkelman, M., Hanley, J., et al. (2014). Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 49(1), 55-61.

Pudakalkatti, P. S., & Baheti, A. S. (2015). Correlation of salivary immunoglobulin A against lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* with clinical periodontal parameters. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6(3), 305-308.

Sánchez-Hernández, P. E., Zamora-Perez, A. L., Fuentes-Lerma, M., Robles-Gómez, C., Mariaud-Schmidt, R. P., & Guerrero-Velázquez, C. (2011). IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 17(5), 522-529.

Schenkein, H. A., Koertge, T. E., Brooks, C. N., Sabatini, R.; Purkall, D. E., & Tew, J. G. (2010). IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89(9), 943-947.

Sheets, S. M., Potempa, J., Travis, J., Fletcher, H. M., & Casiano, C. A. (2006) Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. *Infection and Immunity*, 74(10), 5667-5678.

Shenker, B. J., & Slots, J. (1989). Immunomodulatory effects of bacteroides products on in vitro human lymphocyte functions. *Oral Microbiology and Immunology*, 4(1), 24-29.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.

Tardif, F., Ross, G., & Rouabhia, M. (2004). Gingival and dermal fibroblasts produce interleukin-1 beta converting enzyme and interleukin-1 beta but not interleukin-18 even after stimulation with lipopolysaccharide. *Journal of Cellular Physiology*, 198(1), 125-132.

Tonetti, M. S., Cortellini, D., & Lang, N. P. (1998). In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infection and Immunity*, 66(11), 5190-5195.

- Trindade, S. C., Gomes-Filho, I. S., Meyer, R., Vale, V. L. C., Moura-Costa, L., Cruz, S. S., et al. (2007a). Antibody response to a chromatographic fraction of *Porphyromonas gingivalis* and its correlation with periodontal status. *Odonto Ciência*, 22(57), 197-203.
- Trindade, S. C., Gomes-Filho, I. S., Meyer, R. J., Vale, V. C., Pugliese, L., & Freire, S. M. (2008). Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 10(2), 50-58.
- Trindade, S. C., Gomes-Filho, I. S., Meyer, R., Cerqueira, E. M. M., Moura-Costa, L., Vale, V. L. C., et al. (2007b). Is there any correlation between serum antibody levels reactive to *Porphyromonas gingivalis* and clinical periodontal status? *Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA*, 35, 5-8.
- Trindade, S. C., Olczak, T., Gomes-Filho, I. S., Moura-Costa, L. F., Cerqueira, E. M., Galdino-Neto, M., et al. (2012a). Induction of interleukin (IL)-1B, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* hmuY in humans. *Journal of Periodontal Research*, 47(1), 27-32.
- Trindade, S. C., Olczak, T., Gomes-Filho, I. S., Moura-Costa, L. F., Vale, V. L., Galdino-Neto, M., et al. (2012b). *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. *Archives of Oral Biology*, 57(3), 314-320.
- Trindade, S. C., Olczak, T., Gomes-Filho, I. S., Moura-Costa, L. F., Vale, V. C., Galdino-Neto, M., et al. (2013). *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84, 650-655.
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Suppl. 2), S24-S32.
- Urnowey, S., Ansai, T., Bitko, V., Nakayama, K., Takehara, T., & Barik, S. (2006). Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signaling. *BMC Microbiology*, 6, 26.
- Van Dyke, T. E., & Van Winkelhoff, A. J. (2013). Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl. 14), S1-S7.
- Wang, P. L., & Ohura, K. (2002). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2), 132-142.
- Yao, L., Jermanus, C., Barbetta, B., Choi, C., Verbeke, P., & Ojcius, D. M., et al. (2010). *Porphyromonas gingivalis* infection sequesters pro-apoptotic Bad

through Akt in primary gingival epithelial cells. *Molecular Oral Microbiology*, 25(2), 89-101.

Yee, M., Kim, A., Alpagot, T., Duzgunes, N., & Konopka, K. (2012). *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes and Infection*, 14(9), 684-689.

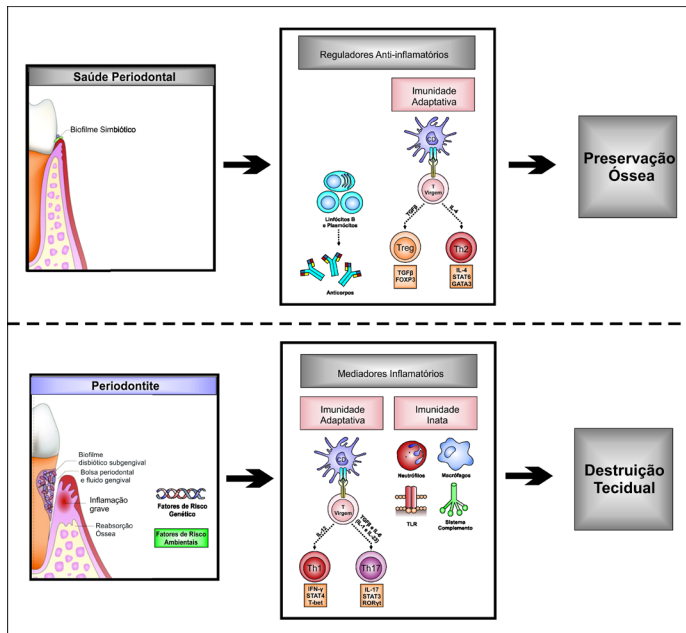
Yilmaz O., Yao, L., Maeda, K., Rose, T. M., Lewis, E. L., Duman, M., et al. (2008). ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cellular Microbiology*, 10(4), 863-875.

Yoshinaka, K., Shoji, N., Nishioka, T., Sugawara, Y., Hoshino, T., Sugawara, S., et al. (2014). Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 232(3), 215-222.

Younes, R., Ghorra, C., Khalife, S., Igondjo-Tchen-Changotade, S., Yousfi, M., Willig, C., et al. (2009). Pertinent cell population to characterize periodontal disease. *Tissue and Cell*, 41(2), 141-150.

Zelkha, S. A., Freilich, R. W., & Amar, S. (2010). Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis and obesity. *Periodontology 2000*, 54(1), 207-221.

Figura 1 – Imunopatogênese da doença periodontal



Receptores *toll like* (TLR) e a resposta imune na atopia e asma brônquica

Emilia Maria Medeiros de Andrade Belitardo, Ricardo Riccio Oliveira, Camila Alexandrina Figueiredo, Neuza Maria Alcântara Neves

Introdução

A prevalência de doenças alérgicas vem crescendo em todo o mundo nos últimos anos. (Global Initiative for Asthma [Gina], 2014; Von Mutius, Weiland, Fritzsche, Duhme, & Keil, 1998; World Health Organization [WHO], 2013) Nos países desenvolvidos, o percentual é superior a 20%; nos países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil, a média percentual é semelhante à do países ricos e industrializados. (Solé et al., 2007) Em Salvador, dados da Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE) reportam o percentual de escolares com sintomas de asma – 18,8%, sendo esse valor semelhante à média mundial. (Barreto et al., 2014) O aumento da prevalência das doenças alérgicas, segundo a hipótese da higiene (Strachan, 1989, 2000), estaria associado à redução da exposição aos agentes microbianos na primeira infância, resultado do crescente processo de industrialização e das melhorias das condições sanitárias e de higiene, além do uso indiscriminado de antibióticos e do acesso às campanhas de vacinação, o que contribuiria para o aumento da susceptibilidade e do desenvolvimento de doenças alérgicas.

Os mecanismos patogênicos das doenças alérgicas são altamente complexos, com interação de inúmeros fatores e robusta associação entre a herança genética e os fatores ambientais. (Bousquet et al., 2008; Michels, Lukacs, & Fonseca, 2018) A atopia, principal responsável pelo desenvolvimento das doenças alérgicas, é caracterizada como uma susceptibilidade geneticamente determinada de produção exagerada de IgE

em resposta a antígenos comuns – inócuos para os indivíduos não atópicos (alérgenos) – denominada hipersensibilidade. (Johansson et al., 2004) A asma atópica (ou alérgica) apresenta como principal aspecto a presença de IgE específica para alérgenos e um desequilíbrio na balança da condução da resposta imunológica, com polarização para o perfil Th2 e presença de inflamação com predomínio de eosinófilos (Barnes, 2008; Diamant et al., 2010; Finkelman, Hogan, Hershey, Rothenberg, & Wills-Karp, 2010); esta é denominada reação de hipersensibilidade tipo I. Esse fenótipo de asma é mais estudado e predomina nos países desenvolvidos. (Cooper, Rodrigues, Cruz, & Barreto, 2009; Weinmayr et al., 2007) Como exemplo, achados entre as crianças da cidade de Salvador, Bahia, mostram que a fração com asma atribuível a atopia foi de apenas 24,5% (Cunha et al., 2010), sugerindo a presença frequente da asma não atópica nessa população. Uma gama de mecanismos parece estar envolvida no desenvolvimento da asma não atópica, a qual pode apresentar caráter misto de resposta, como a presença das células Th2 e Th17, ou ausência de resposta Th2 e predomínio de inflamação neutrofílica. (Sterk & Lutter, 2014)

Os receptores *toll like* (TLRs) são os principais receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), podendo se apresentar de forma homodímera e heterodímera. Eles estão presentes nas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, nas células dendríticas (CD) e nas células B, além das células T e epiteliais, dos neutrófilos e das células *natural killer*. (Kumar, Kawai, & Akira, 2009; Michels et al., 2018; Reijmerink et al., 2010) Os TLRs possuem como função o reconhecimento de PAMPs de bactérias, vírus e fungos; com a posterior ligação entre PAMPs e TLRs, inúmeras cascatas internas de sinalização são ativadas nas células detentoras desses receptores, produzindo ações imunológicas diretas e indiretas. (Athari et al., 2017; Månsson Kvarnhammar, Tengroth, Adner, & Cardell, 2013; Michels et al., 2018; Sandig & Bulfone-Paus, 2012)

Inúmeros são os trabalhos, na última década, que buscam compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na asma brônquica, com atenção para a atuação da imunidade inata – iniciando-se no entendimento do mecanismo de reconhecimento dos PAMPs e produção de resposta pelos seus receptores e na possibilidade de, durante o desencadeamento do processo alérgico e asmático, alterações nesses

mecanismos serem responsáveis pelo surgimento e gravidade da doença. (Athari et al., 2017; Barboza et al., 2013; Dong, Li, Wang, & Li, 2009; Supajatura et al., 2012; Tanaka et al., 2009) Outros estudos foram desenvolvidos, no intuito de encontrar novos alvos terapêuticos e profiláticos; como exemplo, temos a utilização dos agonistas dos TLRs como adjuvantes na produção de vacinas. (Dong et al., 2016; Kline, 2007; Maheaswari, Sivasankar, & Subbarayan, 2014)

Fisiopatologia da atopia e da asma brônquica

Os mecanismos fisiopatogênicos da asma e da rinite alérgica são altamente complexos, com interação de uma multiplicidade de fatores e forte associação entre *background* genético e aspectos ambientais. (Bousquet et al., 2008; Ciprandi, Tosca, Silvestri, & Ricciardolo, 2017; Von Mutius, 2009; Scholtens et al., 2014) A presença de atopia foi por muito tempo considerada o fator-chave para o desenvolvimento das doenças alérgicas respiratórias. (Von Mutius, 2009) Entretanto, com o descobrimento de células epiteliais e da imunidade inata agindo na iniciação da asma e levando a uma reação semelhante àquela promovida pelas citocinas do perfil Th2, assim como a identificação das células Th-17, esse paradigma está sendo revisto – como pode ser verificado na Figura 1 e no decorrer deste texto.

Atopia é a susceptibilidade, determinada pelo *background* genético do indivíduo, de se sensibilizar e produzir anticorpos do isotipo IgE em resposta a antígenos comuns, inócuos para os indivíduos não atópicos. Esses antígenos são reconhecidos como alérgenos. (Johansson et al., 2004)

A asma brônquica é uma doença crônica caracterizada pela intensa inflamação das células epiteliais, metaplasia das células mucosas, disfunção do músculo liso e contínuo processo de remodelamento das vias aéreas. O remodelamento é descrito pela alta proliferação celular, aumento da deposição de matriz extracelular, angiogênese e espessamento da membrana basal. A contínua exposição ao alérgeno induz a persistência da doença, com aumento da hiper-reatividade brônquica, continuidade do processo de remodelamento das vias aéreas com fibrose do tecido pulmonar e aumento da suscetibilidade do indivíduo às exacerbações da sintomatologia. (Frieri, 2014; Newcomb & Peebles

Junior, 2013) Clinicamente, a doença se manifesta com sibilância, falta de ar, aperto no peito e tosse seca (Barnes, 2008; Ciprandi et al., 2017; Newcomb & Peebles Junior, 2013); ela apresenta vários fenótipos clínicos que diferem em gravidade, história natural e resposta à terapêutica. (Wagener et al., 2014)

Dentre os fenótipos, numa classificação simplista, a asma pode ser categorizada como alérgica/atópica ou não alérgica/não atópica (Beasley, 2000; Raedler et al., 2015), sendo mais recentemente qualificada como asma Th2 alto (atópica) e Th2 baixo (não atópica). (Sterk & Lutter, 2014; Woodruff et al., 2009) Estudos publicados posteriormente foram ainda mais abrangentes, classificando a asma em três fenótipos: um predominantemente Th2, um misto Th2/Th17 alto e um Th2/Th17 baixo. (Irvin et al., 2014; Liu et al., 2017)

O processo alérgico é desencadeado após uma sensibilização inicial, em que o processamento dos alérgenos pelas CD e a exposição às células T promovem a diferenciação e polarização destas para o perfil Th2. Elas irão produzir as citocinas IL-4 e IL-13 que atuarão sob as células B – que, após diferenciação, produzirão imunoglobulinas do isotipo E específicas para alérgenos, além da IL-5, que vai ativar eosinófilos. As IgE se ligam a seus receptores de alta afinidade (FcεRI), principalmente quando em ligação cruzada com os alérgenos presentes nos basófilos e mastócitos, induzindo a degranulação dessas células e a liberação de mediadores químicos e moléculas pró-inflamatórias, como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, óxido nítrico e citocinas. Ligam-se também ao receptor IgE de baixa afinidade (FcεRII ou CD23) presentes nas células B, amplificando, desse modo, as respostas imunes celulares e humorais encontradas nas alergias e na asma atópica. (Barnes, 2008; Diamant et al., 2010; Finkelman et al., 2010; Holgate, 2012; Raedler et al., 2015) Os mediadores liberados por essas células atraem outras do sistema imune, principalmente eosinófilos, desencadeando lesão tecidual, que culmina em estreitamento das vias aéreas, fibrose e remodelamento brônquico. (Barnes, 2008; Finkelman et al., 2010)

Estudos têm demonstrado a participação do epitélio brônquico na asma com a produção de *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), que age na ativação de CD e indução da resposta Th2, além da diferenciação das células T no perfil Th17. (Tanaka et al, 2009; Ziegler & Artis, 2010) O

mecanismo estaria relacionado à similaridade funcional e estrutural do TSLP com a família das citocinas hematopoiéticas, destacando a IL-7. Além disso, sabe-se que o receptor do TSLP (TSLPR) é um complexo heterodímero e que sua funcionalidade depende da cadeia α do receptor da IL-7 (IL-7R α) – que, pelas vias STAT5 e Jak quinases, induziria o desenvolvimento e proliferação de células T e B. (Park et al., 2000; Ziegler & Artis, 2010) Além disso, na presença de alguns vírus (agonistas de TLR3), a união entre TSLP e ácido ribonucleico (RNA) viral induziria a produção de IL-23 e a diferenciação de células T virgens no perfil Th17, sem, no entanto, interferir no desenvolvimento da resposta Th2. (Tanaka et al, 2009)

A IL-33, é uma citocina da família da IL-1 expressa em vários órgãos, como pele, pulmão e sistema nervoso, e é produzida por células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas; sua produção e ação estariam relacionadas ao agravamento dos quadros de asma atópica, incluindo remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (Nabe, 2014), em virtude de suas atividades sobre células da imunidade inata e adquirida. Os basófilos, eosinófilos, macrófagos, as células Th2 e as células linfoides inatas tipo 2 (ILC2s) expressam na sua membrana celular, o ST2, o receptor para a IL-33 e resposta a ação da IL-33 produzem IL-5 e IL13. (Nabe, 2014; Nakae et al., 2013; Schmitz et al., 2005)

Na asma não atópica, os testes cutâneos são negativos para alérgenos específicos, e os níveis séricos da IgE total apresentam resultado normal ou baixo. Também chamada de asma intrínseca, a asma não atópica, a princípio, era considerada como doença de adultos; entretanto, alguns estudos, inclusive de nosso grupo, têm demonstrado que esse fenótipo também ocorre em crianças. (Cunha et al., 2010; Pereira et al., 2007) Os sintomas da asma não atópica são induzidos por gatilhos inespecíficos, e os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram bem definidos, parecendo ser múltiplos. (Peters, 2014) Dentre os fatores desencadeantes da asma não atópica/alérgica, estão a poluição do ar (ozônio, fumaça de cigarro e partículas do diesel), os exercícios físicos, a infecção viral, o estresse e a obesidade. (Kim, Dekruyff, & Umetsu, 2010) Na população de estudo do projeto Mudança Social, Asma e Alergia na América Latina (SCAALA), Barreto et al. (2010) observaram que a asma não atópica estava associada à asma parental e a

fatores ambientais e sociais, como pobreza, sujeira, precárias condições sanitárias, reduzido nível de escolaridade materna e outros marcadores de baixo nível socioeconômico, assim como à frequência em creches.

Com as recentes pesquisas em imunidade inata e ação das células endoteliais e epiteliais, além da descoberta das células iNKT e das células linfoides inatas (ILC), vem se constatando a participação destas células tanto no processo de aumento da gravidade da asma atópica (Barning et al., 2013; Jonckheere, Bullens, & Seys, 2019; Sherkat et al., 2014; Yu, Kim, Chang, DeKruyff, & Umetsu, 2014) quanto como possível mecanismo da asma não atópica. (Jonckheere et al., 2019; Yu et al., 2014) Além disso, os fenótipos mais graves de asma, menos respondedores aos broncodilatadores e corticosteroides, estariam associados à presença de células Th17 e a produção de citocinas deste perfil (IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL21), que induziriam aumento da inflamação das vias aéreas, com padrão celular predominante de neutrófilos, do remodelamento brônquico, em virtude do número crescente de fibroblastos, e da contratilidade, proliferação e sobrevivência do músculo liso das vias aéreas. (Evasovic & Singer, 2019; Newcomb & Peebles Junior, 2013).

Assim, as recentes descobertas sugerem a existência de três perfis clássicos de pacientes asmáticos: 1) o atópico clássico, agora chamado de alto Th2, com alta produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, secreção de IgE e predomínio de eosinófilos; 2) o não atópico, denominado Th2 baixo, que pode apresentar resposta imunológica com citocinas de perfil Th1 e Th17, predomínio de IL-17A, presença aumentada de neutrófilos e baixa relação Th2/Th17; e 3) o de caráter misto, apresentando tanto o perfil Th17 quanto a inflamação mediada por Th2. (Evasovic & Singer, 2019; Liu et al., 2017; Newcomb & Peebles Junior, 2013; Sterk & Lutter, 2014) As células Th17 não são uma linhagem estável; tendo por base os mecanismos de epigenética, a interação entre os fatores de transcrição e o microambiente de citocinas, elas podem expressar citocinas encontradas nos perfis celulares Th1 ou Th2. (Muranski & Restifo, 2013)

Os receptores do tipo *toll like*: estrutura e cascata de sinalização

Os receptores *toll like* e seus agonistas

A interação entre a imunidade inata e a adquirida é um dos mecanismos para a instalação de uma resposta imune efetiva – e, para tanto, as CD possuem papel central nessa interface. As dendríticas são células acessórias imunes derivadas da medula óssea e encontradas em tecidos epiteliais e linfoides. São divididas em dendríticas mieloides (mDC) e plasmocitoides (pDC), consideradas as principais células apresentadoras de antígenos e responsáveis pela ativação de linfócitos T virgens. (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001; Kucuksezzer et al., 2012) As CD possuem plasticidade funcional quando diferenciadas, podendo promover o desenvolvimento de resposta Th1, Th2 e Th17 ou de células T regulatórias (Treg); o que direciona o perfil da resposta é o tipo do antígeno, a dose e o microambiente na ocasião da apresentação antigênica. (Flatow & Barbuto, 2012)

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos em células imunes – como mastócitos, células *natural killer* (NK), células B, células T, neutrófilos, macrófagos e, em especial, CD – identificam e respondem aos componentes microbianos específicos, chamados PAMPs ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). (Bezemer et al., 2011; Dong et al., 2016; Kawai & Akira, 2009) Seguindo-se ao reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, uma reação imune é desencadeada, com o intuito de proteger os hospedeiros contra a infecção ou o dano nos tecidos. (Kumagai & Akira, 2010) Um dos principais receptores de reconhecimento de PAMPs da resposta imune inata é o TLR (Dong et al., 2016).

Até o presente momento, são conhecidos 13 TLRs entre os mamíferos, sendo 12 deles encontrados em seres humanos e 12 em camundongos. Nas duas espécies, são comuns 11 TLRs (TLR1-TLR9 e TLR11-TLR12). No entanto, enquanto os TLR1-TLR10 são funcionais em humanos, os TLR11-TLR12 não são funcionais e o TLR13 não existe no genoma dessa espécie. (Andrade et al., 2013; Korppi & Törmänen, 2019; Pandey, Kawai, & Akira, 2014; Skevaki, Pararas, Kostelidou,

Tsakris, Routsias, 2015) Dependendo das moléculas que são capazes de reconhecer, os TLR podem estar localizados na membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), reconhecendo antígenos livres no ambiente extracelular, ou dentro das células, nos compartimentos endossomais, lisossomais e no retículo endoplasmático (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13), identificando ácidos nucleicos que foram internalizados; podem ainda estar em condições especiais, como doenças autoimunes, reconhecendo ácidos nucleicos próprios. (Kawai & Akira, 2009; Pandey, Kawai, & Akira, 2014; Skevaki et al., 2015) O TLR10 é o menos caracterizado dos receptores, com limitadas informações sobre agonista, localização e função, muito pela ausência de um modelo em camundongo – pois, nesse mamífero, o TLR10 é um pseudogene. (Lee et al., 2018; Skevaki et al., 2015)

Os TLRs funcionam principalmente como homodímeros, excetuando a subfamília do TLR2, constituída por TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10 (Sandig & Bulfone-Paus, 2012; que formam heterodímeros e atuam como correceptores no reconhecimento de lipoproteínas e lipopeptídeos. Não está claro se o TLR10 atua como correceptor com os receptores TLR1, TLR2 e TLR6. (Koponen et al., 2014; Mikacenic, Reiner, Holden, Nickerson, & Wurfel, 2013) Entretanto, apesar de o TLR10 não possuir especificidade do ligante, alguns resultados sugerem que se trata de um receptor com capacidade imunomodulatória e ação anti-inflamatória. (Oosting et al., 2014) Foi sugerido que o TLR10 cooperava com TLR2 no reconhecimento de lipoproteínas, mas falhava em ativar a sinalização induzida por TLR típica, incluindo a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Guan et al., 2010) Contraindo-se a esses dados, Lee et al. (2018) demonstraram que o dsRNA é um possível ligante para a detecção e sinalização de TLR10 e sugerem que, além da sensibilidade aos nucleotídeos, o TLR10 sequestra dsRNA do TLR3 para regular a sinalização do IFN no sistema imune inato.

Dentre outros ligantes, o TLR4 é ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS), um componente lipídico da parede celular externa de bactérias Gram-negativas. (Sukkar et al., 2006) O TLR5 reconhece principalmente a proteína flagelina, que é um componente estrutural do flagelo das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O TLR3 pode ser ativado pelo ácido poliinsínico-policidílico, (Poli (I: C) ou Poli (rI): Poli (rC)), análogo sintético da dupla fita viral de RNA (dsRNA). TLR7 e TLR8

mediam respostas para RNA de cadeia simples (ssRNA) viral, tendo como correspondentes sintéticos as substâncias imiquimod (R-837) e resiquimod (R-848). TLR9 responde a DNA bacteriano e viral, contendo motivos CpG não metilados. (Månsson Kvarnhammar et al., 2013; Sandig & Bulfone-Paus, 2012; Skevaki et al., 2015)

Cascata de sinalização dos TLR

Os TLRs, estruturalmente, são constituídos por glicoproteínas de membrana que possuem repetições ricas em leucinas e flanqueadas por motivos ricos em cisteína nas regiões extracelulares, zona de ligação com os patógenos; internamente, possuem domínio de homologia com o receptor *toll* de IL-1 (TIR) em suas caudas citoplasmáticas. (Athari et al., 2017; Kawai & Akira, 2009; Maheaswari, Sivasankar, & Subbarayan, 2014; Pandey, Kawai, & Akira, 2014)

Para a realização da cascata sinalizadora e ativação dos genes envolvidos na resposta imune, é necessária a presença de domínios intracelulares do tipo TIR contendo as proteínas adaptadoras (MyD88, fator de diferenciação mieloide 88; TIRAP, receptor *toll* de IL-1 contendo uma proteína adaptadora; TRIF, adaptador indutor de interferon β ; e TRAM, molécula adaptadora TRIF relacionado) e fatores de transcrição (NF- κ B, fator nuclear κ B; AP-1, proteína ativadora 1; e IRF 3 e 7, fatores de resposta ao interferon 3 e 7). (Kawai & Akira, 2009; Maheaswari, Sivasankar, & Subbarayan, 2014) A Figura 2, demonstra a cascata de sinalização envolvida na ativação dos TLRs.

Na maioria dos TLRs, o início da sinalização é dependente do MyD88, que promove o recrutamento das cinases 1, 2 e 4. Essas enzimas ativam o receptor de IL-1 – IRAK 1,2 e 4, associado à família do receptor do fator de necrose tumoral 6 (TRAF-6) –, promovendo como desfecho a ativação de NF- κ B e AP-1, com consequente produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial. Nos TLR 7, 8 e 9, é ativado outro fator de transcrição além do NF- κ B: o IRF7, indutor da produção dos interferons tipo I e III, citocinas responsáveis pelo desenvolvimento de respostas imunes inatas antivirais. O TLR3, é um receptor independente de MyD88; sua sinalização é iniciada pelo TRIF e ativa os fatores de transcrição NF- κ B e IRF3, que promovem a produção de citocinas inflamatórias interferon do tipo I e

III, respectivamente. O mecanismo de sinalização do TLR4 ocorre por dois mecanismos, a via independente de TRIF e a via dependente de MyD88, sendo capaz de produzir respostas de acordo com a ativação dos fatores de transcrição IRF3 e NF- κ B, respectivamente. (Dong et al., 2016; Kawai, & Akira, 2009; Maheaswari, Sivasankar, & Subbarayan, 2014; Pandey, Kawai, & Akira, 2014)

Mecanismos de atuação dos TLR na atopia e asma brônquica

A ativação dos TLRs tem sido associada à fisiopatologia das doenças respiratórias, dentre elas a asma. Além disso, as infecções respiratórias desencadeadas por bactérias ou vírus por meio desses receptores podem promover tanto a prevenção como a exacerbação dessa enfermidade. (Månsson Kvarnhammar et al., 2013)

A Figura 3 sumariza os mecanismos imunológicos envolvidos na asma brônquica, com destaque para as múltiplas ferramentas que envolvem a imunidade inata, ressaltando o envolvimento dos TLRs na fisiopatologia e exacerbação da doença pela redução da capacidade antiviral, da indução da capacidade pró-inflamatória e da ação quimiotática desses receptores. Os mecanismos envolvendo os TLR são discutidos ao longo do texto.

Subfamília TLR2

Os TLR2/1 e TLR2/6, são heterodímeros capazes de impedir o equilíbrio Th1/Th2 e desviar o sistema imune para uma resposta Th1. (Kormann et al., 2008) Em estudos experimentais, observou-se que realizar o tratamento intratraqueal de camundongos asmáticos, sensibilizados com ovalbumina (OVA), utilizando o agonista do TLR2/6 em combinação com a citocina de perfil Th1, o IFN- γ , resultou na redução da hiperresponsividade, da eosinofilia e do perfil de citocinas Th2 (IL-5 e IL-13) no lavado bronquioalveolar (BAL) dos camundongos. Além disso, quando o tratamento foi realizado utilizando o agonista sintético de TLR2/1, os resultados foram semelhantes aos do que usou TLR2/6, apresentando redução da hiperresponsividade das vias aéreas, das citocinas de perfil Th2 (IL-4; IL-5) e dos eosinófilos. (Patel et al., 2005)

apud Fuchs & Braun, 2008; Weigt et al., 2005) Coerente com esse achado, um agonista do TLR2/6 reduziu a infiltração eosinofílica em um modelo murino de inflamação alérgica crônica das vias aéreas, no qual camundongos Balb/c foram sensibilizados de forma intranasal com os antígenos de pólen de gramíneas. (Fuchs et al., 2010)

TLR4

A ativação de mastócitos e a secreção subsequente de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são diretamente induzidas por agonistas de TLR. (Sandig & Bulfone-Paus, 2012) Em mastócitos de camundongos estimulados com LPS (agonista de TLR4) e peptidoglicano (PGN, ligante de TLR2), observou-se diferenças significativas quanto à produção de resposta imune; a ativação de TLR4 estimulou a produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-13, estando associada à proteção contra a infecção por bactérias Gram-negativas. Já a ativação de TLR2 com PGN induziu a degranulação de mastócitos e produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5 e IL-13, associando-se a reações agudas e tardias de hipersensibilidade tipo I, bem como exacerbando as lesões inflamatórias da dermatite atópica, quando infectadas por *Staphylococcus aureus*. (Supajatura et al., 2002)

O papel do agonista de TLR4 tem sido continuamente estudado na asma alérgica, sendo proposto que é a dose de LPS que determina qual tipo da resposta imune (Th1 ou Th2) será induzida. Em estudo conduzido em camundongos, a combinação do alérgeno OVA com uma baixa dose de LPS reforçou a inflamação pulmonar eosinofílica e neutrofílica, acompanhada por níveis elevados de citocinas Th2, como: IL-4, IL-5 e IL-13, além de hipersecreção de muco nos animais asmáticos. A dose elevada de LPS, em contrapartida, induziu uma resposta do tipo Th1, com recrutamento dos neutrófilos para o tecido pulmonar, ausência de secreção de muco das vias aéreas e aumento dos níveis de IFN- γ no lavado bronco-alveolar. (Dong et al., 2009)

Ao se comparar o modelo de asma induzido pelo ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) e pela OVA com posterior exposição ao LPS e ao agonista de TLR2 (Pam3CSK4), observou-se alteração no perfil celular da inflamação, com diminuição do influxo de eosinófilos e aumento da afluência de neutrófilos para as vias respiratórias no modelo sensibilizado com

os alérgenos de Bt, mais característico do perfil de inflamação Th17, e redução da inflamação no modelo induzido por OVA. Além disso, os resultados sugeriram dupla sinalização, via TLR4 e TLR2, principalmente pelo extrato de *B. tropicalis*, implicando uma complexa interação entre produtos bacterianos, alérgenos de ácaros e a via de sinalização TLR. (Barboza et al., 2013) A produção *ex-vivo* de TNF, IL-10 e IL-1 β por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas por LPS também foi significativamente menor em pacientes com asma, ao mesmo tempo em que a expressão de TLR4 foi significativamente reduzida em monócitos, linfócitos e CD em pacientes asmáticos quando comparada com controles saudáveis. A redução da expressão e ativação de TLR4 e conseqüentemente redução da liberação de citocinas IL-1 β e da citocina IL-10 poderia contribuir para explicar os mecanismos patogênicos envolvidos no processo asmático, como a manutenção de uma resposta com predomínio do perfil Th2. (Lun, Wong, Ko, Hui, & Lam, 2009)

Para o tratamento e controle da asma brônquica, alguns estudos clínicos têm sido realizados com a utilização de agonistas de TLR4, apresentando sucesso. (Casale, Kessler, & Romero, 2006; Rosewich, Schulze, Fischer von Weikersthal-Drachenberg & Zielen, 2010; Scichilone et al., 2011) No Reino Unido, o agonista de TLR4, monofosforil-lipídeo A (MPL), derivado da *Salmonella minnesota*, é utilizado na vacina para alergia Pollinex Quattro (Allergy Therapeutics, Worthing, Reino Unido) – ela já está na fase IV para rinite alérgica e na fase I/II para asma, tendo possibilitado melhora do quadro alérgico das vias respiratórias superiores e inferiores, com redução do estresse oxidativo em asmáticos e indução de Treg. Além disso, o resultado tem sido mantido por mais de cinco anos. (Musarra, Bignardi, Troise, & Passalacqua, 2010; Scichilone et al., 2011)

TLR3

Existem fortes evidências sobre o papel funcional do TLR3 na patogênese da asma grave. Foi demonstrado que o TSLP e o ligante de TLR3 – Poly (I:C) – ativam as CD (CD11+), estimulando-as a produzirem mais IL-23 e, com isso, fazendo com que haja maior diferenciação das células T CD4+ virgens em células Th17 e que a combinação entre

TLSP e ligantes de TLR3 não interferiram no desenvolvimento da resposta polarizada para o perfil Th2 – sugerindo que, na ativação das CD, TSLP e ligantes de TLR3 podem atuar como facilitadores entre os mecanismos de diferenciação e maturação das células T virgens, células de memória e células T efetoras durante a inflamação crônica das doenças alérgicas. (Tanaka et al., 2009) As células Th17 formam um subconjunto único de células CD4 produtoras de citocinas altamente inflamatórias (IL-17 e IL-25); essas citocinas estão envolvidas em distúrbios imunomediados, dentre elas, a asma. Além disso, pesquisas demonstraram que a ativação de TLR3 por dsRNA aumentou sua expressão e provocou intensa expressão de CXCL8 (IL-8) e CCL20 (quimiocina 3- α pró-inflamatória de macrófagos) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). CCL20 e GM-CSF podem desempenhar papel no recrutamento e maturação de CD imaturas. (Bezemer et al., 2012) Corroborando a evidência de que o TSLP associado aos TLR atua no mecanismo fisiopatológico da asma grave, Ferreira et al. (2012) mostraram que os TLR 2, 3, 4 e o TSLP estavam aumentados nas vias aéreas de pacientes asmáticos que sofreram exacerbação fatal da doença.

TLR5

Em cultivo de queratinócitos estimulados com flagelina, agonista do TLR5, ocorreu indução da produção de TSLP e das citocinas inflamatórias TNF, IL-6 e GM-CSF, bem como das quimiocinas CCL2, CCL5/RANTES, CCL20, CCL27, IL-8 e CXCL10. (Le et al., 2011) A flagelina está presente em bactérias Gram-negativas e, possivelmente, é encontrada na poeira doméstica, como ocorre com o LPS. (Howell et al., 2009; Le et al., 2011) Assim, a disfunção da barreira epitelial em crianças com dermatite atópica, decorrente de disfunção genética ou exposição ambiental, quando expostas às bactérias Gram-negativas e à flagelina poderiam iniciar ou exacerbar as respostas Th2 por meio da produção de TSLP. (Le et al., 2011) Como contraponto, Lun et al. (2009) observaram que pacientes asmáticos, em comparação aos controles saudáveis, apresentavam menor expressão de TLR5 e menor produção de IL-10 e citocinas Th1, o que contribuiria para o desequilíbrio na balança Th1/Th2 e o predomínio da resposta alérgica nesses indivíduos.

TLR7 e TLR8

Inúmeros trabalhos foram realizados com o intuito de verificar a ação imunomodulatória desses receptores intracelulares no mecanismo da atopia e da asma brônquica. (Drake et al., 2013; Hackstein et al., 2012; Kaufman, Fryer, & Jacoby, 2011; Quarcoo et al., 2004) Em modelo experimental controlado por placebo, Hackstein et al. (2012) observaram que a administração de imiquimod (agonista de TLR7) pela pele promoveu aumento das CD respiratórias e das células NK e redução das células B. Além disso, após estímulo com *Klebsiella pneumonia* e administração de agonista de TLR7, ocorreu redução de TNF e IFN- γ , ao mesmo tempo em que se propiciou aumento da produção de IL-10 e IL-12. Corroborando os resultados, Kaufman, Fryer, & Jacoby (2011) encontraram ação broncodilatadora para o agonista de TLR7 em suínos com hiper-responsividade brônquica das vias aéreas induzida por eletroestimulação do nervo vago ou administração de acetilcolina.

Camundongos Balb/c tratados com dose única de R848, utilizando o modelo de asma experimental com OVA, apresentaram redução de linfócitos e eosinófilos no BAL, além de diminuição na produção de citocinas Th2 e aumento de IFN- γ e IL-12 no grupo tratado em relação aos controles sensibilizados não tratados. (Quarcoo et al., 2004) Posteriormente, Camateros et al. (2007) observaram que o agonista de TLR8 é capaz de prevenir a hiperplasia das células caliciformes e aumento do músculo liso das vias aéreas.

Na busca de novos tratamentos para as doenças alérgicas, os agonistas de TLR7 (AZD8848) e TLR8 (VTX-1463) estão na fase II de estudos clínicos de alergia respiratória (AR), mostrando-se seguros e apresentando efeitos benéficos, com redução dos sintomas nasais para a doença. (Aryan, Holgate, Radzioch, & Rezael, 2014; Greiff et al., 2012; Horak et al., 2011)

TLR9

O TLR9 é um dos TLR mais extensivamente estudados no contexto da asma. (Kline, 2007; Kline, Kitagaki, Businga, & Jain, 2002; Maheaswari, Sivasankar & Subbarayan, 2014; Zhang et al., 2007) Ligantes de TLR9 (CpG ODN) se mostraram benéficos em roedores

e em modelos de asma em primatas não humanos (Kline, 2007; Kline et al., 2002), assim como em alguns ensaios pré-clínicos. (Kline, 2007; Maheaswari et al., 2014) Os motivos de CpG ODN ativam as células NK por meio de estimulação das CD – e, com isso, induzem uma resposta Th1. Essa resposta é caracterizada pela produção de IFN- γ , bem como de IL-10 e IL-12, e contrabalança a resposta Th2 alérgica. Além disso, o CpG DNA é capaz de induzir a atividade das Treg na produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , promovendo a regulação da atividade inflamatória, com redução da atividade das células Th2. (Kline, 2007)

TLR10

O gene TLR10 está localizado no braço curto do cromossomo 4 e codifica uma proteína com 811 aminoácidos, com estrutura apresentando várias repetições ricas em leucina e cisteína, domínio transmembrana e um receptor de interleucina citoplasmática de domínio 1. (Athari et al., 2017) No entanto, como já discutido anteriormente, informações sobre localização, mecanismo de sinalização e funções do TLR10 não estão bem esclarecidas. (Lee et al. 2018; Skevaki et al., 2015)

Nos estudos sobre polimorfismos, foram encontradas variações genéticas no gene TLR10 no sistema respiratório. (Athari et al., 2017; Lazarus et al., 2002) Além disso, as células B apresentaram expressão aumentada do receptor TLR10. (Athari et al., 2017) Korppi e Törmänen (2019) observaram que variações nos genes de TLR1 e TLR10 foram associadas ao aumento do risco de asma após bronquiolite.

Resultados recentes demonstraram ainda a ação anti-inflamatória do TLR10, para o qual dsDNA seria um possível agonista, induzindo supressão na produção de IFN via MyD88 e IRF7, possível sequestro do dsDNA do receptor TLR3 e consequente inibição da ativação da via inflamatória do TLR3. (Lee et al., 2018)

TLR, infecções virais e exacerbação da asma

Sabe-se que as exacerbações da asma podem estar associadas às infecções virais que acometem as vias aéreas. Os vírus são indutores da produção de INF-I e IFN-III, que promovem um estado antiviral.

Estudos demonstraram que os indivíduos asmáticos possuem produção defeituosa e incipiente de IFN indutores do estado antiviral. O mecanismo da deficiência de produção dessa citocina ainda não está esclarecido. (Contoli et al., 2006; Sykes et al. 2012, 2013)

Os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 têm sido associados às respostas à infecção por vírus em modelos animais por intermédio da indução da produção de IFN tipo I e IFN tipo III. (Zhang et al., 2007) No entanto, em um estudo realizado para se investigar o papel dos TLR 3, 4 e 7-9 na produção de IFN do tipo I e III, não foram encontradas diferenças na produção dessas citocinas entre asmáticos e não asmáticos após estimulação dos TLR. (Sykes et al., 2013) Mori et al. (2015) ao investigarem a interação entre IL-17A e a sinalização de TLR3 em cultura primária de células epiteliais das vias aéreas, observaram que a IL-17A e o Poly (I:C) atuaram sinergicamente na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (G-CSF, IL-8, CXCL1, CXCL5 e IL-1F9) – no entanto, não verificaram indução de proteínas da família do IFN antiviral.

Em modelo murino de asma alérgica, Starkhammar, Kumlien Georén, Dahlén, Cardell e Adner (2015) avaliaram a coinfeção provocada pela presença de vírus e bactérias presentes nas exacerbações da crise asmática em seres humanos adultos. Para isso, os autores estimularam camundongos Balb/c com agonistas de TLR3 e TLR4 e observaram aumento da hiper-responsividade das vias aéreas, associado à presença de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no BAL. Quando o bloqueador de TNF (infiximab) foi dado uma hora antes da administração dos agonistas de TLR, o aumento da hiper-responsividade brônquica foi reduzido, sem efeitos sobre a presença de células no LBA ou no pulmão.

Considerações finais

A asma brônquica é uma doença complexa, multifatorial e que possui inúmeros mecanismos imunopatológicos, destacando-se atualmente o papel da imunidade inata. Como visto, os TLR atuam como imunomoduladores dos processos alérgicos e da asma brônquica, em alguns momentos promovendo a exacerbação do processo alérgico e da gravidade da asma, como pela interposição do agonista do TLR3 e TSLP. Em outros momentos, eles reduzem o processo inflamatório

característico da alergia e da asma, de forma que agonistas com ação regulatória, indutores da ativação de Treg, estão em fase clínica e pré-clínica de teste como adjuvantes de vacinas, a exemplo do agonista de TLR4 (MPL) e do agonista de TLR9 (CpG ODN), e como novos fármacos para controle dos sintomas da rinite alérgica – a citar, os agonistas de TLR7 (AZD8848) e TLR8 (VTX-1463).

Referências

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8), 675-680.

Andrade, W. A. C., Souza, M. C., Martinez, E. R., Nagpal, K., Dutra, M. S., Melo, M. B., et al. (2013). Combined action of nucleic acid-sensing toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe*, 13(1), 42-53.

Aryan, Z., Holgate, S. T., Radzioch, D., & Rezaei, N. (2014). A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 164(1), 46-63.

Athari, S. S., Athari, S. M., Beyzayc, F., Movassaghie, M., Mortazf, E., Taghavah, M. (2017). Critical role of Toll-like receptors in pathophysiology of allergic asthma. *European Journal of Pharmacology*, 808(5), 21-27.

Barboza, R., Câmara, N. O., Gomes, E., Sá-Nunes, A., Florsheim, E., Mirotti, L., et al. (2013). Endotoxin exposure during sensitization to *Blomia tropicalis* allergens shifts TH2 immunity towards a TH17-mediated airway neutrophilic inflammation: role of TLR4 and TLR2. *PLoS One*, 8(6), e67115.

Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews: Immunology*, 8(3), 183-192.

Barning, C., Cernadas, M., Dutilleul, S., Liu, X., Perrella, M. A., Kazani, S., et al. (2013). Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Science Translational Medicine*, 5(174), 174ra26.

Barreto, M. L., Cunha, S. S., Fiaccone, R., Esquivel, R., D'Amorim, L., Alvim, S., et al. (2010). Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. *Respiratory Research*, 11(1), 167, 2010.

Barreto, M. L., Ribeiro-Silva, R. C., Malta, D. C., Oliveira-Campos, M., Andreazzi, M. A., & Cruz, A. A. (2014). Prevalência de sintomas de asma

entre escolares do Brasil: Pesquisa Nacional em Saúde do Escolar (PeNSE 2012). *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 17(Supl. 1), 106-115.

Beasley, R., Crane, J., Lai C.K., Pearce N. (2000). Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105, S466-S472.

Bezemer, G. F., Bauer, S. M., Oberdörster, G., Breysse, P. N., Pieters, R. H., Georas, S. N., et al. (2011). Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles in vivo. *Journal of Innate Immunity*, 3(2), 150-166.

Bezemer, G. F. G., Sagar, S., Van Bergenhenegouwen, J., Georgiou, N. A., Garssen, J., Kraneveld, A. D., et al. (2012). Dual role of toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacology Reviews*, 64(2), 337-358.

Bousquet, J., Khaltayev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A., et al. (2008). Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA (2) LEN and AllerGen). *Allergy*, 63(Suppl. 86), 8-160.

Camateros, P., Tamaoka, M., Hassan, M., Marino, R., Moisan, J., Marion, D., et al. (2007). Chronic asthma-induced airway remodeling is prevented by Toll-like receptor-7/8 ligand s28463. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175, 1241-1249.

Casale, T. B., Kessler, J., & Romero, F. A. (2006). Safety of the intranasal toll-like receptor 4 agonist CRX- 675 in allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 97(4), 454-456.

Ciprandi, G., Tosca, M. A., Silvestri, M., & Ricciardolo, F. L. M. (2017). Inflammatory biomarkers in asthma endotypes and consequent personalized therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(7), 715-721.

Contoli, M., Message, S. D., Laza-Stanca, V., Edwards, M. R., Wark, P. A., Bartlett, N. W., et al. (2006). Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nature Medicine*, 12(9), 1023-1026.

Cooper, P. J., Rodrigues, L. C., Cruz, A. A., & Barreto, M. L. (2009). Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*, 64(1), 5-17.

Cunha, S. S., Barreto, M. L., Flaccone, R. L., Cooper, P. J., Alcantara-Neves, M. N., Simões, S. M., et al. (2010). Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 28(6), 405-411.

- Diamant, Z., Boot, J. D., Mantzouranis, E., Flohr, R., Sterk, P. J., & Gerth van Wijk, R. (2010). Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23(6), 468-481.
- Dong, L., Li, H., Wang, S., & Li, Y. (2009). Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. *The Journal of Asthma*, 46(3), 229-233.
- Dong, Z., Xiong, L., Zhang, W., Gibson, P. G., Wang, T., Lu, Y., et al. (2016). Holding the inflammatory system in check: TLRs and their targeted therapy in asthma. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2180417.
- Drake, M. G., Scott, G. D., Proskocil, B. J., Fryer, A. D., Jacoby, D. B., & Kaufman, E. H. (2013). Toll-like receptor 7 rapidly relaxes human airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 664-672.
- Evasovic, J. M., & Singer, C. A. (2019). Regulation of IL-17A and implications for TGF- β 1 co-modulation of airway smooth muscle remodeling in severe asthma. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(5), L843-L868.
- Ferreira, D. S., Annoni, R., Silva, L. F., Buttignol, M., Santos, A. B., Medeiros, M. C., et al. (2012). Toll-like receptors 2, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(10), 1459-1471.
- Finkelman, F. D., Hogan, S. P., Hershey, G. K., Rothenberg, M. E., & Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *Journal of Immunology*, 184(4), 1663-1674.
- Flatow, E. A., & Barbuto, J. A. M. (2012). *Células dendríticas: elementos integradores do sistema imune – enfoque aplicado* (Relatório de pesquisa não publicado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Frieri, M. (2014). Asthma linked with rhinosinusitis: an extensive review. *Allergy & Rhinology*, 5(1), 41-49.
- Fuchs, B., & Braun, A. (2008). Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 3(Suppl. 1), S5.
- Fuchs, B., Knothe, S., Rochlitzer, S., Nassimi, M., Greweling, M., Lauenstein, H.-D., et al. (2010). A toll-like receptor 2/6 agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitization to Timothy grass pollen antigens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(2), 131-139.
- Global Initiative for Asthma (Gina). (2014). *Global Burden of Asthma 2014*. Recuperado em 15 janeiro, 2015, de http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINABurdenReport_1.pdf

- Greiff, L., Cervin, A., Ahlstrom-Emanuelsson, C., Almqvist, G., Andersson, M., Dolata, J., et al. (2012). Repeated intranasal TLR7 stimulation reduces allergen responsiveness in allergic rhinitis. *Respiratory Research*, 13(1), 53.
- Guan, Y., Ranao, D. R., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J., et al. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *The Journal of Immunology*, 184(9), 5094-5103.
- Hackstein, H., Hagel, N., Knoche, A., Kranz, S., Lohmeyer, J., Von Wulffen, W., et al. (2012). Skin TLR7 triggering promotes accumulation of respiratory dendritic cells and natural killer cells. *PLoS One*, 7(8), e43320.
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 673-683.
- Horak, F., Zieglmayer, P., Zieglmayer, R., Lemell, P., Newkirk, M., Manjarrez, T. D., et al. (2011). Intranasal Toll-like receptor 8 agonist (VTX-1463) significantly improves symptoms of allergic rhinitis in a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(Suppl. S), AB199.
- Howell M. D., Kim B. E., Gao P., Grant A. V., Boguniewicz M., De Benedetto A., Schneider L., et al. (2009). Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3 Suppl. 2), R7-R12.
- Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M. M., et al. (2014). Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 1175-1186.e7.
- Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., et al. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 832-836.
- Jonckheere, A. C., Bullens, D. M. A., & Seys, S. F. (2019). Innate lymphoid cells in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 19(1), 53-60.
- Kaufman, E. H., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. (2011). Toll-like receptor 7 agonists are potent and rapid bronchodilators in guinea pigs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 462-469.
- Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21, 317-337.

- Kim, H. Y., Dekruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, *11*(7), 577-584.
- Kline, J. N. (2007). Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *4*(3), 283-288.
- Kline, J. N., Kitagaki, K., Businga, T. R., Jain, V. V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, *283*, 170-179.
- Koponen, P., Vuononvirta, J., Nuolivirta, K., Helminen, M., He, Q., & Korppi, M. (2014). The association of genetic variants in toll-like receptor 2 subfamily with allergy and asthma after hospitalization for bronchiolitis in infancy. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *33*(5), 463-466.
- Kormann, M. S., Depner, M., Hartl, D., Klopp, N., Illig, T., Adamski, J., et al. (2008). Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(1), 86-92, 92.e1-92.e8.
- Korppi, M., & Tirmo, S. (2019). Toll-like receptor 1 and 10 variations increase asthma risk and review highlights further research directions. *Acta Paediatrica*. Advance online publication. doi:10.1111/apa.14795
- Kucuksezer, U. C., Palomares, O., Rückert, B., Jartti, T., Puhakka, T., Nandy, A., et al. (2012). Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(3), 875-885.e.9.
- Kumagai, Y., & Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(5), 985-992.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *388*(4), 621-625.
- Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L.J., Klimecki, W.J., Silverman, E.K., Richter, B., Riva, A., et al. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunological Reviews*, *190*(1), 9-25.
- Le, T. A., Takai, T., Vu, A. T., Kinoshita, H., Chen, X., Ikeda, S., et al. (2011). Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5. *International Archives of Allergy and Immunology*, *155*(1), 31-37.

- Lee, S. M.-Y., Yip, T.-F., Yan, S., Jin, D.-Y., Wei, H.-L., Guo, R.-T., et al. (2018). Recognition of double-stranded RNA and regulation of interferon pathway by toll-like receptor 10. *Frontiers in Immunology*, 9, 516.
- Liu, W., Liu, S., Verma, M., Zafar, I., Good, J. T., Rollins, D., Groshong, S., et al. (2017). Mechanism of T_H2/T_H17-predominant and neutrophilic, T_H2/T_H17-low subtypes of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1548-1558.e4.
- Lun, S. W., Wong, C. K., Ko, F. W., Hui, D. S., & Lam, C. W. (2009). Expression and functional analysis of toll-like receptors of peripheral blood cells in asthmatic patients: implication for immunopathological mechanism in asthma. *Journal of Clinical Immunology*, 29(3), 330-342.
- Maheaswari, R., Sivasankar, K., & Subbarayan, S. (2014). Toll gates: an emerging therapeutic target. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(6), 686-692.
- Månsson Kvarnhammar, A., Tengroth, L., Adner, M., & Cardell, L. O. (2013). Innate immune receptors in human airway smooth muscle cells: activation by TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and NOD1 agonists. *PLoS One*, 8, e68701.
- Michels, K. R., Lukacs, N. W., & Fonseca, W. (2018). TLR Activation and allergic disease: early life microbiome and treatment. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18, 61.
- Mikacenic, C., Reiner, A. P., Holden, T. D., Nickerson, D. A., & Wurfel, M. M. (2013). Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 locus is the major genetic determinant of inter-individual difference in TLR1/2-mediated responses. *Genes and Immunity*, 14(1), 52-57.
- Mori K., Fujisawa T., Kusagaya H., Yamanaka K., Hashimoto D., Enomoto N., Inui N., et al. (2015). Synergy between IL-17A and TLR3 in airway epithelial cells. *PLoS One*, 10(9), e0139491.
- Muranski, P., & Restifo, N. P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 121(13), 2402-2414.
- Musarra A., Bignardi, D., Troise, C., & Passalacqua, G. (2010). Long-lasting effect of a monophosphoryl lipid-adjuvanted immunotherapy to parietaria: a controlled field study. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 42(3), 115-119.
- Nabe, T. (2014). Interleukin (IL)-33: new therapeutic target for atopic diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*, 126(2), 85-91.
- Nakae, S., Morita, H., Ohno, T., Arae, K., Matsumoto, K., & Saito, H. (2013). Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergology International*, 62(1), 13-20.

- Newcomb, D. C., & Peebles Junior, R. S. (2013). Th17-mediated inflammation in asthma. *Current Opinion in Immunology*, 25(6), 755-760.
- Oosting, M., Cheng, S. C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschueren, I. C., et al. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), e4478-e4484.
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2014). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016246.
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Werner Muller, W., et al. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 659-669.
- Patel, M., Xu, D., Kewin, P., Choo-Kang, B., McSharry, C., Thomson, N. C., Liew, F. (2005). TLR2 agonist ameliorates allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 174(12), 7558-7563.
- Pereira, M. U., Sly, P. D., Pitrez, P. M., Jones, M. H., Escouto, D., Dias, A. C., et al. (2007). Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *European Respiratory Journal*, 29(6), 1154-1160.
- Peters, S. P. (2014). Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(6), 650-652.
- Quarcoo, D., Weixler, S., Joachim, R. A., Stock, P., Kallinich, T., Ahrens, B., et al. (2004). Resiquimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolinamines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(8), 1314-1320.
- Raedler, D., Ballenberger, N., Klucker, E., Bock, A., Otto, R., Costa, O. P., et al. (2015). Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 81-91.
- Reijmerink, N. E., Bottema, R. W., Kerkhof, M., Gerritsen, J., Stelma, F. F., Thijs, C., et al. (2010). TLR-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy. *Allergy*, 65, 199-207.
- Rosewich, M., Schulze, J., Fischer von Weikersthal-Drachenberg, K. J., & Zielen, S. (2010). Ultra-short course immunotherapy in children and adolescents during a 3-yr post-marketing surveillance study. *Pediatric Allergy and Immunology*, 21(7), e185-e189.

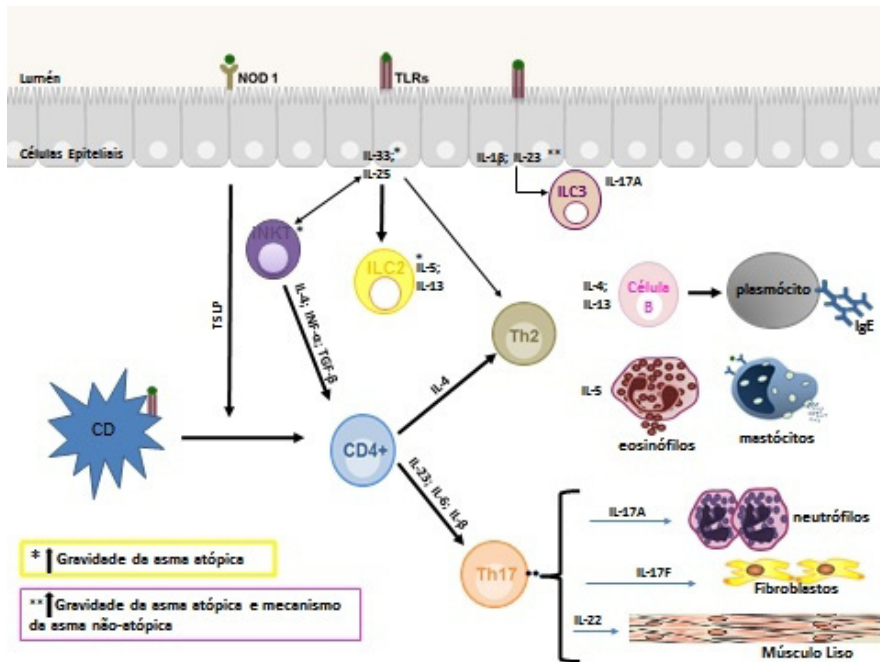
- Sandig, H., & Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in Immunology*, 4(3), 185.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), 479-490.
- Scichilone, N., Minaldi, C., Santagata, R., Battaglia, S., Camarda, G., & Bellia, V. (2011). Anti-inflammatory effects of pre-seasonal Th1-adjuvant vaccine to *Parietaria judaica* in asthmatics. *Journal of Asthma and Allergy*, 4, 19-25.
- Scholtens, S., Postma, D. S., Moffatt, M. F., Panasevich, S., Granel, R., Henderson, A. J., et al. (2014). Novel childhood asthma genes interact with in utero and early-life tobacco smoke exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 885-888.
- Skevakis, C., Pararas, M., Kostelidou, K., Tsakris, A., Routsias, J. G. (2015). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 180(2), 165-177.
- Solé, D., Melo, K. C., Camelo-Nunes, I. C., Freitas, L. S., Britto, M., Rosário, N. A., et al. (2007). Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among Brazilian schoolchildren (13-14 years old): comparison between ISAAC phases one and three. *Journal of Tropical Pediatrics*, 53(1), 13-21.
- Starkhammar M., Kumlien Georén S., Dahlén S. E., Cardell L. O., Adner M. (2015). TNF α -blockade stabilizes local airway hyperresponsiveness during TLR-induced exacerbations in murine model of asthma. *Respiratory Research*, 16, 129.
- Sterk, P. J., & Lutter, R. (2014). Asthma phenotyping: TH2-high, TH2-low, and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 395-396.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299(6710), 1259-1260.
- Strachan, D. P. (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*, 55(Suppl. 1), S2-S10.
- Sukkar, M. B., Xie, S., Khorasani, N. M., Kon, O. M., Stanbridge, R., Issa, R., et al. (2006). Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 641-648.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., et al. (2002). Differential responses of mast cell toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(10), 1351-1359.

- Sykes, A., Edwards, M. R., Macintyre, J., Del Rosario, A., Bakhsoliani, E., Trujillo-Torralbo, M. B., et al. (2012). Rhinovirus 16-induced IFN-alpha and IFN-beta are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(6), 1506-1514.
- Sykes, A., Edwards, M. R., Macintyre, J., Del Rosario, A., Gielen, V., Haas, J., et al. (2013). TLR3, TLR4 and TLRs7-9 induced interferons are not impaired in airway and blood cells in well controlled asthma. *PLoS One*, 8(6), e65921.
- Tanaka, J., Watanabe, N., Kido, M., Saga, K., Akamatsu, T., Nishio, A., et al. (2009). Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(1), 89-100.
- Von Mutius, E. (2009). Gene-environment interactions in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(1), 3-11.
- Von Mutius, E., Weiland, S. K., Fritsch, C., Duhme, H., & Keil, U. (1998). Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *The Lancet*, 351(9106), 862-866.
- Wagener, A. H., De Nijs, S. B., Lutter, R., Sousa, A. R., Weersink, E. J., Bel, E. H., et al. (2014). External validation of blood eosinophils, FENO and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*, 70(2), 115-120.
- Weigt, H., Nassenstein, C., Tschernig, T., Mühlrad, P. F., Krug, N., & Braun, A. (2005). Efficacy of macrophage-activating lipopeptide-2 combined with interferon-gamma in a murine asthma model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(5), 566-572.
- Weinmayr, G., Weiland, S. K., Björkstén, B., Brunekreef, B., Büchele, G., Cookson, W. O., et al. (2007). Atopic sensitization and the international variation of asthma symptom prevalence in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176, 565-574.
- Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia G., Abbas A. R., Ellwanger, A., et al. (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(5), 388-395.
- World Health Organization (WHO). (2013). Recuperado em 30 novembro, 2013, de <http://www.who.int/en/>
- Yu, S., Kim, H. Y., Chang, Y-J., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. (2014). Innate lymphoid cells and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(4), 943-950.

Zhang, S. Y., Jouanguy, E., Sancho-Shimizu, V., Von Bernuth, H., Yang, K., Abel, L., et al. (2007). Human Toll-like receptor dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunological Reviews*, 220, 225-236.

Ziegler, S. F., & Artis, D. (2010). Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature Immunology*, 11(4), 4, 289-293.

Figura 1 – Mecanismo de desenvolvimento da asma brônquica



A fisiopatologia da asma parece envolver três mecanismos: 1) a polarização de resposta imune para o perfil Th2, ocorrendo produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, com participação de IgE específica, degranulação de mastócitos e basófilos e predomínio de eosinófilos (asma atópica clássica); 2) participação predominante de resposta Th17, com produção de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 e presença de neutrófilos (provável mecanismo da asma não atópica, também associado ao aumento da gravidade da asma atópica); 3) a ação da imunidade inata, em evidência por meio de liberação de citocinas pelas células epiteliais (TSLP, IL-33, IL-1β, IL-25 e IL-23) e ativação e interação entre as células iNKT e ILC.

A TSLP age sobre a ativação das CD e a indução de resposta Th2, além da diferenciação de células T com perfil Th17. A citocina IL-33 tem atividade na interação entre iNKT e ILC, assim como nas células Th2. As iNKT e ILC, na

presença da IL-33 e IL-25, produzidas pelas células epiteliais, se diferenciam em células com diferentes perfis, sejam as com resposta semelhante às células Th2 e associadas à asma grave refratária, sejam as induzidas por IL-1 β e IL-23. As ILC apresentam o perfil Th17, com produção de IL-17A, estando associadas tanto ao aumento da gravidade da asma atópica quanto ao mecanismo imunopatológico da asma não atópica.

CD = células dendríticas

IgE específica = imunoglobulina E específica

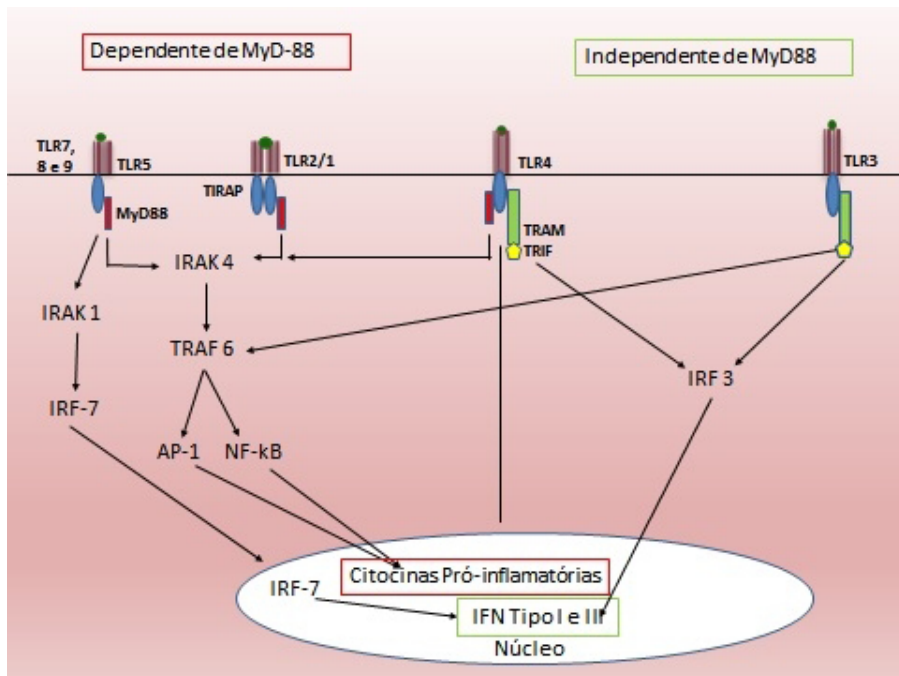
TLSP = linfopoetina estromal tímica

iNKT = *natural killer* T invariante

ILC2 = células linfoides inatas tipo 2

ILC3 = células linfoides inatas tipo 3

Figura 2 – Representativa da cascata de sinalização envolvendo receptores celulares toll like



Fonte: Adaptado de Maheaswari et al. (2014).

MyD88 = fator de diferenciação mieloide 88

TIRAP = receptor Toll/interleucina-1 contendo proteína adaptadora

TRIF = adaptador indutor de interferon β

TRAM = molécula adaptadora TRIF relacionado

NF-kB = fator nuclear kB

AP-1 = proteína ativadora 1

IRF 3 e 7 = fatores de resposta ao interferon 3 e 7

IRAK 1 e 4 = quinases 1 e 4

TRAF-6 = receptor do fator de necrose tumoral 6

Figura 3 – Síntese dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na asma brônquica, ação da imunidade inata e destaque para as ações desenvolvidas pelos TLRs

Mecanismo imunopatológico da asma brônquica e ação dos TLRs

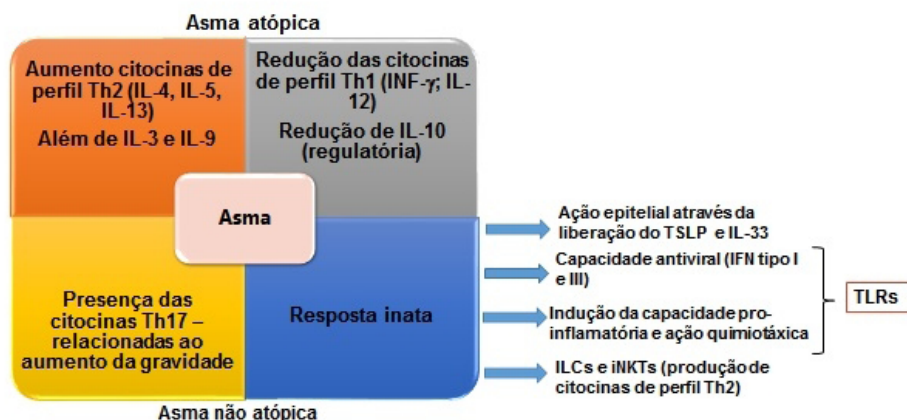


Tabela 1 – Resumo dos principais trabalhos associando agonistas de TLR com atopia e asma brônquica

Agonistas	Autores e ano de publicação	Desfecho encontrado
TLR2/1	Fuchs & Braun (2008), Patel et al. (2005), Weigt et al. (2005)	Em modelo murino, o agonista sintético de TLR2/1 promoveu redução da hiper-responsividade das vias aéreas, das citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-5) e dos eosinófilos.
TLR2/6	Fuchs & Braun (2008), Fuchs et al. (2010), Weigt et al. (2005)	Modelos murinos sensibilizados com OVA e antígenos de pólen de gramíneas, o agonista do TLR2/6, permitiram redução da hiper-responsividade, da eosinofilia e do perfil de citocinas Th2 no BAL.

TLR3	Tanaka et al. (2009)	TSLP + ligante de TLR3 ativam CD11+, de modo a produzirem mais IL-23 e, com isso, maior diferenciação das células T CD4+virgens em células Th17, sem interferir no desenvolvimento da resposta polarizada para o perfil Th2.
	Bezemer et al. (2012)	A ativação de TLR3 por dsRNA aumentou sua expressão e provocou intensa expressão de CXCL8 (IL-8), CCL20 e GM-CSF.
TLR4	Supajatura et al. (2002)	Mastócitos de camundongos estimulados com LPS promoveram a produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-13, que estava associada à proteção contra a infecção por bactérias Gram-negativas.
	Dong et al., 2009	A dose de LPS determina qual é o tipo da resposta imune (Th1 ou Th2) que será induzida.
	Lun et al. (2009)	A produção <i>ex vivo</i> de TNF, IL-10 e IL-1 β por PBMC estimuladas por LPS foi significativamente menor em pacientes com asma.
	Barboza et al. (2013)	Foi observada dupla sinalização, via TLR4 e TLR2, em modelo murino de asma com OVA e extrato de Bt, além de diminuição do influxo de eosinófilos e aumento de neutrófilos para as vias respiratórias no modelo de Bt.
	Musarra et al. (2010), Scichilone et al. (2011)	O agonista de TLR4 (monofosforil-lipídeo A) é utilizado na vacina para alergia Pollinex Quattro. A vacina melhora o quadro alérgico das vias respiratórias, com redução do estresse oxidativo em asmáticos e indução de Treg.
TLR3 e TLR4	Starkhammar et al. (2015)	Em modelo murino de asma alérgica, observou-se aumento da hiper-responsividade das vias aéreas, associado à presença de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no BAL. A administração do bloqueador de TNF (infliximab) reduziu o aumento da hiper-responsividade brônquica.
TLR5	Lun et al. (2009)	Foi observado que pacientes asmáticos, em comparação aos controles saudáveis, apresentavam menor expressão de TLR5 e menor produção de IL-10 e citocinas Th1.
	Le et al. (2011)	Em cultivo de queratinócitos estimulados com flagelina, ocorreu indução da produção de TSLP, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.
TLR7	Drake et al. (2013), Hackstein et al. (2012), Kaufman et al. (2011)	O agonista promoveu aumento das CD respiratórias e das células NK, redução das células B, das citocinas TNF e IFN- γ e crescimento da produção de IL-10 e IL-12, além de ação broncodilatadora.

TLR8	Quarcoo et al. (2004)	No modelo de asma experimental com OVA, houve redução de linfócitos e eosinófilos no BAL, além de diminuição na produção de citocinas Th2.
TLR7 e TLR8	Greiff et al. (2012), Horak et al. (2011)	TLR7 (AZD8848) e TLR8 (VTX-1463) estão na fase II de estudos clínicos para AR.
TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9	Zhang et al. (2007)	Têm sido associados às respostas à infecção por vírus em modelos animais (produção de IFN I e III).
TLR9	Kline (2007), Maheaswari et al. (2014), Zhang et al. (2007)	Ativam as células NK por estimulação das CD e induzem resposta Th1. São capazes de induzir a atividade das células Treg com produção de IL-10 e TGF- β .
TLR10	Athari et al. (2017), Lazarus et al. (2002), Korppi et al. (2019)	Foram encontradas variações genéticas no gene <i>TLR10</i> no sistema respiratório e as variações nos genes de <i>TLR10</i> foram associados com aumento do risco de asma após bronquiolite.

Impacto de polimorfismos em genes imunorregulatórios na asma e atopia

Valdirene Leão Carneiro, Tamires Cana Brasil, Cintia Rodrigues Marques, Gerson Queiroz, Hellen Freitas, Regina Nascimento, Hugo Bernardino Ferreira Silva, Bianca Sampaio, Milca de Jesus Silva, Icanaã Solon, Talita Santos, Thales Fonseca, Milena Clementino, Ryan Santos Costa, Camila Alexandrina Figueiredo

Introdução: asma e atopia

A prevalência de asma e alergia, definida como predisposição à produção de IgE (reação de hipersensibilidade tipo I), vem crescendo em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 20% da população mundial seja acometida por distúrbios mediados por IgE, como, rinite alérgica, asma alérgica, eczema, conjuntivite alérgica e anafilaxia. (World Health Organization [WHO], 2008) A asma, em especial, afeta cerca de 334 milhões de pessoas em todo o mundo, apresentando importante impacto nos custos com saúde, e constitui-se como a principal causa de hospitalizações em crianças no mundo ocidental. (Bush, Kleinert, & Pavord, 2015)

De modo clássico, a inflamação das vias aéreas relacionada ao processo alérgico é tipicamente eosinofílica e acompanhada do aumento de citocinas da resposta imune tipo 2. Os indivíduos que apresentam esse perfil são classificados como asmáticos atópicos. A ativação de respostas aberrantes envolvendo citocinas imunológicas tipo 2 em resposta a antígenos inócuos desencadeia uma inflamação crônica e um dano tecidual que caracterizam esses distúrbios imunopatológicos. (Brandtzaeg, 2010) As células T helper (Th)2 são importantes tanto para a resposta IgE específica quanto para a resposta eosinofílica, que caracterizam as

doenças alérgicas. (Fallon & Mangan, 2007) O papel da resposta imune inata através das células linfoides inatas (ILC) e de citocinas, tais como a interleucina (IL)-33 também vem sendo elucidado. (Kabata, Moro, Koyasu, & Asano, 2015) As ILC2, após estímulo por citocinas provenientes do tecido epitelial, como a IL-25, a TSLP e a IL-33, produzem citocinas da resposta imune tipo 2 (Halim, Krauss, Sun, & Takei, 2012; Moro et al., 2010). Bartemes, Kephart, Fox e Kita (2014) demonstraram que indivíduos asmáticos alérgicos apresentavam maior número de ILC2 no sangue periférico em relação a indivíduos saudáveis e com rinite alérgica. As ILC2 também têm sido associadas a menores taxas de remissão da asma alérgica na infância e agravamento dessa doença na vida adulta. (Halim et al., 2012)

Avanços científicos sobre a fisiopatologia da asma têm contribuído para o entendimento de que nem sempre essa enfermidade tem características alérgicas (Perlikos, Hillas, & Loukides, 2015), sendo eventualmente ligada a padrões imunológicos nunca antes associados ao envolvimento na ocorrência dessa doença – como a produção de interferon-gama (IFN- γ) (Figueiredo et al., 2013) e IL-17. (Chesné et al., 2014)

A asma não alérgica (ou não atópica) inclui o subgrupo de pacientes com asma nos quais a sensibilização alérgica não é observada. Esses indivíduos apresentam teste cutâneo e/ou teste de IgE específica para aeroalérgenos com resultado negativo. A asma não atópica ocorre em 10% a 33% dos indivíduos com asma e tem um início mais tardio; é normalmente mais grave do que a asma alérgica em muitos casos, e esses indivíduos podem ser menos sensíveis à terapia anti-inflamatória. (Van Vliet-Ostapchouk et al., 2014) A resistência aos corticoides em pacientes com asma grave parece ser dependente também de IFN- γ . Esses pacientes produzem maiores níveis de IL-17A e IFN- γ quando comparados com pacientes asmáticos respondedores ao tratamento. (Chambers et al., 2015)

Estudos recentes têm identificado o envolvimento de linfócitos Th17 na fisiopatologia da asma não alérgica, tendo em vista sua importante função na inflamação mediada por neutrófilos e consequente lesão tecidual, contribuindo para uma melhor compreensão do processo inflamatório relacionado ao fenótipo não alérgico da asma. (Bousquet et al., 2010)

Dessa forma, a asma vem sendo considerada uma doença complexa, multimediada e com marcada heterogeneidade. Ferramentas para classificar os diversos fenótipos individuais de asma vêm sendo cada vez mais estudadas, na tentativa de caracterizar os diferentes padrões de fatores indutores dos sintomas, as diferentes apresentações clínicas da doença e os diferentes marcadores inflamatórios envolvidos em cada subfenótipo. A melhor caracterização da asma é fundamental para prevenir sua progressão e gravidade, bem como auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos dessa enfermidade na tentativa de caracterizar e prever a gravidade e progressão da doença, bem como a resposta ao acompanhamento, além de ajudar a identificar novos alvos para o tratamento. (Bousquet et al., 2010)

Entretanto, seja qual for o padrão inflamatório relacionado ao processo asmático, o controle de tais respostas é importante, sendo a regulação imunológica componente essencial para tal. Assim, falhas na organização e/ou manutenção dessa regulação podem ser fatores determinantes no processo saúde-doença.

Generalidades sobre imunorregulação

Em cada microambiente, diversos elementos específicos são continuamente regulados para manutenção da homeostase do sistema imunológico. Várias populações celulares estão envolvidas na manutenção desse equilíbrio e controle da resposta imune. Nesse contexto, as células T regulatórias (Treg) desempenham papel importante, sendo capazes, em indivíduos saudáveis, de suprimir a ativação, a proliferação e as funções efetoras de células T CD4⁺, T CD8⁺, *natural killer* (NK), NKT, células B e células apresentadoras de antígenos (APC) *in vitro* e *in vivo* (Figura 1).

Em 2001, as Treg foram, pela primeira vez, caracterizadas em humanos como apresentando o fenótipo CD4⁺CD25^{high}, o que compreende de 1 a 2% das células T CD4⁺ circulantes. Essas células apresentam função protetora em várias situações patológicas, modulando a resposta imune diante de diversos agentes infecciosos, alérgenos, tumores, aloantígenos e autoantígenos. (Baecher-Allan, Brown, Freeman, & Hafler, 2001; Mills, 2004) Como marcadores dessas células, pode-se citar, além da elevada expressão de cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), o fator

de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3), o receptor da família TNF induzido por glucocorticoide (GITR) e o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4). As células Treg apresentam como principais mecanismos supressores a produção de citocinas inibitórias, como a IL-10, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e a IL-35, além da capacidade de supressão mediada por contato célula-célula. (Sakaguchi, Yamaguchi, Nomura, & Ono, 2008) Existem diversas subclasses de Treg, podendo elas ser classificadas em duas populações principais: células Treg de ocorrência natural (nTreg) e induzida (iTreg). As nTreg estão relacionadas à inibição da ativação de vários subtipos celulares e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune contra antígenos exógenos e autoantígenos. (Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995; Sakaguchi et al., 2008) As iTreg são produzidas na periferia a partir dos linfócitos T *naïve* recém selecionados mediante contato com citocinas imunomodulatórias (IL-10, TGF- β), a partir de drogas imunossupressoras ou por células apresentadoras de antígenos condicionadas por produtos microbianos. (Jonuleit, & Schmitt, 2003) De acordo com a hipótese da higiene, a diminuição da exposição aos microrganismos, a melhoria das condições de higiene, a utilização de vacinas e o uso generalizado dos antibióticos estão fortemente associados ao aumento das doenças alérgicas. (Yazdanbakhsh, Kreamsner, & Van Ree, 2002)

Nosso grupo recentemente descreveu a primeira evidência em estudo de base populacional do potencial regulador da IL-10. Nesse estudo, foi verificado que crianças que vivem em regiões com falta de higiene (escassa coleta de lixo, falta de esgoto e falta de pavimentação das ruas) produzem menos citocinas Th1 e Th2 em cultura, sendo essa supressão significativamente maior entre as crianças que produzem IL-10 quando comparadas àquelas que não produzem IL-10, indicando que esta molécula pode modular esse efeito. (Figueiredo et al., 2009) A IL-10 pode ser produzida por numerosos tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas e células B. (Dardalhon et al., 2008) É reconhecida pela sua capacidade de inibir a ativação e a função efetora de células T, monócitos e macrófagos, incluindo a síntese de citocinas, a regulação e/ou a diferenciação de células B, células NK, linfócitos T auxiliares e citotóxicos, mastócitos, células dendríticas e endoteliais (Moore, Waal Malefyt, Coffman, & O'Garra, 2001), controlando

e reduzindo respostas imunes exacerbadas. (Figueiredo et al., 2009) Estudos *in vitro* e *in vivo* com citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes revelam atividades pleiotrópicas de IL-10 sobre células B, T e mastócitos (Go et al., 1990; Thompson-Snipes et al., 1991); já estudos experimentais têm sugerido uma possível utilização terapêutica de IL-10 em humanos para o tratamento de doenças inflamatórias. (Allan et al., 2008) Alterações nos níveis de citocinas regulatórias – não só a IL-10, mas também a TGF- β – parecem possuir importante papel na mediação de doenças inflamatórias. (Yazdanbakhsh et al., 2002)

Partindo-se do entendimento de que a presença da regulação imunológica – em especial, mediada por Treg – é essencial para o controle das respostas imunes, é natural pensar que polimorfismos em genes que codificam marcadores de células Treg, como as citocinas IL-10 e TGF- β e o fator transcricional FOXP3, poderiam estar associados ao desenvolvimento de doenças imunomediadas, como a asma. Dessa maneira, o estudo do impacto de tais polimorfismos nos sintomas ou na gravidade da asma poderá contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença, tendo em vista a adoção de medidas preventivas e de intervenção terapêutica.

Polimorfismos em genes imunorregulatórios

Mutações ou polimorfismos consistem em variações na sequência de nucleotídeos em regiões codificantes ou não codificantes. (Crow, 2000) Mutações são eventos raros e frequentemente associados a alterações que podem levar ao surgimento de doenças. Polimorfismos são variações mais frequentes no genoma, que não levam diretamente ao surgimento de uma enfermidade – embora, em alguns casos, possam se associar ao surgimento de doenças complexas. (Jeffreys, 1993) Polimorfismos em sequências gênicas podem ter efeitos biológicos, impactando diretamente na expressão e função de proteínas, podendo, dessa forma, associar-se ao surgimento de diversas doenças. Em geral, as sequências gênicas são formadas por éxons (regiões codificantes) e íntrons (regiões não codificantes); as primeiras contém informações utilizadas no processo de tradução para a formação de uma proteína. O tipo de polimorfismo mais frequente é conhecido como polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), podendo se associar a diferenças

individuais e fenotípicas. (Jeffreys, 1993) Além disso, polimorfismos em genes que codificam citocinas ou receptores de citocinas podem afetar a produção ou função dessas proteínas, podendo influenciar no desenvolvimento de diversas doenças. (Marques et al., 2015) A seguir apresentamos os principais genes imunorregulatórios, seus principais SNP e o impacto destes na ocorrência de asma e outras doenças alérgicas:

IL-10

A expressão de IL-10 é regulada por mudanças estruturais na cromatina do seu locus. Esse remodelamento parece ser um evento inicial que conduz a sua produção – contudo, sinais adicionais são requeridos para elevar os níveis de transcrição dessa citocina. (Chang et al., 2007; Saraiva et al., 2005) O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1, região 1q31-1q32, ao longo da qual já foram identificados vários SNP, registrados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 podem determinar sua produção em níveis mais baixos ou mais altos, em resposta a diferentes estímulos. Como consequência, esses polimorfismos podem influenciar na susceptibilidade a doenças inflamatórias, bem como em sua gravidade, ou conferir proteção a elas. (Turner et al., 1997)

Em diferentes populações, polimorfismos na região promotora e haplótipos de IL-10 foram associados a níveis alterados dessa citocina; estudos de meta-análise trazem associações entre SNP no gene da IL-10 e uma grande diversidade de doenças, incluindo metabólicas, infecciosas e autoimunes, além de neoplasias e alergias, entre outras. (Ober & Hoffjan, 2006)

No contexto das patologias tumorais, os efeitos imunossupressores da IL-10 estão diretamente correlacionados com a via de desenvolvimento, sobrevida e invasão tecidual de alguns tipos de tumores. Alguns polimorfismos também foram associados a uma maior susceptibilidade a carcinomas. (Cools, Ponsaerts, Van Tandeloo, & Berneman, 2007) Em relação às doenças autoimunes, estudos sugerem que a produção de IL-10 por células B de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) podem promover a sobrevivência das células B autoimunes *in vivo*,

resultando no aumento da produção de autoanticorpos. Polimorfismos nos genes dessa citocina estão potencialmente associados à susceptibilidade ao LES. (Salim & Xavier, 2014)

Nas infecções helmínticas, ocorre indução da produção de IL-10, modulando a resposta imune e favorecendo, dessa forma, a sobrevivência do parasita e protegendo o hospedeiro do desenvolvimento de atopia. Recentemente, foi descrito por nosso grupo que polimorfismos no gene da IL-10 estão associados negativamente à produção de IL-10 e a infecções helmínticas e positivamente ligados ao risco de asma atópica e marcadores de alergia. (Figueiredo et al., 2013)

Embora existam muitos estudos envolvendo o gene dessa citocina, os diferentes papéis que a IL-10 exerce e os mecanismos pelos quais ela controla as diferentes respostas imunológicas ainda permanecem pouco esclarecidos. Atualmente, há grande interesse em saber como a expressão da IL-10 é regulada em diferentes células imunológicas, revelando alguns dos mecanismos moleculares envolvidos em nível de transdução de sinal, a epigenética, a ligação do fator de transcrição e a ativação do gene.

Estudos funcionais *in vitro* demonstraram que indivíduos com o haplótipo CGC nos sítios polimórficos da região promotora rs1800896, rs1800871 e rs1800872 produzem altos níveis de IL-10 em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), enquanto indivíduos com o haplótipo ATA possuem menor taxa de transcrição, produzindo baixos níveis de IL-10. (Turner et al., 1997)

Associação de polimorfismos no gene IL-10 com a asma e atopia

Em estudos de associação genética, variações no gene que codifica IL-10 foram previamente associadas a atopia e fenótipos de asma. (Bottema et al., 2010) Na Tabela 1 estão descritos os principais SNP da IL-10 vinculados a asma e atopia.

Em um estudo envolvendo uma população brasileira, mostrou-se que polimorfismos nas regiões promotoras de IL-10 rs1800896, rs1800871 e rs1800872 estão associados a níveis elevados de IgE total. Relatou-se também associação do SNP rs3024495 com o aumento na contagem de ovos de *Schistosoma mansoni*. (Grant et al., 2011) Em concordância com esses dados, num estudo envolvendo uma população

brasileira, de Salvador, demonstramos que o SNP rs1800896 está associado negativamente à infecção crônica por *A. lumbricoides* e à maior produção de IgE específica para *Ascaris lumbricoides*. Contudo, em nosso trabalho, a variante rs1800872 foi negativamente associada com a IgE específica para a *Blatella germanica*, enquanto o SNP rs3024495 foi positivamente ligado a níveis de IgE específica para *D. pteronyssinus*.

Hunninghake et al. (2008) demonstraram que os polimorfismos rs1800896, rs3024492 e rs3024496 estão associados ao aumento nos níveis de IgE em pacientes expostos a ácaro da poeira, com alto risco de ocorrência e frequência da exacerbação de asma em uma população de crianças costarriquenhas. Similarmente, nosso grupo demonstrou que as variantes rs3024492 e rs3024496 estão vinculadas a uma menor produção de IL-10 e positivamente associadas à asma atópica. Além disso, o SNP rs3024492 está associado à maior positividade no teste cutâneo em resposta a baratas (*B. germanica* e *P. americana*). (Figueiredo et al., 2013)

Variações no gene da IL-10 podem desempenhar um papel nas infecções e alergias. Como visto por nosso grupo, os SNP rs1800871, rs1800872 e rs1518111 foram associados com baixos níveis de ovos de *T. trichiura* por grama de fezes. (Figueiredo et al., 2013) Ainda, os polimorfismos rs3024491 rs1800872 estão associados a maior produção de IL-10 e menor risco de atopia quando os indivíduos são expostos ao *Helicobacter pylori*. (Assis et al., 2014)

Os dados descritos anteriormente demonstram que variantes genéticas da IL-10 estão associadas a infecções e marcadores de atopia e asma – portanto, podem contribuir para a ocorrência das doenças respiratórias alérgicas.

TGF- β 1

O TGF- β é uma citocina multifuncional com potente efeito imunorregulatório que controla a proliferação e diferenciação celular, o reparo tecidual, a apoptose e algumas funções biológicas de outros fatores de crescimento. (Acevedo et al., 2010) A superfamília do TGF- β possui mais de 33 membros, incluindo principalmente o TGF- β s, o fator de crescimento e diferenciação (GDFS) e as inibinas, sendo o TGF- β 1 a

isoforma mais prevalente. (Klass, Grobbelaar, & Rolfe, 2009) Esse gene está localizado na região cromossômica 19q13. (Yang et al., 2011)

O TGF- β é um fator de crescimento pleiotrópico produzido por diversas células do sistema imunológico (células epiteliais, eosinófilos, linfócitos Th2, macrófagos e fibroblastos), que desempenham papel fundamental na regulação da resposta imune durante a homeostasia, promovendo tolerância imunológica e regulação de defesa contra patógenos e doenças inflamatórias. (Tran, 2012; Yang et al., 2011) Ademais, o TGF- β 1 é um importante regulador de muitos processos fisiológicos, exercendo atividade anti-inflamatória pela regulação de linfócitos, células NK, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e granulócitos (Shull et al., 1992), bem como inibição da produção de citocinas (INF- γ , IL-12 e IL-4). (Yoshimura, Wakabayashi, & Mori, 2010)

O TGF- β 1 tem atribuição importante em diversas doenças, influenciando processos como fibrose e angiogênese. Na asma, o TGF- β é crucial para induzir a expressão do fator de transcrição FOXP3, e regula o desenvolvimento, a função e a produção de IL-10 a partir de células Treg CD4⁺CD25⁺. Além disso, o TGF- β pode suprimir a ativação dos linfócitos Th2, reduzir a resposta inflamatória, assim como a hiperreatividade das vias aéreas, e inibir a liberação de IgE. O TGF- β também parece estar envolvida no remodelamento das vias respiratórias e, conseqüentemente, na gravidade da asma. (Costa et al., 2017)

Associação de polimorfismos no gene TGF- β 1 com asma e atopia

Estudos de associação têm sido desenvolvidos, avaliando os polimorfismos do gene TGF- β 1 e o risco de doenças como hipertensão, tuberculose, pancreatite e LES, entre outras. (Li et al., 1999; Niimi et al., 2002; Wang et al., 2007)

A literatura relata vários estudos de associação do tipo gene candidato entre SNP do gene TGF- β 1 e a asma. Os SNP rs1800469 (C-509T) e rs1800470 (T869C) são os mais estudados, e os trabalhos demonstram que os estudos de associação desses polimorfismos com o risco de asma são controversos. Celedón et al. (2004), demonstraram significativa associação do alelo T do polimorfismo rs1800469 com a doença; os polimorfismos rs1800469 e rs1800470 estão ligados à susceptibilidade à enfermidade em indivíduos atópicos na população de Hong

Kong. Além disso, nesse mesmo estudo, o rs1800469 foi associado à gravidade da asma, sugerindo que este pode desempenhar papel importante na patogênese da obstrução do fluxo aéreo. (Mak et al., 2006) (Tabela. 1). Faria, Faria, Toro, Ribeiro, & Bertuzzo (2008) sugerem que o genótipo CC do polimorfismo T869C poderia ser um fator de gravidade para a asma (Tabela. 1). No entanto, outros autores não encontraram vínculo entre os polimorfismo rs1800470 e rs1800469 e a doença. (Acevedo et al., 2010)

Em um trabalho recentemente concluído em nosso grupo com crianças do programa Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (Scaala), foi demonstrado que o polimorfismo rs1800470 apresenta associação negativa com a atopia e seus marcadores. Ainda nesse estudo, foi relatado que, em indivíduos infectados com *Toxocara spp*, o genótipo CC (rs1800470) do gene TGF- β 1 está ligado ao baixo risco de asma atópica – ou seja, não somente as infecções podem modular a inflamação alérgica, mas também a variabilidade genética pode contribuir para a proteção contra a atopia (Costa et al. 2017) (Tabela 1).

Sharma et al. (2009) verificaram que polimorfismos nas regiões promotoras de TGF- β 1 rs2241712 (alelo A), rs1800469 (alelo C) e rs1800471 (alelo C) estão associados ao aumento da hiperresponsividade das vias aéreas a ácaros. Além disso, demonstraram que o rs1982073 reduz o risco da exacerbação de asma (Tabela 1).

Além dos SNP já citados, outros polimorfismos também têm sido estudados. Outros trabalhos mostraram que os SNP rs1800469, rs2241715, rs2241712, rs4803455 e rs7258445. estão ligados à asma em uma população de crianças mexicanas. (Wu et al., 2010)

Logo, as evidências científicas demonstram haver relação entre os mecanismos genéticos envolvendo o gene TGF- β 1 e o desenvolvimento e gravidade da asma.

FOXP3

FOXP3 é uma proteína envolvida nas respostas do sistema imune que codifica um fator de transcrição responsável pela função e desenvolvimento das Treg (Zhang & Zhao, 2007), sendo considerado o marcador mais específico para a identificação dessas células. É expressa predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos, e

particularmente nas células T CD4+ CD25+. A função do FOXP3 é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do ácido desoxirribonucleico (DNA), aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos. O gene humano FOXP3 contém 11 éxons e está localizado na região Xp11.23. (Hanel, Velavan, Kremsner, & Kun, 2011)

FOXP3 é expresso principalmente em um subconjunto de células T CD4+ que expressam CD25, como são conhecidas as Treg, e é um fator-chave para o desenvolvimento desse importante subconjunto de células (Figura 2). Desse modo, a FOXP3 tem um papel crucial na regulação do desenvolvimento e função das Treg. Estudos têm demonstrado que a expressão contínua de FOXP3 em células Treg maduras é indispensável para a manutenção da tolerância dominante mediada por essas células. (Oda, Hirata, Guembarovski, & Watanabe, 2013)

As células Treg expressam numerosos marcadores – entretanto, a FOXP3 é o marcador específico, importante no desenvolvimento da ocorrência natural das células Treg no timo, além de ser necessário para manter a função supressora de induzi-las. (Paradowska-Gorycka et al., 2015)

Mutações no gene humano FOXP3 podem causar desregulação imunológica, poliendocrinopatia e síndrome ligada ao X (Ipex), caracterizada pela elevada incidência de doenças autoimunes, como diabetes mellitus, tireoidites e outras alterações definidas por níveis elevados de IgE no soro. (Fodor et al., 2011) Estudos têm demonstrado que a ausência do FOXP3 funcional suprime a eficiência de linfócitos a se diferenciarem em células Treg maduras. (Hanel et al., 2011)

Associação de polimorfismos no gene FOXP3 com asma e atopia

Polimorfismos têm sido descritos em várias regiões do gene FOXP3, como a promotora, o íntron e o éxon. Tais polimorfismos podem mudar o papel funcional ou quantitativo de proteínas (Oda et al., 2013), alterando a especificidade de ligação dos fatores de transcrição por seus locais de ligação e a cinética de iniciação da transcrição. (Naderi-Mahabadi et al., 2015)

Assim como descrito na Tabela 1, o rs3761548 é um SNP localizado em uma região intrônica do gene FOXP3, e já foi estudado para diversas doenças, incluindo alergias; publicações têm demonstrado a

associação com níveis de IgE e atopia. (Bottema et al., 2010; Hassannia, Abediankenari, & Ghaffari, 2011; Zhang et al., 2009) Além dele, o rs3761547, também localizado numa região intrônica do gene FOXP3, já foi associado negativamente à rinite alérgica. (Zhang et al., 2009)

Como descrito numa publicação recente de nosso grupo, polimorfismos no gene FOXP3 têm sido associados a algumas doenças alérgicas (Marques et al., 2015), mas sua contribuição ao desenvolvimento da asma tem sido pouco estudada. Além disso, diversas linhas apontam para o envolvimento de alterações epigenéticas no locus FOXP3 das células Treg em diferentes fenótipos de asma. (Nadeau et al., 2010) Outras investigações serão importantes para esclarecer o papel dos polimorfismos no gene FOXP3, bem como mecanismos epigenéticos para o risco ou a proteção de asma e outras doenças alérgicas.

Considerações finais

Nos últimos anos, vem crescendo o interesse da comunidade científica em determinar como os fatores imunorregulatórios envolvendo genes, células e moléculas regulatórias, contribuem para a fisiopatologia e a descoberta de novas abordagens terapêuticas das doenças alérgicas. Numerosos trabalhos têm demonstrado que polimorfismos em genes imunorregulatórios estão envolvidos na susceptibilidade ou proteção à asma e/ou rinite. Dados do nosso grupo são condizentes com os da literatura ao mostrar que polimorfismos nos genes da IL-10 e TGF- β 1 estão vinculados à diminuição da produção de IL-10 e a asma atópica. Polimorfismos no gene FOXP3 vêm sendo associados a marcadores de atopia e rinite alérgica – porém pouco é conhecido sobre eles na asma. Apesar dos avanços na descoberta de variantes genéticas em IL-10, TGF- β 1 e FOXP3, ligados a asma e atopia, pouco tem sido investigado sobre o impacto funcional de polimorfismos e padrões de metilação desses genes e as doenças alérgicas respiratórias. Portanto, mais estudos deverão ser realizados para elucidar o papel das variações genéticas e epigenéticas dos genes imunorregulatórios nos diversos endótipos e fenótipos de asma e outras enfermidades alérgicas. Tais avanços são necessários na busca de uma terapia individualizada e mais segura.

Referências

- Acevedo, N., Vergara, C., Gusmão, L., Jiménez, S., Martínez, B., Mercado, D., et al. (2010). The C-509T promoter polymorphism of the transforming growth factor beta-1 gene is associated with levels of total and specific IgE in a Colombian population. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151(3), 237-246.
- Allan, S. E., Broady, R., Gregori, S., Himmel, M. E., Locke, N., Roncarolo, M. G., et al. (2008). CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunological Reviews*, 223, 391-421.
- Assis, S., Marques, C. R., Silva, T. M., Costa, R. S., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M. L., et al. (2014). IL10 single nucleotide polymorphisms are related to upregulation of constitutive IL-10 production and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 19(3), 168-173.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology*, 167(3), 1245-1253.
- Bartemes, K. R., Kephart, G. M., Fox, S. J., & Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 13(3), 671-678.e674.
- Bottema, R. W., Kerkhof, M., Reijmerink, N. E., Thijs, C., Smit, H. A., Van Schayck, C. P., et al. (2010). Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(2), 338-346, 346.e1-346.e10.
- Bousquet, J., Mantzouranis, E., Cruz, A. A., Ait-Khaled, N., Baena-Cagnani, C. E., Bleeker, E. R., et al. (2010). Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 926-938.
- Brandtzaeg, P. (2010). Food allergy: separating the science from the mythology. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology*, 7(7), 380-400.
- Bush, A., Kleinert, S., & Pavord, I. D. (2015). The asthmas in 2015 and beyond: a Lancet Commission. *The Lancet*, 385(9975), 1273-1275.
- Celedón, J. C., Lange, C., Raby, B. A., Litonjua Lyle, A. A., Palmer, L. J., DeMeo, D. L., et al. (2004). The transforming growth factor- β 1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Human Molecular Genetics*, 13(15), 1649-1656.

- Chambers, E. S., Nanzer, A. M., Pfeffer, P. E., Richards, D. F., Timms, P. M., Martineau, A. R., et al. (2015). Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A(high) and IFN- γ (high) immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), 628-637.e624.
- Chang, H. D., Helbig, C., Tykocinski, L., Kreher, S., Koeck, J., Niesner, U., et al. (2007). Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *European Journal of Immunology*, 37(3), 807-817.
- Chesné, J., Braza, F., Mahay, G., Brouard, S., Aronica, M., & Magnan, A. (2014). IL-17 in severe asthma: where do we stand? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(10), 1094-1101.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F., & Berneman, Z. N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clinical & Developmental Immunology*, 2007, 89195.
- Costa, R. S., Figueiredo, C. A., Barreto, M. L., Alcantara-Neves, N. M., Rodrigues, L. C., Cruz, A. A., et al. (2017). Effect of polymorphisms on **TGFB1 on allergic asthma and helminth infection in an African admixed population**. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 118(4), 483-488.
- Crow, J. F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Reviews: Genetics*, 1(1), 40-47.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology*, 9(12), 1347-1355.
- Fallon, P., & Mangan, N. (2007). Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nature Reviews: Immunology*, 7(3), 220-230.
- Faria, I. C., Faria, E. J., Toro, A. A., Ribeiro, J. D., & Bertuzzo, C. S. (2008). Association of TGF-beta1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. *Jornal de Pediatria*, 84(3), 203-210.
- Figueiredo, C. A., Barreto, M. L., Alcantara-Neves, N. M., Rodrigues, L. C., Cooper, P. J., Cruz, A. A., et al. (2013). Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(6), 1683-1690.
- Figueiredo, A. S., Höfer, T., Klotz, C., Sers, C., Hartmann, S., Lucius, R., et al. (2009). Modelling and simulating interleukin-10 production and regulation

by macrophages after stimulation with an immunomodulator of parasitic nematodes. *The FEBS Journal*, 276(3), 3454-3469.

Fodor, E., Garaczi, E., Polyánka, H., Koreck, A., Kemény, L., & Széll, M. (2011). The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Human Immunology*, 72(10), 926-929.

Go, N. F., Castle, B. E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., et al. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(6), 1625-1631.

Grant, A. V., Araújo, M. I., Ponte, E. V., Oliveira, R. R., Cruz, A. A., Barnes, K. C., et al. (2011). Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. *Genes and Immunity*, 12(1), 46-50.

Halim, T. Y., Krauss, R. H., Sun, A. C., & Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, 36(3), 451-463.

Hanel, S. A., Velavan, T. P., Kreamsner, P. G., & Kun, J. F. (2011). Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population. *Immunogenetics*, 63(7), 409-415.

Hassannia, H., Abediankenari, S., & Ghaffari, J. (2011). FOXP3 and TGF- β gene polymorphisms in allergic rhinitis. *Iranian Journal of Immunology*, 8(4), 218-225.

Hunninghake, G. M., Soto-Quirós, M. E., Lasky-Su, J., Avila, L., Ly, N. P., Liang, C., et al. (2008). Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(1), 93-98, 98.e91-98.e95.

Jeffreys, A. J. (1993). DNA typing: approaches and applications. *Journal of the Forensic Science Society*, 33(4), 204-211.

Jonuleit, H., & Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *Journal of Immunology*, 171(12), 6323-6327.

Kabata, H., Moro, K., Koyasu, S., & Asano, K. (2015). Group 2 innate lymphoid cells and asthma. *Allergology International*, 64(3), 227-234.

Klass, B. R., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2009). Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal*, 85(999), 9-14.

- Li, B., Khanna, A., Sharma, V., Singh, T., Suthanthiran, M., & August, P. (1999). TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension*, 33(1 Pt 2), 271-275.
- Mak, J. C., Leung, H. C., Ho, S. P., Law, B. K., Ho, A. S., Lam, W. K., et al. (2006). Analysis of TGF-beta(1) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 92-96.
- Marques, C. R., Costa, R. S., Costa, G. N. O., Silva, T. M., Teixeira, T. O., Andrade, E. M. M., et al. (2015). Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy. *Asthma Research and Practice*, 1, 10.
- Mills, K. H. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews: Immunology*, 4(11), 841-855.
- Moore, K. W., Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., et al. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, 463(7280), 540-544.
- Nadeau, K., McDonald-Hyman, C., Noth, E. M., Pratt, B., Hammond, S. K., Balmes, J., et al. (2010). Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 845-852.e810.
- Naderi-Mahabadi, F., Zarei, S., Fatemi, R., Kamali, K., Pahlavanzadeh, Z., Jeddi-Tehrani, M., et al. (2015). Association study of forkhead box P3 gene polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Journal of Reproductive Immunology*, 110, 48-53.
- Niimi, T., Sato, S., Sugiura, Y., Yoshinouchi, T., Akita, K., Maeda, H., et al. (2002). Transforming growth factor-beta gene polymorphism in sarcoidosis and tuberculosis patients. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(6), 510-515.
- Ober, C., & Hoffjan, S. (2006). Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity*, 7(2), 95-100.
- Oda, J. M., Hirata, B. K., Guembarovski, R. L., & Watanabe, M. A. (2013). Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *Journal of Genetics*, 92(1), 163-171.
- Paradowska-Gorycka, A., Jurkowska, M., Felis-Giemza, A., Romanowska-Próchnicka, K., Manczak, M., Maslinski, S., et al. (2015). Genetic

polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 42(2), 170-180.

Perlikos, F., Hillas, G., & Loukides, S. (2015). Phenotyping and endotyping asthma based on biomarkers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(14), 1582-1586.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (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. *Journal of Immunology*, 155(3), 1151-1164.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775-787.

Salim, P. H., & Xavier, R. M. (2014). Influence of genetic polymorphisms (IL-10/CXCL8/CXCR2/NFκB) on the susceptibility of autoimmune rheumatic diseases. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 54(4), 301-310.

Saraiva, M., Christensen, J. R., Tsytsykova, A. V., Goldfeld, A. E., Ley, S. C., Kioussis, D., et al. (2005). Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus. *Journal of Immunology*, 175(2), 1041-1046.

Sharma, S., Raby, B. A., Hunninghake, G. M., Soto-Quirós, M., Avila, L., Murphy, A. J., et al. (2009). Variants in TGFB1, dust mite exposure, and disease severity in children with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(5), 356-362.

Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359(6397), 693-699.

Thompson-Snipes, L., Dhar, V., Bond, M. W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., & Rennick, D. M. (1991). Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(2), 507-510.

Tran, D. Q. (2012). TGF-β: the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(1), 29-37.

Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J., & Hutchinson, I. V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European Journal of Immunogenetics*, 24(1), 1-8.

Van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Nuotio, M. L., Slagter, S. N., Doiron, D., Fischer, K., Foco, L., et al. (2014). The prevalence of metabolic syndrome and

metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocrine Disorders*, 14, 9.

Wang, B., Morinobu, A., Kanagawa, S., Nakamura, T., Kawano, S., Koshiba, M., et al. (2007). Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 53(1-2), 15-23.

Wu, H., Romieu, I., Shi, M., Hancock, D. B., Li, H., Sienra-Monge, J. J., et al. (2010). Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 321-327.e313.

Yang, X. X., Li, F. X., Wu, Y. S., Wu, D., Tan, J. Y., & Li, M. (2011). Association of TGF-beta1, IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma in a Chinese population. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 29(3), 273-277.

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., & Van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296(5567), 490-494.

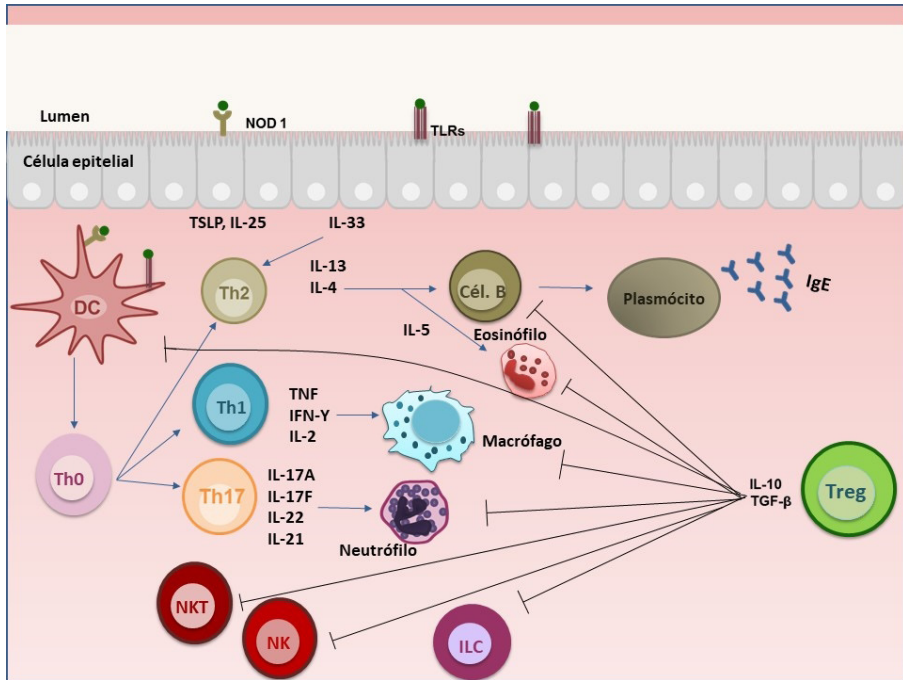
Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., & Mori, T. (2010). Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of Biochemistry*, 147, 781-792.

World Health Organization (WHO). (2008). *The World Health Report 2008: primary health care – now more than ever*. Recuperado em 25 fevereiro, 2019, do <https://www.who.int/whr/2008/en/>

Zhang, L., Zhang, Y., Desrosiers, M., Wang, C., Zhao, Y., & Han, D. (2009). Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Human Immunology*, 70(11), 930-934.

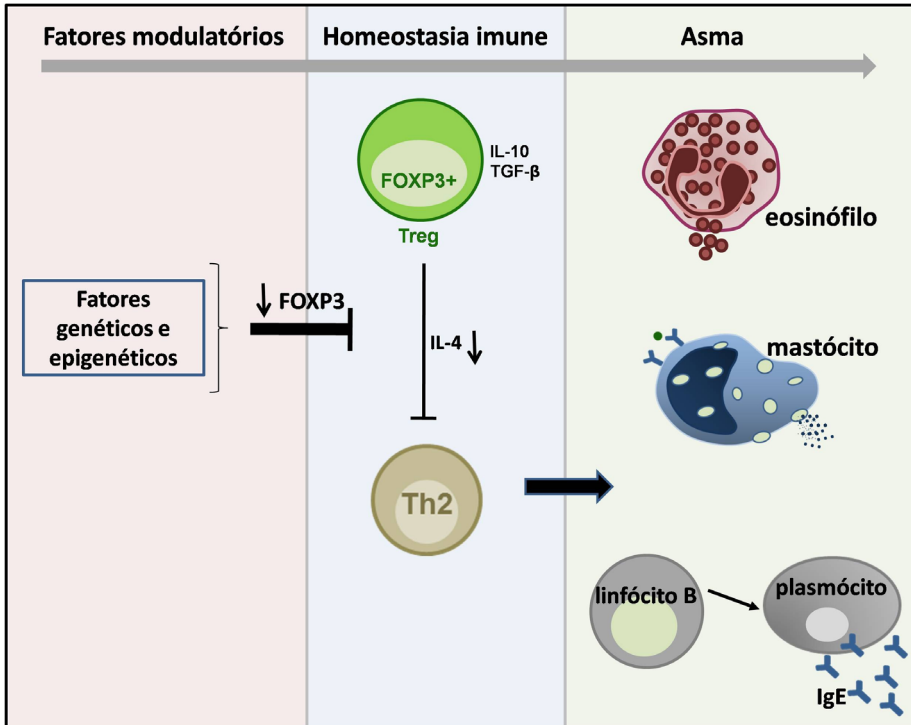
Zhang, L., & Zhao, Y. (2007). The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *Journal of Cellular Physiology*, 211(3), 590-597.

Figura 1 – Os linfócitos T regulatórios induzem a supressão de vários tipos celulares, tanto da resposta imune inata quanto adaptativa



As células Treg atuam bloqueando a ativação e a função dessas células, a exemplo da produção de citocinas inflamatórias pelos linfócitos Th1, Th2 e Th17, da apresentação de antígeno pelas células dendríticas e das atividades efetoras de células NK, NKT e ILC.

Figura 2 – Mecanismo de desenvolvimento da asma alérgica



A manutenção da homeostase do sistema imune ocorre por expressão constitutiva das moléculas CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nas células Tregs, resultando na supressão das respostas Th2, por exemplo, após exposição a alérgenos. No entanto, no contexto de asma, os fatores genéticos e epigenéticos, como a metilação de DNA, podem inibir ou reduzir a expressão de FOXP3, levando a uma diminuição da homeostase imune e subsequente desenvolvimento de asma.

Tabela 1 – Polimorfismos associados à asma e atopia nos genes IL-10, TGF-β1 e FOXP3

SNP	Cromossomo	Dados da literatura
IL-10		
rs1518111	1	Associado a baixos níveis de ovos de <i>T. trichiura</i> /grama de fezes (Figueiredo et al., 2013)
rs1800871	1	Altos níveis de IgE (Grant et al. 2011) Associado a baixos níveis de ovos de <i>T. trichiura</i> /grama de fezes (Figueiredo et al., 2013)
rs1800872	1	Altos níveis de IgE (Grant et al., 2011) Associado a baixos níveis de ovos de <i>T. trichiura</i> /grama de fezes (Figueiredo et al., 2013) Associado a maior produção de IL-10 quando expostos ao <i>Helicobacter pylori</i> . Menor risco de atopia (Assis et al., 2014)
rs1800896	1	Aumento nos níveis de IgE total (Grant et al., 2011) Positivamente associado a IgE específico em pacientes expostos ao ácaro da poeira; risco de ocorrência e frequência da exacerbação da asma (Hunninghake et al., 2008) Associado negativamente à infecção crônica por <i>A. lumbricoides</i> e IgE específica anti- <i>Ascaris lumbricoides</i> (Figueiredo et al., 2013)
rs3024491	1	Associado a maior produção de IL-10 quando expostos ao <i>Helicobacter pylori</i> . Menor risco de atopia (Assis et al., 2014)
rs3024492	1	Aumento nos níveis de IgE em pacientes expostos ao ácaro da poeira; risco de ocorrência e frequência da exacerbação da asma (Hunninghake et al., 2008) Associado à menor produção de IL-10; positivamente associado à asma atópica. Positividade no teste cutâneo em resposta à barata (<i>B. germanica</i> e <i>P. americana</i>) (Figueiredo et al., 2013)
rs3024495	1	Aumento na contagem de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Grant et al., 2011) Positivamente associado a níveis de IgE específica para <i>D. pteronyssinus</i> (Figueiredo et al., 2013)
rs3024496	1	Associado à proliferação de ovos do <i>Schistosoma mansoni</i> ; aumento nos níveis de IgE em pacientes expostos ao ácaro da poeira. Maior exacerbação da asma em crianças na Costa Rica. (Grant et al., 2011) Menor produção de IL-10. Positivamente associado à asma atópica (Figueiredo et al., 2013)
TGF-β1		
rs1800469	19	Positivamente associado a asma, rinite alérgica e hiperresponsividade das vias aérea (Sharma et al., 2009; Wu et al., 2010)

rs1800470	19	Aumento no risco de desenvolver asma e asma grave (Faria, 2008; Mak et al., 2006) Associação negativa com a atopia e seus marcadores. Baixo risco de asma atópica em indivíduos infectados com <i>Toxocara spp</i> – genótipo CC (Costa et al., 2017)
rs1800471	19	Aumento da hiperresponsividade ao ácaro (Sharma et al., 2009)
rs1982073	19	Redução do risco de exacerbação da asma (Sharma et al., 2009)
rs2241715	19	Positivamente associados à asma (Wu et al., 2010)
rs4803455	19	Positivamente associado à asma (Wu et al., 2010)
rs7258445	19	Aumento do risco de desenvolver asma. Positivamente associado à doença (Li et al., 2007; Wu et al., 2010)
FOXP3		
rs3761547	X	Associado negativamente a rinite alérgica e IgE HDM* (Zhang et al., 2009)
rs3761548	X	Associado negativamente a rinite alérgica e IgE HDM (Zhang et al., 2009)

* IgE HDM: Detecção de anticorpo IgE antiácaro de poeira doméstica

Produtos naturais e seus derivados: propriedades farmacológicas e potencial aplicação no tratamento da asma alérgica

Ryan Costa, Raimon Rios da Silva, Norma Vilany
Queiroz Carneiro, Ana Tereza Cerqueira Lima, Tamires
Cana Brasil, Anaque de Oliveira Pires, Hugo Bernardino
Ferreira da Silva, Laise Cedraz Pinto, Louise Correia de Lima,
Valdirene Leão Carneiro, Camila Alexandrina Figueiredo

Introdução

A asma alérgica é uma desordem comum das vias aéreas inferiores, desencadeada por uma resposta imune contra antígenos inócuos e caracterizada por uma interação complexa da obstrução do fluxo de ar, hiper-responsividade brônquica (BHR) e inflamação das vias aéreas que levam a recorrentes episódios de sibilo, falta de ar, aperto no peito e tosse. Os fatores genéticos do indivíduo e ambientais atuam conjuntamente para determinar o surgimento e a gravidade da asma. (Upton et al., 2000; Woolcock & Peat, 1997)

A asma apresenta índices crescentes de incidência em países de alta e média renda, como o Brasil, e representa um problema de saúde pública. (Czirják, Kiss, & Kiss, 2007; Ludvigsson, 2006; Steagall, Moutinho, Mantovani, Passarelli, & Thomassian, 2009)

Os custos da hospitalização, atendimentos de emergência e ausências ao trabalho são significativos. (Franco et al., 2007) Além disso, as limitações impactam na qualidade de vida, visto que leva a ausência em atividades normais como escola, lazer e exercícios, que são impossibilitadas de serem executadas quando em crise; além das idas à emergência hospitalar. (Graham & Eid, 2015) Sendo assim, a prevenção das

complicações e evolução da doença representa uma estratégia relevante para a diminuição da mortalidade/morbidade e melhoria da qualidade de vida dos indivíduos acometidos. (Brasil, 2006)

Os glicocorticóides inalatórios são atualmente os medicamentos anti-inflamatórios mais eficazes para o tratamento da asma. A eficácia dos glicocorticóides incluem a redução dos sintomas de asma e da frequência da exacerbação, a melhora da qualidade de vida, melhora da função pulmonar, diminuição da hiperreatividade das vias aéreas, controle da inflamação das vias aéreas e redução da mortalidade. (Barnes, 2006; Chanez et al., 2004) No entanto, a resposta ao tratamento com corticóides em asmáticos varia, e certos subtipos de asma, como a asma refratária, respondem mal à alta dose de glicocorticóides inalados e esteróides sistêmicos. Além disso, os glicocorticóides podem induzir importantes eventos adversos como atrofia muscular, osteoporose e supressão do sistema imunológico, além de síndrome metabólica (Cushing). (Arnaldi et al., 2003; Covar et al., 2000; Leclerc et al., 2004)

Como estratégia broncodilatadora, os fármacos agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 AR) permanecem entre os principais medicamentos comumente prescritos para reverter a obstrução ao fluxo aéreo em adultos. (Johnson, 2006) Embora diversos estudos descrevam que na maioria dos pacientes asmáticos estes medicamentos são eficazes, tem havido relatos de que a estimulação persistente da via dos adrenoreceptores β_2 pode ter consequências negativas, particularmente em pacientes com asma. (Salpeter, Buckley, Ormiston, & Salpeter, 2006) Recentemente, um grande ensaio com β_2 -agonista de longa ação (Laba) e salmeterol foi interrompido por causa da elevada taxa de mortalidade e graves eventos adversos, especialmente entre o subgrupo de afro-americanos. (Nelson et al., 2006)

Além da falha terapêutica e do impacto dos efeitos adversos provenientes das terapias convencionais, especialmente em decorrência ao uso prolongado, é relevante destacar o alto custo desses tratamentos. (Steagall et al., 2009) Neste contexto, a utilização de terapia baseada no uso de plantas medicinais destaca-se como alternativa para o tratamento ou controle da asma.

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos antigos para a busca de alívio e cura de doenças. A ingestão de ervas e folhas para tratamento de desordens talvez tenha sido uma das

primeiras formas de utilização dos produtos naturais pela humanidade. (Viegas Junior, Barreiro, & Bolzani, 2006)

Desde então, as pesquisas envolvendo produtos naturais, bem como a consequente descoberta de moléculas ativas e o desenvolvimento de novos fármacos, têm crescido consideravelmente. (Barreiro & Bolzani, 2009) A etnofarmacologia contribui para esse desenvolvimento, uma vez que representa uma poderosa ferramenta para obtenção de informações sobre a utilização popular dos produtos naturais. (Albuquerque & Hanazaki, 2006)

Medicamentos antiasma de origem natural

Alguns produtos bem estabelecidos para o tratamento de asma surgiram a partir de fontes naturais. A cromolina, por exemplo, é uma substância derivada da planta *Ammi visnaga*, que foi sintetizada no ano de 1965 e vem sendo usada para o tratamento da asma desde 1973. (Serafin, 2012)

Além da cromolina, desde o século XIX, xantinas presentes em chás e café, se tornaram conhecidas por apresentarem efeitos terapêuticos. Então, a partir do início do século XX essas substâncias começaram a ter utilidade clínica como broncodilatadoras. Dentre as classes de medicamentos derivados das xantinas, podemos citar a aminofilina (Aminofilina Sandoz) e a teofilina (Talofilina), que são utilizadas até hoje na terapia para a asma. (Rang, Dale, Ritter, & Moore, 2012; Wannmacher, 2006)

Outro fármaco que está estabelecido para o tratamento de asma, é o Pycnogenol, derivado da obtenção de um extrato padronizado da casca de pinheiro marítimo francês. O Pycnogenol mostrou-se eficaz na diminuição de níveis de IgE específica, além de reduzir os níveis de leucotrienos pela diminuição da expressão da 5-lipoxigenase, em pacientes asmáticos. (Belcaro et al., 2011) Outros estudos apontam que Pycnogenol regula a resposta imune em humanos por meio da ação anti-inflamatória pela redução da atividade do Fator Nuclear Kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição importante, que regula a expressão de genes pró-inflamatórios como leucotrienos, citocinas e moléculas de adesão envolvidos na fisiopatologia da asma. (Grimm et al., 2006) Além disso, o Pycnogenol parece aumentar o volume de expiração forçada,

que está diminuído em asmáticos em decorrência da broncoconstrição e restrição das vias aéreas. (Hosseini et al., 2001)

A Tabela 1 destaca produtos de origem natural que são comercializados, cujas propriedades terapêuticas para o tratamento de asma estão bem estabelecidas na literatura.

Produtos naturais em ensaios pré-clínicos

O bioma brasileiro se caracteriza por uma riqueza de espécies vegetais que são, historicamente, utilizadas em práticas populares. Ainda que muitas propriedades biológicas de plantas medicinais já tenham sido descritas na literatura científica, muitas espécies ainda requerem comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, especialmente por meio de testes pré-clínicos e clínicos. (Turolla, & Nascimento, 2006) Diversas moléculas de origem vegetal apresentam potencial anti-inflamatório relacionado à sua capacidade imunomoduladora, por meio da inibição da síntese ou da ação de citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e a cascata do ácido araquidônico, dentre outros. (Calixto, Campos, Otuki, & Santos, 2004; Werz, 2007)

O desenvolvimento de novos medicamentos e insumos farmacêuticos, nos primeiros estágios de estudos, requer a realização de estudos pré-clínicos que forneçam evidências mínimas quanto aos aspectos de segurança e eficácia. (Brasil, 2013) Estes aspectos compreendem características farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) e farmacodinâmicas (determinação das características químicas do composto), bem como suas propriedades físicas e toxicológicas que são realizadas em bactérias, amostras de tecidos e animais, para determinar o nível de segurança de um determinado composto para ser utilizado em ensaios clínicos, isto é, em humanos. (Brasil, 2013)

O Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular (Imunobio) investiga o potencial farmacológico de produtos naturais para o tratamento de alergias respiratórias, utilizando como principais parâmetros: a) os perfis de células imunológicas e citocinas envolvidas na fisiopatologia da asma; b) a avaliação histopatológica de órgãos envolvidos; c) a produção de anticorpos relacionados à resposta alérgica; e d) a avaliação da função respiratória dos animais.

Nesse contexto, os produtos naturais que se destacam nos estudos conduzidos pelo Imunobio são: a milona (*Cissampelos sympodialis*) e seus alcaloides, o manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e seus flavonoides, o ácido rosmarínico e o ácido caféico, o capim-santo (*Cymbopogon citratus*), a cebola (*Allium cepa* L.) e seu constituinte quercetina e o eugenol. Eles foram avaliados quanto a seu potencial farmacológico *in vitro* e em modelo murino de alergia respiratória induzida pelo ácaro *Blomia tropicalis*, conforme modelo experimental descrito previamente. (Baqueiro et al., 2010)

Estudos com o *Cissampelos sympodialis* (Cs), conhecida popularmente como Milona ou “orelha-de-onça”, mostraram que o extrato hidroalcoólico dessa planta, bem como os alcalóides totais e principal, a warifteína, apresentam a capacidade de reduzir o infiltrado inflamatório eosinofílico das vias aéreas inferiores. Além disso, a utilização do extrato hidroalcoólico da Cs reduz a produção de IL-5, citocina envolvida no estímulo à produção de eosinófilos, e IL-13, que está relacionada com a produção de muco. O extrato, também, aumenta a produção de IL-10, que por sua vez tem importante papel na regulação de doenças inflamatórias. Estes dados sugerem um efeito farmacológico promissor da Cs no tratamento de desordens alérgicas como a asma. (Cerqueira-Lima et al., 2010)

Além do nosso grupo, outros autores têm demonstrado o potencial anti-inflamatório e antialérgico do alcalóide warifteína, presente na *Cissampelos sympodialis*. (Aragão, Barbosa-Filho, & Macedo, 2001; Barbosa-Filho, Agra, & Thomas, 1997) Bezerra-Santos et al. (2006) demonstraram que o pré-tratamento com warifteína foi capaz de reduzir a eosinofilia e a produção de leucotrienos. (Bezerra-Santos et al., 2006) Em outro estudo, o mesmo grupo comprovou que tratamento com warifteína inibe a hiperresponsividade das vias aéreas. Também foi demonstrado que a inalação do extrato hidroalcoólico de Cs foi capaz de reduzir IgE específica para ovalbumina, infiltrado leucocitário e produção de muco no pulmão. (Vieira et al., 2013) Ademais, tanto o pré quanto o pós-tratamento com warifteína reduziram a infiltração eosinofílica, a produção de muco e a fibrose subepitelial em animais com alergia respiratória (Tabela 2).

As propriedades anti-inflamatórias de Cs foram mostradas em modelo de alergia alimentar induzida por ovalbumina. Na oportunidade,

o extrato hidroalcoólico das folhas de Cs e seus alcaloides, a warifiteína e a metil-warifiteína, reduziram importantes parâmetros fisiopatológicos. O tratamento reduziu IgE antiovalbumina, *score* diarreico, células inflamatórias e produção de muco intestinal. A cultura das células dos linfonodos mesentéricos tratada com os alcaloides reduziu a produção de IL12p70 e estimulou a produção de células Treg. Este trabalho foi capaz de mostrar a atividade antialérgica do extrato da Cs e de produtos do seu metabolismo secundário, os alcaloides warifiteína e a metil-warifiteína. (Costa et al., 2013)

Outro produto que tem demonstrado potencial para o tratamento da asma é o extrato metanólico do *Ocimum gratissimum* e seus fitoquímicos, o ácido rosmarínico e o ácido caféico. Estes produtos mostraram-se capazes de reduzir os níveis de eosinófilos no lavado bronco-alveolar de animais alérgicos, o infiltrado inflamatório no pulmão e a produção de muco. O *Ocimum gratissimum*, bem como o ácido rosmarínico e o ácido caféico, reduziu os níveis de IL-4 no lavado bronco-alveolar, demonstrando potencial efeito farmacológico desses produtos sobre a asma. (Costa et al., 2012) (Tabela 2).

O ácido rosmarínico também exerce uma ação antialérgica por suprimir a liberação de β -hexosaminidase, um marcador comum de degranulação de mastócitos e basófilos; por reduzir os níveis de IgE, além de reduzir os níveis de ciclo-oxigenase-2 (COX2). (Zhu et al., 2014) (Tabela 2) Evidências apontam que o ácido rosmarínico diminuiu o infiltrado de células T CD4⁺, T CD8⁺, mastócitos em lesões cutâneas na dermatite e possui efeito inibitório na expressão de TNF. (Lee et al., 2006; Jang et al., 2011) Assim, esse composto representa uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento das doenças alérgicas.

O Eugenol é um óleo encontrado em diversas espécies vegetais, incluindo o *gratissimum*, que apresenta capacidade de reduzir a inflamação eosinofílica das vias aéreas e a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. (Campos et al., 2014; Pan & Dong, 2015) (Tabela 2) Adicionalmente, o Eugenol possui propriedade broncodilatadora e relaxante do músculo da traqueia de camundongos previamente estimulados por agonista colinérgico, demonstrando potencial ação farmacológica na inflamação das vias respiratórias. (Campos et al., 2014)

O extrato do *Cymbopogon citratus* também demonstra capacidade de diminuir a produção de eosinófilos, IgE e citocina inflamatória

IL-4 (Machado et al., 2015), além de inibir a expressão de iNOS (do inglês *inducible nitric oxide synthase*) e produção de óxido nítrico (NO) sem afetar a viabilidade celular, suprimindo estresse oxidativo, o que reflete em seu potencial anti-inflamatório e antialérgico. (Figueirinha, Cruz, Francisco, Lopes, & Batista, 2010; Francisco et al., 2011; Tiwari, Dwivedi, & Kakkar, 2010) (Tabela 2) Além disso, extratos da *C. citratus* têm efeito inibitório sobre mediadores da inflamação, como as prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (TNF; IL-1 β). (Francisco et al., 2011; Salim, Kumolosasi, & Jantan, 2014) Ainda é possível reconhecer o efeito antialérgico do *C. citratus* dada a sua capacidade de reduzir edema e ter atividade antianafilática na reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em modelos animais. (Boukhatem, Ferhat, Kameli, Saidi, & Kebir, 2014; Mithosi et al., 2014) O efeito anti-inflamatório atribuído a essa espécie é, pelo menos em parte, resultado da inibição da ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF-kB por esse produto. (Francisco et al., 2013; Francisco et al., 2011; Machado et al., 2015) (Tabela 2)

A utilização do extrato da cebola (*Allium cepa* L.) e a quercetina também apresentam potencial para o tratamento das alergias. Esses produtos reduzem a eosinofilia, a produção de IgE e a produção das citocinas inflamatórias IL-4, IL-5, IL-13 e IL-1 β . (Ma, Li, Xie, Liu, & Liu, 2015; Oliveira et al., 2015; Park et al., 2009; Rogerio et al., 2010; Sakai-Kashiwabara & Asano, 2013) Em modelo *in vitro* utilizando mastócitos de ratos, o *Allium cepa* L. demonstrou atividade anti-histamínica, inibindo a liberação de histamina. (Kaiser et al., 2009) (Tabela 2) Também há relatos dessa substância atuar inibindo o estresse oxidativo por meio da diminuição de óxido nítrico e iNOS, além de suprimir o acúmulo e ativação de células imunes, como macrófagos e linfócitos. (Impellizzeri et al., 2015)

Adicionalmente, evidências mostram que a quercetina potencializa relaxamento das vias aéreas, em modelo *in vivo*, atenuando a responsividade das vias, tendo efeito broncodilatador. (Joskova, Francova, & Sadlonova, 2011; Oliveira et al., 2015) Estudo avaliando o efeito anti-inflamatório das formulações de quercetina-microemulsão (QU-ME) e suspensão quercetina (QU-SP) – num modelo experimental de inflamação alérgica das vias respiratórias no qual camundongos receberam doses orais diárias de diferentes concentrações destas formulações

– demonstrou propriedades anti-inflamatórias desse composto e seu potencial terapêutico para as doenças inflamatórias das vias aéreas. (Machado et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Park et al., 2009; Rogerio et al., 2010; Sakai-Kashiwabara, & Asano, 2013) O efeito anti-inflamatório da quercetina deve-se a sua capacidade de inibir a ativação do NF- κ B, bem como inibir TLR2, TLR4 e COX-2. (Gardi et al., 2015; Kobori et al., 2016; Ma et al., 2015; Rogerio et al., 2010) Estudo clínico avaliando os níveis plasmáticos de formulações da quercetina mostrou que essa substância apresenta uma boa biodisponibilidade por via oral. (Burak et al., 2017)

Assim, os produtos apresentados acima apresentam-se como promissores candidatos a serem testados em ensaios clínicos que visem estabelecer a segurança e eficácia destes produtos em humanos, que justifiquem sua utilização clínica no tratamento de doenças alérgicas.

Produtos naturais em ensaios clínicos

Embora exista considerável número de produtos naturais testados em nível pré-clínico para o tratamento das alergias, atualmente poucos são os produtos que tem sua segurança e eficácia testadas em ensaios clínicos. Dentre estes, os que apresentam promissores resultados são o ASHMI e o STA-1.

O ASHMI é um extrato vegetal composto por 3 espécies (*Ganoderma lucidum*, *Radix Sophora flavescens* e *Radix Glycyrrhiza uralensis*) que apresenta ação terapêutica sobre a hiper-reatividade brônquica, a inflamação pulmonar e o remodelamento das vias aéreas através da redução da resposta Th2, bem como da modulação da contração da musculatura brônquica. (Wen et al., 2005; Busse et al., 2010)

Estudo clínico realizado na China, comparou o ASHMI e a prednisona demonstrando resultados similares dos dois produtos sobre a redução dos níveis séricos de IgE, eosinofilia e utilização de broncodilatadores β 2. Pacientes tratados com ASHMI também apresentaram melhora na função pulmonar, embora a prednisona tenha apresentado melhor resultado. A dose diária total testada de ASHMI foi 3,6 g do extrato aquoso seco, equivalente a um extrato da mistura das ervas *Ganoderma lucidum* (20g), *Radix Sophorae Flavescens* (9g) e *Radix Glycyrrhiza* (3g). (Wen et al., 2005)

O ASHMI não afetou significativamente a massa corporal, ao passo que o grupo de pacientes que receberam prednisona apresentaram um ganho de peso significativo após 4 semanas de tratamento. (Wen et al., 2005) Não foram descritos efeitos adversos graves com a intervenção terapêutica com o ASHMI, embora alguns pacientes apresentem desconforto gástrico leve. (Kelly-Pieper et al., 2009; Wen et al., 2005) Assim, o ASHMI é seguro e bem tolerado em pacientes com asma alérgica podendo, portanto, continuar a ser estudado para que sua eficácia em pacientes asmáticos seja avaliada.

Ensaio clínico duplo-cego randomizado avaliou a eficácia, a segurança e o mecanismo de ação de uma outra formulação, o STA-1 para o tratamento de asma alérgica em pacientes chineses. (Chang, Huang, & Hsu, 2006) Este composto é constituído pelo extrato das seguintes plantas medicinais: *Rehmannia glutinosa*, *Paeonia suffruticosa*, *Ophiopogon japonicus*, *Pinellia ternata*, *Cornus officinalis*, *Poria cocos*, *Panax quinquefolius*, *Alisma orientale*, *Dioscorea opposita* e *Glycyrrhiza uralensis*. Neste estudo foram incluídos 120 pacientes entre 5 e 20 anos de idade diagnosticados com asma leve a moderada. Comparado com os pacientes que receberam placebos, os pacientes tratados com STA-1 na dose de 80 g/kg/dia duas vezes por dia durante 6 meses apresentaram uma redução dos níveis de IgE total e IgE específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, bem como redução da dose de esteroide sistêmico (prednisolona) utilizada. Além disso, o grupo tratado com STA-1 apresentou melhora na função pulmonar, avaliado por meio do Volume Expiratório Forçado (FEV1) no primeiro segundo em comparação com o grupo placebo. Os resultados deste estudo sugerem que STA-1 pode ser utilizado para o tratamento de asma crônica leve a moderada. (Chang et al., 2006)

Dessa forma, o ASHMI e o STA-1 potencialmente se destacam como futuras alternativas para o tratamento da asma alérgica. Entretanto, outros estudos clínicos ainda precisam ser conduzidos para assegurar a eficácia e segurança dessas preparações. Além disso, é necessário realizar a padronização do conteúdo das substâncias ativas presentes nessas preparações, uma vez que diversos fatores ambientais interferem na produção dos metabólitos secundários, prováveis componentes ativos dentro das preparações testadas.

Considerações finais

O Brasil é um país com grande diversidade genética e que é sub-explorado em termos científicos. Historicamente, produtos de origem natural derivaram várias drogas comerciais utilizadas até os dias de hoje para o tratamento da asma. As drogas antiasma disponíveis no momento possuem importantes efeitos colaterais, o que justifica a busca por novas moléculas, sendo a biodiversidade uma grande fonte de fármacos para tal procura. O laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular vem, ao longo dos últimos anos, investindo no estudo de espécies que ocorrem, especialmente, no semiárido baiano (como a milona – *Cissampelos sympodialis* –; o manjeriçã – *Ocimum gratissimum* –; o capim-santo – *Cymbopogon citratus* – e a cebola – *Allium cepa* L.) e vem demonstrando evidências em nível pré-clínico da eficácia destas espécies em asma experimental. Em nível clínico, poucos estudos envolvendo plantas foram conduzidos para asma nos últimos anos, o que evidencia a necessidade de novos estudos na área. É importante salientar que, independente da estratégia do estudo, destacam-se parâmetros indispensáveis à avaliação de eficácia destes preparados (Heinrich & Verpoorte, 2014): (1) Autenticidade botânica; (2) Descrição química e analítica dos extratos; (3) Critérios racionais no estabelecimento de doses; (4) A utilização de modelos farmacológicos bem estabelecidos.

Referências

- Albuquerque, U. P. & Hanazaki, N. (2006). As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectivas. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16, 678-689.
- Aragão, C. F. S., Barbosa-Filho, J. M., & Macedo, R. O. (2001). Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSC photovisual system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 64(1), 185-191.
- Arnaldi, G., Angeli, A., Atkinson, A. B., Bertagna, X., Cavagnini, F., Chrousos, G. P., et al. (2003). Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 5593-5602.
- Baqueiro, T., Russo, M., Silva, V. M., Meirelles, T., Oliveira, P. R., Gomes, E., et al. (2010). Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in

four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. *Respiratory Research*, 11, 51.

Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., & Thomas, G. (1997). Botanical, chemical and pharmacological investigation on *C. sympodialis* from Paraíba (Brazil). *Ciência e Cultura*, 49: 386-394.

Barnes, P. J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, 148, 245-254.

Belcaro, G., Luzzi, R., Cesinaro Di Rocco, P., Cesarone, M. R., Dugall, M., et al. (2011). Pycnogenol improvements in asthma management. *Panminerva Medica*, 53(3 Suppl. 1), 57-64.

Bezerra-Santos, C. R., Vieira-de-Abreu, A., Barbosa-Filho, J. M., Bandeira-Melo, C., Piuvezam, M. R., & Bozza, P. T. (2006). Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *International Immunopharmacology*, 6, 1152-1160.

Bezerra-Santos, C. R., Vieira-de-Abreu, A., Vieira, G. C., Filho, J. R., Barbosa-Filho, J. M., et al. (2012). Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. *International Immunopharmacology*, 13(2), 148-155.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 9, 25431.

Brasil. Anvisa. (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Recuperado de <https://bit.ly/2Xl4DYi>. Acesso em: 27 fev. 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. (2006). *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 60 p.

Burak, C., Brüll, V., Langguth, P., Zimmermann, B. F., Stoffel-Wagner, B., Sausen, U., et al. (2017). Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dihydrate in humans. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 343-353.

Busse, P. J., Schofield, B., Birmingham, N., Yang, N., Wen, M. C., Zhang, T., et al. (2010). The traditional Chinese herbal formula ASHMI inhibits allergic lung inflammation in antigen-sensitized and antigen-challenged aged mice. *Ann Allergy Asthma Immunology*, 104(3): 236-46.

Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F., & Santos, A. R. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, 70(2), 93-103.

Campos, K. M., Teixeira, T.O., Cerqueira-Lima, A. T., Costa, R. S., Carneiro, T. C. B., Silva, D. F., et al. (2014). Effect of Eugenol (4-Allyl-2-Methoxyphenol) mediated by both bronchodilator and immunomodulatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 38-49.

Carneiro, T. C. B., Costa, R. S., Carneiro, N. V. Q., Cerqueira-Lima, A. T., Oliveira, T., & Dourado K. (2014). Antiallergic effects of caffeic acid in Blomia tropicalis murine model of experimental asthma. *Lung, Pulmonary & Respiratory Research*, 1(4), 00023.

Cerqueira-Lima, A. T., Alcântara-Neves, N. M., Carvalho, L. C., Costa, R. S., Barbosa-Filho, J. M., Piuvezam, M., et al. (2010). Effects of Cissampelos sympodialis Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to Blomia tropicalis. *Current Drug Targets*, 11, 1458-1467.

Chanez, P., Bourdin, A., Vachier, I., Godard, P., Bousquet, J., & Vignola, A. M. (2004). Effects of inhaled corticosteroids on pathology in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(3), 184-190.

Chang, T. T., Huang, C. C., & Hsu, C. H. (2006). Clinical evaluation of the Chinese herbal medicine formula STA-1 in the treatment of allergic asthma. *Phytotherapy Research*, 20(5), 342-347.

Costa, R. S., Carneiro, T. C., Cerqueira-Lima, A. T., Queiroz, N. V., Alcântara-Neves, N. M., Pontes-de-Carvalho, L. C., et al. (2012). Ocimum gratissimum Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to Blomia tropicalis. *International Immunopharmacology*, 13(1), 126-134.

Costa, H. F., Leite, F. C., Alves, A. F., Barbosa-Filho, J. M., Santos, C. R., & Piuvezam, M. R. (2013). Managing murine food allergy with Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids. *International Immunopharmacology*, 17, 300-308.

Covar, R. A., Leung, D. Y., McCormick, D., Steelman, J., Zeitler, P., & Spahn, J. D. (2000). Risk factors associated with glucocorticoid-induced adverse effects in children with severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 651-659.

Czirják, L., Kiss, C. G., & Kiss, E. (2007). [Does the number of patients with autoimmune disorders and the frequency of autoimmune diseases increase?]. *Orv Hetil*, 148(suppl. 1), 17-20.

Figueirinha, A., Cruz, M. T., Francisco, V., Lopes, M. C., & Batista, M. T. (2010). Anti-inflammatory activity of Cymbopogon citratus leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 681-690.

- Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Miguel Neves, B., et al. (2013). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 126-134.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B. M., García-Rodríguez, C., Lopes, M. C., Cruz, M. T., et al. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 818-827.
- Franco, R., Santos, A. C., Nascimento, H. F., Souza-Machado, C., Ponte, E., Souza-Machado, A., et al. (2007). Cost-effectiveness analysis of a state funded programme for control of severe asthma. *BMC Public Health*, 7, 82.
- Gardi, C., Bauerova, K., Stringa, B., Kuncirova, V., Slovak, L., Ponist, S., et al. (2015). Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 583, 150-157.
- Graham, L. M., & Eid, N. (2015). The impact of asthma exacerbations and preventive strategies. *Current Medical Research Opinion*, 31, 825-835.
- Grimm, T., Chovanová, Z., Muchová, J., Sumegová, K., Liptáková, A., Duracková, Z., et al. (2006). Inhibition of NF- κ B activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Journal of Inflammation*, 3, 1-6.
- Heinrich, M., & Verpoorte, R. (2014). Good practice in ethnopharmacology and other sciences relying on taxonomic nomenclature. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 385-386.
- Hosseini, S., Pishnamazi, S., Sadrzadeh, S. M., Farid, F., Farid, R., & Watson, R. R. (2001). Pycnogenol(R) in the management of asthma. *Journal of Medicinal Food*, 4, 201-209.
- Impellizzeri, D., Talero, E., Siracusa, R., Alcaide, A., Cordaro, M., Maria Zubelia, J., et al. (2015). Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis in mice. *The British Journal of Nutrition*, 114, 853-865.
- Jang, A. H., Kim, T. H., Kim, G. D., Kim, J. E., Kim, H. J., Kim, S. S., et al. (2011). Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology*, 11, 1271-1277.
- Johnson, M. (2006). Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 18-24.

- Joskova, M., Franova, S., & Sadlonova, V. (2011). Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma. *Bratisl Lek Listy*, 112(1), 9-12.
- Kaiser, P., Youssouf, M. S., Tasduq, S. A., Singh, S., Sharma, S. C., Singh, G. D., et al. (2009). Anti-allergic effects of herbal product from *Allium cepa* (bulb). *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 374-382.
- Kelly-Pieper, K., Patil, S. P., Busse, P., Yang, N., Sampson, H., Li, X. M., et al. (2009). Safety and tolerability of an antiasthma herbal Formula (ASHMI) in adult subjects with asthma: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-escalation phase I study. *The Journal of Alternative Complementary Medicine*, 15, 735-743.
- Kobori, M., Takahashi, Y., Sakurai, M., Akimoto, Y., Tsushida, T., Oike, H., et al. (2016). Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60, 300-312.
- Leath, T. M., Singla, M., & Peters, S. P. (2005). Novel and Emerging therapies for asthma. *Drug Discovery Today*, 10(23-24), 1647-1655.
- Leclerc, N., Luppen, C. A., Ho, V. V., Nagpal, S., Hacia, J. G., Smith, E., et al. (2004). Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(1), 175-193.
- Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Park, J., Hong, S., Hyun, C. G., et al. (2006). Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3. *The British Journal of Pharmacology*, 148, 366-375.
- Ludvigsson, J. (2006). Why diabetes incidence increases--a unifying theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1079, 374-382.
- Ma, J. Q., Li, Z., Xie, W. R., Liu, C. M., & Liu, S. S. (2015). Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*, 28 (1), 531-539.
- Mitoshi, M., Kuriyama, I., Nakayama, H., Miyazato, H., Sugimoto, K., & Kobayashi, Y. (2014). Suppression of allergic and inflammatory responses by essential oils derived from herbal plants and citrus fruits. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(6), 1643-51.
- Nelson, H. S., Weiss, S. T., Bleecker, E. R., Yancey, S. W., Dorinsky, P. M., & SMART Study Group. (2006). The Salmeterol multicenter asthma research trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest*, 129(1), 15-26.
- Oliveira, T., Campos, K. M., Cerqueira-Lima, A. T., Carneiro, T. C. B., Silva Velozo, E., Melo, I. C. R., et al. (2015). Potential therapeutic effect of *Allium*

cepa L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *Daru*, 23, 18.

Pan, C., & Dong, Z. (2015). Antiasthmatic effects of eugenol in a mouse model of allergic asthma by regulation of vitamin D3 upregulated protein 1/ NF- κ B pathway. *Inflammation*, 38, 1385-1393.

Park, H. J., Lee, C. M., Jung, I. D., Lee, J. S., Jeong, Y. I., Chang, J. H., et al. (2009). Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*, 9, 261-267.

Rogério, A. P., Dora, C. L., Andrade, E. L., Chaves, J. S., Silva, L. F., Lemos-Senna, E., et al. (2010). Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research*, 61(4), 288-297.

Sakai-Kashiwabara, M., & Asano, K. (2013). Inhibitory action of quercetin on eosinophil activation *in vitro*. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2013, 127105.

Salim, E., Kumolosasi, E., & Jantan, I. (2014). Inhibitory effect of selected medicinal plants on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Natural Medicines*, 68(3), 647-653.

Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Ormiston, T. M., & Salpeter, E. E. (2006). Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Annals of Internal Medicine*, 144, 904-912.

Machado, M. S. S., Silva, H. B. F., Rios, R., Oliveira, A. P., Carneiro, N. V. Q., Costa, R. S., et al. (2015). The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 15, 168.

Rang, M. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. (2012). *Farmacologia*. (8a ed.). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Serafin, W. E. Fármacos usados no tratamento da asma. In Goodman, L. S.; Gilman, A.; Hardman, J. G., et al. (2012). *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. (12a ed.). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan/New York, NY: McGraw-Hill.

Steagall, P. V., Moutinho, F. Q., Mantovani, F. B., Passarelli, D., & Thomassian, A. (2009). Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. *Research in Veterinary Science*, 86(1), 115-120.

- Tiwari, M., Dwivedi, U. N., & Kakkar, P. (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chemistry Toxicology*, 48, 2913-2919.
- Turolla, M. S. & Nascimento, E. S. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 289-306.
- Upton, M. N., McConnachie, A., McSharry, C., Hart, C. L., Smith, G. D., Gillis, C. R., et al. (2000). Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults: the Midspan family study surveys of parents and offspring. *BMJ*, 321(7253), 88-92.
- Vieira, G. C., Lima, J. F., De Figueiredo, R. C., Mascarenhas, S. R., Bezerra-Santos, C. R., & Piuvezam, M. R. (2013). Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-regulates airway allergic reaction by reducing lung CD3+ T cells. *Phytotherapy Research*, 27, 916-925.
- Wannmacher, L. (2006). Tratamento medicamentoso da asma em crianças. Uso racional de medicamentos: temas selecionados, 3(9), 1-6.
- Wen, M. C., Wei, C. H., Hu, Z. Q., Srivastava, K., Ko, J., Xi, S. T., et al. (2005). Efficacy and tolerability of anti-asthma herbal medicine intervention in adult patients with moderate-severe allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116, 517-524.
- Werz, O. (2007). Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Medica*, 73, 1331-1357.
- Woolcock, A. J., & Peat, J. K. (1997). Evidence for the increase in asthma worldwide. *Ciba Foundation Symposium*, 206, 122-134.
- Zhu, F., Asada, T., Sato, A., Koi, Y., Nishiwaki, H., & Tamura, H. (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 885-892.

Tabela 1 – Produtos de origem natural, estabelecidos na literatura para o tratamento de asma, organizados conforme as fontes naturais e as respectivas propriedades farmacológicas

Substâncias	Fontes naturais	Propriedades farmacológicas	Referências
Cromolina	<i>Ammi visnaga</i>	Inibe a ação de leucotrienos e PDE4.	Leath, Singla, & Peters (2005)
Xantinas	Café, chás	Inibe PDE3 e PDE4; Broncodilatação.	Barnes (2011)
Pycnogenol	Casca do pinheiro marítimo francês	Diminui os níveis de IgE específico; reduz a ação dos leucotrienos; reduz a atividade do NF-κB; e aumenta o volume de expiração forçada.	Belcaro et al. (2011), Grimm et al. (2006), Hosseini et al. (2001)

PDE: Fosfatidil-esterase.

Tabela 2 – Produtos naturais em estudos de fase pré-clínica para o tratamento de asma, organizados conforme suas propriedades farmacológicas descritas na literatura.

Planta medicinal	Eosinófilos	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13	IgE	IgG1	NF-κB	Referência
<i>Cissampelos sympodialis</i>			↓	↑	↓				Bezerra-Santos et al., 2006 Cerqueira-Lima et al., 2010 Bezerra-Santos et al., 2012
Warifteina	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	Bezerra-Santos et al., 2006 Cerqueira-Lima et al., 2010 Bezerra-Santos et al., 2012
<i>Ocimum gratissimum</i>	↓	↓					↓		Costa et al., 2012
Ácido rosmarinico	↓	↓	↓			↓	↓		Costa et al., 2012; Zhu et al., 201
Ácido cafeico	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	Carneiro et al., 2014
<i>Cymbopogon citratus</i>	↓	↓				↓		↓	Machado et al., 2015; Boukhatem al., 2014; Mitoshi et al., 2014
<i>Allium cepa</i>	↓	↓	↓		↓				Kaiser et al., 2009; Park et al., 200 Rogerio et al., 2010; Sakai-Kashwabara & Asano, 2013; Ma al., 2015; Oliveira et al., 2015
Quercetina	↓	↓	↓		↓	↓			Kaiser et al., 2009; Park et al., 200 Rogerio et al., 2010; Sakai-Kashwabara & Asano, 2013; Ma al., 2015; Oliveira et al., 2015
Eugenol	↓	↓	↓		↓			↓	Pan & Dong, 2015; Campos et al 2014

Infecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em humanos

Ramon Mendes dos Santos, Marcos Borges Ribeiro, Songelí Menezes Freire, Roberto Meyer

O bacilo *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis é um comum e importante patógeno que causa linfadenite em pequenos ruminantes, e em humanos causa a linfadenite e a pneumonia. Sua descoberta data de 1888 por Nocard, e foi primeiro identificado e descrito como causa de abscesso renal em ovinos, em 1891. É um bacilo gram-positivo pleomórfico anaeróbico facultativo e bem conhecido na medicina veterinária por infectar predominantemente ovinos e caprinos, apesar de também afligir cavalos, gado e veados. Linfadenite caseosa é a manifestação clínica dominante entre estes animais, mas órgãos viscerais, incluindo os pulmões, também podem ser afetados. (Dorella, Pacheco, Oliveira, Miyoshi, & Azevedo, 2006)

Infecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em humanos

A infecção humana em geral ocorre em consequência da contaminação cruzada com animais infectados. Tem sido relatada a possibilidade de contágio por consumo de alimentos crus contaminados, e o manejo ou contato com animais infectados ou com a bactéria. Alguns trabalhos citam a dificuldade do diagnóstico humano para esta infecção já encontrada em diferentes países. (Bregenzer, Frei, Ohnacker &

Zimmerli, 1997; Trost et al., 2010) Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal – *World Organisation for Animal Health* (OIE), entre os 201 países que relataram suas situações sanitárias, 64 declararam a presença de animais com linfadenite caseosa dentro de suas fronteiras em 2009. No Brasil, a infecção é considerada endêmica em ovino e caprino nas regiões Nordeste e Sudeste, que contam com comércio, consumo e criação de subsistência e empresas de pequeno e médio porte. No estado de Minas Gerais, em estudo soroepidemiológico por método imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi encontrado o valor de prevalência de 75,8% para ovinos e no estado da Bahia a soroprevalência foi de 21,8%. (Loureiro, 2012)

Primeiro caso em humano

O primeiro caso de infecção de *C. pseudotuberculosis* em humano foi publicado por J. F. Lopez em 1966. Tratava-se de um homem panameño de 37 anos de idade que se queixava de fadiga, dores musculares generalizadas e dor na virilha direita por uma semana. O diagnóstico e cura só puderam ser alcançados após a excisão do linfonodo inguinal que estava inchado e causando a dor. A partir dele pode ser feita cultura e posterior identificação da *C. pseudotuberculosis*. Segundo descrição de Lopez, o linfonodo apresentava hiperplasia dos centros germinativos, algumas células apresentavam-se multinucleadas e as células gigantes de Langerhans não estavam presentes. (Lopez, Wong, & Quesada, 1966)

A linfadenite

A *C. pseudotuberculosis* pode causar séria inflamação dos gânglios linfáticos comprometendo seu funcionamento. Esta doença é chamada de linfadenite, e frequentemente atinge o linfonodo inguinal ou axilar. Em biópsias de pacientes com esta infecção observa-se inflamações granulomatosas necrotizantes não específica, mas sem sinais de malignidade, além de vasculite não específica, inflamação linfoplasmacelular com histiócitos, células grandes de Langhans e granulomas epitelióides. Algumas áreas mostram infiltrados de granulócitos eosinofílicos e

necroses focais. (Bregenzer et al., 1997) Geralmente o linfonodo é excisado para obter a cura do paciente, caso contrário, a inflamação pode retornar. (Peel, Palmer, Stacpole, & Kerr, 1997)

Pneumonia associada

Na Austrália, em julho de 2007, uma estudante de medicina veterinária que trabalhava com *C. pseudotuberculosis* no laboratório de microbiologia da sua universidade apresentou-se no hospital com histórico de quatro semanas com leves sintomas respiratórios, com sensação de *globus* e disfagia, levando a tosse com expectoração purulenta intermitente, alguns suores noturnos, mas sem febre. Foi feita tomografia computadorizada do tórax, revelando uma estrutura consolidada de 60 mm na parte posterior do lóbulo superior com aumento dos gânglios linfáticos no hilo e mediastino direito. (Heggelund et al., 2015)

Após várias tentativas para diagnosticar a causa da enfermidade por testes sorológicos (pertússis, micoplasma, *chlamydochila*, *francisella*, plúmula, toxoplasma e HIV), e por PCR para *Mycobacterium tuberculosis*, o qual deu negativo, apenas em dezembro do mesmo ano conseguiu-se diagnosticar a paciente com infecção por *C. pseudotuberculosis* a partir da cultura do infiltrado pulmonar extraído por biopsia, da análise bioquímica do bacilo utilizando o teste ApiCoryne (BioMérieux) e posterior análise de DNA usando dois *primers* com o gene 16S do rRNA. (Heggelund et al., 2015)

A estudante não teve contato com ungulados (animais de cascos, principalmente cabras e ovelhas) durante as semanas que antecederam os sintomas, mas trabalhou com a *C. pseudotuberculosis* em sua classe no laboratório de microbiologia, de onde se acredita ter sido o local da contaminação. (Heggelund et al., 2015)

Uma estudante de veterinária que também trabalhava com a *C. pseudotuberculosis* no laboratório de microbiologia apresentou pneumonia com infiltrado eosinofílico. A manifestação clínica era de fadiga e tosse seca. Sendo tratada com tetraciclina (250 mg, quatro vezes ao dia) apresentou mal-estar persistente, e por falta de diagnóstico específico a estudante foi internada e o tratamento interrompido. (Keslin, McCoy, McCusker, & Lutch, 1979)

O leucograma é mostrado na Tabela 2. Seu raio X mostrou infiltrado no lobo inferior do pulmão esquerdo e o escarro apresentou 29% de eosinófilos. Vários testes sorológicos foram realizados para identificar o agente causador da lesão, mas todos deram negativo. Dosagem de imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE, além dos componentes do sistema complemento com C3 e C4, deram normais. Anticorpos antinucleares e fatores reumatoide estavam ausentes. (Keslin et al., 1979)

A amostra de biópsia retirada do lobo inferior do pulmão esquerdo revelou fibrose intersticial focal, e algumas áreas dos espaços alveolares estavam cheios de grandes pneumócitos descamativos. Numerosos eosinófilos estavam presentes nos espaços intra-alveolares. (Keslin et al., 1979)

O diagnóstico foi alcançado com a cultura do aspirado transtraqueal, o qual revelou um crescimento puro de *C. pseudotuberculosis* bastonetes Gram-positivos intracelular e extracelular. Os testes bioquímicos para identificação do bacilo apontaram beta hemólise em 5% de ágar (ovelha), catalase e produção de urease, fermentação da glicose e maltose, desenvolvimento de um halo marrom em Tinsdale ágar e fermentação de sacarose negativa. (Keslin et al., 1979)

Diagnóstico em humanos

Atualmente o diagnóstico da infecção em humanos não se encontra disponível comercialmente, e mesmo o diagnóstico *in house* (não comercial) é considerado complexo. A maioria dos diagnósticos realizados até o momento tem sido baseado em métodos invasivos com excisão do linfonodo lesionado (geralmente linfonodos axilar ou inguinal) e sua investigação por imagem, em análise histológica de lesão tecidual de amostras de biópsias, e análise de tipos moleculares para identificação do DNA do patógeno (PCR *in house*), cultura bacteriana e análise bioquímica com ApiCoryne (bioMérieux). (Heggelund et al., 2015 ; Peel et al., 1997)

Referências

- Bregenzer, T., Frei, R., Ohnacker, H., & Zimmerli, W. (1997). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clinical Microbiology and Infection*, 3(6), 696-698.
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37(2), 201-218.
- Heggelund, L., Gaustad P., Håvelsrud O. E., Blom J., Borgen L., Sundset, A., et al. (2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(2), 1-6.
- Keslin, M. H., McCoy, E. L., McCusker, J. J., & Lutch, J. L. (1979). *Corynebacterium pseudotuberculosis* a new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. *The American Journal of Medicine*, 67(2), 228-231.
- Lopez, J. F., Wong, F. M., & Quesada, M. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (1966). First case of human infection. *American Journal of Clinical Pathology*, 46, 562-567.
- Loureiro, D. N. (2012). *Soroepidemiologia da linfadenite caseosa, doença da língua azul e da doença de Maedi-Visna em ovinos de raça definida no estado da Bahia, e correlações com aspectos zootécnicos*. Dissertação de mestrado não publicada, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.
- Peel, M. M., Palmer G. G., Stacpole, A., M., & Kerr, T., G. (1997). Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infectious Diseases*, 24(2), 185-191.
- Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schöder J., Jaenicke S., Goesmann, A., et al. (2010). The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 11, 728.

Tabela 1 – Publicações de casos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, em humanos

Autor e ano	Pacientes	Método diagnóstico	Meio e via de contaminação provável	Diagnóstico, tratamento e observações
Keslin, et al.1979	01 estudante de veterinária de 28 anos.	Cultura do aspirado transtraqueal mostrando crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> puro.	Práticas de microbiologia em laboratório utilizando a <i>C. pseudotuberculosis</i> .	- Pneumonia Eosinofílica. - Eritema minimal no lobo inf. - Fibrose intersticial focal - Tratou com eritromicina 500mg 4x por dia mais de 2 semanas
Peel et al.1997	Tab 01: 10 indivíduos da Austrália 1985 até 1992	Isolamento, cultura, Api Coryne	- Fazendeiro - Açougueiro - Matadouro - Inspetor de carne (cortou a mão) - Contato com ovelha há 1 ano e corte na mão - Outros casos são desconhecidos	- Um paciente sem contato com animais e derivados. - Maioria compromete linfonodo axilar.
Peel et al.1997	Tab 02: 12 indivíduos (1 Panamá, 8 Austrália, 1 França, 1 EUA, 1 N. Zelândia)	- Casos anteriores a 1985 - Metodologia não descrita pela autora	- Panamá: Sem contato - Austrália: Gerente de fazenda de ovelha e bovinos; ovelha tosquiador; açougueiro; trabalhador rural; d. casa contato com ovelha; - França: pastor - EUA: bebeu leite de vaca e de cabra cru - Nova Zelândia: gerente de fazenda espremeu abscesso de ovelha	- Maioria dos casos (8) compromete linfonodo axilar.
Bregenzner et al.1997	01 homem, 30 anos, turco, há 2 meses na Suíça.	Cultura em amostras de tecido e pus. Reação de CAMP reverso. Padrão celular de ácido gorduroso por Sherlock system.	Trabalhou como açougueiro e em fazendas de carneiros.	- Inchaço doloroso epitroclear, abscesso entre bíceps e tríceps. - Linfonodo axilar. Tratado com Claritromicina 500 b.i.d por 6 semanas.
Join-Lambert 2006	01 Menina francesa de 12 anos de idade	- Cultura do aspirado do linfonodo mostrou crescimento para <i>Corynebacterium</i> . - API Coryne (Pasteur bioMerieux) - A sequência 16S rRNA (1402 pb) mostrou 100% de homologia com a sequência de 16S rRNA de <i>C. pseudotuberculosis</i> da estirpe NCTC 3450 (GenBank número de acesso X84255). - PCR de extrato de proteínas da <i>C.p.</i> exibindo a fosfolipase D.	Contato com ovelhas em área rural nas férias nos Alpes franceses	- Tratamento eficaz: imipenem-clastatina, rifampicina e ofloxacina intravenosas. Retirada da massa retroperitoneal sem resseção do linfonodo ciprofloxacina, rifampicina, gentamicina.
Heggelund, et al. 2015	01 estudante de veterinária de 23 anos. Austrália.	Cultura, Api Coryne. Confirmação com análise de DNA	Aulas práticas de microbiologia em laboratório.	- Api Coryne não discriminava <i>C. p.</i> sendo necessária a análise de DNA. - Tratamento: trimetoprim/sulfametoxazol e rifampicina

Tabela 2 – Leucograma de estudante de medicina veterinária da acometido pela pneumonia eosinofílica

Hemoglobina	15gm
Leucócitos totais	8.100/mm ³
Leucócitos polimorfonucleares	53%
Neutrófilos	4%
Leucócitos	8%
Eosinófilos	31%
Monócitos	8%

Regulação Neuroendócrina do sistema imune nas leishmanioses

Danielle Christine Chaves Teixeira, Ananda Isis Lima de Marinho, Adenilma Duranes Sousa, Natali Alexandrino Cerqueira, Fabine Correia Passos, Monique Salles de Souza, Rosângela Gomes de Lima, Gyselle Chrystina Baccan

Regulação neuroendócrina da resposta imune

Principais vias de neuroimunomodulação

Há alguns anos tem se intensificado os trabalhos que mostram que hormônios e neurotransmissores podem modular vários tipos de resposta imunológica. (Webster et al., 2002a) Esses mediadores podem afetar muitos aspectos da função imune: como a produção de citocinas e anticorpos, a atividade das células NK, as respostas proliferativas de linfócitos, a fagocitose, a distribuição dos leucócitos sanguíneos pelos tecidos, entre outros. (Aarstad, Gaudernack, & Seljelid, 1983; Baccan, Oliveira, & Mantovani, 2004; Dhabhar & Mcewen, 1996; Glaser et al., 2001; Keller, Blake, Lyman, & Siebenlist, 1981; Marshall et al., 1998)

O sistema nervoso (SN) influencia as funções imunológicas principalmente por meio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático (SNS). (Haddad, Saadé, & Safieh-Garabedian, 2002; Sternberg, Chrousos, Wilder, & Gold, 1992; Stratakis & Chrousos, 1995) O eixo HPA é ativado em resposta a algum tipo de estresse (injúria, estresse emocional, infecções etc). Esses sinais de ameaça à homeostasia chegam a determinadas regiões do cérebro, as quais sinalizam para o hipotálamo, que inicia as respostas específicas

ao estresse. Mediadores químicos, como noradrenalina, acetilcolina e serotonina são liberados e ativam as células do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo para liberarem *corticotrophin-releasing hormone* (CRH) e *arginine vasopressin* (AVP). Esses peptídeos são transportados por intermédio das projeções de axônios até a eminência mediana, onde são secretados dentro do sistema porta hipofisário para, sinergicamente, estimularem a liberação de pró-opiomelanocortina (POMC) pelas células corticotróficas da pituitária anterior. Esse peptídeo é clivado, originando o *adrenocorticotropina* (ACTH), β -endorfina e α -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*). O ACTH, por meio da corrente sanguínea, chega até as glândulas adrenais, nas quais estimula, principalmente, a liberação de glicocorticoides.

Os glicocorticoides, assim como outros esteroides, produzem seus efeitos por alterarem a expressão de genes específicos, atuando diretamente nos *hormone response elements* (HREs) ou por meio da interferência na regulação gênica mediada pelo NF κ B (*nuclear factor kappa B*). Esse fator de transcrição é responsável pela ativação da expressão de genes importantes nas respostas imunes, como os de várias citocinas e moléculas de adesão. (Almawi & Melemedjian, 2002; Ghosh, May, & Kopp, 1998; Saklatvala, 2002; Webster et al., 2002a) Os glicocorticoides levam a uma diminuição na expressão da NO sintase II e iNOS, diminuição na síntese de prostaglandinas, diminuição na síntese das citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF e aumento na síntese de IL-4 e IL-10.

A outra via que conecta o cérebro ao sistema imunológico é o SNS. (Elenkov, Wilder, Chrousos, & Vizi, 2000; Sternberg, et al., 1992; Stratakis & Chrousos, 1995) A ativação do eixo HPA, além de estimular a liberação de glicocorticoides pela adrenal, também estimula liberação de catecolaminas por esta glândula. O CRH induz o *locus coeruleus*, um conjunto de células autonômicas no tronco cerebral, a liberar noradrenalina das terminações nervosas simpáticas. A ativação central do SNS é transmitida para a medula adrenal, onde as fibras simpáticas estimulam as células cromóafins a liberarem adrenalina. Vários órgãos são inervados pelas fibras simpáticas, incluindo os órgãos linfóides. Nesses locais, a noradrenalina liberada pelas terminações nervosas, em conjunto com a adrenalina sanguínea, causa vários efeitos fisiológicos.

Diversos autores têm discutido a importância do SNS na regulação da resposta imunológica. Vários órgãos linfoides, como o timo, baço, linfonodos e medula óssea são inervados pelas fibras do SNS. As catecolaminas desempenham papéis-chave nesses órgãos linfoides, sendo importantes no desenvolvimento do sistema imune, na regulação da hematopoiese e na diferenciação dos linfócitos T. (Elenkov et al., 2000) Os leucócitos possuem em sua superfície os diferentes subtipos de adrenorreceptores e a expressão deles parece estar alterada dependendo do estado de ativação imunológica. (Cazaux, Sterin-Borda, Gorelik, & Cremaschi, 1995) Aparentemente todos os leucócitos expressam receptores β adrenérgicos, com exceção apenas dos clones Th2. (Elenkov et al., 2000; Kohm & Sanders, 2000; Madden, 2003; Ramer-Quinn, Baker, & Sanders, 1997; Sanders et al., 1997) Alguns estudos mostram que as células NK são as que possuem maior número desses receptores. (Elenkov et al., 2000) A quantidade de receptores β presentes na superfície das células parece variar conforme o desenvolvimento do sistema imunológico e o grau de maturação das células. Por exemplo, os tímócitos parecem ter menor número de β -adrenorreceptores do que os linfócitos T maduros. (Radojic, Baird, Darko, Smith, & Bulloch, 1991) Alguns resultados indicam que a expressão de receptores α_1 adrenérgicos pode ser regulada por glicocorticoides, agonistas β -adrenérgicos e por citocinas. (Kavelaars, 2002) Além de expressarem em sua superfície receptores para as catecolaminas, alguns leucócitos podem sintetizar e liberar essas substâncias. (Bergquist, Tarkowski, Ekman, & Ewing, 1994; Marino et al., 1999; Musso, Brenci, Indiveri, & Lotti, 1997)

As catecolaminas produzem vários efeitos imunomoduladores que podem ser imunoestimulantes ou supressores. (Baccan, Sesti-Costa, Chedraoui, & Mantovani, 2010; Elenkov et al., 2000; Kohm & Sanders, 2000; Madden, 2003;) A maioria dos resultados são obtidos por meio de ensaios com tratamento *in vitro* de células com agonistas ou antagonistas adrenérgicos, com simpatectomia cirúrgica ou química, e com técnicas de adrenodemedulação. Os estudos concentram-se nos efeitos sobre os linfócitos e indicam que as catecolaminas exercem um papel importante na regulação das respostas Th1 e Th2. A β estimulação das células T leva a uma predominância das respostas Th2, com aumento da produção de anticorpos e de IL-4, mediante o aumento da expressão de moléculas acessórias das células B. (Kasproicz et al., 2000)

Entretanto, quando as células T são crescidas em condições promotoras de padrão Th1, o tratamento com β agonistas leva a um aumento da liberação de IFN- γ e de IL-12. (Swanson, Lee, & Sanders, 2001) Esses resultados, e outros além deles, demonstram que os efeitos das catecolaminas dependem do tipo celular envolvido e do seu estado de ativação. (Madden, 2003) No geral, a maioria dos trabalhos indica que as catecolaminas promovem uma diminuição na produção de citocinas Th1 e aumento na citocinas Th2, mas ainda há importantes exceções. As catecolaminas influenciam as células B causando aumento na produção de IgG1 e de IgE. A adrenalina inibe a formação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, sendo que este efeito parece ser mediado pelos receptores β (Barnett, Moore, Patrick, & Silliman, 1997). O efeito das catecolaminas sobre as células NK é duplo, aumenta o número e a mobilização das células, mas parece inibir as suas atividades. (Elenkov et al., 2000) Em relação à fagocitose, o efeito do tratamento in vitro de macrófagos com catecolaminas, depende do estado de ativação dos macrófagos, podendo ser estimulatório ou inibitório. (Baccan et al., 2010)

Além desses dois eixos principais, HPA e SNS, existem outras alças de comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico. (Sternberg et al., 1992; Stratakis & Chrousos, 1995) O eixo HPG (hipotálamo-pituitária-gônadas) influencia várias respostas imunológicas por intermédio de seus mediadores: testosterona, estrogênio, progesterona e prolactina. (Tanriverdi, Silveira, MacColl, & Bouloux, 2003) Os leucócitos possuem receptores para testosterona e estrogênio (Benten et al., 1999; Tanriverdi et al., 2003; Viselli, Olsen, Shults, Steizer, & Kovacs, 1995), e esses hormônios aparentemente participam da maturação de linfócitos T e B. (Tanriverdi et al., 2003) A testosterona parece aumentar o número de Linfócitos T supressores e diminuir o número de células B. (Olsen, Watson, Henderson, & Kovacs, 1991; Smithson, Couse, Lubahn, Korach, & Kincade, 1998; Wilson, Mrose, & Thomas, 1995) O estradiol estimula a secreção de TNF- α , IL-1, IL-10, IFN- γ , diminui a secreção de IL-2, não altera a síntese de IL-4 e suprime a função das células dendríticas. (Beagley & Gockel, 2003; Chao, Van Alten, Greager, & Walter, 1995; Fox, Bond, & Parslow, 1991; Kovacs, Messingham, & Gregory, 2002; McMurray, Ndebele, Hardy, & Jenkins, 2001) O principal efeito da progesterona é promover a proliferação dos clones Th2, mas também inibe a produção de TNF- α e de NO. (Miller

& Hunt, 1996) Os hormônios sexuais podem afetar inúmeras outras funções imunológicas, principalmente durante a gravidez. (Walker, 1998; Whitacre, 2001)

O Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) também participa da regulação do Sistema Imune, por meio de ações de respostas locais rápidas, denominadas “reflexo anti-inflamatório”. (Tracey, 2002) Neurônios colinérgicos inibem a inflamação aguda, de modo semelhante ao qual controlam outras funções vitais de nosso organismo, como a frequência cardíaca, motilidade gástrica e dilatação da pupila. Estudos com agonistas e antagonistas muscarínicos e nicotínicos e de estimulação do nervo vago revelaram que esse “reflexo anti-inflamatório” leva, principalmente, à uma diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1- β e TNF. (Bernik et al., 2002; Borovikova et al., 2000;)

Alterações hormonais durante infecções

Durante infecções, ocorrem alterações neuroendócrinas, as quais podem estar relacionadas com as respostas de defesa do hospedeiro. São descritas para inúmeras infecções entre elas tuberculose, filariose, malária, HIV e Doença de Chagas. (Del Rey et al., 2007; Libonati, Mendonça, Maués, Quaresma, & Souza, 2006; Mavoungou et al., 2005; Roggero, Pérez, Bottasso, Besedovsky, & Del Rey, 2009; Zapanti, Terzidis, & Chrousos, 2008) Pacientes com tuberculose apresentam uma profunda redução de testosterona e DHEA e aumento de GH, cortisol, estradiol, prolactina, e hormônio tireoideano. (Del Rey et al., 2007) Na filariose crônica, também ocorre alteração dos níveis hormonais, com diminuição de testosterona, cortisol, estradiol e LH e aumento de prolactina, que se correlaciona com o aumento de citocinas pró-inflamatórias. (Mavoungou et al., 2005) Um aumento nos níveis de cortisol e DHEA é observado em pacientes com malária. (Libonati et al., 2006)

Uma das possíveis causas dessas alterações hormonais seria a ação de citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α , diretamente no SNC, resultando na ativação ou inibição de alguns eixos neuroendócrinos, como o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) e HPG (hipotálamo-pituitária-gônadas) e do SNS e SNP. Isto seria possível, visto que a comunicação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imunológico

é bilateral. (Webster et al., 2002b) A resposta do SN à infecção, seria mais uma forma que este sistema teria de manter a homeostasia corporal, visando principalmente a contenção de uma resposta inflamatória exacerbada, que seria prejudicial ao organismo.

Hormônios produzidos pelo tecido adiposo e seu papel nas infecções

Alguns autores têm discutido sobre a importância do tecido adiposo e das adipocinas na regulação da resposta imune em processos inflamatórios e em infecções. Adipocinas são proteínas e peptídeos produzidos principalmente pelos adipócitos e que têm como função principal a regulação da homeostase energética, participando de processos que afetam o apetite, o gasto de energia e a sensibilidade dos tecidos à insulina. (Fantuzzi, 2005) Várias adipocinas também participam de processos não metabólicos podendo modular a resposta imunológica de diversas formas. A primeira adipocina descoberta foi a leptina (1995). Esta proteína tem como principal função controlar o apetite e seus níveis correlacionam-se com a massa de tecido adiposo corporal. Vários efeitos imunológicos têm sido descritos para leptina: regulação da proliferação e diferenciação de linfócitos T (alteração para padrão Th1), regulação da ativação, capacidade fagocítica e produção de citocinas por monócitos. (Faggioni, Feingold, & Grunfeld, 2001; Fantuzzi, 2005) A adiponectina tem como principal papel metabólico aumentar a sensibilidade dos tecidos à insulina. Seus efeitos imunológicos são principalmente anti-inflamatórios, inibindo a produção de TNF- α e de IL-6 e estimulando a liberação de IL-10. (Masaki et al., 2004; Wolf, Wolf, Rumpold, Enrich, & Tilg, 2004)

Os níveis de algumas adipocinas estão alterados durante infecções. Baker e colaboradores (2011) observaram que pacientes com infecção persistente por HPV apresentam níveis elevados de resistina e nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de adiponectina e leptina. Pacientes com tuberculose apresentam redução de leptina (Buyukoglan, et al., 2007; Van Crevel et al., 2002) e de grelina, em pacientes mal nutridos. (Kim et al., 2010) Durante a malária placentar, também é observada uma redução de leptina nas pacientes e no cordão umbilical, que se correlaciona com o peso dos bebês quando nascem. (Kabyenela,

Fried, Kurtis, Mutabingwa, & Duffy, 2008a; Kabyenela et al., 2008b) Na doença de Chagas, os níveis de leptina também estão diminuídos (Fernandes et al., 2007) e camundongos CD-1 infectados com *T. cruzi* apresentam redução de adiponectina. (Combs et al., 2005) Acredita-se que na Doença de Chagas, os adipócitos e o tecido adiposo sirvam como um importante reservatório de parasitas, que podem causar a enfermidade décadas após a infecção. (Nagajyothi et al., 2012a; Nagajyothi et al., 2012b) A infecção do tecido adiposo pelo *T. cruzi* levaria a um profundo impacto no metabolismo sistêmico e aumento do risco de síndrome metabólica. (Nagajyothi et al., 2009)

Leishmanioses

Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas, causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidos por meio da picada de insetos vetores. Existem diferentes apresentações clínicas, que variam desde formas que acometem a pele e mucosas até formas mais severas, onde há o parasitismo dos órgãos. As principais formas clínicas são: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV).

Anualmente são reportados por volta de 600 mil novos casos de leishmanioses, mas a Organização Mundial de Saúde estima que o número real seja de 1,3 milhões de casos. (Alvar et al., 2012; World Health O, 2013) Dentre esses, 300 mil são casos de LV e 1 milhão são casos de LC. Esses números vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos o que se deve possivelmente a uma maior mobilidade populacional, com exposição de pessoas não imunes ao parasita. (Aagaard-Hansen, Nombela, & Alvar, 2010)

Os indivíduos infectados estão distribuídos em 98 países nos 5 continentes. Em relação à LV, 90% dos casos ocorrem em sete países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Nepal e Brasil. Entre as formas cutâneas, os casos de LC são encontrados no Afeganistão, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria, Tunísia e Brasil e os casos de LMC, ocorrem principalmente no Peru, Bolívia e Brasil.

Como visto acima, no Brasil são encontradas as principais formas clínicas de leishmanioses. O maior número de casos de leishmaniose são de LC, com aproximadamente 18 mil casos reportados em 2013. A maioria dos casos de LC estão na região Norte (8407). Nesse mesmo ano, foram reportados ao Ministério da Saúde 3253 novos casos de LV, sendo que quase a metade deles são provenientes da região nordeste. (Ministério da Saúde, 2015)

A principal forma de transmissão do parasita, para o homem e outros hospedeiros mamíferos, é por meio da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A infecção do vetor se dá quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos contendo as formas amastigotas de *Leishmania sp.* No trato digestivo anterior, acontece o rompimento dos macrófagos com a liberação dos parasitas, multiplicação e diferenciação em formas promastigotas. Essas formas colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas. O ciclo no inseto se completa em torno de 72 horas. Após esse período, as fêmeas infectadas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, injetam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, essas formas são ingeridas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o seu rompimento, ocorrendo a liberação dessas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo. (Handman, 1999)

Mais de vinte diferentes espécies estão envolvidas na patogênese das leishmanioses. As formas cutâneas da leishmaniose são causadas principalmente, no novo mundo, pelas espécies *L. braziliensis*, *L. amazonenses*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* e no velho mundo, pela *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major*. As principais espécies que causam LV são *L. chagasi*, no novo mundo, e *L. donovani* e *L. infantum*, no velho mundo (Almeida et al., 2011; Handler, Patel, Kapila, Al-Qubati, & Schwartz, 2015). Estudos moleculares sugerem que *L. chagasi* e *L. infantum* sejam a mesma espécie. (Almeida et al., 2011; Mauricio, Howard, Stothard, & Miles, 1999)

A infecção por *Leishmania sp* não é o único fator que determina o desenvolvimento da doença. Estudos em áreas endêmicas revelaram que muitos indivíduos apresentam anticorpos contra *Leishmania sp*, sem nunca terem tido sintomas relacionados à enfermidade (casos assintomáticos).

As formas mais frequentes de leishmaniose são as formas tegumentares ou cutâneas. A LC caracteriza-se pela presença de úlceras únicas ou múltiplas, geralmente em locais mais expostos, como membros inferiores, superiores e face. As úlceras podem curar-se espontaneamente e ocorrer a formação de cicatrizes. Na LMC as lesões ocorrem em mucosas na boca ou nariz e tecidos adjacentes podendo levar a destruição do septo nasal e comprometimento da aparência.

A LV é a forma clínica mais grave de leishmaniose podendo levar a óbito em casos onde não há tratamento farmacológico. Clinicamente, é caracterizada por febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e perda de peso. (Hohenschild & Feldmeier, 1995) Má nutrição e perda de peso são observadas nos pacientes com LV, principalmente em crianças. (Caldas et al., 2006; Cerf et al., 1987; Dye & Williams, 1993; Zijlstra et al., 1992; Verde, Verde, Neto, Almeida, & Verde, 2011) No Brasil, a LV é causada pela *L. chagasi/L. infantum* e transmitida principalmente pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. Os parasitas são transmitidos pela picada do inseto vetor infectado. No hospedeiro vertebrado, os parasitos infectam principalmente células da linhagem macrofágica e alteram a produção de eritrócitos, plaquetas e linfócitos, conseqüentemente gerando anemia, trombocitopenia e diminuição das contagens de células T. (Stäger, Joshi, & Bankoti, 2010; Tripathi, Singh, & Naik, 2007) Durante a infecção, os parasitas podem ser encontrados no fígado, baço, linfonodos, intestino e medula óssea. Após a resolução da doença, o baço e a medula óssea permanecem cronicamente infectados. (Smelt, Engwerda, McCrossen, & Kaye, 1997) Após o tratamento da LV, pode ocorrer recidiva ou reativação tardia (recrudescência) de infecção subclínica ou previamente tratada. A reativação pode ser espontânea, mas é frequentemente provocada por uma baixa da imunidade celular devido ao uso de corticosteroide, terapia citotóxica ou em quadros de AIDS avançada. (Silva et al., 2013)

Resposta imunológica durante as leishmanioses

A proteção dos indivíduos infectados com *Leishmania sp*, está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente na destruição dos parasitas. A citocina IFN- γ desempenha um papel chave durante a infecção pois ativa os macrófagos, estimulando seus mecanismos microbicidas. (Kima & Soong, 2013) A produção de espécies reativas de oxigênio e / ou de óxido nítrico é responsável pela morte das leishmanias. (Giudice et al., 2007; Melby, Chandrasekar, Zhao, & Coe, 2001; Novais et al., 2014)

De maneira geral, a saliva do inseto vetor é muito importante no processo inflamatório, visto que a mesma apresenta componentes associados à vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e coagulação sanguínea, o que aumenta o fluxo sanguíneo e possibilita a alimentação do inseto. A saliva dos vetores desempenha um papel importante no estabelecimento da infecção, como vem sendo demonstrado por diversos estudos. (Gomes et al., 2008; Mondragon-Shem et al., 2015 ; Prates et al., 2012)

Diferentes células participam da resposta imune durante a leishmaniose. (Carvalho, Passos, Schriefer, & Carvalho, 2012; Kumar & Nylén, 2012) As células dendríticas atuam apresentando os antígenos para às células T, as quais participam da ativação dos macrófagos, produzindo IFN- γ . As células NK também contribuem liberando essa citocina. Além do IFN- γ , a IL-12 também tem um papel determinante na infecção por *Leishmania sp*. Esta citocina é produzida primariamente por células apresentadoras de antígenos e sua principal atividade biológica é sobre células T e NK, nas quais estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- γ . Também desempenha função importante na diferenciação e expansão de células T CD4+ do tipo Th1 que conferem resistência à infecção. Segundo Scharon (1993), as células NK ativadas por IL-12 são a fonte inicial de IFN- γ na infecção por *L. major* em camundongos resistentes, e a produção elevada de IL-12 parece ser o mecanismo que confere a resistência a esses animais. Os neutrófilos também desempenham um papel importante durante a infecção, cooperando com os macrófagos na indução de resposta imune protetora. (Novais et al., 2009)

A resposta imune mediada pelas células T, é crucial para a cura ou o agravamento da leishmaniose cutânea (LC) (DA-Cruz et al., 2002). A resposta do tipo Th1 está relacionada com o bom prognóstico da LC, uma vez que, aumenta a produção de IFN- γ e TNF- α , que levam a ativação dos macrófagos. No entanto, a exarcebação da resposta tipo Th1, leva ao desenvolvimento de formas clínicas de LC mais graves. (Bacellar et al., 2002; Oliveira et al., 2011)

Existem algumas diferenças nas respostas imunológicas observadas durante as formas cutâneas e a forma visceral, sendo que esta última ainda é pouco compreendida pelos pesquisadores. Estudos demonstraram que a principal alteração imunológica na LV é a incapacidade dos linfócitos de ativarem os macrófagos para destruir as *leishmanias*, o que permite a disseminação parasitária e estabelecimento da doença propriamente dita. (Goto & Lindoso, 2004)

Durante a forma ativa da LV, as citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-12 estão diminuídas e as citocinas IL-4 e IL-10 estão elevadas, levando à uma inibição da resposta imunológica mediada por células. (Caldas et al., 2005; Carvalho, Badaró, Reed, Jones, & Johnson Jr., 1985; Carvalho, Teixeira, & Johnson Jr, 1981) O controle da infecção é mediado por uma resposta imune do tipo celular e a citocina IL-12 é crucial para o controle e resolução da doença. (Engwerda, Murphy, Cotterell, Smelt, & Kaye, 1998)

Pacientes com LV apresentam níveis séricos altos de TNF- α e de IL-6, que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e o TNF- α , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso acentuada nesses pacientes. (Karplus et al., 2002) Embora vários fatores contribuam para uma ausência da resposta imune celular na LV, existem evidências de ativação de células Th2 e regulatórias do sistema imune que indicam a importância do papel das citocinas com atividade imunomoduladora na patogenia da LV.

Regulação neuroendócrina durante as leishmanioses

Nas leishmanioses também ocorrem alterações hormonais. (Baccan et al., 2011; Galindo-Sevilla et al., 2007; Teixeira, 2015; Verde

et al., 2011) Galindo-Sevilla et al. (2007) mostraram que pacientes com leishmaniose difusa, causada por *L. mexicana*, apresentavam redução nos níveis plasmáticos de cortisol e DHEA quando comparados com pacientes com LC localizada ou indivíduos não infectados. Em um estudo conduzido por nosso grupo, observamos que pacientes com LC localizada apresentavam redução nas concentrações plasmáticas de DHEA/S, prolactina e testosterona. (Baccan et al., 2011) Não observamos alterações nos níveis de cortisol e estradiol, mas a concentração desses hormônios estava associada com marcadores clínicos e imunológicos. Cortisol e estradiol correlacionaram-se positivamente com o tamanho da lesão e com a dose de Glucantime utilizada no tratamento e cortisol, com níveis de IFN- γ . Esses resultados indicam que, durante a LC localizada, as alterações hormonais parecem ser benéficas ao hospedeiro. Em modelo experimental de LC, onde camundongos BALB/c foram inoculados com *L. braziliensis*, demonstramos que mesmo em períodos iniciais da infecção, não é observada ativação do eixo HPA. (Cerqueira, 2009; Sousa, 2010) Os animais infectados exibem uma profunda redução nas concentrações plasmáticas de testosterona, que prevalece durante todo o período até a cura da lesão. Uma pequena diminuição nos níveis de estradiol é observada após 6 semanas de infecção, período este correspondente ao pico da lesão.

Mudanças hormonais durante a LV foram descritas pela primeira vez por Verde e colaboradores (2011). Entretanto, nesse estudo não foram avaliadas associações com alterações imunológicas. Em relação ao cortisol, eles encontraram que os pacientes apresentavam níveis mais elevados que os controles. Recentemente, em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa, confirmamos o dado de Verde e colaboradores (2011) e demonstramos que pacientes com LV (crianças) apresentam níveis mais elevados de ACTH e cortisol, indicando uma evidente ativação do eixo HPA. (Teixeira, 2015) Nesse estudo, evidenciamos que essas alterações endócrinas poderiam estar associadas à marcadores terapêuticos de gravidade da enfermidade, visto que os níveis de cortisol estavam associados com um tempo maior de doença e com menor contagem de plaquetas. Um provável mecanismo para a ativação do eixo HPA, observada nos pacientes com LV, seria a ação das citocinas diretamente no SNC, pois as concentrações plasmáticas de IL-6 correlacionavam-se positivamente com os níveis de cortisol e as de IL-1 β e de

TNF, com os de ACTH. (Teixeira, 2015) Ativação do eixo HPA também foi observada em hamsters infectados com *L. infantum*. (Marinho, 2015)

De acordo com esses estudos, as alterações endócrinas variam dependendo da forma clínica de leishmaniose. Uma explicação para isso poderia estar relacionada com a marcante diferença nas concentrações plasmáticas de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF, na LC e na LV. Nesta última, são observados níveis elevados dessas citocinas, que poderiam levar à ativação do eixo HPA, atuando diretamente no SNC.

Dayakar et al. (2011) publicaram uma hipótese de que os níveis de leptina poderiam estar diminuídos em pacientes com LV, devido à redução de peso corporal. O autor também propõe que esta diminuição contribuiria para o aumento das respostas Th2 observadas em LV. Em estudo realizado por nosso grupo, não detectamos alterações de adipocinas em pacientes com LV, sendo que, tanto pacientes como indivíduos saudáveis apresentavam concentrações plasmáticas semelhantes de leptina e adiponectina. (Teixeira, 2015) De modo semelhante ao observado com os hormônios do eixo HPA, embora os níveis plasmáticos das adipocinas não estejam alterados, eles correlacionam-se com marcadores clínicos da enfermidade, particularmente os hematológicos.

4. Diferenças entre sexos, regulação hormonal e leishmanioses

De modo semelhante a outras infecções, nas leishmanioses também são observadas importantes diferenças entre os sexos, em relação ao número de indivíduos infectados e na manifestação clínica da doença.

Estudos em animais de experimentação fornecem dados mais concretos na comparação entre os diferentes sexos, pois os animais são analisados nas mesmas condições de infecção, como inóculo, via e fase da infecção. Assim, alguns dados foram obtidos com os modelos experimentais das diferentes formas clínicas de leishmaniose.

Em relação à LC, camundongos DBA/2 fêmeas infectadas com *L. mexicana*, não exibem ou exibem apenas pequenas lesões, em contraste do que acontece com os machos. (Alexander, 1988) Esta diferença se deve principalmente ao fato de que elas desenvolvem predominantemente

uma resposta Th1, com produção de IFN- γ em diferentes fases da infecção, ao passo que em apenas alguns machos são observados transcritos desta citocina. (Satoskar & Alexander, 1995; Satoskar, Al-Quassi, & Alexander, 1998) O tratamento in vitro, de macrófagos de camundongos DBA/2, com concentrações fisiológicas de 17- β estradiol, induz a um aumento da morte dos parasitas (*L. mexicana*), provavelmente pela elevação da produção de NO e não pela produção de citocinas pró-inflamatórias. (Lezama-Dávila, Isaac-Márquez, Barbi, Oghumu, & Satoskar, 2007) Interessantemente, quando camundongo DBA/2 são infectados com *L. major*, ambos os sexos desenvolvem lesão, mas apenas nos machos, essas lesões são curadas. (Alexander, 1988) Em outro modelo experimental de LC, onde hamsters são infectados com *L. panamensis* ou *L. guyanensis*, nos machos as lesões são maiores e mais severas, a disseminação de parasitas para outros sítios além do de infecção é mais frequente e a carga parasitária no linfonodo drenante mais elevada. (Travi et al., 2002) Também há maior expressão de IL-4, IL-10 e TGF- β nas lesões dos machos, quando comparados com fêmeas. O tratamento das fêmeas com testosterona antes da infecção leva ao desenvolvimento de lesões maiores que as fêmeas não tratadas. Em relação à *L. brazilienses*, que é a principal espécie envolvida nos casos de LC no Brasil, também são observadas diferenças entre sexos no modelo experimental com camundongos BALB/c, porém, são as fêmeas que apresentam lesões maiores. (Cerqueira, 2009; Sousa, 2010) O tratamento in vitro com testosterona ou estradiol, não altera a porcentagem de macrófagos infectados, nem a quantidade de parasita por fagócito. (Sousa, 2010)

Não obstante os diversos trabalhos que evidenciam a dicotomia sexual em modelos experimentais de LC, apenas dois trazem informações sobre *LV. Anuradha* e col. (1990), mostrou que hamsters machos infectados com *L. donovani*, apresentam maior carga parasitária que as fêmeas. O tratamento das fêmeas com testosterona, aumenta a carga parasitária e o dos machos com estradiol, confere resistência à infecção. De modo semelhante, hamsters infectados com *L. infantum*, também apresentam maior carga parasitária que as fêmeas. (Marinho, 2015) Entretanto, as alterações bioquímicas causadas pela infecção são mais acentuadas nas fêmeas.

Conclusões

Atualmente existem inúmeras evidências do importante papel regulador que os hormônios exercem no sistema imunológico durante infecções, incluindo as leishmanioses. O laboratório de neuroendocrinologia tem contribuído significativamente para uma maior compreensão das alterações endócrinas que ocorrem nas diversas formas clínicas de leishmaniose, por meio de avaliações de pacientes e de estudos com animais de experimentação. Deste modo, propomos que a infecção desencadeia uma série de alterações endócrinas que são específicas para cada forma clínica e que se relacionam com parâmetros de gravidade da doença. Destacamos ainda a importante ativação do eixo HPA que ocorre nos pacientes com LV.

A compreensão dos mecanismos que desencadeiam essas respostas neuroendócrinas e dos efeitos delas, pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e do reconhecimento de novos marcadores clínicos de gravidade da enfermidade.

Referências

- Aagaard-Hansen, J., Nombela, N., & Alvar, J. (2010). Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. *Tropical medicine & international health*, 15(11), 1281-1288.
- Aarstad, H. J., Underback, G., & Seljelid, R. (1983). Stress causes reduced natural killer activity in mice. *Scandinavian journal of immunology*, 18(5), 461-464.
- Alexander, J. (1988). Sex differences and cross-immunity in dba/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology*, 96 (2), 297-302.
- Almawi, W. Y., & Melemedjian, O. K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *Journal of leukocyte biology*, 71(1), 9-15.
- Almeida, M. E., Steurer, F. J., Koru, O., Herwaldt, B. L., Pieniazek, N. J., & Silva, A. J. (2011). Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of the rRNA internal transcribed spacer 2. *Journal of clinical microbiology*, 49(9), 3143-3149.

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 7(5), e35671.
- Baccan, G. C., Oliveira, R. D., & Mantovani, B. (2004). Stress and immunological phagocytosis: possible nongenomic action of corticosterone. *Life sciences*, 75(11), 1357-1368.
- Baccan, G. C., Sesti-Costa, R., Chedraoui-Silva, S., & Mantovani, B. (2010). Effects of cold stress, corticosterone and catecholamines on phagocytosis in mice: differences between resting and activated macrophages. *Neuroimmunomodulation*, 17(6), 379-385.
- Baccan, G. C., Oliveira, F., Sousa, A. D., Cerqueira N. A., Costa, J. M., Barral-Netto, M., et al. (2011). Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. *Brain, behavior, and immunity*, 25(3), 548-554.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Jesus, A. R., Dutra, W.O., et al. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70(12), 6734-6740.
- Baker, R., Dauner, J. G., Rodriguez, A. C., Williams, M. C., Kemp, T. J., Hildesheim, A., et al. (2011). Increased plasma levels of adipokines and inflammatory markers in older women with persistent HPV infection. *Cytokine*, 53(3), 282-285.
- Barnett, C. C. Jr., Moore, E. E., Partrick, D. A., & Silliman, C. C. (1997). Beta-adrenergic stimulation down-regulates neutrophil priming for superoxide generation, but not elastase release. *Journal of Surgical Research*, 70(2), 166-170.
- Beagley, K. W., & Gockel, C. M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38(1), 13-22.
- Benten, W. P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C. E., et al. (1999). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB Journal*, 13(1), 123-133.
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., & Ewing, A. (1994). Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12912-12916.
- Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., et al. (2002). Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of experimental medicine*, 195(6), 781-788.

Borovikova, L. V., Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M., et al. (2000). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Autonomic neuroscience*, 85(1-3), 141-147.

Brasil. (2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Bahia* (5a ed.). Brasília, DF: Ministério da Saúde.

Buyukoglan H., Gulmez, I., Kelestimur, F., Kart, L., Oymak, F. S., Demir, R., et al. (2007). Leptin levels in various manifestations of pulmonary tuberculosis. *Mediators of inflammation*, 2007, 64859.

Caldas, A. J., Costa, J., Aquino, D., Silva, A. A., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2006). Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta tropica*, 97(3), 252-258.

Caldas, A., Favali, C., Aquino, D., Vinhas, V., van Weyenbergh, J., Brodskyn, C., et al. (2005). Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC infectious diseases*, 5, 113.

Carvalho, E. M., Badaró, R., Reed, S. G., Jones, T. C., & Johnson Jr, W. D. (1985). Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, 76(6), 2066-2069.

Carvalho, L. P., Passos, S., Schriefer, A., & Carvalho, E. M. (2012). Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 3, 301.

Carvalho, E. M., Teixeira, R. S., & Johnson Júnior, W. D. (1981). Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infection and immunity*, 33(2), 498-500.

Cazaux, C., Sterin-Borda, L., Gorelik, G., & Cremaschi, G. (1995). Relation between cell proliferation and beta adrenergic receptor expression in activated T lymphocytes. *Acta physiologica, farmacológica et therapeutica latino-americana*, 45(1), 43-48.

Cerf, B. J., Jones, T. C., Badaro, R., Sampaio, D., Teixeira, R., & Johnson Jr, W. D. (1987). Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 156(6), 1030-1033.

Cerqueira, N. A. (2009). *Neuroimunomodulação na leishmaniose tegumentar experimental murina – papel dos eixos HPA e HPG*. Trabalho de conclusão de curso

de graduação não-publicado, Universidade Católica de Salvador, Salvador, Brasil.

Chao, T. C., Van Alten, P. J., Greager, J. A., & Walter, R. J. (1995). Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cellular Immunology*, 160(1), 43-49.

Combs, T. P., Nagajyothi, Mukherjee, J., Almeida, C. J., Jelicks, L. A., Schubert, W., et al. (2005). The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of biological chemistry*, 280(25), 24085-24094.

Costa, C. H., Stewart, J. M., Gomes, R. B., Garcez, L. M., Ramos, P. K., Bozza, M., et al. (2002). Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 334-337.

Dayakar, A. (2011). Role of leptin in human visceral leishmaniasis? *Medical hypotheses*, 77(3), 416-418.

Del Rey, A., Mahuad, C. V., Bozza, V. V., Bogue, C., Farroni, M. A., Bay, M. L., et al. (2007). Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(2), 171-179.

Dhabhar, F. S., & Mcewen, B. S. (1996). Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*, 156(7), 2608-2615.

Dye, C., & Williams, B. G. (1993). Malnutrition, age and the risk of parasitic disease. visceral leishmaniasis revisited. *Proceedings of the royal society of London B: biological sciences*, 254(1339), 33-39.

Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., & Vizi E. S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*, 52(4), 595-638.

Engwerda, C. R., Murphy, M. L., Cotterell, S. E., Smelt, S. C., & Kaye, P. M. (1998). Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *European journal of immunology*, 28(2), 669-680.

Faggioni, R., Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB Journal*, 15(14), 2565-2571.

Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 115(5), 911-919.

- Fernandes, F., Dantas, S., Ianni, B. M., Ramires, F. J., Buck, P., Salemi, V. M., et al. (2007). Leptin levels in different forms of Chagas' disease. *Brazilian journal of medical and biological research*, 40 (12), 1631-1636.
- Fox, H. S., Bond, B. L., & Parslow, T. G. (1991). Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *The Journal of Immunology*, 146(12), 4362-4367.
- Galindo-Sevilla, N., Soto, N., Mancilla, J., Cerbulo, A., Zambrano, E., Chavira, R., et al. (2007). Low serum levels of dehydroepiandrosterone and cortisol in human diffuse cutaneous leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 566-572.
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225-260.
- Giudice, A., Camada, I., Leopoldo, P. T., Pereira, J. M., Riley, L. W., Wilson, M. E., et al. (2007). Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, 7, 1-12.
- Glaser, R., MacCallum, R. C., Laskowski, B. F., Malarkey, W. B., Sheridan, J. F., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2001). Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *The Journals of Gerontology*, 56(8), 477-482.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., et al. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22), 7845-7850.
- Goto, H., & Lindoso, J. A. (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 37(4), 615-623.
- Haddad, J. J., Saadé, N. E., & Safieh-Garabedian, B. (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology*, 133(1-2), 1-19.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 911-928.
- Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, 44, 1-39.

- Hohenschield, S., & Feldmeier, H. (1995). Imported kala azar in children and adults--comparison of medical history, clinical, and diagnostic findings. *Journal of Tropical Pediatrics*, 41(6), 378-379.
- Karplus, T. M., Jeronimo, S. M., Chang, H., Helms, B. K., Burns, T. L., & Murray, J. C. (2002). Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infection and Immunity*, 70(12), 6919-6925.
- Kasprowicz, D. J., Kohm, A. P., Berton, M. T., Chruscinski, A. J., Sharpe, A., & Sanders, V. M. (2000). Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *The Journal of Immunology*, 165(2), 680-690.
- Kavelaars, A. (2002). Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain, behavior, and immunity*, 16(6), 799-807.
- Keller, R. H., Blake, D. G., Lyman, S., & Siebenlist, R. (1981). Immunoregulatory abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. I. Correlations of immunoregulatory subpopulations with stage of disease. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology*, 6(3), 201-209.
- Kim, J. H., Lee, C. T., Yoon, H. I., Song, J., Shin, W. G., & Lee, J. H. (2010). Relation of ghrelin, leptin and inflammatory markers to nutritional status in active pulmonary tuberculosis. *Clinical Nutrition*, 29(4), 512-518.
- Kima, P. E., & Soong, L. (2013). Interferon gamma in leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 4, 156.
- Kohm, A. P., & Sanders, V. M. (2000). Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunology Today*, 21(11), 539-542.
- Kovacs, E. J., Messingham, K. A., & Gregory, M. S. (2002). Estrogen regulation of immune responses after injury. *Molecular Cellular Endocrinology*, 193(1-2), 129-135.
- Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3, 251.
- Lezama-Davila, C. M., Isaac-Márquez, A. P., Barbi, J., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2007). 17 β -estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from dba/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6), 1125-1127.
- Libonati, R. M., Mendonça, B. B., Maués, J. A., Quaresma, J. A., & Souza, J. M. (2006). Some aspects of the behavior of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: cortisol and dehydroepiandrosterone levels. *Acta tropica*, 98(3), 270-276.

- Madden, K. S. (2003). Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behavior, Immunity*, 17(1).
- Marinho, A. I. L. (2015). *Diferenças entre sexos na leishmaniose visceral experimental*. Dissertação de mestrado não-publicada, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.
- Marino, F., Cosentino, M., Bombelli, R., Ferrari, M., Lecchini, S., & Frigo, G. (1999). Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Experimental Hematology*, 27(3), 489-495.
- Masaki, T., Chiba, S., Tatsukawa, H., Yasuda, T., Noguchi, H., Seike, M., et al. (2004). Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, 40(1), 177-184.
- Marshall Junior, G. D., Agarwal, S. K., Lloyd, C., Cohen L., Henninger, E. M., & Morris, G. J. (1998). Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain, behavior, immunity*, 12(4), 297-307.
- Mauricio, I. L., Howard, M. K., Stothard, J. R., & Miles, M. A. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 119(3), 237-46.
- Mavoungou, D., Poaty-Mavoungu, V., Ongali, B., Akoume, M. Y., Maka, G., & Mavoungu, E. (2005). Hypothalamic-pituitary gonadal axis and immune response imbalance during chronic filarial infections. *Tropical Medicine & International Health*, 10(11), 1180-1186.
- McMurray, R. W., Ndebele, K., Hardy, K. J., & Jenkins, J. K. (2001). 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine*, 14(6), 324-333.
- Miller, L. & Hunt, J. S. (1996). Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences*, 59(1), 1-14.
- Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W., & Coe, J. E. (2001). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *The Journal of Immunology*, 166(3), 1912-1920.
- Mondragon-Shem, K., Al-Salem, W. S., Kelly-Hope, L., Abdeladhim, M., Al-Zahrani, M. H., Valenzuela, J. G., et al. (2015). Severity of old world cutaneous leishmaniasis is influenced by previous exposure to sandfly bites in Saudi Arabia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), e0003449.
- Musso, N. R., Brenci, S., Indiveri, & F., Lotti, G. (1997). L-tyrosine and nicotine induce synthesis of L-Dopa and norepinephrine in human lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 74(1-2), 117-120.

- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Weiss, L. M., Chua, S., Albanese, C., Machado, F. S., et al. (2009). Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Suppl 1, 219-225.
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Machado, F. S., Upadhya, R., Zhao, D., Schwartz, G. J., et al. (2012a). Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *The Journal of Infectious Diseases*, 205(5), 830-840.
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Weiss, L. M., Chua, S., Albanese, C., Machado, F. S., et al. (2009b). Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Suppl 1, 219-225.
- Novais, F. O., Santiago, R. C., Báfica, A., Khouri, R., Afonso, L., Borges, V. M., et al. (2009). Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *The Journal of Immunology*, 183(12), 8088-8098.
- Novais, F. O., Nguyen, B. T., Beiting, D. P., Carvalho, L. P., Glennie, N. D., Passos, S., et al. (2014). Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *Journal of Infectious Diseases*, 209(8), 1288-1296.
- Oliveira, F., Báfica, A., Rosato, A. B., Favali, C. B., Costa, J. M., Cafe, V., et al. (2011). Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 70-73.
- Olsen, N. J., Watson, M. B., Henderson, G. S., & Kovacs, W. J. (1991). Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice. *Endocrinology*, 129(5), 2471-2476.
- Prates, D. B., Araújo-Santos, T., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., Barral, A., & Borges, V. M. (2012). New insights on the inflammatory role of *Lutzomyia Longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 643029.
- Radojic, T., Baird, S., Darko, D., Smith, D., & Bulloch, K. (1991). changes in beta-adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: an analysis of T cells and macrophages. *Journal of Neuroscience Research*. 30(2), 328-335.
- Ramer-Quinn, D. S., Baker, R. A., & Sanders, V. M. (1997). Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *Journal of Immunology*. 159(10), 4857-4867.

- Roggero, E., Pérez, A. R., Bottasso, O. A., Besedovsky, H. O., & Del Rey, A. (2009). Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 264-271.
- Saklatvala, J. (2002). Glucocorticoids: do we know how they work?. *Arthritis Research*, 4(3), 146-150.
- Sanders, V. M., Baker, R. A., Ramer-Quinn, D. S., Kasprowicz, D. J., Fuchs, B. A., & Street, N. E. (1997). Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *The Journal of Immunology*, 158(9), 4200-4210.
- Satoskar, A., & Alexander, J. (1995). Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology*, 84(1), 1-4.
- Satoskar, A., Al-Quassi, H. H., & Alexander, J. (1998). Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN-gamma; production by female but not male DBA/2 mice. *Immunology and Cell Biology*, 76(2), 159-166.
- Scharton, T. M. & Scott, P. (1993). Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(2), 567-577.
- Silva, E. D., Andrade, L. D., Araujo, P. S. R., Silveira, V. M., Padilha, C. E., Silva, M. A. L., et al. (2013). Case study of a patient with HIV-Aids and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(6), 425-428.
- Smelt, S. C., Engwerda, C. R., McCrossen, M., & Kaye, P. M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 158(8), 3813-3821.
- Smithson, G., Couse, J. F., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Kincade, P. W. (1998). The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis. *The Journal of Immunology*, 161(1), 27-34.
- Sousa, A. D. (2010). *Regulação endócrina e perfil de citocinas em pacientes com leishmaniose cutânea localizada*. Trabalho de conclusão de curso de graduação não-publicado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.
- Stäger, S., Joshi, T., & Bankoti, R. (2010). Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. *Immunologic Research*, 47 (1-3), 14-24.

- Sternberg, E. M., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., & Gold, P. W. (1992). The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Annals of Internal Medicine*, 117(10), 854-866.
- Stratakis, C. A., & Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771, 1-18.
- Swanson, M.A., Lee, W.T., & Sanders, V.M. (2001). IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *The Journal of Immunology*, 166(1), 232-240.
- Tanriverdi, F., Silveira, L. F., MacColl, G. S., & Bouloux, P. M. (2003). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *The Journal of Endocrinology*, 176(3), 293-304.
- Teixeira, D. C. (2015). *Regulação endócrina, adipocinas e perfil de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral*. Dissertação de mestrado não-publicada, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420(6917), 853-859.
- Travi, B. L., Osorio, Y., Melby, P. C., Chandrasekar, B., Arteaga, L., & Saravia, N. G. (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infection and Immunity*, 70(5), 2288-2296.
- Tripathi, P., Singh, V., & Naik, S. (2007). Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(2), 229-242.
- Van Crevel, R., Karyadi, E., Netea, M. G., Verhoef, H., Nelwan, R. H., West, C. E., et al. (2002). Decreased plasma leptin concentrations in tuberculosis patients are associated with wasting and inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), 758-763.
- Verde, F. A., Verde, F. A., Neto, A. S., Almeida, P. C., & Verde, E. M. (2011). Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5), 668-673.
- Viselli S. M., Olsen N. J., Shults, K., Steizer, G., & Kovacs, W. J. (1995). Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 109(1), 19-26.
- Walker, J. J. (1998). Antioxidants and inflammatory cell response in preeclampsia. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 16(1), 47-55.
- Webster, J. C., Huber, R. M., Hanson, R. L., Collier, P. M., Haws, T. F., Mills, J. K., et al. (2002a). Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act

- together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology*, 143(10), 3866-3874.
- Webster, J. I., Tonelli, L., & Sternberg, E. M. (2002b). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 125-163.
- Whitacre, C. C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology*, 2(9), 777-780.
- Wilson, C. A., Mrose, S. A., & Thomas, D. W. (1995). Enhanced production of B lymphocytes after castration. *Blood*, 85(6), 1535-1539.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., & Tilg, H. (2004). Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), 630-635.
- World Health Organization (WHO). (2013). *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Zapanti, E., Terzidis, K., & Chrousos, G. (2008). Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in HIV infection and disease. *Hormones (Athens)*, 7(3), 205-216.
- Zijlstra, E. E., Ali, M. S., El-Hassan, A. M., El-Toum, I. A., Satti, M., & Ghalib, H. W. (1992). Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. *Journal of Tropical Pediatrics*, 38(1), 17-21.

Aspectos da interação neurônio-glia, sob a ótica da resposta inflamatória a um protozoário intracelular

Maria de Fátima Dias Costa, Alexandre Moraes Pinheiro, Érica Etelvina Viana de Jesus, Alex Barbosa dos Santos, Cátia Suse de Oliveira Ribeiro, Marcienne Tardy, Vivaldo Moura-Netto, Songeli Menezes Freire, Ramon dos Santos El-Bachá E Silvia Lima Costa

Introdução

O sistema nervoso central (SNC) dispõe de células altamente especializadas para a transmissão de sinais e manutenção da homeostasia tecidual. Dentre elas, destacam-se as células gliais, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, cujo protagonismo tem sido descortinado a passos largos pela neurociência. O conhecimento dos determinantes moleculares e celulares do funcionamento do SNC e sua reatividade frente a insultos, tem demonstrado que a glia exerce papéis individuais ou em íntima interação com neurônios, o que tem servido para bem embasar aspectos da fisiopatologia tecidual. São atribuídas às células gliais a secreção de mediadores pró-inflamatórios, de quimiocinas e proteases, além da geração de espécies reativas do oxigênio e intermediários do nitrogênio. (Kaur, Seunggu, Yang, & Crane, 2010)

Astrócitos correspondem a mais de 50% do total de células do SNC, e sua atividade espelha-se na demanda metabólica neuronal, seja no aspecto nutricional, detoxificativo, ou de controle da homeostasia e neurotransmissão. (Haydon & Carmignoto, 2006;) A resposta astrocitária às injúrias no SNC, sejam estas de origem mecânica, isquêmica ou infecciosa, é caracterizada por um processo definido como astrogliose, que corresponde à proliferação e à hipertrofia, com alargamento

do corpo celular e aumento da expressão de *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), componente de seu citoesqueleto, responsável pelas modificações fenotípicas. (Benveniste, 1993)

Por sua vez, a micróglia, que integra o sistema fagocítico mononuclear, corresponde a aproximadamente 20% do total das células da glia. Com acentuada capacidade de proliferar e de migrar ativamente para o local da injúria, incluindo aquelas de natureza infecciosa. As células micrógliais detêm competência imunológica no parênquima cerebral, diferenciando-se em macrófagos e células dendríticas, se estimuladas respectivamente com *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e com *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). (Fischer & Reichman, 2001; Vilhardt, 2005) Em resposta a uma variedade de lesões do sistema nervoso central, a micróglia torna-se reativa (microgliose) e pode aumentar o número de receptores específicos, incluindo o receptor de complemento tipo 3, denominado OX-42, que se tornou seu imune marcador celular preferencial. (Kim & De Vellis, 2005)

No SNC, a resposta imune inata frente à patógenos é iniciada por uma resposta antigênica não-específica e pela rápida produção de citocinas e quimiocinas, protagonizada pelas células gliais. (Aloisi, 2001) O reconhecimento de moléculas inespecíficas é feito através de receptores de reconhecimento de padrões ou de receptores *Toll-like* (TLR). Diferentes TLRs presentes na superfície das células gliais disparam uma cascata de reações intracelulares que comandam a transcrição de genes para a síntese de citocinas, como: *Tumor necrosis factor* (TNF), IL-1 β e IL-6, e a indução da enzima óxido nítrico sintase destroem o patógeno invasor. (Becker, 2006; Farina et al., 2005; Larsen, Holm, & Owens, 2007)

A micróglia participa ativamente da vigilância imunológica, expressando citocinas da resposta imune inata, como: IL-12, IL-18 e TNF, além de quimiocinas – Proteína de inflamação de macrófago 1 (MIP-1), Proteína quimiotática de monócito (MCP), e *Regulated upon Activation normal T-cell Expressed and Secreted* (Rantes) – que são necessárias para atrair macrófagos e células T. (Olson & Miller, 2004) Durante a resposta imune adquirida, essas células desempenham funções conforme as necessidades do microambiente, as quais incluem proliferação, migração, fagocitose, regulação da capacidade de apresentação de antígenos e regulação dos receptores de superfície da resposta imune inata. Células microgliais participam na resposta imune adaptativa como células

apresentadoras de antígenos e ativadoras de linfócitos T, apresentando em sua superfície moléculas *major histocompatibility complex* (MHC II) e moléculas co-estimuladoras que se ligam à superfície dos linfócitos T, resultando na indução de respostas do tipo Th1 ou Th2. (Becker, 2006) Os astrócitos também participam ativamente na imunidade adaptativa, pois além de expressarem MHC II, possuem moléculas de adesão intracelular (Icam) que permitem maior interação célula-célula com linfócitos T efetores. Atribui-se ainda à glia a regulação da resposta imune no SNC pelo aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, facilitando a circulação e atividade de linfócitos no sítio de infecção. (Gee & Keller, 2005)

As culturas primárias mistas de células gliais, em especial de astrócitos e micróglia, têm sido adotadas para o esclarecimento dos efeitos de agentes externos sobre estas duas subpopulações de células e o impacto de suas inter-relações em diversos fenômenos ou desordens do SNC. Alternativamente, o modelo de co-culturas de células gliais e neurônios originários de diferentes regiões cerebrais tem permitido elucidar a sensibilidade e as interações das diferentes populações de células do SNC, em diferentes condições patológicas. (Costa et al., 2002)

Evolução da linha de pesquisa: Interação neurônioglia na infecção por *Neospora caninum*

No Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) do Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA), modelos de estudo *in vitro* de células do SNC estão bem estabelecidos. Pinheiro et al. (2006a) caracterizaram aspectos da resposta imune de culturas primárias de astrócitos de ratos infectados com taquizoítos de *N. caninum*, parasita que costuma infectar inúmeras espécies animais, trazendo especial prejuízo para rebanhos bovinos, em razão de provocar abortos. (Dubey, 2003) Encistando-se no tecido cerebral de seus hospedeiros, o *N. caninum* parece estabelecer interações em prol de sua defesa, as quais facultam a cronicidade da infecção. (Innes et al., 2000)

No limiar desta linha de pesquisa que contribui para formação de mestres e doutores em Imunologia, o parasito *N. caninum* foi empregado

na infecção de astrócitos de ratos em cultura primária investigando-se as características da resposta inflamatória, sendo então confirmada por imunocito química, astrogliose e a presença do vacúolo parasitóforo nessas células. (Pinheiro et al., 2006a) A seguir, ainda em astrócitos, verificou-se que o perfil da resposta ao parasita evidenciava expressiva liberação de IL-10, IL-6 e ainda óxido nítrico, detectado a partir da dosagem de nitritos. (Pinheiro et al., 2006b) As observações foram em seguida estendidas às culturas mistas gliais contendo 85% de astrócitos (marcação GFAP+) e 12% de microgliócitos (OX-42+), onde verificou-se que a infecção por taquizoítos de *N. caninum* promoveu gliose acentuada e liberação significativa de IL-10, IL-6 e TNF. Nessas culturas mistas, foi demonstrado através do teste de Azul de Tripán que a infecção produziu lesão de membranas em 15 % das células após 24 h. (Pinheiro et al., 2010) Esses achados levaram à conclusão de que a resposta pró-inflamatória, mais acentuada nas primeiras 24 h, poderia ser responsável pela redução do número de parasitas nas etapas subsequentes da infecção *in vitro*. Também se cogitou que através de mecanismo autócrino a micróglia estaria contendo a inflamação em favor de uma possível proteção neuronal.

O tecido nervoso, quando submetido a uma agressão, responde através do estímulo à síntese e à atividade da isoforma da enzima óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS-2), responsável pelo incremento na liberação de óxido nítrico (NO). A resposta inflamatória assim acionada é, principalmente, da competência da micróglia. (Rock et al., 2004) Culturas primárias de astrócitos de ratos quando tratadas com TGF- β e IL-10 respondem com inibição de TNF, o que segundo Benveniste, Tang e Law (1995), contribui para manter a homeostasia do SNC. A secreção de IL-10 pelas células da micróglia pode também ser interpretada como um dos mecanismos envolvidos na homeostase no SNC durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, parasita este, genética e fisiologicamente assemelhado ao *N. caninum*. A IL-10 reduz o estresse oxidativo ao promover uma regulação negativa na produção de NO quando a micróglia é ativada por IFN- γ o que, conseqüentemente, favorece à restauração do equilíbrio neuronal. (Gazzinelli et al., 1996) Segundo Rozenfeld et al. (2005), a produção de NO em co-culturas ativadas com IFN- γ foi também inibida na presença de *T. gondii*, tendo favorecido a viabilidade neuronal em mecanismo dependente da secreção de TGF- β 1. Por

outro lado, a resposta inflamatória no tecido nervoso pode ser ainda intermediada pela prostaglandina E2 (PGE2). Esse prostanoide parece desempenhar ação anti-inflamatória, por reduzir a produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias. (Tzeng, Hsiao, & Mak, 2005) Minghetti, Polazzi, Nicolini, Créminon & Levi (1996) relataram que a síntese de PGE2 catalisada pela isoenzima ciclo oxigenase-2 (COX-2) é regulada por IFN- γ e NO. Já a adição de PGE2 a células microgлияis sob estímulo inflamatório acarreta inibição da iNOS.

Em nosso grupo, para testar a resposta glial em ambiente regulado por estímulo pró-inflamatório, desenhou-se experimentos em que culturas de astrócitos e micrógлия foram previamente tratadas com TNF e IFN- γ (50, 150 e 300 IU/ml) 24 h antes de serem infectadas com *N. caninum*, em modelo de inflamação preconizado por Yamane et al., (2000). Moduladas por essas citocinas, as células não apresentaram comprometimento da viabilidade, demonstrado pelos testes de exclusão de Azul de Tripán e de MTT, porém, o estímulo pró-inflamatório reduziu progressivamente a proliferação parasitária. Nas culturas não infectadas, o tratamento com TNF não afetou a liberação de óxido nítrico, enquanto o IFN- γ provocou aumento da liberação desse mediador, mensurado a partir da concentração de nitrito. Já nas culturas infectadas, o IFN- γ reduziu drasticamente os níveis de NO, sugerindo possível efeito inibitório da óxido nítrico sintase tipo 2 (iNOS). (Jesus et al., 2009)

A modulação pró-inflamatória foi também desenhada experimentalmente nessas culturas gliais mistas, a partir do bloqueio da ação das citocinas IL-10 e TGF- β . Nessas condições, avaliou-se viabilidade celular, controle da proliferação parasitária, assim como a liberação dos efetores NO e PGE2, sendo observado aumento da liberação basal de PGE2 quando da modulação pró-inflamatória tanto pelo efeito de IFN- γ , quanto do bloqueio de citocinas regulatórias, associado ao decréscimo da liberação de NO, sugerindo que o prostanoide deveria exercer papel retroregulador sobre síntese de NO. Nossos resultados também suscitaram a hipótese de uma possível sinergia entre IFN- γ e o *N. caninum*, desencadeando mecanismos que facilitariam a imune evasão do parasita. (Jesus et al., 2013) A resposta atenuada da glia frente ao parasita poderia ser favorável ao tecido nervoso, preservando particularmente os neurônios.

Para verificar essa provável proteção, desenvolveu-se, como mostrado a seguir, experimentos em modelo de co-cultura, cultivando-se neurônios obtidos de embriões de ratos sobre tapete glial. Após 72 horas de infecção, o número de parasitas foi reduzido em 54.1 e 44.3% nas culturas estimuladas com IFN- γ e LPS; a liberação de óxido nítrico, medida a partir da dosagem de nitrito, também foi inibida nas culturas infectadas e a redução da liberação de nitrito foi bem mais acentuada nas células moduladas por IFN- γ . A análise morfológica, além de confirmar astrogliose (GFAP+) e microgliose (OX-42+), evidenciou, através da marcação com β -III Tubulina, uma fragmentação de neuritos nas células submetidas ao estímulo pró-inflamatório ou à ação do parasita. Contudo, a morfologia neuronal foi preservada nas amostras que sofreram estímulo do IFN- γ seguido da infecção parasitária. (Jesus et al., 2014)

Relatos na literatura dão conta de que co-culturas de células gliais/neurônios quando infectadas com *T. gondii*, parasita este assemelhado ao *N. caninum*, também tiveram o crescimento de neuritos estimulados. (Rozenfeld et al., 2005) Os autores propuseram que isto poderia ser explicado por efeito indireto da PGE2 secretada mediante estímulo inflamatório, causando liberação e ação autócrina de IL-10.

A citocina IL-10 é reconhecida pelo perfil regulatório, enquanto a IL-6 pode eventualmente estar relacionada com efeitos protetores, por indução de fator de crescimento neuronal (FCN) em astrócitos (Otten et al., 2000), ou ainda, através da sua capacidade de ativar uma resposta rápida pró-inflamatória pela micróglia, acarretando eliminação imunomediada dos agentes infecciosos. Owens, Badcook, Millward e Toft-Hansen (2005), Wagoner e Benveniste (1999), Streit, Walter e Pennell (1999), e Otten et al. (2000) também atribuem ação pró-regenerativa à IL-6, enquanto Escartine e Bonvento (2008) atribuíram ao TGF- β a capacidade de estimular astrócitos a liberarem fatores neurotróficos e de cicatrização.

Por sua vez, Cacci, Ajmone-Cat, Anelli, Biagioni, e Minghetti (2008) verificaram que culturas de células microgliciais respondiam a estímulos inflamatórios crônicos, reduzindo a liberação de IL-1, IL-6 e TNF, enquanto aumentavam a liberação de IL-10 e PGE2. Esses autores também verificaram que o meio condicionado por estímulo microglial “agudo” acarretou redução da sobrevivência de células precursoras

neurais (PCN), enquanto o meio condicionado por micróglia, cronicamente estimuladas, favoreceu à neuritogênese.

Discorrendo sobre os papéis dos mensageiros inflamatórios PGE2 e óxido nítrico no tecido nervoso, Minghetti et al. (1997) formularam uma correlação de equilíbrio na qual a elevação das taxas do prostanoide sobre as taxas de NO favoreciam a proteção tecidual, enquanto a elevação de NO com decréscimo de PGE2 estaria associado à neurodegeneração.

Quanto ao IFN- γ , este desencadeia atividade antiparasitária por mecanismos que podem atuar concomitantemente. Ao mecanismo oxidativo, com ativação da NOS-2 e liberação de óxido nítrico, associa-se também o controle da proliferação de parasitas por meio da indução da enzima indolamina 2-3 dioxigenase (IDO). (Spekker et al., 2009) A atividade da IDO (E.C. 1.13.11.52) em células da imunidade inata foi inicialmente associada à defesa do hospedeiro contra patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci*, citomegalovírus (CMV), e à contenção do crescimento de células tumorais, sendo justificada por depletar triptofano e limitar a habilidade dos patógenos em sintetizar proteínas. (Uyttenhove et al., 2003) A IDO transforma o L-triptofano em N-formil cinurenina, cuja hidrólise libera cinurenina, catabólito utilizado para mensurar a atividade enzimática. (Rafice, Chauhan, Efimov, Basran, & Raven, 2009) O composto 1-metil-triptofano (1MT) inibe competitivamente a enzima IDO e consequentemente a formação das cinureninas. (Yuasa, Ball, Austin, & Hunt, 2010)

Neste sentido, nos propusemos a investigar a atividade da IDO em co-culturas neurônio-glia infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (1:1 célula: parasito) verificando que a infecção promoveu aumento de 40% na atividade enzimática enquanto sua inibição com 1-MT, acarretou proliferação parasitaria. (Jesus et al, 2019) (Figura 1A e 1B)

A ação anti-parasitária da IDO foi observada por Carvalho et al. (2010) em cultura de células uterinas humanas (HeLa) e trofoblasto (BeWo) infectadas por taquizoítos de *N. caninum* as quais, quando ativadas por IFN- γ e suplementadas com triptofano ou tratadas com metil-triptofano tinham o crescimento parasitário favorecido. Por outro lado, sabe-se que a atividade de IDO nas células é regulada por vários fatores bioquímicos, como a presença de óxido nítrico e a biossíntese de grupos heme. Citocinas como IL-6, IL-4, IL-13 e TGF- β são apontadas como

supressoras de IDO. (Orabona et al., 2005; Yuan, Collado-Hidalgo, Yufit, Taylor & Varga, 1998)

O catabolismo do triptofano, desencadeado pela ativação da IDO, é, portanto, um potente mecanismo antiparasitário (Murakami et al., 2012) e esta enzima, expressa em micróglia e astrócitos, e desempenha importante papel na homeostasia do tecido nervoso. (Guillemin et al., 2001) Após a ação da IDO, no primeiro passo do catabolismo do triptofano, a cinurenina pode ser oxidada para produção do ácido quinolinico (QUIN), um agonista dos receptores NMDA ou transaminada, produzindo ácido cinurênico (KINA), por sua vez, um antagonista desses receptores. (Guillemin et al., 1999) A infecção de co-cultivos neurônio-glia por *N. caninum* com consequente preservação neuronal, poderia ser interpretada pela ativação predominante da cinurenina transaminase (KAT) em astrócitos. Uma vez que os processos inflamatórios no SNC estimulam a síntese de fatores neurotróficos por células da glia (Takemoto et al., 2015) no modelo em estudo, células gliais foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* e com esse meio condicionado pela infecção cultivou-se neurônios obtidos de embriões de ratos. A análise do meio condicionado por RT-PCR mostrou um aumento na expressão gênica de IL-10 (2 vezes), BDNF (1,6 vezes) e NGF (1,7 vezes), quando comparado a cultivos controle, enquanto a imunomarcação com β -Tubulina evidenciou expressiva proliferação de neuritos. (Grangeiro et al., 2019)

Conclusões

O conjunto desses dados evidencia que quando o tecido nervoso é infectado pelo coccídio *N. caninum*, células gliais desempenham um papel imuno-modulador com liberação de IL-10 e PGE2 e inibição da enzima iNOS. São ainda atribuídas à modulação glial a liberação de fatores neurotróficos e a ativação da IDO, enzima que desencadeia catabolismo do triptófano e tem papel no controle da proliferação parasitária. A modulação glial, com resposta inflamatória atenuada, mantém a homeostasia tecidual, favorecendo neuroproteção, mas também o encistamento e sobrevivência do agente infeccioso.

Referências

- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), 165-179.
- Becker, K. (2006). Innate and adaptive immune responses in CNS disease. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 227-236.
- Benveniste, E. N. (1993). Astrocytes-microglia interactions. In S. Murphy (Ed.) *Astrocytes: pharmacology and functions* (pp. 355-382). Amsterdam: Academic Press.
- Benveniste, E. N., Tang, L. P., & Law, R. M. (1995). Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13(3-4), 341-349.
- Cacci, E., Ajmone-Cat, M.A., Anelli, T., Biagioni, S., & Minghetti, L. (2008). *In vitro* neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia*, 56(4), 412-425.
- Carvalho, J. V., Alves, C. M., Cardoso, M. R., Mota, C. M., Barbosa, B. F., Ferro, E. A., et al. (2010). Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 40(14), 1629-1637.
- Costa, S., Planchenault, T., Charriere-Bertrand, C., Mouchel, Y., Fages, C., Juliano, S., et al. (2002). Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. *Glia*, 37(2), 105-113.
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1-16.
- Escartin, C. & Bonvento, G. (2008). Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Molecular Neurobiology*, 38(3), 231-241.
- Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F., & Meini, E. (2005). Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1-2), 12-19.
- Fischer, H. G. & Reichmann, G. (2001). Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *The Journal of Immunology*, 166(4), 2717-2726.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., et al. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of Immunology*, 157(2), 798-805.

Gee, J. R. & Keller, J. N. (2005). Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(6), 1145-1150.

Grangeiro, M. S., Santos, C. C., Borges, J. M. P., Sousa, C. S., Freitas, S., Argolo, D. S., et al. (2019). Neuroprotection during *Neospora caninum* infection is related to the release of neurotrophic factors BDNF and NGF. *The Journal of Parasitology*, 105(2), 18-81.

Guillemin, G. J., Kerr, S. J., Smythe, G. A., Armati, P. J., & Brew, B. J. (1999). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 125-131.

Guillemin, G. J., Kerr, S. J., Smythe, G. A., Smith, D. G., Kapoor, V., Armati, P. J., et al. (2001). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *Journal of Neurochemistry*, 78(4), 842-853.

Haydon, P. G. & Carmignoto, G. (2006). Astrocytes control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological Reviews*, 86(3), 1009-1031.

Innes, E. A., Buxton, D., Maley, S., Wright, S., Marks, J., Esteban, I., et al. (2000). Neosporosis: aspects of epidemiology and host immune response. *Annals of the New York Academy of Science*, 916, 93-101.

Jesus, E. E. V., Pinheiro, A. M., Santos, A. B., Portela, R. W., Freire, S. M., Ribeiro, C. S. O., et al. (2009). Effects of IFN- and TNF- α on glial cells immune response to *N. caninum*. In A. Baron (Ed.). *Proceedings of 9th. European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Paris, France, Sep. 8-12, 2009.* (pp. 212-218). Paris: Medimond.

Jesus, E. E., Pinheiro, A. M., Santos, A. B., Freire, S. M., Tardy, M. B., El-Bachá, R. S., et al. (2013). Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. *Experimental Parasitology*, 133 (3), 269-274.

Jesus, E. E., Santos, A. B., Ribeiro, C. S. O., Pinheiro, A. M., Freire, S. M., El-Bachá, R. S., et al. (2014). Role of IFN- and LPS on neuron/glia co-cultures infected by *Neospora caninum*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 340.

Jesus, L. B., Santos, A. B., Jesus, E. E. V., Santos, R. G. D., Grangeiro, M. S., Silva, A. B., et al. (2019). IDO, COX and iNOS have an important role in the proliferation of *Neospora caninum* in neuron/glia co-cultures. *Veterinary Parasitology*, 266, 96-102.

Kaur, G., Seunggu, J. H., Yang, I., & Crane, C. (2010). Microglia and Central Nervous System Immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*, 21(1), 43-51.

Kim, S. U. & De Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302-313.

Larsen, P. H., Holm, T. H., & Owens, T. (2007). Toll-like receptors in brain development and homeostasis. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2007(402), 47.

Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A., Créminon, C. & Levi, G. (1996). Interferon- γ and nitric oxide down regulate lipopolysaccharide-induced prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 1963-1970.

Minghetti, L., Nicolini, A., Polazzi, E., Créminon, C., Maclouf, J., & Levi, G. (1997). Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia*, 19(2), 152-160.

Murakami, Y., Hoshi, M., Hara, A., Takemura, M., Arioka, Y., Yamamoto, Y., et al. (2012). Inhibition of increased indoleamine 2,3 dioxxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine*, 59, 245-251.

Orabona, C., Belladonna, M. L., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Volpi, C., et al. (2005). Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns CD28-Ig from immune adjuvant to suppressant. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6582-6586.

Olson, J. K., & Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3916-3924.

Otten, T., März, P., Heese, K., Hock, C., Kunz, D., & Rose-John, S. (2000). Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 322-330.

Owens, T., Babcock, A. A., Millward, J. M., & Toft-Hansen, H. (2005). Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Research Reviews*, 48 (2), 178-184.

Pinheiro, A. M., Costa, S. L., Freire, S. M., Almeida, M. A., Tardy, M., El Bachá, R., et al. (2006a). Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2), 243-247.

Pinheiro, A. M., Costa, S. L., Freire, S. M., Meyer, R., Almeida, M. A., Tardy, M., et al. (2006b). *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. *Experimental Parasitology*, 112(3), 193-197.

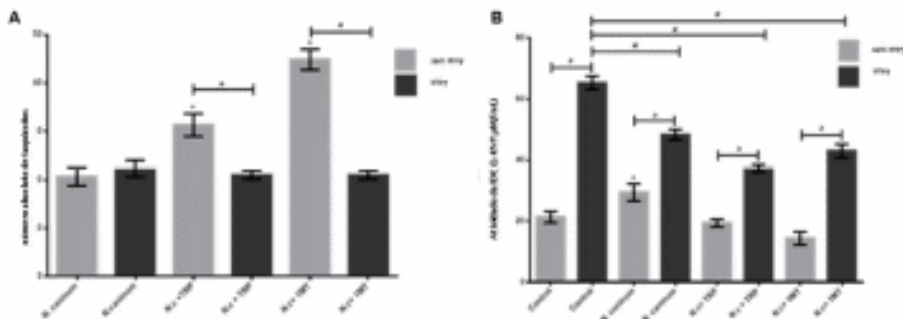
- Pinheiro, A. M., Costa, S. L., Freire, S. M., Ribeiro, C. S. O., Tardy, M., El-Bachá, R. S. et al. (2010). Neospora caninum: Early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. *Experimental Parasitology*, 124(4), 442-447.
- Rafice, S. A., Chauhan, N., Efimov, I., Basran, J., & Raven, E. L. (2009). Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 408-412.
- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R. et al. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 942-964.
- Rozenfeld, C., Martinez, R., Seabra, S., Sant'anna, C., Goncalves, J. G., Bozza, M. et al. (2005). *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. *The American Journal of Pathology*, 167(4), 1021-1031.
- Spekker, K., Czesla, M., Ince, V., Heseler, K., Schmidt, S. K., Schares, G. et al. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infection and Immunity*, 77 (10), 4496-4501.
- Streit, W. J., Walter, S. A., & Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57(6), 563-581.
- Takemoto, T., Ishihara, Y., Ishida, A., & Yamazaki, T. (2015). Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 199-205.
- Tzeng, S. F., Hsiao, H. Y., & Mak, O. T. (2005). Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4(3), 335-340.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., et al. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*, 9(10), 1269-1274.
- Vilhardt, F. (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37, (1), 17-21.
- Wagoner, N. J. V. & Benveniste, E. N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 100(1-2), 124-139.

Yamane, I., Kitani, H., Kokuho, T., Shibahara, T., Haritani, M., Hamaoka, T., et al. (2000). The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, 62 (3), 347-351.

Yuan, W., Collado-Hidalgo, A., Yufit, T., Taylor, M., & Varga, J. (1998). Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 177(1), 174-186.

Yuasa, H. J., Ball, H. J., Austin, C. J., & Hunt, N. H. (2010). 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 157(1), 10-5.

Figura 1- Atividade da Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) em co-cultura de ratos infectados ou não com taquizoítos *N. caninum*



Atividade da IDO foi medida em co-culturas obtidas de ratos recém-natos (24 h) e embriões (18 dias) com ou sem estímulo de IFN- γ (100UI/ml). Trp (1 mM) e 1 metil-Trp (1,5 mM) foram adicionados previamente à infecção com taquizoítos de *N. caninum* na proporção 1:1 (parasito: célula/72 horas). Análise realizada com Teste de Turkey (Anova).

A: contagem de taquizoítos, B: atividade da Indolamina 2,3 dioxigenase (*) = $p < 0,5$.

Flavonoides como potenciais agentes anti-tumorais e imunomoduladores para tratamento de tumores gliais malignos

Paulo Lucas Cerqueira Coelho, Alessandra Bispo da Silva, Balbino Lino dos Santos, Bruno Penas Seara Pitanga, Cleide dos Santos Souza, Maria de Fátima Dias Costa, Sílvia Lima Costa

Introdução

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor primário mais agressivo e mais frequente do sistema nervoso central (SNC), que compreende cerca de 50% dos gliomas cerebrais, e que é classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Grau IV. (Louis et al., 2016) São tumores que se desenvolvem nos hemisférios cerebrais com rápida proliferação e que são altamente invasivos, apresentando um mau prognóstico. A remoção cirúrgica do tumor constitui a primeira linha de terapia. Infelizmente, as células de glioblastoma são altamente móveis e também se infiltram nos tecidos circundantes. Assim, na maioria dos casos, a cirurgia tem de ser seguida por terapia de radiação. A quimioterapia padrão consiste em drogas alquilantes, como carboplatina, carmustina e fotemustina. Agentes, como tamoxifeno, selênio, retinoides, citocinas e anticorpos, têm sido propostos, mas seus efeitos continuam a ser um tema de discussão. (Chambaut-Guérin et al., 2000; Costa et al., 2001; Defer et al., 1997; Hertenstein et al., 2016; Rooprai et al., 2007) Apesar dos recentes avanços nestas terapias, inclusive com a introdução mais recente da temozolomida, o tempo de sobrevivência médio para pacientes com glioblastoma continua a ser de aproximadamente 12 meses. (Hart et al., 2008; Soffiatti, Rudà, & Trevisan, 2007)

A resistência ao tratamento tem sido associada, em parte, à presença de células tronco tumorais e micróglia/macrófagos no microambiente tumoral, gerando assim um ambiente que pode ser caracterizado por quimio-resistência, radio-resistência e imunossupressão. Estudos em culturas primárias a partir de explantes de tumores neuroglicais malignos humanos têm revelado quimio-resistência à temozolomida e capacidade de auto renovação, quando transplantadas em camundongos. (Patru et al., 2010) Marcadores moleculares têm sido associados com malignidade e quimio-resistência. O grupo de Hervé Chneiweiss observou, após análise proteômica, que o fator de crescimento derivado de hepatoma (HDGF- *hepatoma-derived growth factor*) estava superexpresso em tumores neuroglicais malignos. (Thirant, 2012) Por outro lado, a supressão da expressão do receptor CXCR4 em células-tronco de glioma com o uso de miR-302-367 induziu bloqueio da via *sonic hedgehog* (SHH-GLI-NANOG) envolvida na autoexpressão e renovação. (Fareh et al., 2012) Outros fatores do microambiente tumoral também são determinantes para o crescimento de gliomas e imunomodulação. Já está bem estabelecido o papel de Interleucina 10 (IL-10) na atividade supressora do crescimento de glioma por células imunoefetoras de perfil Th1. (De Vleeschouwer, Spencer, Ceuppens, & Van Gool, 2007) Por outro lado, um desafio significativo para o desenvolvimento de novas terapias para gliomas é a sua capacidade para induzir imunossupressão local e sistêmica, limitando a resposta imune inata para o crescimento tumoral, e a eficiência da resposta imune da adaptativa. (Gousias et al., 2010) Tem sido demonstrado que no microambiente tumoral os gliomas são capazes de suprimir a resposta imune, por intermédio de regulação positiva de proteínas anti-inflamatórias, à regulação negativa de apresentação de antígenos, além da expansão de efetor imunossupressora de células, como as células T reguladoras. Gliomas também pode expressar moléculas de superfície com efeito imunossupressor, incluindo a molécula homóloga de B7-1 co-estimuladora (B7-H1), também conhecida como ligante indutor de morte celular programada 1 (PD-L1; 15). (Crane, Ahn, Han, & Parsa, 2012; Parsa et al., 2007; Zou et al., 1999) Em particular, atenção tem sido dada ao estudo da resposta de micróglia no microambiente tumoral.

Por outro lado, a participação da micróglia/macrófagos no favorecimento do crescimento dos gliomas tem sido demonstrada, mas ainda

está pouco elucidada. Estas células têm demonstrado produzir citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, no entanto, também são capazes de produzir fatores de crescimento e quimiocinas. (Butovsky et al., 2006) Apesar de seu potencial citotóxico, essas células podem infiltrar significativamente na massa tumoral e parecer favorecer o crescimento do tumor, e não a sua erradicação. (Wu, Pastor-Pareja, & Xu, 2010) Uma vez que as células do glioblastoma são imunogênicas (Kostianovsky et al., 2008) e secretam citocinas imunossupressoras (Badie, Schartner, Prabakaran, Paul, & Vorpahl, 2001), a controlada ativação da micróglia e de sua propriedade antitumoral dentro do ambiente do glioma pode constituir uma importante arma para defesa adicional em terapias contra tumores cerebrais.

Portanto, os compostos que mostram atividade antitumoral e imunomodulatória podem ser considerados como aliados-chave para melhorar o tratamento convencional aplicado a tumores do CNS. A busca por medicamentos alternativos para intervenções terapêuticas contra tumores do cérebro lançou luz sobre compostos fitoquímicos.

Um grupo de moléculas que despertou o interesse da comunidade científica é o dos flavonoides, presentes em diferentes gêneros de plantas, tendo em conta a diversidade de efeitos biológicos em células do SNC, incluindo a atividade anti-glioma como demonstrado pelos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), e outros. (Braganhol et al., 2006; Coelho et al., 2015; Freitas et al., 2010; Santos et al., 2011; Sharma et al., 2007; Silva et al. 2008; Youdim, Shukitt-Hale, & Joseph, 2004) Mais recentemente, temos caracterizado a propriedade imunomoduladora de flavonoides durante a interação da micróglia com células de glioma. (Coelho, 2013; Coelho et al., 2016; Silva et al., 2015; Silva et al. 2019)

Neste capítulo, iremos apresentar o estado atual de conhecimento sobre a fisiopatologia de gliomas malignos, destacando o papel da micróglia/macrófagos no favorecimento do crescimento tumoral, assim como os principais achados do grupo LabNq sobre a investigação do potencial antitumoral e imunomodulador de flavonoides na busca de possíveis agentes adjuvantes ao tratamento de gliomas malignos.

Aspectos da fisiopatologia de gliomas malignos: resposta microglial no microambiente tumoral

A glia é formada por quatro células principais: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e epêndima. É a partir dessas células que as neoplasias do SNC se originam. “Gliomas” é o termo utilizado para designar os tumores (neoplasias) originários das células da glia encefálica, a saber, astrócitos, oligodendrócitos, e seus precursores do SNC. (Goodenberg & Jenkins, 2012)

Glioblastomas são pobremente imunogênicos e não expressam antígenos às células apresentadoras de antígenos (APC), além do mais, expressam níveis significantes de TLR e não secretam citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , responsáveis pelo desenvolvimento da resposta imune inata. (Lehnardt, 2010) A interação do tumor com as células normais do SNC altera o perfil inflamatório da resposta imunológica antitumoral. Diversos estudos demonstram que o perfil de resposta Th1 apresenta um melhor prognóstico em pacientes com câncer. (Galon, 2006) Esse perfil de resposta contribui para a destruição tumoral. (Dieu-Nosjean et al., 2008) Pacientes com resposta a citocinas inflamatórias polarizadas para o perfil Th1 apresentaram melhora no quadro clínico. Por outro lado, pacientes com alta resposta regulatória no ambiente tumoral, por exemplo expressão genética de marcadores Th17 obtiveram piores prognósticos.

Micróglia são consideradas como a primeira linha de defesa no Sistema Nervoso Central (SNC) (Färber & Kettenmann, 2006), quando ativadas, adquirem uma morfologia ameboide, fenótipo semelhante a macrófagos, e expressam os mesmos marcadores, como MHCI, MHCII, Iba1 e Glut5. (Halliday & Stevens, 2011) Dependendo dos estímulos, as células da micróglia podem atuar de maneira favorável, promovendo regeneração tecidual, podem ter um papel regulador, ou também podem favorecer um perfil patológico, promovendo a neuroinflamação ou neurodegeneração. (Czech et al., 2009)

Descrita pela primeira vez em 1932 por Del Rio-Hortega como uma população de células distintas dos astrócitos e oligodendrócitos, a morfologia da micróglia foi esclarecida, inicialmente por Mori e Leblond (1969), por meio de microscopia óptica e eletrônica, e por Ling (1981),

por meio de análise citoquímica. Desde então, suas propriedades têm sido estudadas com maiores detalhes.

As micróglias produzem citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Além disso, com a estimulação destas células também são produzidos fatores de crescimento e quimiocinas. (Butovsky et al., 2006) A neuroinflamação microglial em paralelo com a produção de citocinas pró-inflamatórias é comumente associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), dependente de ativação e espécies reativas de nitrogênio (RNS). ROS são moléculas contendo oxigênio, que oxidam e reagem com constituintes celulares vulneráveis, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. O cérebro é particularmente vulnerável ao excesso de geração de ROS e RNS. O estado classicamente ativado de micróglia conduz a resposta neuroinflamatória e modula os efeitos prejudiciais sobre os neurônios, ao passo que em seu estado de ativação alternativa, que é aparentemente um estado de ativação benéfica, a micróglia desempenha um papel crucial na manutenção e reparação tecidual. (Jha, Lee, & Suk, 2015)

Dentre as doenças com as quais as células da micróglia estão associadas, os tumores cerebrais representam um desafio à ciência devido sua complexidade. Micróglia e macrófagos infiltram o glioblastoma adquirindo um fenótipo que contribui para a invasão tumoral, proliferação, sobrevivência e angiogênese, bloqueando as respostas imunes tanto a nível local como de forma sistêmica. (Galea et al., 2005; Mieczkowski et al., 2015) Essas células são dominantes, infiltrando-se no tumor, são recrutadas por fatores secretados pelas células tumorais, que induzem a aquisição de função imunossupressora, servindo de suporte para o tumor. (Wu et al., 2010) Micróglias/macrófagos representam a maior subpopulação de células normais em gliomas humanos. (Hussain et al., 2006) Existem dois estados funcionais de polarização da micróglia ativadas, nomeadas por tipo M1 (clássico/ativação pró-inflamatória) e tipo M2 (alternativa/ativação anti-inflamatório), como em macrófagos.

Muitos gliomas humanos mostram infiltração proeminente de micróglia/macrófagos e hoje já é considerada uma correlação a abundância de estas células com o grau de malignidade do tumor. (Nishie et al., 1999) Badie et al. (2001) verificaram que as funções imunológicas da micróglia são suprimidas no ambiente do glioma. Existem várias evidências de que o comportamento da micróglia é controlado pelas células do

tumor, resultando na secreção de citocinas e fatores de crescimento que podem contribuir para a evasão imune, crescimento e invasão de outras regiões no cérebro. Estudos afirmam que o aumento na liberação de IL-10 em micróglia cultivada junto com glioblastoma está diretamente relacionado ao aumento da expressão de Stat3. (Yu, Luptrawan, Black, & Liu, 2006) A avaliação da progressão do glioma *in vivo* demonstra que a atividade fagocítica da micróglia está inibida na presença do tumor, e por outro lado, o crescimento do glioma não é afetado pela micróglia, sugerindo a presença de um ambiente imunossupressor que contribui para sua proliferação. (Zhai, Heppner, & Tsirka, 2011)

Diversos estudos demonstram que o perfil de resposta Th1 está associado à um melhor prognóstico em pacientes com câncer. (Galon et al., 2006) Dieu-Nosjean et al. (2008) observaram a importância da resposta Th1 para a destruição tumoral. Pacientes com resposta a citocinas inflamatórias em células B, T-CD4 e T-CD8, polarizadas para o perfil Th1 em câncer de pulmão, apresentaram uma melhora no prognóstico. Por outro lado, pacientes que apresentaram alta resposta regulatória no ambiente tumoral, por exemplo expressão genética de marcadores Th17, obtiveram piores prognósticos. O perfil de resposta Th2 está diretamente relacionado à secreção de citocinas IL-4 e IL-10 por células microgliais, que têm mostrado propriedades anti-inflamatórias no microambiente tumoral. (Wong, Lotze, Wahl, & Wahl, 1992) Portanto, como delineado na Figura 1, para que haja uma eficiente resposta imune dirigida contra células tumorais é desejado um equilíbrio para um microambiente Th1.

A resposta imune inata a gliomas envolve além de macrófagos/micróglia, neutrófilos, células *natural killer* e células dendríticas (DC) (Fig. 2). Gliomas secretam citocinas anti-inflamatórias e induzem a produção de Fas ligante por micróglia, este induz apoptose de células T com regulação negativa do MHC, gerando defeitos funcionais em células apresentadoras de antígenos, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos, (Badhiwala et al., 2013) também secretam citocinas imunossupressoras e, portanto, prejudicam terapias baseadas em linfócitos T citotóxico. Além disso, induzem a produção de Fas ligante pela micróglia, este, por sua vez, induz apoptose em células T. (Badie et al., 2001)

Neste contexto, a investigação da ação de compostos que atuem na modulação de alvos moleculares e sua relação com potencial

antitumoral e imunomodulação pode trazer novos avanços no desenvolvimento de fármacos e aplicação na terapia adjuvante de tumores cerebrais malignos.

Flavonoides como agentes antitumorais: potencial aplicação para gliomas malignos

Os flavonoides são compostos químicos naturais hidrossolúveis de baixo peso molecular que compõem uma classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou conjugada a açúcares (glicosídeos). Esses compostos podem ser encontrados nos frutos, folhas, flores, sementes e são amplamente distribuídos no reino vegetal, basicamente nas angiospermas. Nos vegetais, os flavonoides desempenham diversas funções: nas folhas, bloqueiam a radiação ultravioleta extrema, nas flores, atuam como sinais visuais atraindo agentes polinizadores, como pássaros e abelhas. (Lopes, Oliveira, Nagem, & Pinto, 2003)

De um modo geral, os flavonoides estão envolvidos nos mecanismos de defesa naturais das plantas, além de participarem da dieta humana como constituinte de diversos alimentos, como: vinho tinto, frutas, óleo de oliva, chá, café, e na maioria dos componentes de origem vegetal. O consumo diário destes compostos está em torno de 23 mg/dia, das quais a maior parte é representada pela quercetina, especialmente devido à ingestão de alimentos como o chá preto, cebolas, frutas e o vinho tinto. Além disso, esses compostos são sintetizados exclusivamente pelos vegetais, onde desempenham atividades fundamentais para seu desenvolvimento. (Yunes, Pedrosa, Rozangela, & Cechinel Filho, 2001; Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñon, 2002)

Uma das propriedades biológicas dos flavonoides mais estudadas é a sua atividade antioxidante. (Friedman, 2007; Ye, Liu, & Wei, 2007; Bubols et al., 2013) Pesquisas também atribuem a estes compostos ação antimicrobiana (Friedman, 2007; Möller et al., 2006), atividade analgésica e anti-inflamatória (Bukhari et al., 2007), entre outras.

O estudo dos flavonoides tem gerado resultados promissores em várias patologias. Diversas pesquisas *in vitro* utilizando flavonoides em vários tipos de câncer têm demonstrado uma promissora atividade

antitumoral. (Hertog, Hollman, & Katan, 1992) A atividade antiglioma dos flavonoides também tem sido demonstrada por estudos desenvolvidos pelo nosso grupo e outros. Observamos que a rutina, extraída de vagens da planta brasileira *Dimorphandra mollis* exerce ações nas células da linhagem de glioblastoma humano GL-15, diminuindo a proliferação celular, induzindo apoptose e alterando a morfologia de células remanescentes para um fenótipo indiferenciado para um fenótipo diferenciado astrocitário, caracterizado por um aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), efeitos associados à regulação negativa da via de sinalização associada, por sua vez à proteína ERK1/2, e resultante redução na produção do fator pró-angiogênico ligada ao endotélio vascular (VEGF). (Freitas et al., 2011; Santos et al., 2011) O tratamento com flavonoides polihidroxilados, e entre estes a rutina, induziram retardo na migração de células de glioma GL-15, associado à redução de estruturas tipo filopodias na superfície celular, à presença de células em apoptose, além da regulação da expressão de proteínas componentes da matriz extracelular (MEC) e metaloproteinase associada a matriz (MMP), com marcação intra e extracelular para a fibronectina, marcação predominantemente intracelular para laminina, e redução na expressão e atividade de MMP-2. (Santos et al., 2015) O grupo também observou que o flavonoide rutina não é citotóxica para células gliais normais, (astrócitos e micróglia) mas é capaz de induzir ativação destas células associadas à liberação de fatores tróficos, como TNF- α e óxido nítrico (NO). (Silva et al., 2008)

Estudos desenvolvidos por Das e colaboradores (2010) demonstraram que os flavonoides apigenina, (-) -epigallocatequina, (-) -epigallocatequina-3-gaate (EGCG) e genisteína foram capazes de induzir apoptose em células de linhagens derivadas de glioblastomas humanos T98G e U87MG, mas não foram tóxicos para células astrocitárias normais. (Das, Banik, & Ray, 2010) Entre as drogas testadas em nosso grupo também foi verificado um efeito anti-glioma muito promissor obtido em estudos *in vitro* após tratamento com flavonoides casticina, penduletina e hidroxiflavona, extraídos da espécie regional *Croton betulaster*. Foi verificado que, além de inibir o crescimento e a invasão, os flavonoides também induziram apoptose de células de glioblastoma da linhagem GL-15. (Coelho et al., 2015) Também demonstramos recentemente que o flavonoide apigenina, também extraído de *Croton betulaster*, foi capaz

de inibir o crescimento de células de linhagem glioma murino C6, mas não foram tóxicos para células astrocitárias normais. (Coelho et al., 2015) A apigenina induziu acumulação de células na fase G0/G1 do ciclo celular e inibiu a migração de células de glioma de forma eficiente. Além disso, induziu alterações morfológicas associadas a diferenciação astrogliial, caracterizadas por um aumento da expressão da proteína astrocitária GFAP e a diminuição da expressão da proteína nestina, um marcador típico de precursores neuronais. Efeitos imunomoduladores de apigenina também foram caracterizados neste estudo. O flavonoide diminuiu a secreção da citocina inflamatória TNF, reduziu a citocina regulatória IL-10, além de aumentar a produção de ON. (Coelho et al., 2016)

Considerando os promissores resultados obtidos sobre efeito anti-glioma e potencial imunomodulador dos flavonoides rutina e apigenina, buscamos aprofundar os efeitos destas moléculas em uma situação simulando interações no microambiente tumoral, em especial das células de glioma com a micróglia. De fato, ambos flavonoides demonstram ser capazes de modular fatores envolvidos na resposta imune tumoral durante a interação micróglia/glioma.

Nos ensaios de interação direta glia/glioma, os efeitos inibitórios dos flavonoide rutina e sua aglicona quercetina sobre a viabilidade e migração de células glioma foram amplificados, ligados à ativação de micróglia e aumento na secreção de citocina pró-inflamatória TNF- α e redução na citocina IL-6. A análise ultraestrutural revelou a formação de sinapses micróglia/glioma e vacúolos fagocíticos em células expostas à rutina. Em ensaios de interação indireta utilizando sistema *Transwell*, as células tumorais cultivadas na câmara inferior na presença da rutina atraíram micróglia e macrófagos peritoneais da câmara superior para o ambiente das células tumorais, induzindo quimiotaxia dose dependente. Por outro lado, esta interação indireta das células de glioma com a micróglia também resultou na amplificação do efeito inibitório do flavonoide sobre a viabilidade e migração das células de glioma. O conjunto dos resultados deste estudo mostrou que rutina e quercetina modulam a expressão de fatores de crescimento e quimiocinas em células de glioma e quimiotaxia de microglia; que microglia exposta à rutina ou à quercetina inibe indiretamente a proliferação e migração de células de glioma; e que ambos os flavonoides modulam citocinas

inflamatórias durante as interações diretas entre microglia/glioma e reduz a expressão de fatores imunomodulatórios, assim como reduzem a tumorigênese, com perda de competência de neoformação do tumor quando xenotransplantadas no cérebro de ratos, efeito também associado à modulação do perfil inflamatório. (Silva et al., 2017; Silva et al., 2019)

Os ensaios de interação micróglia/glioma também apontam efeitos inibitórios do flavonoide apigenina nas células microgliciais isoladas e em co-culturas. O flavonoide foi capaz de induzir diferenciação e alteração no perfil imunológico para M2 em células microgliciais, além de promover quimiotaxia para culturas C6 de gliomas pré-tratados – a quimiotaxia estando associada ao aumento na secreção do fator de necrose tumoral citocina pró-inflamatória (TNF- α) e à diminuição na secreção de citocinas regulatórias IL-6 e IL-10. (Coelho et al., 2016)

Considerações finais

Os flavonoides estão despertando o interesse da comunidade científica devido às suas propriedades biológicas, inclusive antitumorais. Os achados sobre os efeitos de flavonoides em células de glioma e em interação direta ou indireta com células da micróglia indicam que o tratamento mostra efeito antitumoral relacionado à alteração no perfil de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias. Também se destaca a importância da interação entre glia/glioma no perfil de resposta imunológica no ambiente tumoral e no desenvolvimento de fármacos imunomoduladores que possam ser mais ativos para o tratamento de tumores cerebrais malignos. Aponta-se, finalmente, os flavonoides como potenciais compostos adjuvantes ao tratamento de tumores gliais malignos, como o glioblastoma de grau IV.

Referências

Badhiwala, J., Decker, W. K., Berens, M. E., & Bhardwaj, R. D. (2013). Clinical trials in cellular immunotherapy for brain/CNS tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 13(4), 405-24.

- Badie, B., Schartner J., Prabakaran, S., Paul, J., & Vorpahl, J. (2001). Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *Journal of Neuroimmunology*, 120(1-2), 19-24.
- Braganhol, E., Zamin, L. L., Canedo, A. D., Horn, F., Tamajusuku, A. S., Wink, M. R., et al. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*, 17(6), 663-71.
- Bubols, G. B., Vianna, D. R., Medina-Remon, A., von Poser, G., Lamuela-Raventos, R.M., Eifler-Lima, V. L., Garcia, S.C. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Review in Medical Chemistry*. 13(3), 318-34.
- Bukhari, I. A., Khan, R. A., Gilani, A. U., Shah, A. J., Ahmad, V. U., 2007. The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisiodes*. *Archives of Pharmacal Research*, 30, 303-12.
- Butovsky, O., Koronyo-Hamaoui, M., Kunis, G., Ophir, E., Landa, G., Cohen, H., et al. (2006). Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 11784-89.
- Chambaut-Guérin, A. M., Costa, S. L., Lefrançois, T., Fages, C., Gauthereau, X., & Tardy, M. (2000). Effects of retinoic acid and tumour necrosis factor alfa on GL-15 glioblastoma cells. *Neuroreport*, 11(2), 389-93.
- Coelho, P. L. C. (2013). Avaliação da ação antitumoral e imunomodulatória do flavonoide apigenina, extraído de *Croton Betulaster Mull*, em células de glioma. Dissertação de mestrado não-publicada, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
- Coelho, P. L. C., Freitas, S. R. V. B., Pitanga, B. P. S., Silva, V. D. A., Oliveira, M. N., Grangeiro, M. S., et al. (2015). Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 34-43.
- Coelho, P. L., Oliveira, M. N., Silva, A. B., Pitanga, B. P. S., Silva, V. D. A., Faria G. P., et al. (2016). The flavonoid apigenin from *Croton betulaster mull* inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. *Anticancer Drugs*, 27(10), 960-69.
- Costa, S. L., Paillaud, E., Fages, C., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Jouault, H., et al. (2001). Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *European Journal of Cancer*, 37(4), 520-30.

- Crane, C. A., Ahn, B. J., Han, S. J., & Parsa, A. T. (2012). Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Neuro-Oncology*, 14(5), 584-95.
- Czech, B., Pfeilschifter, W., Mazaheri-Omrani, N., Strobel, M. A., Kahles, T., Neumann-Haefelin, T., et al. (2009). The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(2), 251-56.
- Das, A., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2010). Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. *Cancer*, 116(1), 164-76.
- Defer, G. L., Adle-Biassette, H., Ricolfi, F., Martin, L., Authier, F. J., Chomienien, C., et al. (1997). All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *Journal of Neuro-Oncology*, 34(2), 169-77.
- De-Vleeschouwer, S., Spencer, I. L., Ceuppens, J. L., & Van Gool, S. W. (2007). Persistent IL-10 production is required for glioma growth suppressive activity by Th1-directed effector cells after stimulation with tumor lysate-loaded dendritic cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 84(2), 131-40.
- Dieu-Nosjean, M. C., Antoine M., Danel C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot V., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology*, 26(27), 4410-17.
- Färber, K., & Kettenmann, H. Purinergic signaling and microglia. (2006). *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 452(5), 615-21.
- Fareh, M., Turchi, L., Virolle, V., Debruyne, D., Almairac, F., De-La Forest, S. D., et al. (2012). The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death and Differentiation*, 19(2), 232-44.
- Freitas, S., Costa, S., Azevedo, C., Carvalho, G., Freire, S., Barbosa, P., et al. (2011). Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells. *Phytotherapy Research*, 27(6), 916-21.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 116-34.

- Galea, I., Palin, K., Newman, T. A., Van Rooijen, N., Perry, V. H., & Boche, D. (2005). Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*, *49*(3), 375-84.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès C., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, *313*(5795), 1960-64.
- Goodenberger, M. L. & Jenkins, R. B. Genetics of adult glioma. (2012). *Cancer Genetics*, *205*(12), 613-621.
- Gousias, K., Markou, M., Arzoglou, V., Voulgaris, S., Vartholomatos, G., Kostoula, A., et al. (2010). Frequent abnormalities of the immune system in gliomas and correlation with the WHO grading system of malignancy. *Journal of Neuroimmunology*, *226*(1-2), 136-42.
- Halliday, G. M. & Stevens, C. H. (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *26*(1), 6-17.
- Hart, G., Grant, R., Garside, R., Rogers, G., Somerville, M., & Stein, K. (2008). Temozolomide for high grade glioma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *8*(4), CD007415.
- Hertenstein, A., Hielscher, T., Menn, O., Wiestler, B., Winkler, F., Platten, M., et al. (2016). Impact of tapering and discontinuation of bevacizumab in patients with progressive glioblastoma. *Journal of Neuro-oncology*, *129*(3), 533-39.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, *40*(12), 2379-83.
- Hussain, F. S., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., & Heimberger, A. B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncology*, *8*(3), 261-79.
- Jha, M. K., Lee, W. H., & Suk, K. (2015). Functional polarization of neuroglia: implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochemical Pharmacology*, *103*, 1-6.
- Kostianovsky, A. M., Maier, L. M., Anderson, R. C., Bruce, J. N., & Anderson, D. E. (2008). Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. *Journal of Immunology*, *181*(8), 5425-32.

- Lehnardt, S. (2010). Innate Immunity and Neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3), 253-63.
- Ling, E. A. (1981). The origin and nature of microglia. In Fedoroff, S., Hertz, L., editors. *Advances in cellular neurobiology* (pp 33-82) (vol. 2). London: Academic Press.
- Lopes, R. M., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., & Pinto, A. S. (2003). Flavonóides: farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3(17), 18-22.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., et al. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-20.
- Martínez-Flórez, S., Gonzalez-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tunon, M. J. (2002). Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-78.
- Mieczkowski, J., Kocyk, M., Nauman, P., Gabrusiewicz, K., Sielska, M., Przanowski, P., et al. (2015). Down-regulation of IKK β expression in glioma-infiltrating microglia/macrophages is associated with defective inflammatory/immune gene responses in glioblastoma. *Oncotarget*, 6(32), 33077-090.
- Möller, M., Suschke, U., Nolkemper, S., Schneele, J., Distl, M., Sporer, F., et al. (2006). Antibacterial, antiviral, antiproliferative and apoptosis-inducing properties of *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(8), 1131-38.
- Mori, S. & Leblond, C. P. (1969). Identification of microglia in light and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*, 135(1), 57-80.
- Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., et al. (1999). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clinical Cancer Research*, 5(5), 1107-13.
- Parsa, A. T., Waldron, J. S., Panner, A., Crane, C. A., Parney, I. F., Barry, J. J., et al. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine*, 13(1), 84-8.
- Patru, C., Romão, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadessu, J., et al. (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer*, 10, 66-71.
- Rooprai, H. K., Kyriazis, I., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Zicha, D., Aubyn, D., et al. (2007). Inhibition of invasion and induction of apoptosis by

selenium in human malignant brain tumour cells *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 30(5), 1263-71.

Santos, B. L., Oliveira, M. N., Coelho, P. L., Pitanga, B. P., Da Silva, A. B., Adelita, T., et al. (2015). Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 123-38.

Santos, B. L., Silva, A. R., Pitanga, B. P. S., Sousa, C. S., Grangeiro, M. S., Fragomeni, B. O., et al. (2011). Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on glioblastoma cells. *Food Chemistry*, 127(2), 404-11.

Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., Agarwal, A., Mishra, M. K., & Sen, E. (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(9), 2544-53.

Silva, A. B., Coelho, P. L. C., Amparo, J. A. O., Almeida-Carneiro, M. M. A., Borges, J. M. P., Souza, C. S., et al. (2017). The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chemico-Biological Interactions*, 25 (274), 89-99.

Silva, A. B., Coelho, P. L. C., Oliveira, M. N., Oliveira, J. L., Amparo, J. A. O. Silva, K. et al. (2019). The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving anti glioma activity. *Brain Behavior and Immunity*, 1591(19).

Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Souza, C. S., Freitas, S. R. V. B., Vasconcelos, V., Freire, S. M., et al. (2008). The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, 24(1), 75-89.

Soffietti, R., Rudà, R., & Trevisan, E. (2007). New chemotherapy options for the treatment of malignant Gliomas. *Anticancer Drugs*, 18(6), 621-32.

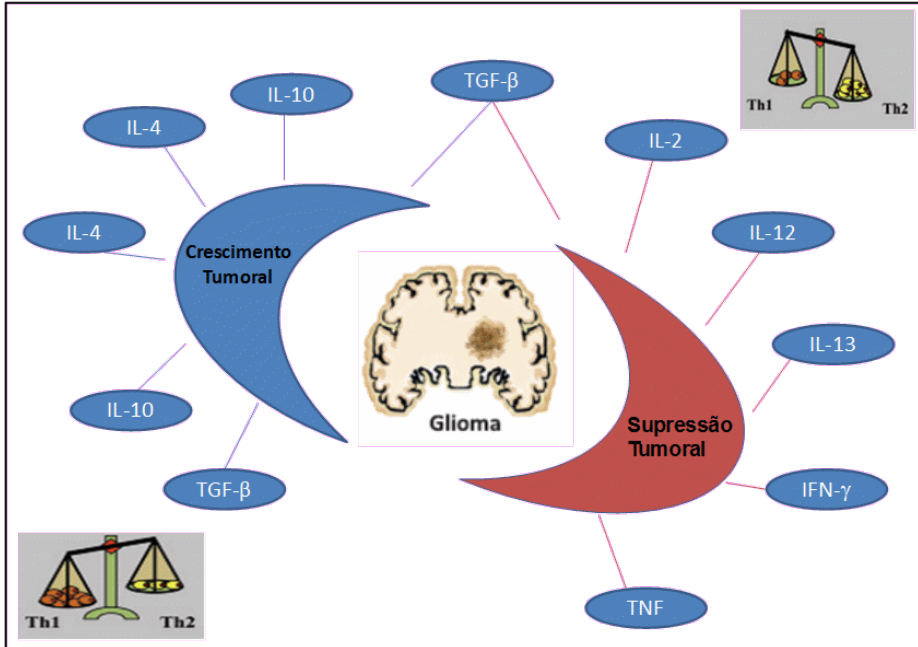
Thirant, C., Galan-Moya, E. M., Dubois, L. G., Pinte, S., Chafey, P., Broussard, C., et al. (2012) Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells*, 30(5), 845-53.

Wong, H. L., Lotze, M. T., Wahl, L. M., & Wahl, S. M. (1992). Administration of recombinant IL-4 to humans regulates gene expression, phenotype, and function in circulating monocytes. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2118-25.

Wu, M., Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2010). Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*, 463(7280), 545-48.

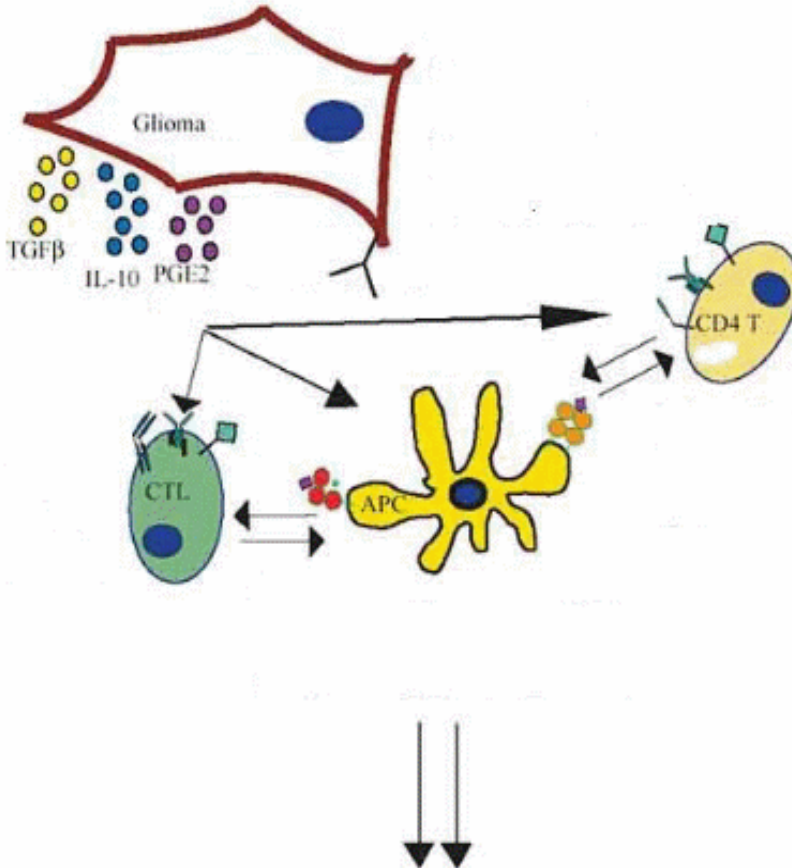
- Ye, C. L., Liu, Y., & Wei, D. Z. (2007). Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4', 6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavanone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59, 553-59.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2004). Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11), 1683-93.
- Yu, J. S., Luptrawan, A., Black, K. L., & Liu, G. (2006). Mahaley clinical research award: chemosensitization of glioma through dendritic cell vaccination. *Clinical Neurosurgery*, 53, 345-51.
- Yunes, A. R., Pedrosa, R. C., & Cechinel Filho, V. (2001). Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitofármacos no Brasil. *Química nova*, 24(1), 147-52.
- Zhai, H., Heppner, F. L., & Tsirka, S. E. (2011). Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*, 59(3), 472-85.
- Zou, J. P., Morford, L. A., Chougnet, C., Dix, A. R., Brooks, A. G., Torres, N., et al. (1999). Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *The Journal of Immunology*, 162(8), 4882-92.

Figura 1 – Perfil de citocinas que influenciam na biologia tumoral do glioma



Tumores condicionam o microambiente para um perfil de resposta dominante para Th2 como estratégia para escapar do ataque mediado por células do sistema imune. Na presença de citocinas Th2 (IL10, TGFβ, IL-4), tumores regulam negativamente a expressão de MHC e moléculas co-estimuladoras necessárias para atrair células supressoras, como células T-reg e células mieloides que suprimem a função da célula assassina. O ambiente de Th2 regula negativamente as moléculas co-estimuladoras sobre as células apresentadoras de antígenos (APC), que servem para ativar quaisquer células Th1 que venham a se infiltrar no tumor como as micróglias. A morte de células tumorais imunomediada requer um microambiente Th1 (IL-2, IL-12, IL-13, INF γ , TNF). Na presença de citocinas Th1, tumores regulam positivamente a expressão de moléculas de MHC I e co-estimuladoras necessárias para a ativação das células T citolíticas (CTLs) que irão, então, para reconhecer e matar as células tumorais. Portanto, as estratégias para aumentar a imunidade de Th1 por si só não são suficientes para mediar a imunidade anti-tumoral, sendo a manutenção na produção de citocinas Th1 necessária no microambiente tumoral. (Adaptado de Zhu et al., 2012)

Figura 2 – Mecanismo proposto de escape elaborado pelo glioma



Resposta imune inata a gliomas envolvendo macrófagos teciduais, micróglia, neutrófilos, células *natural killers* (NK) e células dendríticas (DC). Gliomas secretam citocinas anti-inflamatórias e induzem a produção de Fas ligante por micróglia, este induz apoptose de células T com regulação negativa do MHC, gerando defeitos funcionais em células apresentadoras de antígenos, células Tauxiliares e linfócitos T citotóxico. (Adaptado de Badhiwala, et al., 2013)

Bioprospecção farmacológica de flavonoides como agentes imunomoduladores e neuroprotetores para doenças neurodegenerativas: uma emergente linha de pesquisa do PPGIM

Victor Diogenes Amaral da Silva, Cleide dos Santos Souza, Noélio de Jesus Menezes, Monique Marilyn Alves de Almeida Carneiro, Cleonice Creusa dos Santos, Fillipe Mendes de Araújo, Érica Patrícia Pereira, Silvia Lima Costa

Introdução

As íntimas interações e sinalizações entre neurônios e células gliais desempenham papéis cruciais durante o desenvolvimento e no sistema nervoso central (SNC) adulto, assim como apresentam um papel crucial no controle nutricional, na homeostase e na manutenção de funções e estruturas cerebrais, tal qual para neuroproteção. Ainda, estas interrelações também podem participar de sua deterioração devido ao envelhecimento ou a doenças. As patologias do sistema nervoso central são originadas por agentes tóxicos, lesão traumática e doenças isquêmicas, ou podem ser desencadeados por degeneração neuronal associada ao envelhecimento ou a doença degenerativa e até mesmo por acúmulo de citocinas, neurotransmissores e radicais reativos. Desordens neurodegenerativas têm como uma das características em comum o envolvimento de diferentes tipos de células, dentre estas os astrócitos e células da microglia que apresentam respostas características de gliose, que por sua vez contribui para a disfunção e/ou morte

neuronal. (Frank-Cannon, Alto, McAlpine, & Tansey, 2009; Parpura et al., 2012; Perry, Nicoll, & Holmes, 2010; Verkhatsky & Butt, 2007)

Os flavonoides estão entre os metabólitos secundários de origem vegetal amplamente investigados no presente e representam um dos produtos naturais mais importantes e diversificados com grupos fenólicos. Os flavonoides são encontrados em frutas, legumes, sementes, cascas, raízes, caules, flores e seus produtos de preparação, como chás e vinhos. Diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, como atividades antitumoral (Yang et al., 2000) antioxidante (Kandaswami & Middleton, 1994), antiviral (Miki et al., 2007) anti-inflamatória (Guardia, Rotelli, Juarez, & Pelzer, 2001), entre outras, que dão importância farmacológica significativa para este grupo de moléculas.

O consumo de flavonoides na dieta tem sido associado à redução do risco de doenças neurodegenerativas (DND) em humanos, neuroproteção contra insultos relevantes relacionados às DND em modelos animais de estudo, tal qual melhorias na cognição e aprendizagem. (Engelhart et al., 2002; Janssen et al., 2015; Weinreb, Mandel, Amit, & Youdim, 2004)

Esses compostos também induzem um amplo espectro de respostas em células gliais e culturas de neurônios e em modelos in vitro de doenças do SNC, apoiando a hipótese de que podem ser considerados como potenciais agentes neuroprotetores e neuroimunomoduladores in vivo.

Neste capítulo, apresentaremos uma revisão sobre os principais aspectos relacionados à linha de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, que envolve efeitos farmacológicos dos flavonoides na modulação da resposta neuroinflamatória e sua implicação em modelos in vivo e in vitro de desordens degenerativas do sistema nervoso central e associada a estudos desenvolvidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq).

O papel da resposta inflamatória em doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central

Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, que constitui a forma mais comum de demência e causa de incapacidade nos idosos em todo o mundo. Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer e é caracterizada pela perda de neurônios cerebrais relacionados a funções cognitivas. (Alzheimer, 1907; Stelzmann, Schnitzlein, & Murtagh, 1995) Os sintomas iniciais normalmente incluem dificuldade para lembrar nomes e acontecimentos recentes, apatia e depressão. Os sintomas tardios incluem agravamento da perda de memória, diminuição da compreensão da fala, dificuldade de raciocínio, desorientação, confusão, alterações comportamentais e dificuldade para falar, engolir e caminhar. (Förstl & Kurz, 1999)

A DA pode ser classificada como familiar ou esporádica. A forma familiar da doença é rara e representa cerca de 5-10% dos casos. Esta é caracterizada por início precoce, apresenta-se principalmente por meio de mutações da proteína precursora amilóide – do inglês amyloid precursor protein (APP) –, presenilina-1 (PS1) e presenilina-2 (PS2). (Shinohara et al., 2014)

A maioria dos casos da DA manifesta-se de forma esporádica, representando cerca de 90-95% dos casos. Nessa condição, os pacientes normalmente desenvolvem a doença depois dos 65 anos de idade (embora tenha etiologia multifatorial, a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento desta forma da enfermidade). (Ballard et al., 2011) Apesar de existirem diferentes causas genéticas e ambientais, todos os pacientes apresentam comportamento clínico semelhante, e desenvolvem lesões cerebrais idênticas, que histopatologicamente é marcada por dois componentes principais: os emaranhados neurofibrilares intracelulares, e as placas neuríticas extracelulares cercadas por astrócitos e microglia ativados. O principal componente dos emaranhados neurofibrilares são filamentos helicoidais emparelhados de proteína tau truncada, que se apresenta anormalmente hiperfosforilada, ao passo que o principal componente das placas neuríticas ou senis são

os depósitos do peptídeo beta amilóide (A β). (Meraz-Ríos, Toral-Rios, Franco-Bocanegra, Villeda-Hernández, & Campos-Peña, 2013) Estas alterações são o resultado final de modificações pós-traducionais e envolvem diferentes genes, o que torna a DA uma doença neurodegenerativa multigênica complexa. (Ballard et al., 2011)

Além dessa complexidade multigênica na DA, já é sabido que A β promove uma resposta inflamatória mediada por células residentes do sistema nervoso, como microglia e astrócitos, ativando vias de sinalização que podem levar a neurodegeneração. (Glass, Saijo, Winner, Marchetto, & Gage, 2010) Embora se pensasse anteriormente que o sistema nervoso central (SNC) fosse um local imunologicamente privilegiado, agora é bem descrito que certas características de processos inflamatórios ocorrem normalmente no SNC em resposta a uma lesão, doença ou infecção, uma vez que *células residentes podem gerar mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas (PGs), radicais livres e fatores de sistema complemento. Além disso, estas células podem simultaneamente induzir a produção de moléculas de adesão e quimiocinas, podendo recrutar células do sistema imune periférico.* (Heneka et al., 2015)

As placas neuríticas são estruturas formadas por depósitos extracelulares que contêm um núcleo fibrilar de A β altamente insolúvel, formado por fragmentos de 39-42 resíduos de aminoácidos. Estas placas são rodeadas por microglias, astrócitos reativos gerados a partir de processos degenerativos neuronais. (Olabarria, Noristani, & Verkhatsky, 2010; Frost & Yue-Ming, 2017)

O acúmulo de A β no cérebro é um dos principais processos patológicos encontrados nos pacientes com a DA. O peptídeo A β normalmente origina-se a partir da APP- β , por meio das ações sequenciais de beta-secretases e de um complexo multiprotéico de gama secretases. (Yan et al., 1999) A formação destes depósitos inicia uma série de eventos celulares que são capazes de provocar uma resposta imunológica com a participação de células residentes do sistema nervoso central, como microglia e astrócitos. O acúmulo de A β no parênquima cerebral induz uma migração microglial e promove uma resposta inflamatória aguda e crônica contra estes agregados, mediante indução da produção de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio – do inglês reactive oxygen species (ROS)–, citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e

IL-6) e prostaglandinas (PGE2), que eventualmente podem promover a morte neuronal. (Heneka et al., 2015; Glass et al., 2010) (Figura 1)

Existem dois tipos celulares no SNC envolvidos diretamente como mediadores celulares na Doença de Alzheimer: a microglia e os astrócitos. A microglia representa um grupo de células residentes no sistema nervoso, que diferentemente dos astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, de origem ectodérmica, são derivadas do mesoderma, ou seja, a partir de células precursoras de monócitos, e são capazes de proporcionar uma resposta inicial contra qualquer dano que ocorra no SNC. (Verkhratsky & Butt, 2007) A presença da microglia ativada em volta das placas neuríticas sugere que essa célula participa do acúmulo de A β observado em pacientes com DA. (Salter & Stevens, 2017)

Em condições fisiológicas, a microglia está em seu estado “inativo” onde morfológicamente apresenta um pequeno corpo celular com processos ramificados. Quando ativadas por patógenos ou por dano, estas células sofrem visíveis alterações morfológicas incluindo redução dos processos e crescimento do corpo celular, adquirindo uma morfologia amebóide e exibindo uma ampla variedade de marcadores de superfície celular específicos. (Torres-Platas et al., 2014; Salter & Stevens, 2017) As placas neuríticas presentes no cérebro de pacientes com Alzheimer induzem uma resposta inflamatória mediada pela microglia, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias que podem causar diretamente dano neuronal. (Glass et al., 2010)

Células da microglia têm inicialmente um papel imunomodulador e expressam uma grande variedade de moléculas e antígenos relacionados à resposta imune. No entanto, o papel específico da microglia no SNC permanece controverso. A ativação da microglia não é um fenômeno simples e único, pelo contrário, é uma contínua série de eventos nos quais a microglia desperta elementos das respostas imunes inata e adaptativa e consistentemente demonstra ativação por meio da apresentação de antígenos na superfície celular. (Verkhratsky & Butt, 2007; Salter & Stevens, 2017) De acordo com esse princípio, a microglia apresenta resposta “variável”, em que uma mistura das vias de ativação clássicas, além de um aumento exacerbado da ativação alternativa, é observada na Doença de Alzheimer; o prolongamento da inflamação resulta na propagação e persistência da neurodegeneração. (Salter & Stevens, 2017)

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes presentes no SNC e apresentam um importante papel na organização e manutenção deste sistema. Estas células interagem com neurônios e estão envolvidas na secreção e reciclagem de neurotransmissores, homeostase iônica, regulação do metabolismo energético, remodelamento sináptico, detoxificação de substâncias endógenas e exógenas, modulação do estresse oxidativo, processamento da informação e transmissão de sinais. (Verkhatsky & Butt, 2007)

Nos estágios iniciais da DA, astrócitos ativados são encontrados em duas regiões: a camada molecular do córtex cerebral e próximo aos depósitos amilóides abaixo da camada de células piramidais. Entretanto, os mecanismos que levam à ativação destas células em resposta às mudanças patológicas produzidas pela Doença de Alzheimer não são evidentes, mas tem sido demonstrado que a presença do amilóide induz a ativação de astrócitos. Essas células ativadas são capazes de fagocitar e degradar amilóide, sugerindo sua contribuição para a remoção do A β no parênquima. (Frost & Yue-Ming, 2017)

Não só astrócitos, mas também a microglia é ativada por meio de receptores do tipo toll – do inglês toll-like receptors (TLR) – e de receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) causando inflamação local que, eventualmente, poderia intensificar a morte neuronal. (Glass et al., 2010)

Em geral, o processo inflamatório em pacientes com DA apresenta alterações na morfologia da microglia e ativação astrocitária, fenômeno denominado de gliose, sendo a astrogliose manifestada pelo aumento do número, tamanho e motilidade dos astrócitos, e por aumento nos níveis de expressão da proteína ácida fibrilar glial – do inglês glial fibrillary acidic protein (GFAP) –, vimentina e nestina. Estas mudanças resultam numa “ruptura” das funções dos astrócitos, que são essenciais para o funcionamento dos neurônios e manutenção da homeostase do sistema. (Verkhatsky & Butt, 2007)

Essas mudanças causam alterações nas atividades normais dos astrócitos, que são essenciais para a função neuronal. Dentre as funções fisiológicas realizadas pelos astrócitos, a manutenção da concentração de glutamato no espaço extracelular destaca-se, uma vez que provoca uma despolarização neuronal local, o que leva a danos citotóxicos. (Verkhatsky & Butt, 2007; Kirchoff, Dringen, & Giaume, 2001) Deste

modo, embora a ativação de astrócitos tenha um papel protetor no cérebro, a ativação intensa exacerba o dano neuronal e acelera a progressão da doença. (Glass et al., 2010) Além disso, astrócitos ativados são capazes de causar neurodegeneração e expressar fatores associados à inflamação, como a proteína S100 β . Em circunstâncias normais, S100 β promove o crescimento de neuritos, estimula a proliferação de astrócitos e aumenta as concentrações de cálcio livre em ambos, neurônios e astrócitos. No entanto, a super-expressão de S100 β pode ter consequências nocivas, como o crescimento excessivo de neuritos distróficos, observado em pacientes diagnosticados com a Doença de Alzheimer. (Marshak, Ann Pesce, Stanley, & Griffin, 1992)

Estudos envolvendo mecanismos de sinalização revelam que em astrócitos o fator de transcrição NF-kB é responsável por controlar significativamente a secreção de quimiocinas e moléculas de adesão, favorecendo a infiltração de linfócitos periféricos e aumentando a resposta inflamatória. Este processo torna-se um mecanismo de auto-regulação, favorecendo a neurodegeneração. (Glass et al., 2010)

Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado por perda progressiva e muito lenta de neurônios dopaminérgicos que contêm neuromelanina. Nesta enfermidade os sintomas motores bradicinesia (lentidão dos movimentos), ataxia, rigidez e tremor em repouso aparecem após anos de processo degenerativo e são precedidos por sintomas não motores, como perda olfativa e distúrbios de humor. (Braak, Ghebremedhin, Rüb, Bratzke, & Tredici, 2004)

Os mecanismos responsáveis pela perda de neurônios dopaminérgicos que contêm neuromelanina na substância nigra pars compacta (SNPC) permanecem desconhecidos, no entanto a disfunção mitocondrial, disfunção na degradação de proteínas, agregação de α -sinucleína para formação de oligômeros neurotóxicos, estresse oxidativo, estresse em retículo endoplasmático, e neuroinflamação são considerados eventos envolvidos nesta neurodegeneração. (Ebrahimi-Fakhari, Wahlster, & McLean, 2012; Exner, Lutz, Haass, & Winkholfer, 2012; Golembiowska & Dziubina, 2012; Hauser & Hastings, 2013; Kalia,

Kalia, McLean, Lozano, & Lang, 2013; Martinez-Vicente & Vila, 2013; Mercado, Valdés, & Hetz, 2013; Rohn, 2012; Taylor, Main, & Crack, 2013; Yong-Kee, Sidorova, Hanif, & Perera, 2012)

É conhecida a ocorrência de alterações no sistema imune de pacientes que sofrem de DP e outras desordens neurodegenerativas, entre elas, mudança na população de linfócitos do sangue e líquido cefalorraquidiano, síntese de imunoglobulinas, citocinas e proteínas de fase aguda. (Czlonkowska, Kurkowska-Jastrzebska, Czlonkowski, Peter, & Stefano, 2002) Em regiões danificadas no SNC existem evidências de inflamação caracterizadas pela reação glial, especialmente da microglia, bem como um aumento da expressão dos receptores de antígenos do tipo HLA, citocinas e componentes do sistema complemento. Sem contar que a análise post-mortem da SNPC mostra que a degeneração dopaminérgica se correlaciona com um aumento de células microgliais ativadas. (McGeer, Itagaki, Akiyama, & McGeer, 1988) Estas observações sugerem que a microglia está envolvida na progressão da DP, uma vez que a resposta inflamatória iniciada por lesão neuronal em células primárias dopaminérgicas na SNPC é caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1 β) e indução do estresse oxidativo e que, portanto, pode agravar o curso da doença. As observações também sugerem que o uso de agentes anti-inflamatórios possa inibir a progressão desta enfermidade. (Peterson & Flood, 2012)

Outras evidências do envolvimento da neuroinflamação na patogênese da DP é o fato de que neurotoxinas usadas para induzir modelos para estudos pré-clínicos são capazes não só de “seletivamente” degenerar o sistema dopaminérgico, como também de induzir resposta neuroinflamatória. As mais utilizadas são neurotoxinas exógenas, como 6-hidroxidopamina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e rotenona, que têm em comum a indução de disfunção mitocondrial por inibição do complexo I, estresse oxidativo e neuroinflamação. (Aguiar et al., 2014; Aguiar et al., 2013; Ahmad, Maruyama, Narumiya, & Doré, 2013; Anandhan, Essa, & Manivasagam, 2013; Archer & Fredriksson, 2013; Cabezas, Avila, González, El-Bachá, & Barreto, 2014; Choi et al., 2015b; Choi, Kim, & Xia, 2015; Del-Bel et al., 2014; Elmassri et al., 2016; Gołembiowska & Dziubina, 2012; Huang et al., 2013; Jantas et al., 2013; Kadar et al., 2014; Lao, Kuo, Hsieh, & Chen, 2013; Lopes et al., 2012; Masoudi, Ibanez-Cruceyra, Offenburger, Holmes, & Gartner,

2014; Murakami, Miyazaki, Sogawa, Miyoshi, & Asanuma, 2014; Palencia et al., 2015; Qualls, Brown, Ramlochansingh, Hurley, & Tizabi, 2014; Renaud, Chiasson, Bournival, Rouillard, Martinoli, 2014; Segura-Aguilar & Kostrzewa, 2015; Segura-Aguilar & Paris, 2014; Tolosa, Zhou, Spittau, & Krieglstein, 2013; Tristão et al., 2014; Villa et al., 2013; Wei et al., 2014; Wong et al., 2013; Zaminelli et al., 2014)

O aminocromo, uma neurotoxina endógena, foi proposto para ser um modelo pré-clínico mais fisiológico para DP, uma vez que este é um produto da oxidação da dopamina e o precursor de neuromelanina, que por sua vez caracteriza os neurônios envolvidos na degeneração em substância nigra. Além disso, o aminocromo está envolvido diretamente na formação e estabilização de oligômero neurotóxico da alfa-sinucleína, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, disfunção de ambos os sistemas proteossoma e do lisossomo para a degradação de proteínas e estresse em retículo endoplasmático. (Dibenedetto, Rossetti, Caliandro, & Carloni, 2013; Muñoz et al., 2015; Norris et al., 2005; Aguirre et al., 2012; Arriagada et al., 2004; Briceño et al., 2015; Cuevas et al., 2015; Huenchuguala et al., 2014; Muñoz, Paris, Sanders, Greenamyre, & Segura-Aguilar, 2012a; Muñoz, Huenchuguala, Paris, & Segura-Aguilar, 2012b; Paris et al., 2011; Segura-Aguilar & Kostrzewa, 2015; Xiong, & Siegel, Ross, 2014; Zafar, Siegel, & Ross, 2006; Zhou & Lim 2009) No entanto, pouco se sabe sobre sua ação direta em tipos celulares responsáveis pela resposta neuroinflamatória do SNC.

Recentes estudos desenvolvidos pelo grupo de Neurofarmacologia da Universidade do Chile evidenciaram que células de linhagem tumorais de origem astrocítica (U373MG) apresetaram morte celular com envolvimento de autofagia e disfunção lisossomal ao serem expostas diretamente ao aminocromo, e que o silenciamento de genes que codificam a enzima Glutathione Transferase mu 2 (GSTM2) nestas células amplificam a toxicidade, sugerindo que esta é uma enzima protetora contra a neurotoxina endógena. (Huenchuguala et al., 2014) Ainda, foi demonstrado em estudos posteriores que esta linhagem é capaz de aumentar a excreção de GSTM2 em meio condicionado, quando estimulada pela exposição ao aminocromo, e que o meio condicionado contendo GSTM2 solúvel é potencialmente protetor contra morte de células de linhagem neuronal (SHSY-5Y) induzida por aminocromo. (Cuevas et al., 2015)

O LabNq da Universidade Federal da Bahia vem se dedicando a estudar a ação tóxica do aminocromo em células gliais, com vistas na neuroinflamação, usando como modelos biológicos de estudo culturas de células gliais isoladas de diferentes regiões do SNC de ratos, ou cultivadas em conjunto com neurônios mesencefálicos. Estes estudos têm revelado que tanto células da microglia, quanto astrócitos sofrem consequências do efeito do aminocromo no SNC, sendo alvos da neurotoxina e respondem com a ativação de neuroinflamação. (Santos et al., 2017; Araújo et al., 2018)

Não apenas a dopamina, ou melhor, o composto derivado da sua oxidação, aminocromo, representa as neurotoxinas endógenas envolvidas na patogênese da enfermidade de Parkinson. Também há evidências que relacionam a excitotoxicidade induzida pelo glutamato, como integrante da patogênese da DP. O glutamato é o transmissor excitatório predominante no gânglio da base, que é a sede dos déficits motores observados em DP. (Greenamyre & Porter, 1994) Além de enviar projeções glutamatérgicas para o estriado, o córtex também envia projeções para o núcleo subtalâmico (STN), tálamo, e substância Nigra Pars Compacta (SNPC), em adição a outros núcleos do tronco cerebral e da medula espinhal. (Albin, Young, & Penney, 1989) A SNPC recebe inervações glutamatérgicas do STN, que exercem uma importante função reguladora dos gânglios da base no disparo padrão de certas vias glutamatérgicas retroalimentar por consequência da depleção de dopamina na DP. (Wichmann & DeLong, 1993) Mais notavelmente, a redução na mensagem dopaminérgica a ser enviada para o estriado resulta em um aumento de atividade da STN, causando um aumento na liberação de glutamato para os corpos celulares dopaminérgicos localizados na SNPC, que são ricos em receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-Asparato (NMDA) e AMPA, bem como mGluR1 e mGluR2/3. (Rodriguez et al., 1998) Assim, o aumento sustentado do glutamato, liberado para uma já comprometida população de células dopaminérgicas, desencadeia uma cascata excitotóxica que potencializa a neurodegeneração na Doença de Parkinson. (Caudle & Zhang, 2009)

Esclerose múltipla

A sintomatologia característica da esclerose múltipla (EM) é descrita desde o século XIV. (Kumar, Aslinia, Yale, & Mazza, 2011) No entanto, poucos discordariam que o seu estudo mais aprofundado começou nas últimas três décadas do século XIX com Jean-Martin Charcot (1825-1893). Charcot, trabalhando no Hospital Salpêtrière em Paris atendeu uma mulher jovem cujos sintomas eram tremor, fala arrastada e nistagmo (posteriormente conhecida como tríade de Charcot). No exame post-mortem da paciente, Charcot pôde observar perda de mielina e lesões semelhantes a escleras disseminadas, consequentes da morte de neurônios tanto nos ventrículos e hemisférios cerebrais, como na medula espinhal, as quais chamou “sclérose en plaque” (Compston et al., 2006; Pearce, 2005; Orrell, 2005) podendo assim estabelecer a primeira visão sobre a fisiopatologia da EM, e distinguindo-a de outros transtornos do sistema nervoso, incluindo os da neurosífilis. (Kumar, Aslinia, Yale, & Mazza, 2011)

Atualmente a EM é definida como uma doença complexa, multifacetada, inflamatória/autoimune de etiologia desconhecida e incurável, que afeta o cérebro e a medula espinhal, cuja principal característica fisiopatológica é a formação de placas desmielinizantes no SNC. (Compston & Coles, 2008; Lassmann, Bruck, & Lucchinetti, 2007) Muito embora o diagnóstico de doença desmielinizante seja somente confirmado em seu estágio final, resultante de vários processos patológicos que incluem, embora não necessariamente nesta ordem: a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), inflamação multifocal, desmielinização, remielinização, perda e depleção de oligodendrócitos, gliose reativa e degenerescência axonal e neuronal. (Compston & Coles, 2008; Lassmann, et al., 2007; Dutta et al., 2006)

A disfunção da BHE tem sido descrita há muito tempo como um elemento-chave da progressão de várias doenças do SNC. Provavelmente isto esteja relacionado à exposição do microambiente cerebral a agentes potencialmente nocivos, podendo resultar em uma perda da homeostase, comprometimento na sinalização neuronal e morte celular. Na esclerose múltipla (EM) a neuroinflamação elicit a liberação de citocinas/quimiocinas inflamatórias, e que por mecanismos não completamente compreendidos, permeia a entrada de linfócitos ativados e

macrófagos responsivos a lesão/patógeno, podendo desencadear uma resposta autoimune, como a própria EM. (Weiss, Miller, Cazaubon, & Couraud, 2009)

A principal função dos oligodendrócitos é a formação de mielina, que é uma estrutura formada por uma membrana lipídica rica em glicofosfolipídeos e colesterol, e atua como um isolante de segmentos axonais, sendo fundamental para que haja a condução nervosa de alta velocidade. (Hartline, 2008: Fields, 2008)

Os oligodendrócitos são encontrados, em maior número, na substância branca, ligados à mielina. No entanto, para o menor número de oligodendrócitos encontrados na massa cinzenta, em especial os que não estão ligados à mielina, suas funções até agora são desconhecidas. Possivelmente, há alguma atividade de regulação da homeostase iônica compartilhada com os astrócitos. (Hartline, 2008: Fields, 2008)

Já os oligodendrócitos formadores de mielina têm vários processos (até 40), que se conectam a um segmento de mielina. Cada um destes segmentos tem várias centenas de micrômetros de comprimento e é também denominado entrenó. Os segmentos são interrompidos por estruturas conhecidas como nó de Ranvier, que se estende por pelo menos 1 micron. No nó, em comparação com a região internodal, o axônio não é envolto por mielina. O final do segmento intermodal contém mais citoplasma e formas chamadas de laço paranodal, criando junções axônio-like septadas. Além disso, os processos de astrócitos também estão em contato com a membrana axonal na região nodal. (Hartline, 2008: Fields, 2008)

Os modelos animais são necessários para esclarecer os mecanismos imunopatológicos subjacentes e testar abordagens de novas técnicas terapêuticas. No entanto, por se tratar de uma patologia multifacetada, não é possível estabelecer para a EM um modelo único. Nenhum modelo é capaz de mimetizar adequadamente todas as características clínicas, radiológicas, patológicas e genéticas de EM. Portanto, atualmente três grandes categorias são mais comumente utilizadas para mimetizar a EM: 1. O modelo da encefalomielite alérgica experimental (EAE), puramente alérgico; 2. Os modelos de doenças desmielinizantes crônicas induzidas pelo vírus, especialmente de encefalomielite pelo vírus de Theiler (TMEV); e 3. Os modelos induzidos por toxina de desmielinização, incluindo o modelo cuprizona, e desmielinização focal induzida

pela colina liso-fosfatidilcolina. No entanto, o EAE é o mais amplamente utilizado para compreensão geral do perfil neuroinflamatório no SNC da EM. Além disso, o modelo EAE foi utilizado no desenvolvimento de três medicamentos aprovados para o tratamento de esclerose múltipla: acetato de glatirâmero, mitoxantrona e natalizumabe. Por outro lado, numerosas abordagens terapêuticas que demonstraram resultados promissores para a EAE mostraram ser ineficazes ou, em alguns casos, nocivos para EM. (Denic et al., 2011)

A EM pode ser considerada uma das mais importantes doenças neurológicas não-traumáticas, em virtude de sua frequência (cerca de dois milhões de pessoas em todo o mundo), cronicidade e tendência em afetar adultos jovens. Muito embora provavelmente envolva uma combinação de fatores genéticos e ambientais, e possua estratégias terapêuticas para seu tratamento, incluindo drogas imunomoduladoras, nenhum fármaco é claramente eficaz para evitar o progresso da sintomatologia da EM, que é em longo prazo incapacitante. (Compston & Coles, 2008; Ropper & Brown, 2005)

Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH) é o distúrbio neurológico monogênico mais comum no mundo desenvolvido. É uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante causada por uma expansão de trinucleotídeos códon lipídacid (CAG) presente no cromossomo 4 do gene HTT (ID 3064), o qual codifica uma proteína denominada Huntingtina (Htt) que na DH encontra-se mutada. Indivíduos normais apresentam alelos que podem variar de 8 a 35 unidades de CAG, enquanto os indivíduos afetados pela DH possuem alelos com mais de 40 unidades CAG. (Laks et al., 2004)

O primeiro relato da DH foi por intermédio de uma carta de Charles Oscar Waters, publicada em 1842 na primeira edição da *Practice of Medicine* com fortes indícios de transmissão hereditária. No entanto, em 1872, George Huntington, ao examinar o histórico clínico de uma família com sintomas semelhantes, ao longo de várias gerações, demonstrou o padrão de herança autossômica dominante da DH, bem como os sinais e sintomas clínicos prevalentes nos portadores. (Gonçalves, 2013)

A neurodegeneração presente na DH afeta inicialmente o corpo estriado, região responsável pelo controle dos movimentos, humor e funções cognitivas superiores, e posteriormente, o córtex e o hipocampo. O diagnóstico pode ser realizado por meio de testes genéticos, ou baseado na sintomatologia clínica do indivíduo afetado associada ao histórico familiar. A prevalência da doença varia de 4 a 10 casos por 100.000 pessoas, em diferentes partes do mundo. Nos EUA, a prevalência é de 4,1 a 7,5 casos em 100.000 indivíduos. A progressão da doença, entre o início dos sintomas até a morte do paciente, é de 15 a 20 anos em adultos, e de 8 a 10 anos na variante juvenil. (Rada, 2008)

As manifestações clínicas incluem sintomas cognitivos, psiquiátricos e motores. Movimentos involuntários, arrítmicos, aleatórios, “tipo dança”, denominados de movimentos coreicos, constituem-se como uma das manifestações clínicas mais comuns na DH. (Chakraborty et al., 2014)

Os agregados de proteína mutante (MHTT) no tecido cerebral, denominados de corpos de inclusão, promovem a perda de neurônios por meio de mecanismos que ainda não foram completamente elucidados, mas que envolvem a falha na transcrição gênica. Dentre os mecanismos implicados nesta falha, estão: modificações nas histonas, imparidade do fator de transcrição e expressão aberrante de miRNA (Mastrokolias et al., 2015) Estudos demonstram o envolvimento da Htt na ancoragem do citoesqueleto e transporte de mitocôndrias em paralelo ao tráfego de vesículas que medeiam a endocitose, implicando assim, na embriogênese e desenvolvimento. A participação ativa da Htt no desenvolvimento e manutenção do cérebro ilustra sua importância no SNC. (Orr et al., 2008)

Muitas hipóteses têm sido relatadas para explicar a perda local e progressiva de neurônios, como a toxicidade dopamínica (DA), desequilíbrio de cálcio, estresse oxidativo e excitotoxicidade do glutamato. Níveis elevados de DA, por exemplo, podem promover morte seletiva de neurônios gabaérgicos, aumentar a formação de agregados e causar perda precoce da atividade locomotora de transportadores da DA em modelos de DH utilizando camundongos-nocaute. (Cyr et al., 2003)

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desempenham um papel significativo na neurodegeneração. O estresse

oxidativo é considerado como um dos principais eventos deletérios observados em muitos estudos clínicos e experimentais em modelos de DH. O aumento do estresse oxidativo é atribuído a alterações nas defesas do sistema antioxidante que inclui a peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes. (Mehrotra & Sandhir, 2014)

Crescentes evidências indicam que a neuroinflamação crônica tem uma função crítica na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas. Estudos neuropatológicos indicam que as respostas neuroinflamatórias podem começar antes de uma perda significativa de populações neuronais. Embora não haja evidências que apontem para uma citocina em particular no desencadeamento direto de condições neurodegenerativas, a progressão destas desordens geralmente está associada a uma resposta inflamatória crônica que normalmente está diretamente relacionada à cascata de morte neuronal. (McMenamin & Wood, 2010)

A neuropatologia da DH é caracterizada pela atrofia cerebral e perda neuronal, predominantemente no corpo estriado e, em menor grau, no córtex. Além disso, agregados proteicos que contêm fragmentos de poliglutamina (poliA) mHtt N-terminais se acumulam nos neurônios afetados. A biologia da Htt normal e mutante permanece complexa e pouco esclarecida. A Htt está presente em quase todos os tipos de células e em muitos compartimentos subcelulares, e interage com várias centenas de proteínas cerebrais em redes moleculares distintas. (Daggett & Yang, 2013)

Injúrias ao sistema nervoso central culminam com ativação de células existentes no microambiente, dentre as quais se destaca a microglia. (Kim & Vellis, 2005; Wang, Chen, Ma, Ye, & Lu, 2005) No cérebro normal, as células microgliais estão em um estado de quiescência. A barreira hemato-encefálica (BHE) protege o cérebro das células imunes circulantes, como células dendríticas, e outros agentes patogênicos e materiais estranhos. No entanto, no cérebro de indivíduos com DH, o dano neuronal causado por agregados de mHtt ativa as células microgliais e, conseqüentemente, leva à fagocitose dos debris celulares e à secreção de citocinas pró-inflamatórias, que levam à neuroinflamação. Esta neuroinflamação enfraquece a BHE levando à infiltração de células dendríticas, que exacerbam a resposta imune. (Nayak, Ansar, Verma, Bonifati, & Kishore, 2011)

Na maioria das doenças neurodegenerativas, uma resposta imunitária para o dobramento anormal de proteínas e a formação de agregados desencadeia neuroinflamação e está implicada na degeneração neuronal. Na DH, similarmente às outras desordens neurodegenerativas, agregados de mHtt e atrofia neostriatal são observados. Os agregados de mHtt são corpos estranhos e as células microgлияis são susceptíveis a reconhecê-los. É também possível que os agregados proteicos promovam morte neuronal por apoptose e os corpos apoptóticos produzidos possam ativar o sistema imune inato do SNC. A progressão de DH, portanto, está associada à ativação da microglia no corpo estriado como resultado da agregação de mHtt e disfunção neuronal precoce, incluindo elevada patogenicidade a sinalização do receptor NMDA extra sináptico, reduzida conectividade sináptica, e redução do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). (Nayak, 2011)

Potencial de ação farmacológica dos flavonoides como moduladores da neuroinflamação e agentes neuroprotetores em doenças neurodegenerativa.

As terapias atuais aplicadas a pacientes com doenças neurodegenerativas são sintomáticas e não diminuem ou param a degeneração neuronal. Portanto, as terapias com outros produtos que exibem propriedades farmacológicas, como agentes anti-inflamatórios, podem ser consideradas para inibir a progressão e, potencialmente, a prevenção e/ou tratamento destas enfermidades. (Antonini, Tolosa, Mizuno, Yamamoto, & Poewe, 2009; Chen et al., 2006; Schapira 2005; Smith, Wichmann, Factor, & Delong, 2012)

Neste contexto, a pesquisa de compostos com potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas tem sido direcionada para a investigação de substâncias capazes de exibir atividade anti-inflamatória e anti-oxidante no SNC. Várias substâncias são descritas na literatura, a fim de avaliar o seu potencial e, então, serem utilizadas para facilitar a gestão destas doenças, dentre as quais um grupo de substâncias que têm suscitado muita atenção por parte da comunidade científica, conhecida como flavonoides. (Jones, Warfrod, Rupasinghe, &

Robertson, 2012; Magalingam, Radhakrishnan, & Halegrahara, 2015; Solanki, Parihar, Mansuri, & Parihar, 2015)

Os flavonoides são compostos fenólicos derivados de várias plantas, cuja estrutura básica é composta por 15 átomos de carbono dispostos em três anéis, dos quais dois são anéis aromáticos ligados por meio de um anel heterocíclico oxigenado. (Johnston, Stern, & Walss, 1968; Kumar & Pandey, 2013)

Devido ao fato de serem encontrados em frutas, nozes, sementes, ervas, especiarias, (Terahara, 2015) flores, bem como chá e vinho tinto, estes são regularmente consumidos na dieta humana, o que pode gerar benefícios para a saúde cerebral, uma vez que estudos sugerem correlação entre o consumo de flavonoides e baixos níveis de demência, tal qual melhoria de várias condições patológicas neuronais, além de benefícios para o processo de aprendizagem e memória. (Andrade & Assunção, 2012)

O aparecimento de flavonoides no plasma e conseqüentemente no sangue é a principal evidência para a hipótese de que estes compostos podem chegar ao cérebro. Na verdade, os flavonoides já foram detectados no plasma de voluntários humanos após a ingestão de bebidas ou alimentos ricos destes compostos. (Mullen, Borges, Lean, Roberts, & Crozier, 2010) Estudos indicam diferentes graus de permeabilidade destas substâncias por meio da BHE, a depender do seu arranjo estrutural, o que estimula a investigação do potencial terapêutico destes compostos para distúrbios do sistema nervoso central, dentre eles a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a Esclerose Múltipla e a doença de Huntington. (Youdim et al., 2003; Youdim, Shukitt-Hale, & Joseph, 2004)

Flavonoides com potenciais farmacológicos para a Doença de Alzheimer

No início dos anos 90, começaram a surgir estudos relacionando o processo inflamatório com a Doença de Alzheimer. A partir de então, estudos demonstraram que certas citocinas pró-inflamatórias estavam elevadas em pacientes com a DA e que indivíduos com artrite apresentavam uma baixa prevalência da DA, com posterior associação negativa ao uso crônico de drogas anti-inflamatórias. A partir deste e

de outros estudos, medicamentos anti-inflamatórios começaram a ser introduzidos como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da Doença de Alzheimer. Atualmente, vários estudos epidemiológicos, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, bem como ensaios clínicos, têm sido desenvolvidos para elucidar a relação entre moduladores da inflamação e a DA.

Estudos vêm demonstrando que diversos compostos flavonoides, por exemplo a naringina, uma flavanona glicosilada encontrada em toranjas e frutas cítricas, apresentam efeitos farmacológicos promissores contra processos envolvidos na neurodegeneração da DA, como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos realizados por Sachdeva, Kuhad e Chopra (2014) demonstraram que o tratamento crônico com naringina restaura de maneira dose-dependente os déficits cognitivos em um modelo animal da DA com atenuação da disfunção mitocondrial mediada por estresse oxidativo e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Outro flavonoide com propriedades biológicas promissoras é a quercetina, presente em diversos alimentos vegetais, que tem demonstrado um potencial protetor contra danos oxidativos por atenuar a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em culturas de células gliais. (Kabadere, Oztopcu-Vatan, Uyar, & Durmaz, 2011) De fato, a atividade antioxidante e o potencial neuroprotetor da quercetina foram ligados às suas características estruturais, mais precisamente pela quantidade de grupos hidroxilas presentes nos seus anéis fenólicos. Estudos utilizando um modelo triplo transgênico murino da Doença de Alzheimer (3xTg-AD) demonstraram que a quercetina diminui a deposição de placas neuríticas amilóides, e reduz a astrogliose e a ativação de microglia no hipocampo e na amígdala. (Sabogal-Guáqueta et al., 2015)

Além da quercetina, a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), que estruturalmente representa a sua forma glicosilada – amplamente encontrada em *Dimorphandra mollis* Bent, planta do semi-árido da Bahia, Brasil – também apresenta potencial neuroprotetor contra a DA. Por exemplo, num modelo murino de Doença de Alzheimer realizado por Choi et al. (2015a) no qual animais que receberam administração de A β para induzir uma redução no processo cognitivo e memória, foi visualizado que estes sintomas foram amenizados pela administração de

rutina. Neste estudo foi demonstrado também que a rutina reduziu a formação de óxido nítrico e a peroxidação lipídica no cérebro, fígado e rins destes animais. Em outro estudo, utilizando um modelo transgênico murino da Doença de Alzheimer (APP^{swe}/PS1^{dE9}), foi demonstrado que rutina administrada oralmente atenuou significativamente os déficits de memória, diminuiu os níveis de oligômeros de A β e aumentou os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) e a razão de glutatona (GSH)/glutatona dissulfeto (GSSG), reduzindo os níveis de GSSG e de malondialdeído. (Xu et al., 2014)

Além da atividade antioxidante, a rutina tem demonstrado propriedade em modular a ativação microglial para um perfil de resposta M1, induzindo uma diminuição nos níveis de ARNm de TNF, IL1 β , IL6 e iNOS, e a produção de IL6, TNF e óxido nítrico, aumentando a produção da citocina reguladora de IL10 e arginase. A rutina também inibe a expressão induzida por LPS de ARNm de PTGS2, IL18 e TGF β . (Bispo da Silva et al., 2017)

Outros flavonoides de interessante ação contra a DA são a apigenina e a bis-apigenina (agathisflavona). A apigenina é um flavonoide que existe em abundância em frutas e legumes, como aipo, salsa, camomila, laranja, brotos de trigo, cebola e alguns temperos, e tem sido usada há séculos na medicina alternativa, como Passiflora, conhecida popularmente como flor da paixão, para o tratamento de asma, insônia, Doença de Parkinson e neuralgia. Passiflora contém altos níveis deste flavonoide. Os benefícios da apigenina para a saúde têm sido relatados em estudos recentes que descrevem atividade antioxidante, anti-tumoral, anti-inflamatória e um potente inibidor de diversas cinases, dentre elas PI3K e MAPK (Chao, Huang, Dan-Ning, & Lin, 2013; Ju et al., 2015; Zang, Fangcai, & Gang, 2014) No sistema nervoso, a apigenina foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias geradas por monócitos, macrófagos e particularmente pela microglia. Evidências têm demonstrado que a apigenina é capaz de proteger neurônios contra a toxicidade mediada por A β induzida pelo cobre, que foi caracterizada pelo aumento da viabilidade neuronal. (Rezai-Zadeh et al., 2008). Além disso, estudos de Souza et al. (2015) realizados no laboratório Nacional de Células Tronco da UFRJ, em colaboração com o LabNq da UFBA, demonstraram que o flavonoide apigenina foi capaz de induzir neurogênese em células-tronco pluripotentes humanas. Neste estudo,

eles demonstraram que a apigenina induz diferenciação neural em células-tronco embrionárias – do inglês embryonic stem cells (ESC) – e células-tronco de pluripotência induzida – do inglês induced pluripotent stem cells (IPSC) – humanas por meio de receptores de estrogênio. Eles observaram também que a apigenina promoveu a sinaptogênese e reduziu a morte celular.

Uma classe específica de flavonoides são os biflavonoides. Estes compostos são constituídos por uma combinação de dímeros flavonal-flavona, flavona-flavona e flavona-flavanol. Esta classe de flavonoides apresenta atividades farmacológicas diversas, como atividade antimicrobiana, anti-alérgica, anti-inflamatória, hepatoprotetora e anti-oxidante, sendo encontrada numa grande variedade de espécies de plantas. (Jamila, Khan, & Khan, 2014) A bis-apigenina, um biflavonoide produto do acoplamento oxidativo de duas apigeninas, está se tornando mais popular em pesquisas biomédicas, devido ao seu potencial farmacológico. Em estudo realizado por Thapa et al. (2011) relataram que este flavonoide inibiu eficazmente a toxicidade do peptídeo beta amiloide – e a sua fibrilogênese em modelos in vitro da Doença de Alzheimer, neste estudo, eles observaram que a bis-apigenina foi mais eficaz em comparação com o monômero de apigenina. Estes dados aumentam o interesse no estudo deste composto em modelos de doenças neurodegenerativas.

Estudos realizados pelo grupo do LabNq do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA, em colaboração com o Instituto de Química da mesma instituição (nas figuras de Dr. Jorge David e Dra. Juceni David), vêm utilizando como modelo co-culturas de neurônios e células gliais, e demonstraram pela primeira vez que o flavonoide agatisflavona (bis-apigenina), isolado a partir da planta regional *Caesalpinia pyramidalis*, induz neurogênese (nascimento de novos neurônios), via ativação de receptores de estrogênio. Este flavonoide também foi capaz de proteger os neurônios contra a excitotoxicidade induzida por glutamato, por meio da redução da ativação microglial, da expressão de citocinas pro-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e IL-6) e pelo aumento de marcadores regulatórios (IL-10, arginase 1). Em astrócitos a agatisflavona promoveu um aumento na expressão do transportador de aminoácidos excitatórios 1 – em inglês, excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) – e da enzima glutamina sintetase. Adicionalmente, a agatisflavona promoveu o aumento na expressão das neurotrofinas (NT)

BDNF, NT4, NGF e GDNF. (Souza et al., 2018) As NT são uma família de proteínas que induzem a sobrevivência, o desenvolvimento e a função dos neurônios. Outro estudo realizado no Laboratório Nacional de Células-tronco (LaNCE) da UFRJ, em colaboração com o LabNq da UFBA, demonstrou que a agatisflavona foi capaz de potencializar a neurogênese induzida pelo ácido retinóico a aumentar a expressão dos receptores de ácido retinóico RAR α e RAR β em células-tronco pluripotentes murinas (ESC e iPSC). Neste estudo, eles também demonstraram que a agatisflavona protege neurônios da morte celular. (Paulsen et al., 2011) Muitos estudos mostraram que o estresse oxidativo seguido de inflamação pode ser a principal causa por trás da neurodegeneração observada na Doença de Alzheimer. Devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e neurogênico, os flavonoides apresentam-se como uma alternativa interessante para o tratamento da DA, contudo, muitos estudos ainda precisam ser realizados a fim de avaliar o potencial, isolado ou em associação destas moléculas.

Flavonoides com potenciais farmacológicos para a Doença de Parkinson

Alguns flavonoides têm sido revelados como agentes imunomoduladores e neuroprotetores contra distintos modelos de estudo de Doença de Parkinson, a exemplo da silibinina, principal componente da silymarina, que é um complexo de flavonolignanas derivado das sementes da planta *Silybum marianum* e também encontrado na *Cynara cardunculus*. A silibinina demonstrou ter melhorado efeitos motores induzidos por 6-OHDA em ratos, mediante a diminuição do nível da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β) e diminuição de peroxidação lipídica (Haddadi, Nayebi, Farajniya, Brooshghalan, & Sharifi, 2014), assim como atenuar a neurodegeneração em substância nigra e o nível de moléculas inflamatórias, como IL-1 β , óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), induzidos em ratos pela neurotoxina derivada de MPTP, a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺). (Jung, Jeon, Choi, & Kim, 2014)

Assim como a silibinina, a baicaleína (5, 6, 7-trihydroxyflavone), um flavonoide isolado a partir das raízes de *Scutellaria baicalensis*, foi capaz de inibir a regulação positiva das citocinas IL-1 β e TNF α na

substância nigra e corpo estriado em animais tratados com MPTP (Xue et al., 2014), além de melhorar a capacidade motora em animais expostos a esta neurotoxina e inibir a ativação da microglia e astrócitos. (Lee, Park, Ji, Lee, Lee, 2014)

A rutina tem estado sob investigação farmacológica por sua ação ativadora de vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que resulta em neuroproteção contra a apoptose, assim como atividade indutora de sobrevivência de células da crista neural por mecanismos moleculares dependentes de ERK2 e PI3K. (Wang et al., 2014; Nones, Costa, Leal, Gomes, & Trentin, 2012) Além de receber destaque por seu potencial farmacológico em modelos de estudo direcionados para a doença de Alzheimer, conforme mencionado em item anterior, também vem se destacando em estudos que utilizam modelos da doença de Parkinson – a exemplo dos estudos realizados por Magalingam, Radhakrishnan, e Halegrahara (2013), que demonstraram que a rutina inibe a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células tumorais de origem neuronal (linhagem PC-12) por meio do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes e modulação de genes múltiplos de proteção, em especial por meio da supressão de Park2, Park5, Park7, CASP3 e CASP7.

O LabNq tem desenvolvido pesquisas em colaboração com o Laboratório de Química Médica e Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia (Dr. Eudes Velozo), também da Universidade Federal da Bahia, que demonstram que a rutina extraída de sementes da *Dimorphandramollis* modula a ativação da microglia e astrócitos, e regula a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a liberação de óxido nítrico (NO) em culturas de células gliais primários de córtex de ratos. (Silva et al., 2008) Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a rutina protege neurônios mesencefálicos e células gliais de danos celulares induzidos por aminocromo. (Santos et al., 2015)

Outros estudos desenvolvidos no LabNq que visam estudar a ação antiparkinsoniana de flavonoides têm como objeto de estudo a apigenina. Este flavonoide de destacável ação anti-inflamatória e neuroprotetora contra excitotoxicidade glutamatérgica, conforme descrito em itens anteriores, apresenta-se como um agente promissor contra a progressão da degeneração dopaminérgica característica da DP e também

vem sendo investigado frente a danos mesencefálicos induzidos pelo aminocromo.

Flavonoides com potenciais farmacológicos para a Esclerose Múltipla

Muitos trabalhos científicos investigam a ação de produtos naturais e suas possíveis atividades imunomoduladoras na EM. Algumas dessas drogas têm sido consideradas extremamente promissoras nessa área, dentre elas o canabidiol (CBD), um dos mais de 80 constituintes da Cannabis sativa, que não apresenta efeitos psicoativos e parece possuir propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras. Estudos preliminares mostram que esta planta possui moléculas capazes de atenuar sintomas da EM como os da espasticidade e tremor. Entretanto, por se tratar de uma planta de uso não aprovado em muitos países por seus efeitos psicoativos, muitos outros trabalhos científicos buscam demonstrar a atividade terapêutica de outros compostos bioativos de plantas em modelos celulares e animais que mimetizam a EM. (Zajicek et al., 2003)

Estudos desenvolvidos pelo LabNq em colaboração com o grupo de Neuroimunologia do Instituto Cajal em Madri (Dr. Carmen Guaza) vêm avaliando o papel imunomodulatório de dois flavonoides rutina e quercetina em modelos animais de Esclerose Múltipla, encefalomielite alérgica experimental (EAE) e encefalomielite pelo vírus de Theiler (TMEV). Resultados preliminares têm demonstrado que estes compostos fenólicos possuem a propriedade de reduzir a população de células gliais com perfil inflamatório no sistema nervoso central, e ainda, que a rutina é efetiva na redução da incapacidade neurológica promovida o modelo de EAE, observada pelo atraso na sintomatologia, redução na progressão da gravidade e duração da EAE. Além disso, esse trabalho vem demonstrando que os animais tratados com rutina não apresentaram infiltração celular linfocitária característica na EAE e menor ativação microglial, ao passo que os animais tratados com quercetina apresentaram menor remissão dos sintomas da EM, e baixos níveis de infiltrados celulares no SNC.

Esses dados preliminares sugerem que a rutina demonstra respostas anti-inflamatórias no modelo EAE, podendo ser considerada como potencial adjuvante terapêutico para doenças desmielinizantes do SNC.

Flavonoides com potenciais farmacológicos para a Doença de Huntington

Poucos relatos revelam efeitos farmacológicos de flavonoides em modelos de estudo específicos da Doença de Huntington. Um exemplo destes foi o trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2015), que analisou o efeito protetor de luteolina, ou derivados de luteolina, sobre células do estriado de camundongos DH knock-in, expressando Httmutante versus **células do estriado do tipo selvagem. As células DH demonstraram aumento da caspase-3** clivada e de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS), que foram reduzidas após o tratamento com Lut-C4 e Lut-C6, sob concentrações que se apresentaram neuroprotetoras. Os resultados apresentados neste estudo indicaram que aluteolina Lut-C6, especialmente, pode exercer importante papel para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra o estresse oxidativo existente na DH e em outras desordens neurodegenerativas.

Considerações finais

Flavonoides e nutracêuticos têm sido utilizados como suplementos alimentares para a prevenção de doenças neurodegenerativas e para melhorar a função cognitiva em seres humanos desde os tempos antigos. Muitos estudos mostraram que a inflamação pode ser uma das principais causas da neurodegeneração em doenças do SNC. Neste contexto, estratégias neuroprotetoras seriam promissoras, não só para reduzir a progressão da neurodegeneração, mas também para recuperar o indivíduo da condição da doença. E compostos naturais com potencial imunomodulador podem representar parte de uma nova geração de drogas bioativas com potencial farmacológico para proteger e melhorar a função cerebral em várias doenças neurodegenerativas.

O LabNq, com o Programa de Pós-Graduação em Imunologia do ICS da UFBA, vem desenvolvendo estudos esclarecedores sobre o potencial farmacológico via efeitos imunomodulatórios e neuroprotetores

de flavonoides presentes em espécies vegetais regionais. Esses estudos devem ser continuados, com a perspectiva de surgimento de novos fármacos voltados para doenças de caráter neurodegenerativo que envolvem a resposta neuroimune como parte da sua patogênese.

Referências

- Aguiar Jr., A. S., Tristão, F. S., Amar, M., Chevarin, C., Lanfumey, L., Mongeau, R., et al. (2013). Parkin-knockout mice did not display increased vulnerability to intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurotoxicity Research*, 24(2), 280-287.
- Aguiar Jr., A. S., Tristão, F. S., Amar, M., Chevarin, C., Glaser, V., De Paula M. R., et al. (2014). Six weeks of voluntary exercise don't protect C57BL/6 mice against neurotoxicity of MPTP and MPP (+). *Neurotoxicity Research*, 25(2), 147-152.
- Aguirre, P., Urrutia, P., Tapia, V., Villa, M., Paris, I., Segura-Aguilar, J., et al. (2012). The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. *Biomaterials*, 25(4), 795-803.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- Ahmad, A. S., Maruyama, T., Narumiya, S., & Doré, S. (2013). PGE2 EP1 receptor deletion attenuates 6-OHDA-induced Parkinsonism in mice: old switch, new target. *Neurotoxicity Research*, 23, 260-266.
- Anandhan, A., Essa, M. M., & Manivasagam T. (2013). Therapeutic attenuation of neuroinflammation and apoptosis by black tea theaflavin in chronic MPTP/probenecid model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 23, 166-173.
- Andrade, J., & Assunção, M. (2012). Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. *Current Pharmaceutical Design*, 18(1), 4-14.
- Antonini, A., Tolosa, E., Mizuno, Y., Yamamoto, M., & Poewe, W. (2009). A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 8, 929-937.

- Araújo, F. M., Ferreira, R. S., Souza, C. S., Santos, C. C., Rodrigues, T. L. R. S., Silva, J. H. C., et al. (2018). Aminochrome decreases NGF, GDNF and induces neuroinflammation in organotypic midbrain slice cultures. *NeuroToxicology*, 66, 98-106.
- Archer, T., & Fredriksson, A. (2013). The yeast product Milmed enhances the effect of physical exercise on motor performance and dopamine neurochemistry recovery in MPTP-lesioned mice. *Neurotoxicity Research*, 24(3), 393-406.
- Arriagada, C., Paris, I., Matas, M. J. S., Martinez-Alvarado, P., Cardenas, S., Castañeda, P., et al. (2004). On the neurotoxicity of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived of dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiology of Disease*, 16, 468-477.
- Bispo da Silva, A., Coelho, P. C., Amparo Jr., A. O., Carneiro, M. M. A. A., Borges, J. M. P., Souza, C. S., et al. (2017). The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chemico-Biological Interactions*, 274, 89-99.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Tredici, K. D. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Research*, 318, 121-134.
- Briceño, A., Muñoz, P., Brito, P., Huenchuguala, S., Segura-Aguilar, J., & Paris, I. (2015). Aminochrometoxicity is mediated by inhibition of microtubules polymerization through the formation of adducts with tubulin. *Neurotoxicity Research*, 29, 381-393.
- Cabezas, R., Avila, M. F., González, J., El-Bachá, R., & Barreto, G. E. (2014). PDGF-BB protects mitochondria from rotenone in T98G cells. *Neurotoxicity Research*, 27, 355-367.
- Caudle, M.W., & Zhang, J. (2009). Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Experimental Neurology*, 220(2), 230-233.
- Chakraborty, J., Singh, R., Dutta, D., Naskar, A., Rajamma, U., & Mohanakumar, K. P. (2014). Quercetin improves behavioral deficiencies, restores astrocytes and microglia, and reduces serotonin metabolism in 3-Nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20, 10-19.
- Chao, S., Huang, S., Dan-Ning, H., & Lin, H. Y. (2013). Subtoxic levels of apigenin inhibit expression and secretion of VEGF by uveal melanoma cells via suppression of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-9.

- Chen, J., Tang, X. Q., Zhi, J. L., Cui, Y., Yu, H. M., Tang, E. H., et al. (2006). Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis*, *11*, 943-953.
- Choi, W. S., Kim, H. W., & Xia, Z. (2015). JNK inhibition of VMAT2 contributes to rotenone-induced oxidative stress and dopamine neuron death. *Toxicology*, *328*, 75-81.
- Choi, J. Y., Lee, J. M., Lee, D. G., Cho, S., Yoon, Y. H, Cho, E. J., et al. (2015a). The n-butanol fraction and rutin from Tartary Buckwheat improve cognition and memory in an in vivo model of amyloid- β -induced Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Food*, *18*, 631-641.
- Choi, S. J., Panhelainen, A., Schmitz, Y., Larsen, K. E., Kanter, E., Wu, M., et al. (2015b). Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(11), 6799-6809.
- Compston, A., McDonald I. R., Noseworthy, J., Lassmann, H., Miller, D. H., Smith, K. J., et al. (2006). *McAlpine's multiple sclerosis* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, *372*(9648), 1502-1517.
- Cuevas, C., Huenchuguala, S., Muñoz, P., Villa, M., Paris, I., Mannervik, B., et al. (2015). Glutathione transferase-M2-2 secreted from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cells from aminochrome neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*, *27*, 217-228.
- Cyr, M., Beaulieu, J. M., Laakso, A., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Bohn, L. M., et al. (2003). Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, *100*, 11035-11040.
- Członkowska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I., Członkowski, A., Peter, D., & Stefano, G. B. (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. *Medical Science Monitor*, *8*(8), RA165-177.
- Daggett, A. & Yang, W. (2013). Huntington's disease: easing the NMDAR traffic jam. *Nature Medicine*, *19*(8), 971-973.
- Del-Bel, E., Padovan-Neto, F. E., Szawka, R. E., Da-Silva, C. A., Raisman-Vozari, R., Anselmo-Franci, J., et al. (2014). Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in

6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 35-44.

Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29.

Dibenedetto, D., Rossetti, G., Caliandro, R., & Carloni, P. (2013). A molecular dynamics simulation-based interpretation of nuclear magnetic resonance multidimensional heteronuclear spectra of α -synuclein dopamine adducts. *Biochemistry*, 52, 6672-6683.

Dutta, R., McDonough, J., Yin, X., Peterson, J., Chang, A., Torres, T., et al. (2006). Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*, 59, 478-89.

Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., McLean, P. J. (2012). Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathologica*, 124, 153-172.

Elmassari, N., Johnstone, D. M., Peoples, C. L., Moro, C., Reinhart, F., Torres, N., et al. (2016). The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *The International Journal of Neuroscience*, 126(1), 76-87.

Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Ruitenber, A., Van Swieten, J. C., Hofman, A., Witteman, J., et al. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association*, 287, 3223-3229.

Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO Journal*, 31(14), 3038-3062.

Fields, R. D. (2008). Substância branca. *Mente e Cérebro*, 188, 60-67.

Förstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(6), 288-290.

Frank-Cannon, T., Alto, L., McAlpine, F., & Tansey, M. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration*, 4, 47-60.

Frost, G. R., Yue-Ming, L. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, 7, 170228.

Glass, C., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M., & Gage, F. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934.

- Gołombiowska, K., & Dziubina, A. (2012). Effect of adenosine A(2A) receptor antagonists and L-DOPA on hydroxyl radical, glutamate and dopamine in the striatum of 6-OHDA-treated rats. *Neurotoxicity Research*, 21, 222-230.
- Gonçalves, N. F. C. (2013). *Doença de Huntington: uma revisão*. Dissertação de mestrado não publicada, Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- Greenamyre, J. T., & Porter, R. H. (1994). Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*, 44, 7-13.
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat.II. *Farmacologia*, 56(9), 683-687.
- Haddadi, R., Nayebi, A. M., Farajniya, S., Brooshghalan, S. E., & Sharifi, H. (2014). Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemiparkinsonian rats: behavioral and molecular study. *Daru*, 22, 38.
- Hartline, D. K. What is myelin? (2008). *Neuron Glia Biology*, 4(2), 153-163.
- Hauser, D. N., & Hastings, T. G. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, 51, 35-42.
- Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurology*, 8, 382-397.
- Huang, Y., Xu, J., Liang, M., Hong, X., Suo, H., Liu, J., et al. (2013). RESP18 is involved in the cytotoxicity of dopaminergic neurotoxins in MN9D cells. *Neurotoxicity Research*, 24(2), 164-175.
- Huenchuguala, S., Muñoz, P., Zavala, P., Villa, M., Cuevas, C., Ahumada, U., et al. (2014). Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy*, 10(4), 618-630.
- Jamila, N. K. M., Khan, S. N., & Khan, N. (2014). Complete NMR assignments of bioactive rotameric (3-8) biflavonoids from the bark of *Garcinia hombroniana*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57(7), 345-352.
- Janssen, C. I., Zerbi, V., Mutsaers, M. P., Jochems, M., Vos, J. O., Berg, B. M., et al. (2015). Effect of perinatally supplemented flavonoids on brain structure, circulation, cognition, and metabolism in C57BL/6J mice. *Neurochemistry International*, 89, 157-169.
- Jantas, D., Roman, A., Kuźmierczyk, J., Lorenc-Koci, E., Konieczny, J., Lenda, T., et al. (2013). The extent of neurodegeneration and neuroprotection in two

chemical in vitro models related to Parkinson's disease is critically dependent on cell culture conditions. *Neurotoxicity Research*, 24(1), 41-54.

Johnston, K. M., Stern, D. J., & Walss Jr, A. C. (1968). Separation of flavonoid compounds on sephadexLH-20. *Journal of Chromatography*, 33, 539-541.

Jones, Q., Warford, J., Rupasinghe, H., & Robertson, G. S. (2012). Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(11), 602-610.

Jung, U. J., Jeon, M. T., Choi, M. S., & Kim, S. R. (2014). Silibinin attenuates MPP⁺-induced neurotoxicity in the substantia nigra in vivo. *Journal of Medicinal Food*, 17, 599-605.

Kabadere, S., Oztoccu-Vatan, P., Uyar, R., & Durmaz, R. (2011). Quercetin both partially attenuates hydrogen peroxide-induced toxicity and decreases viability of rat glial cells. *Acta Biologica Hungarica*, 62, 221-227.

Kadar, H., Le Douaron, G., Amar, M., Ferrié, L., Figadère, B., Touboul, D., et al. (2014). Maldimass spectrometry imaging of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in mouse brain. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 135-145.

Kalia, L., Kalia, S., McLean, P., Lozano, A., & Lang A. (2013). α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 73(2), 155-169.

Kandaswami, C., & Middleton Jr, E. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 366, 351-376.

Kim, S. U. & Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302-313.

Kirchhoff, F., Dringen, R., & Giaume, C. (2001). Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 251(4), 159-169.

Kumar, D. R., Aslinia, F., Yale, S. H., & Mazza, J. J. (2011). Jean-Martin Charcot: the father of neurology. *Clinical Medicine & Research*, 9(1), 46-49.

Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorld Journal*, 2013, 162750.

Laks, J., Rocha, M., Capitão, C., Domingues, R. C., Ladeia, G., Lima, M., et al. (2004). Functional and motor response to low dose of lansapine in huntington's disease: case report. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 62(4), 1092-1094.

Lao, C. L., Kuo, Y. H., Hsieh, Y. T., & Chen, J. C. (2013). Intranasal and subcutaneous administration of dopamine D3 receptor agonists functionally

restores nigrostriatal dopamine in MPTP-treated mice. *Neurotoxicity Research*, 24(4), 523-531.

Lassmann, H., Bruck, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathology*, 17, 210-218.

Lee, E., Park, H. R., Ji, S. T., Lee, Y., & Lee, J. (2014). Baicalein attenuates astroglial activation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease model by downregulating the activations of nuclear factor-kB, ERK, and JNK. *Journal of Neuroscience Research*, 92(1), 130-139.

Lopes, F. M., Londero, G. F., Medeiros, L. M., Motta, L. L., Behr, G. A., Oliveira, V. A., et al. (2012). Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotoxicity Research*, 22, 138-149.

Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A., & Haleagrahara, N. (2013). Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(1), 235-240.

Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A., & Haleagrahara, N. (2015). Protective mechanisms of flavonoids in Parkinson's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 314560.

Marshak, D. R., Ann Pesce, S., Stanley, L. C., & Griffin, W. S. Increased S100 β neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. (1992). *Neurobiology of Aging*, 13(1), 1-7.

Martinez-Vicente, M., & Vila, M. (2013). Alpha-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: a pathological feed-back loop. *Experimental Neurology*, 247, 308-313.

Masoudi, N., Ibanez-Cruceyra, P., Offenburger, S. L., Holmes, A., & Gartner, A. (2014). Tetraspanin (TSP-17) protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-induced neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004767.

Mastrokoulas, A., Ariyurek, Y., Goeman, J. J., Van Duijn, E., Roos, R. A., Van Der Mast, R. C., et al. (2015). Huntington's disease biomarker progression profile identified by transcriptome sequencing in peripheral blood. *European Journal of Human Genetics*, 23, 1349-1356.

McGeer, P. L., Itagaki, S., Akiyama, H., & McGeer, E. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Annals of Neurology*, 24(4), 574-576.

- McMenamin, M. M. & Wood, M. J. A. (2010). Progress and prospects: immunobiology of gene therapy for neurodegenerative disease: prospects and risks. *Gene Therapy*, 17, 448-458.
- Mehrotra, A. & Sandhir, R. (2014). Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behavioural Brain Research*, 261, 345-355.
- Meraz-Ríos, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., & Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 59.
- Mercado, G., Valdés, P., & Hetz, C. (2013). An ERcentric view of Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 19, 165-173.
- Miki, K., Nagai, T., Suzuki, K., Tsujimura, R., Koyama, K., Kinoshita, K., et al. (2007). Anti-influenza virus activity of bioflavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17,772-775.
- Mullen, W., Borges, G., Lean, M. E., Roberts, S. A., & Crozier, A. (2010). Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a polyphenol-rich juice drink. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2586-2595.
- Muñoz, P., Paris, I., Sanders, L. H., Greenamyre, J. T., & Segura-Aguilar, J. (2012a). Overexpression of VMAT-2 and DT-diaphorase protects substantia nigra-derived cells against aminochrome neurotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822.
- Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., & Segura-Aguilar, J. (2012b). Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Disease*, 2012(920953).
- Muñoz, P., Cardenas, S., Huenchuguala, S., Briceño, A., Couve, E., Paris, I., et al. (2015). DT-diaphorase prevents aminochrome-induced alpha-synuclein oligomer formation and neurotoxicity. *Toxicological Sciences*, 145(1), 37-47.
- Murakami, S., Miyazaki, I., Sogawa, N., & Miyoshi, K., Asanuma, M. (2014). Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. *Neurotoxicity Research*, 26(3):285-298.
- Nayak, A., Ansar, R., Verma, S. K., Bonifati, D., & Kishore, U. (2011). Huntington's Disease: an immune perspective. *Neurology Research International*, 2011, 1-7.
- Nones, J., Costa, A. P., Leal, R. B., Gomes, F. C., & Trentin, A. G. (2012). The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell and Tissue Research*, 350(2), 305-315.

- Norris, E. H., Giasson, B. I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J. Q., Ischiropoulos, H., & Lee, V. M. (2005). Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 21212-21219.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58, 831-838.
- Oliveira, A. M., Cardoso, S. M., Ribeiro, M., Seixas, R. S., Silva, A. M., & Rego, A. C. (2015). Protective effects of 3-alkyl luteolin derivatives are mediated by Nrf2 transcriptional activity and decreased oxidative stress in Huntington's disease mouse striatal cells. *Neurochemistry International*, 91, 1-12.
- Orr, A. L., Li, S., Wang, C. E., Wang, J., Rong, J., Xu, X., et al. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *Journal of Neuroscience*, 28(11), 2783-2792.
- Orrell, R. W. (2005). Multiple Sclerosis: the history of a disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98(6), 289.
- Palencia, G., García, E., Osorio-Rico, L., Trejo-Solís, C., Escamilla-Ramírez, A., & Sotelo J. (2015). Neuroprotective effect of thalidomide on MPTP-induced toxicity. *Neurotoxicology*, 47, 82-87.
- Paris, I., Muñoz, P., Huenchuguala, S., Couve, E., Sanders, L. H., Greenamyre, J. T., et al. (2011). Autophagy protects against aminochrome-induced cell death in substantia nigra-derived cell line. *Toxicological Sciences*, 121, 376388.
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H., Schousboe, A., Haydon, P. G., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry*, 121(1), 4-27.
- Paulsen, B. S., Souza, C. S., Chicaybam, L., Bonamino, M. H., Bahia, M., Costa, S. L., et al. (2011). Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its receptors α and β in pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, 20(10), 1711-1721.
- Pearce, J. M. (2005). Historical descriptions of multiple sclerosis. *European Neurology*, 54(1), 49-53.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 6, 193-201.
- Peterson, L., & Flood, P. M. (2012). Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation*, 2012, 401264.

- Qualls, Z., Brown, D., Ramlochansingh, C., Hurley, L., & Tizabi, Y. (2014). Protective effects of curcumin against rotenone and salsolinol-induced toxicity: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 81-89.
- Rada, R. E. (2008). Comprehensive dental treatment of a patient with Huntington's disease: literature review and case report. *Special Care Dentist*, 28(4), 131-135.
- Renaud, J., Chiasson, K., Bournival, J., Rouillard, C., & Martinoli, M. (2014). 17 β -estradiol delays 6-OHDA-induced apoptosis by acting on Nur77 translocation from the nucleus to the cytoplasm. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 124-134.
- Rezai-Zadeh, K., Ehrhart, J., Bai, Y., Sanberg, P., Bickford, P., Tan, J., et al. (2008). Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 41.
- Rodriguez, M. C., Obeso, J. A., & Olanow, C. W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Annals of Neurology*, 44(3), 175-188.
- Rohn, T. T. (2012). Targeting alpha-synuclein for the treatment of Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 11, 174-179.
- Ropper, A. H., & Brown, R. H. (2005). *Adams and Victor's principles of neurology* (8th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Sabogal-Guáqueta, A., Muñoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134-145.
- Sachdeva, A. K., Kuhad, A., & Chopra, K. (2014). Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial dysfunction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 127, 101-110.
- Salter, M. W., Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, 23(9), 1018-1027.
- Schapira, A. (2005). Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 76(11), 1472-1478.
- Segura-Aguilar, J., & Paris, I. (2014). Mechanisms of dopamine oxidation and Parkinson's disease. In R. M. Kostrzewa (Ed.), *Handbook of neurotoxicity* (pp. 865-883). New York: Springer.

Segura-Aguilar, J., & Kostrzewa, R. M. (2015). Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. *Neurotoxicity Research*, 27(3), 328-354.

Shinohara, M., Fujioka, S., Murray, M.E., Wojtas, A., Baker, M., Rovelet-Lecrux, A., et al. (2014). Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Brain*, 137(Pt 5), 1533-1549.

Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Souza, C. S., Freitas, S. R., Vasconcellos, V., Freire, S. M., et al. (2008). The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, 24(1), 75-86.

Souza, C. S., Paulsen, B. S., Devalle, S., Costa, S. L., Borges, H. L., & Rehen, S. K. (2015). Commitment of human pluripotent stem cells to a neural lineage is induced by the pro-estrogenic flavonoid apigenin. *Advances in Regenerative Biology*, 2, 29244.

Souza, C. S., Grangeiro, M. S., Pereira, E. P. L., Santos, C. C., Silva A. B.; Sampaio, G.P., et al. (2018). Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology*, 65, 85-97.

Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S., & DeLong, M. (2012). Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37, 213-246.

Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M. L., & Parihar, M. S. (2015). Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Advances in Nutrition*, 6(1), 64-72.

Stelzmann, R. A., Schnitzlein, N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's paper, "über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy*, 8, 429-431.

Taylor, J. M., Main, B. S., & Crack, P. J. (2013). Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 62, 803-819.

Terahara, N. (2015). Flavonoids in foods: a review. *Natural Product Communications*, 10, 521-528.

Thapa, A., Woo, E. R., Chi, E. Y., Sharoar, M. G., Jin, H. G., Shin, S. Y., et al. (2011). Biflavonoids are superior to monoflavonoids in inhibiting amyloid- β toxicity and fibrillogenesis via accumulation of nontoxic oligomer-like structures. *Biochemistry*, 50(13), 2445-2455.

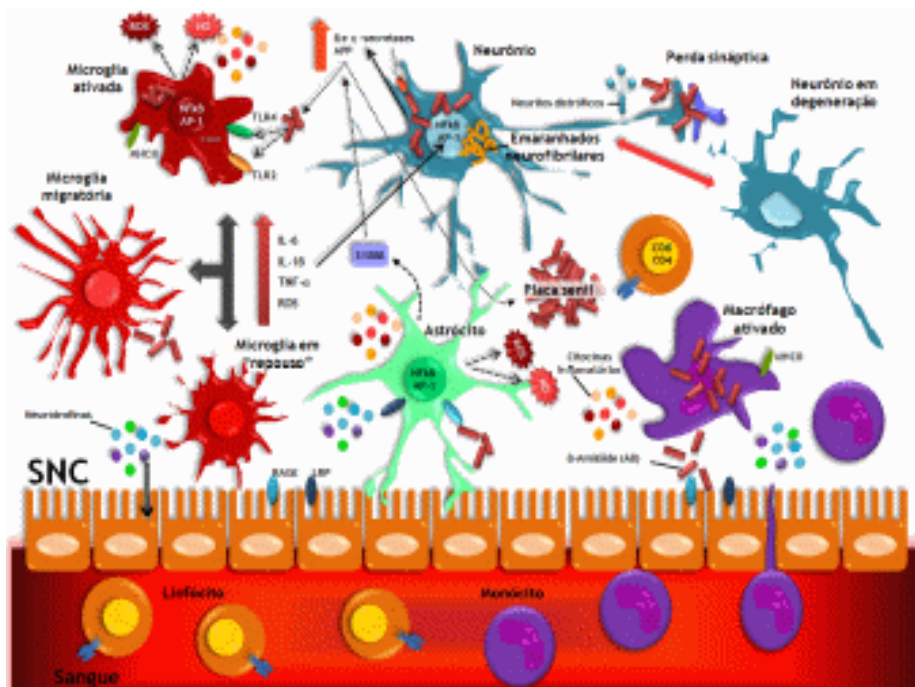
- Tolosa, A., Zhou, X., Spittau, B., & Krieglstein, K. (2013). Establishment of a survival and toxic cellular model for Parkinson's disease from chicken mesencephalon. *Neurotoxicity Research*, 24, 119-129.
- Tristão, F. S., Amar, M., Latrous, I., Del-Bel, E., Prediger, R. D., & Raisman-Vozari, R. (2014). Evaluation of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation following repeated intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in mice, an experimental model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 24-32.
- Verkhratsky, A., & Butt, A. (2007). *Glial Neurobiology: a textbook*. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Villa, M., Muñoz, P., Ahumada-Castro, U., Paris, I., Jiménez, A., Martínez, I., et al. (2013). One-electron reduction of 6-hydroxydopamine quinone is essential in 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*, 24(1), 94-101.
- Wang, X., Chen, S., Ma, G., Ye, M., & Lu, G. (2005). Involvement of proinflammatory factors, apoptosis, caspase-3 activation and Ca²⁺ disturbance in microglia activation-mediated dopaminergic cell degeneration. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(12), 1241-1254.
- Wang, D. M., Li, S. Q., Wu, W. L., Zhu, X. Y., Wang, Y., & Yuan, H. Y. (2014). Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 39(8):1533-1543.
- Wei, X., He, S., Wang, Z., Wu, J., Zhang, J., Cheng, Y., et al. (2014). Fibroblast growth factor 1 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: an in vitro and in vivo investigation in experimental models of Parkinson's disease. *American Journal of Translational Research*, 6(6), 664-677.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 506-516.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4), 842-857.
- Wichmann, T. & DeLong, M. R. (1993). Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Advances in Neurology*, 60, 53-61.
- Wong, M. B., Goodwin, J., Norazit, A., Meedeniya, A. C., Richter-Landsberg, C., Gai, W. P., et al. (2013). SUMO-1 is associated with a subset of lysosomes in glial protein aggregate diseases. *Neurotoxicity Research*, 23(1), 1-21.

- Xiong, R., Siegel, D., & Ross, D. (2014). Quinone-induced protein handling changes: Implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(2), 285-295.
- Xu, P., Wang, S. W., Yu, X. L., Su, Y. J., Wang, T., Zhou, W. W., et al. (2014). Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*, 1, 173-180.
- Xue, X., Liu, H., Qi, L., Li, X., Guo, C., Gong, D., et al. (2014). Baicalein ameliorated the upregulation of striatal glutamatergic transmission in the mice model of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, 103, 54-59.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), 533-537.
- Yang, C., Chung J., Yang, G., Li, C., Meng, X., & Lee M. (2000). Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *Biofactors*, 13, 73-78.
- Yong-Kee, C. J., Sidorova, E., Hanif, A., Perera, G., & Nash, J. E. (2012). Mitochondrial dysfunction precedes other sub-cellular abnormalities in an in vitro model linked with cell death in Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 21, 185-194.
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J., & Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry*, 85(1), 180-192.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2004). Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11), 1683-1693.
- Zafar, K. S., Siegel, D., & Ross, D. (2006). A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4- dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Molecular Pharmacology*, 70(3), 1079-1086.
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., et al. (2003). Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicenter randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 362(9395), 1517-1526.
- Zaminelli, T., Gradowski, R. W., Bassani, T. B., Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Maria-Ferreira, D., et al. (2014). Antidepressant and antioxidative effect of Ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 26(4), 351-362.

Zang, F., Fangcai, L., & Gang, C. (2014). Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. *Neurological Sciences*, 4, 8-583.

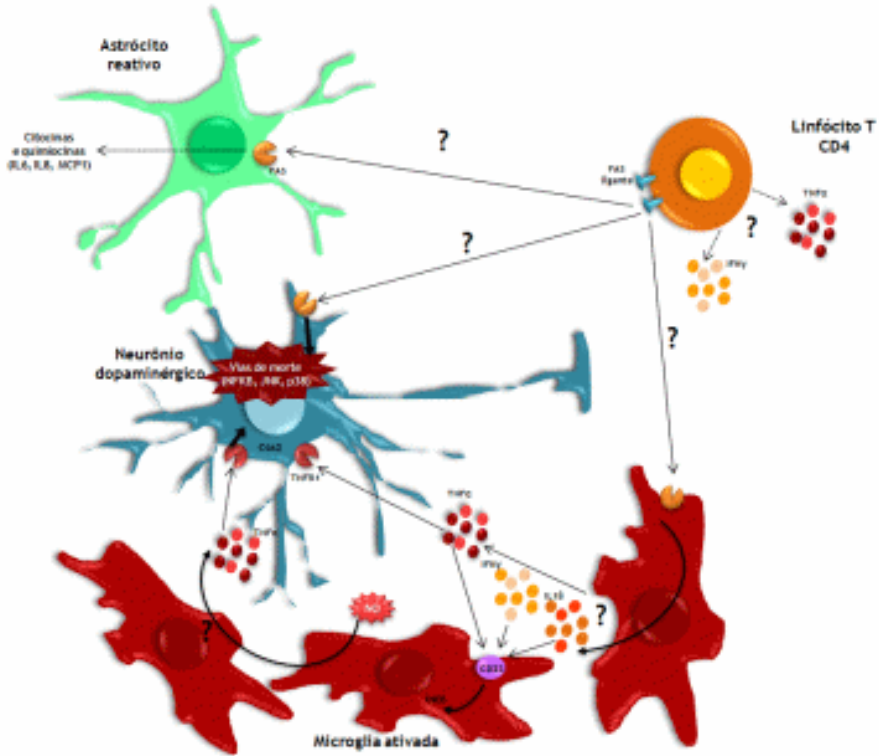
Zhou, Z. D., & Lim, T. M. (2009). Dopamine (DA) induced irreversible proteasome inhibition via DA derived quinones. *Free Radical Research*, 43, 417-430.

Figura 1 –Inflamação na Doença de Alzheimer



O peptídeo beta amilóide ($A\beta$) produzido por meio do processamento da proteína precursora amilóide (APP), forma agregados que ativam a microglia e astrócitos por meio de receptores do TLR e de receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Em resposta a estes receptores, estas células ativam os fatores de transcrição fator nuclear kappa B (NFkB) e proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores de transcrição induzem a produção de ROS e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Estes fatores inflamatórios atuam diretamente sobre os neurônios e também estimulam os astrócitos que amplificam o sinal pró-inflamatório induzindo efeitos neurotóxicos. Os mediadores inflamatórios produzidos por células residentes do sistema nervoso central (SNC) induzem a produção de moléculas de adesão e quimiocinas que recrutam células periféricas do sistema imune.

Figura 2 – Inflamação na Doença de Parkinson



Fonte: Hirsch e Hunot, 2009 (adaptado).

A microglia nunca adormece, sempre está alerta a indicadores de insultos no SNC. Ao perceber a presença de neurônios danificados e liberação de conteúdo citopasmático dos neurônios mortos, inicia um processo de resposta inflamatória, excretando citocinas como $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e $IL1\beta$, que irão ter ação parácrina, ativando outras microglia e ação autócrina retroalimentando a microglia. Estas citocinas irão estimular o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) a produzir óxido nítrico (NO), que é liberado para a matriz extracelular sendo este um composto tóxico para os neurônios. Além disso, a liberação de $TNF\alpha$ pela microglia irá atuar diretamente em neurônio dopaminérgicos viáveis estimulando a superexpressão de vias de ativação de morte celular programada. A microglia também realiza a liberação de quimiocinas que irão sinalizar a vinda de Linfócitos T CD4 positivos, que irão basicamente estimular a liberação de citocinas e quimiocinas pelos astrócitos, potencializando a inflamação. Este conjunto de respostas inflamatórias orquestradas pela microglia contribui para a hipótese da progressão da

neurodegeneração dopaminérgica pela neuroinflamação na doença de Parkinson.

Figura 3 –A cascata de acontecimentos celulares envolvidos na Esclerose Múltipla (EM) que pode variar entre indivíduos



Em pacientes geneticamente propensos um evento patogênico viral, bacteriano ou tóxico pode ativar as moléculas de adesão (LFA-1 e VLA-4) no endotélio cerebral elicitando uma resposta imune de células pró-inflamatórias, que podem aderir e, depois de atravessar a barreira hematomeningeobcefálica, promover neuroinflamação. Microglia ativadas apresentam antígenos e causam conseqüentemente dano à bainha de mielina e também ativação de células T CD4⁺ que, por sua vez quando ativadas, retroalimentam a resposta imunológica mediante o recrutamento de outras células do sistema imune (CD8⁺, linfócitos B, monócitos e outras) e com a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ). Além disso, plasmócitos também produzem anticorpos específicos de mielina que provocam a destruição da mielina. Ciclos de desmielinização e remielinização causam morte neuronal, e conseqüente metaplasia e formação de escleras.

Tópicos avançados em bioética e biossegurança – ICSC52: história da criação, constante adaptação e atualização do componente curricular obrigatório aos cursos de mestrado e doutorado em imunologia no PPGIM – UFBA

Songeli Menezes Freire

No ensino moderno e atual, a importância da ética, da Bioética e da Biossegurança na formação de profissionais pesquisadores e docentes

Conceitos e temáticas da Bioética e da Biossegurança

O papel de professores e de pesquisadores na ciência no mundo moderno, que deve estar ao alcance de todos, é inquestionável. Professores devem promover e facilitar o conhecimento com seriedade e compromisso, cientes da sua responsabilidade de formar uma sociedade mais cidadã, ciente e preparada para exercer sua autonomia. Os recursos financeiros disponíveis para as atividades de ensino e pesquisa justificam a necessidade dos diversos membros das academias e das universidades públicas, e mesmo as privadas que recebem apoio do Estado, de se voltarem à comunidade e se preocuparem em divulgar o conhecimento à sociedade. Sobre essa divulgação do conhecimento científico, Oliveira (2014) lembra a dificuldade da divulgação das terminologias e conceitos

científicos. O pesquisador da Universidade Federal de São Carlos esclarece que para comunicar sobre ciência a um público em geral é preciso cuidar e traduzir o conteúdo formatado dentro de determinada área, na qual se utiliza uma linguagem própria, e inovar nas formas e modelos de exemplos para deixar clara, acessível e compreensível a informação.

Na Figura 1, pode-se observar o processo da comunicação pelas instituições responsáveis que alcançam a comunidade/sociedade, que se abre para o novo conhecimento e a nova informação.

A ética pode ter diversas definições e conceitos, a depender da escola que traz na sua tradução a palavra original, do grego ou do latim. Os significados trazidos, como o “fazer o bem, pelo bem”, “alcançar o estágio de felicidade em plenitude e deixar o outro nesse estágio de felicidade”, refletem sob nosso ponto de vista e compreensão sobre os diversos textos trazidos por inúmeros autores clássicos e modernos.

No contexto da ética profissional, a comissão de ética de uma entidade ou classe determina a conduta adequada, correta, do profissional pelo código de ética profissional da classe. Por outro lado, entre os diversos autores e filósofos, bioeticistas nacionais e internacionais, entre as várias definições existentes desde a década de 1920, entende-se a bioética no contexto dos atos e das consequências das ações diuturnas e esporádicas, ou cotidianas, como a compreensão e reflexão da interferência do conhecimento e dos avanços científicos, biomédicos e tecnológicos na vida e na qualidade e segurança de vida dos seres vivos e do meio ambiente, e em suas relações com os seres humanos e o planeta, e na fase em que o mundo se encontra, nas relações interplanetárias. (Freire & Tunes, 2017)

Numa abrangência ampla, portanto, entre as possíveis ações dos profissionais da saúde, deve-se diferenciar procedimentos da rotina clínica com seus protocolos bem estabelecidos, terapêuticos e diagnósticos, para o paciente (“cliente”) da pesquisa científica, que deve gerar novos conhecimentos, apesar de poder usar protocolos estabelecidos para novas alternativas e adaptações, ou modificações com rigor científico na metodologia do projeto proposto. Referente ainda à bioética, a utilidade do Comitê de Bioética em unidades de atenção à saúde e a participação do médico, foi proposta na Recomendação No. 08/2015 do Conselho Federal de Medicina (CFM). Esta ação é justificada pelo Conselho Federal de Medicina (CFM, 2015) em decorrência das

diversas dúvidas e dilemas que surgem nas atividades dos profissionais da saúde na lida com o diagnóstico e tratamento de seus pacientes. O Comitê ajudaria nas tomadas de decisão e soluções desses conflitos e dilemas na instituição.

Por outro lado, todo e qualquer projeto ou proposta de pesquisa deve ser protocolado de forma institucional e nacional, sendo regulamentado pela atual Resolução 466/12, que substituiu a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Nos últimos anos, o controle social tem sido mais frequente e o Estado tem respondido na área Ministerial com propostas de soluções no CNS, capacitando e promovendo discussões entre a população demandante e os sistemas de Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e o Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Importante também dentro da bioética são os temas referente à eticidade no uso de animais na pesquisa e no ensino (Lei no 11.794/2008) que deve ser mais bem discutida e refletida com a abrangência dos desdobramentos a partir desses usos.

Às abordagens da bioética – as consequências dos métodos e avanços científicos e tecnológicos usados para a abreviação ou prolongamento da vida e de forma convergente e sinérgica para a plenitude da vida em toda a sua complexidade e amplitude –, deve-se considerar adicionalmente a biossegurança.

Existem dezenas de definições para “biossegurança”, palavra originada a partir da tradução do inglês *biosafety*, que foi compreendida e traduzida por diversas instituições e organizações, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), agências das diversas áreas, Ministérios, e pesquisadores brasileiros, como Leila Macedo, Teixeira e Valle (2010), Telma Abdala, e Costa e Costa (2009), que trazem pequenas diferenças em seus artigos e livros. Do nosso ponto de vista, a melhor definição para biossegurança, é aqui adaptada de Valle (2010) como o conjunto de ações, tomadas de decisão, protocolos e procedimentos voltados para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

No Brasil o termo foi amplamente difundido pela Lei 11.105 de 2005 – como lei da biossegurança, “estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos

geneticamente modificados (OGM) e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB)”. Atualmente e de forma mais geral, se somam a esse termo as prevenções dos riscos à qualidade de vida e da saúde das pessoas, dos animais, do meio ambiente e do trabalhador. As demais exigências desta abrangente especialidade refere à qualidade e segurança nos serviços de atenção à saúde (RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002, RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005; RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012), no uso de vacinas, na esterilização e descontaminação dos alimentos e da água, na política da produção mais limpa com a diminuição de resíduos, na promoção da saúde dos seres humanos e dos animais.

Os avanços tecnológicos, como nanotecnologia, biologia sintética, aprendizado de máquina ou aprendizagem de máquina (*machine learning*), aprendizagem profunda (*deep learning*) e inteligência artificial são ainda temas de convergências da Biossegurança e da Bioética.

Considerando a abrangência da Biossegurança, se resgata o termo técnico biosseguridade, devido a que alguns autores chamam a atenção para a diferença no uso desses dois termos, ou de que uma abrange o outro e vice-versa. A biosseguridade, entretanto, para alguns autores, como Cardoso, Navarro, Soares e Tapajós (2008), é originada do inglês *biosecurity*, e pode ser definida como o conjunto de ações, medidas, tomadas de decisões e planejamentos para a contenção e proteção de agentes perigosos evitando o risco potencial à saúde pública e economia do país, envolve os bens sensíveis ou preciosos e as medidas de prevenção contra ações indevidas dos seres humanos e acidentes. Abordagens tratados atualmente pelas Instancias de Segurança Nacional, segundo atualizações presidenciais e ministeriais de inteligência e contrainteligência, segurança à saúde pública, nos grandes eventos e nas fronteiras. No início desta última década a Agência Brasileira de Inteligência (Abin) teve importante ação educativa realizando visitas às Instituições de ensino e pesquisa do país. São exemplos de medidas da biosseguridade as de proteção contra roubo, extravio e uso indevido, que evitam perdas econômicas e riscos de morbimortalidade, como ocorrem na quebra da barreira nas fronteiras, nos casos de pandemias, biopirataria e bioterrorismo.

A bioética e a biossegurança podem então, de forma ampla ou específica, auxiliar na informação das pessoas sobre aspectos positivos e negativos dos avanços do conhecimento (tecnológico, científico ou médico) para que possam tomar decisões e escolher evitá-los, introduzi-los ou usá-los em sua vida, na vida de seus familiares, e a sua implicação com o meio ambiente e com o planeta.

Algumas modificações de normas e exigências legais, atualizações decorrentes de situações novas, requerem busca e leitura de documentos atuais, estando os profissionais, professores ou pesquisadores sempre obrigados(as) a se atualizar quanto à legislação vigente no país.

Pela Constituição Federal brasileira, ao cidadão é garantida proteção, saúde, alimento, educação, e dignidade, o direito à vida, e à segurança. Assim, com relação às pesquisas e aos atendimentos em serviços de atenção à saúde, deve-se preservar, cuidar, e promover o bem-estar e a saúde dos indivíduos, além de considerar as dimensões que o compõem e que são consideradas na OMS (Figura 2). Construindo uma ementa inspirada em textos de Paulo Freire e de alguns autores que o estudam e aprofundam as ideias e modelos discutidos no âmbito da educação e do processo ensino-aprendizagem, torna-se fundamental que se estabeleça no ensino o diálogo, numa abordagem da realidade sociopolítica com exemplos e temáticas que favoreçam a construção de referenciais analíticos novos. (Saul & Silva, 2009) É fundamental desde o ensino médio a abordagem de temas voltadas à Bioética e à Biossegurança, de forma multidisciplinar e transdisciplinar. (Freire, 2018)

A história da abordagem de temas de Bioética e de Biossegurança no PPGIm

Na Pós-Graduação, a visão clássica e ao mesmo tempo de vanguarda do colegiado do PPGIm ficou mais evidente ao estabelecer medidas para atender à necessidade científica e acadêmica nessas áreas do conhecimento prático moderno, e incentivar para seu corpo discente a capacitação e sensibilização em temas de bioética e biossegurança.

Os profissionais, pesquisadores, membros e/ou coordenadores de serviços e de grupos de pesquisa matriculados como pós-graduandos, podem então, no decorrer do período de criação até as adequações anuais da disciplina, ter uma visão crítica num ambiente de discussão com

temas de interesse abordados nesse componente curricular. Aprovado em colegiado como disciplina obrigatória aos cursos de mestrado e doutorado, com oferta anual da disciplina ICSA52, a ação foi reconhecida posteriormente pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) na avaliação do programa daquele triênio 2010-2012.

Tópicos elementares e baseados na literatura e legislações da época, abordados atualmente nessa disciplina, foram compilados no formato de uma disciplina oferecida anteriormente no PPGIm, de caráter optativo, no componente curricular de temáticas inovadoras ou modernas, denominado Tópicos Especiais em Imunologia (ICS 702). Nos primeiros anos, havia sido trazida outra temática para os tópicos especiais, abrangendo a neuroimunoendocrinologia. Este componente curricular foi oferecido nas temáticas de introdução à bioética e à biossegurança, com o professor colaborador convidado e advogado Antônio Fabio Medrado, com formação em bioética e muito interessado nas ciências biológicas e biotecnológicas, tendo especial desejo de cursar mestrado e doutorado nessas áreas. As primeiras discussões sobre bioética nas disciplinas como tópicos especiais ocorreram com seu apoio e interesse. A colaboração fortaleceu a disciplina Tópicos Especiais em Imunologia para discussão de temas de bioética e de biossegurança, com foco nos projetos de pesquisa, pontos dos aspectos legais e controle social nas áreas abordadas.

A parceria de docência foi mantida por anos, mas ele foi impossibilitado de cursar a pós-graduação pela rigidez dos regimentos desses programas nas áreas da saúde, ciências biológicas e biotecnológicas no PPGIm, no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) e na Universidade Federal da Bahia (UFBA).

A dinâmica das abordagens e temáticas de bioética e de biossegurança na época anterior ao ano de 2012 deu-se na disciplina Tópicos Especiais em Imunologia (ICSA702), quando foi criada a disciplina Tópicos Avançados em Bioética e Biossegurança (ICSC52), detalhada na Tabela 1. Os temas do ementário da ICSC52, e do componente curricular obrigatório de 2 créditos (34 horas) oferecido anualmente para os cursos de Mestrado e Doutorado em Imunologia, encontram-se no Quadro 1. Para a abordagem dos temas, desde o seu início, já era recomendada uma literatura ampla, vasta, clássica e atualizada com relevância de

documentos regulatórios e normativos, no contexto científico e legal. Sempre foram recomendados livros impressos, livros digitais, vídeos educativos e lúdicos, sites de associações e sociedades científicas, documentos e legislação atualizada sobre os temas. Os mais comuns sites de Sociedades brasileiras de bioética, Observatório de Bioética e Derecho (OBD) da Cátedra Unesco, na Universidad de Barcelona, e o site de Bioética de Goldim da Universidade Federal Rio Grande do Sul. Desde aquele período tem havido um grande incentivo para atualização do conhecimento dos estudantes com a busca das informações nos sites frequentemente atualizados. Sempre são recomendados os sites ministeriais, de agências e secretarias municipais, estaduais e regionais no Brasil, Fiocruz, Associação Nacional de Biossegurança (ANBio) e OMS.

As principais justificativas e relevâncias do investimento do ambiente acadêmico na discussão de temas das áreas da bioética e da biossegurança na educação formal do professor e do pesquisador encontram-se listadas adiante:

- a. percepção dos conflitos de interesse e prevenção de problemas gerados com a falta de transparência dos mesmos;
- b. consciência da responsabilidade dos atos e ideias nos projetos científicos e acadêmicos;
- c. a importância e o valor da pesquisa e da integridade científica;
- d. conhecimento de definições e legislação específica e geral dos temas que norteiam essas áreas do saber teórico e prático;
- e. busca de um equilíbrio no *trade off* – eficiência e segurança, para o avanço científico e de produção e a prevenção de erros e promoção do cuidado individual e coletivo;
- f. atenção nas várias especialidades, a bioética e a biossegurança, no ambiente do trabalho, foco ao princípio da responsabilidade, de profissional e dos gestores;
- g. desenvolvimento de avaliação crítica ressaltando os princípios éticos, bioéticos, os princípios da responsabilidade e da precaução no agir, referente às novas tecnologias;
- h. aprofundamento crítico e as exigências das agências de fomento e de avaliação;
- i. promoção do conhecimento, melhoria na resposta à sociedade e controle social.

Histórico da biossegurança na UFBA

Início e formação docente em Biossegurança

Em 1998, por indicação e portaria, o magnífico Reitor Professor Dr. Heonir Rocha criou a 1ª Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do ICS na UFBA, em atenção a primeira lei de organismo geneticamente modificado (OGM). Compuseram a Cibio do ICS os servidores: Paulo Almeida, Gúbio Soares Campos e Songeli Menezes Freire, sob coordenação do professor Roberto Meyer. Esta ação surgiu como resposta à solicitação do professor Dr. Paulo Almeida (Departamento de Biointeração) que contava com projeto a ser financiado e com intenção de ser desenvolvido com OGM, o que finalmente não prosseguiu, na época. Mas a comissão instalada se manteve.

A educação formal em Biossegurança, da desde então membro da CIBio e atual coordenadora da disciplina do PPGIm, Tópicos Avançados em Bioética e em Biossegurança (ICSA52), se deu por intermédio da Dra. Marilda Gonçalves (Professora da UFBA e Pesquisadora da Fiocruz-Bahia) com o 1º. Curso de Biossegurança oferecido na Fiocruz-BA, ministrado por Dra. Leila Macedo, então conhecida como Leila Oda, servidora da Fiocruz do Rio de Janeiro e vanguardista na Biossegurança, fundadora da Associação Nacional de Biossegurança (ANBio-RJ).

Esta educação complementar e formal em biossegurança foi apoiada ao longo dos anos pelo chefe imediato, professor Roberto Meyer, coordenador do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno). O chefe imediato autorizou e possibilitou, muitas vezes com ajuda de custo, com recursos Labimuno, para a capacitação da pesquisadora nesta área, em cursos fora da cidade de Salvador, como o Rio de Janeiro na Fiocruz e ANBio, além de diversos cursos locais. Os cursos de formação e capacitação da docente na área encontram-se descritos na Tabela 2. A educação permanente tem sido encarada e fomentada como uma necessidade aos profissionais e educadores.

Formação docente em Bioética

Em 2009, com aprovação em concurso público para o magistério superior, da vaga única para duas disciplinas: bioética e biossegurança, a professora com formação mais sólida após os diversos cursos na área

de Biossegurança, apesar do estudo e da leitura, e da experiência acumulada na ICSA702, com os anos com a parceria de colegas, sentiu a necessidade de capacitação e educação formal em bioética.

Após tentativa de contato com diversos professores na Bahia, de regiões do Brasil, e em Portugal, aqui em Salvador, a Profa. Eliane Azevedo ofereceu, no início de 2010, a oportunidade de participação do Núcleo de Pesquisa e Educação Transdisciplinar em Bioética (NETBio) na FAMEB-UFBA, onde eram realizadas reuniões quinzenais durante anos com a discussão de temas de Bioética. A participação como membro efetivo desde então nesse núcleo foi fundamental para o desenvolvimento docente em temas desta especialidade com aspectos filosóficos e da Bioética. Os princípios da bioética, riscos mínimos, sistema CEP-CONEP, temas diversos que envolviam a bioética e até aspectos da bioética, OGM e a lei de biossegurança foram discutidas e a cada reunião um conhecimento novo sedimentado. Eram membros professores pesquisadores Profa. Eliane Azevedo, Prof. José Tavares, Prof. Gloria Sampaio, Dra. Cristina Fortuna (em memória), Prof. Claudia Bacelar, Prof. Liliane Lins, Prof. Eduardo Netto, e seus respectivos pós-graduandos na FAMEB. O NETBio continua com 50% dos membros originais e conta com mais pesquisadores interessados na área que ingressaram nos últimos anos, e, apesar da ausência de muitos dos fundadores, tem sido constantemente revigorado com a participação dos orientadores e seus novos pós-graduandos e pós-doutores.

Na Tabela 3 encontra-se a capacitação e educação em Bioética como um dos itens para a qual a docente contou com grande apoio institucional, nacional e internacional.

Ação multiplicadora na capacitação de profissionais em Biossegurança e Bioética com apoio institucional e do PPGIm

Atreladas às duas disciplinas convergentes, em muitos temas e abordagens complementares, cursos e palestras tem sido feitas ininterruptamente, desde a criação da CIBio.

Com a formação na área e inicialmente na ausência de atividades originalmente previstas para a CIBio no ICS, tendo sido já cadastrada e oficializada para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

(CTNBio), alguns membros da comissão fizeram o projeto, e em parceria com o PPGIm, ofereceram com a colaboração de diversos professores e técnicos de instituições renomadas do Brasil o “I Curso de capacitação em Biossegurança, para profissionais das áreas das Ciências da Saúde e biológicas”, em 1999 que aconteceu no ICS. O curso contou com o apoio do Labimuno e do PPGIm, e em parceria com as unidades da UFBA, Hospital Universitário, Faculdade de Medicina, Faculdade de Farmácia, Faculdade de Odontologia, Fiocruz e suas unidades na Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais, a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), e a Secretaria de Saúde do Estado (SESAB). A SESAB, então parceira do curso, trouxe muitos profissionais para sua capacitação e, com sua estrutura e orçamento publicou, no formato impresso 3.000 exemplares (e no formato digital, mais adiante, em 2002) o *Manual de Biossegurança para profissionais das áreas da saúde e biológicas*. Nesse manual, os capítulos foram compilados a partir dos conteúdos originais das aulas ministradas e experiências nas atividades de rotina dos professores convidados do Curso. Atualmente encontra-se no formato digital em vários sites, como o da Fiocruz.

Decorrente das diversas capacitações e treinamentos, foram oferecidos pela docente do PPGIm – com apoio da secretaria do programa, e sempre em parceria com diversos colegas em colaboradores do Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, SESAB e diversas unidades da UFBA, seja nos programas anuais do Núcleo de Capacitação da do Centro de Desenvolvimento Humano (CDH) da Pró-Reitoria do Desenvolvimento de Pessoas (Prodep) – cursos para públicos diversos no modelo de cursos rápidos, cursos especiais e de extensão, de capacitação ou palestras em cursos na UFBA campi Salvador, Vitória da Conquista, Universidade Estadual de Feira de Santana, Universidade Estadual de Santa Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, e Secretaria de Saúde da Bahia.

Em 2013 o Colegiado e especialmente a coordenação do PPGIm, na figura de Profa. Silvia Lima Costa e Profa. Camila Alexandrino, são considerados grandes incentivadores que possibilitaram, com apoio da Capes, Fapesb, CNPq, e outras Instituições como Fiocruz e ANBio, que Salvador sediasse em setembro o VIII Congresso Brasileiro de Biossegurança, sob nossa presidência. O evento que teve diversos professores e pesquisadores nas comissões organizadora e setoriais e monitores graduandos e pós-graduandos dos cursos da UFBA, contou com

participantes da UFBA e entidades importantes da região, membros participantes da capital e do interior da Bahia e de estados de várias regiões do país e de participantes estrangeiros dos vários continentes.

No relatório Capes o PPGIm registrou a atividade docente na disciplina informativos relevantes sobre aspectos da preocupação do PPGIm referente à formação ética do pós-graduando e teve reconhecimento registrado no relatório de avaliação trienal pela Comissão de Avaliação da Capes, que se encontra no Quadro 2.

Ainda no texto da apreciação da Capes, segue-se:

O programa fez as adequações sugeridas pela comissão avaliadora do triênio anterior, e isto resultou no aumento de qualidade, como pode ser observado pelo desempenho muito bom em todos os itens avaliados, no presente triênio. Destacam-se a produção científica que cresceu em qualidade e quantidade, com expressiva produção de artigos nos estratos mais altos e com participação de discentes; o índice de formação dos discentes que foi acima da média da área CBIII; a relevante participação dos discentes na produção científica. *Sobressai ainda a preocupação do programa em formar profissionais preparados para a docência e para a pesquisa, capacitados para atuarem de forma ética, e a enfrentarem os atuais desafios técnicos científicos, tão necessários para o desenvolvimento regional e nacional.* Outro ponto relevante foi a grande inserção internacional do programa com visitas de pesquisadores estrangeiros, fato tem facilitado o intercâmbio de alunos e professores do programa com renomadas instituições internacionais de ensino e pesquisa. A qualidade dos egressos, que atuam em diferentes instituições regionais ou nacionais, atesta a importância e qualidade do programa.

Considerações finais

No formato da disciplina atual, com assuntos de tecnologias clássicas e cada vez mais modernas, atualizados anualmente segundo avanços científicos, tecnológicos e situações novas, de um modo geral, os pós-graduandos participam discutindo os temas com suas vivências no ambiente da pesquisa e de suas respectivas atividades laborais diversas, fato que enriquece as atividades e discussões propostas.

A associação do conhecimento científico com as exigências legais nos diversos âmbitos ministeriais e de agências e secretarias de controle consolida a proposta de informação constante e educação/formação permanente dos pós-graduandos. Na intenção de sensibilizar novos pesquisadores e professores temas são propostos e cada um pode sugerir adicionalmente um tema de interesse. Os participantes dos cursos e

da disciplina têm mostrado ao longo dos anos seriedade, compromisso e critério no processo de avaliação e autoavaliação deste componente curricular sempre em constante adaptação acadêmica.

Referências

Brasil. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. *Lei nº 11.105, de 28 março de 2005*. Diário Oficial da União. Brasília, DF: Casa Civil.

Cardoso, T. A. O., Navarro, M. B. M. A., Soares, B. E. C., & Tapajós, A. M. (2008). Biossegurança e biossegurança: aplicabilidades da segurança biológica. *Interciência*, 33(8), 561-568.

Conselho Federal de Medicina (CFM). (2015). *Recomendação CFM nº 8/2015*. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina.

Costa, M. A. F., & Costa, M. F. B. (Orgs.). (2009). *Biossegurança de OGM: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publit. Recuperado em 21 fevereiro, 2019, de <https://bit.ly/2NijGO1>

Freire, S. M. & Tunes, U. R. (2017). A importância dos princípios da bioética na formação do cirurgião dentista contemporâneo. *Revista Baiana de Odontologia*, 8(1), 3-5.

Freire, S. M. (2018). Temas de bioética e de biossegurança para uso de professores da educação secundária na preparação da autonomia de jovens entre 12 e 17 anos. *Revista de Bioética y Derecho*, (44), 103-120.

Oliveira, A. (2014). A difícil e prazerosa missão de comunicar ciência. *Ciência Hoje*. Recuperado em 26 julho, 2016, de <https://bit.ly/2Se2EBR>

Saul, A. M., & Silva, A. F.G. (2009). O legado de Paulo Freire para as políticas de currículo e para a formação de educadores, no Brasil. *Revista Brasileira de Estudos Pedagógicos*, 90(224), 223-244.

Teixeira, P. & Valle, S. (Orgs.). (2010). *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar* (2a ed.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

Figura 1 – Difusão responsável pelo conhecimento e pela informação na interrelação entre universidade e comunidade/sociedade, via meios e canais de comunicação disponíveis

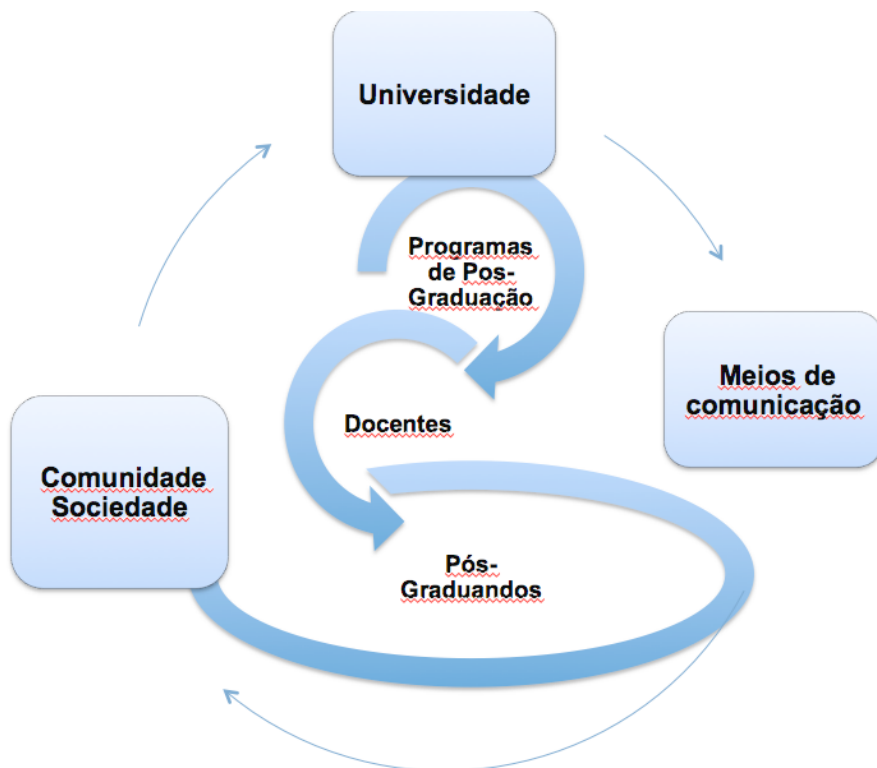
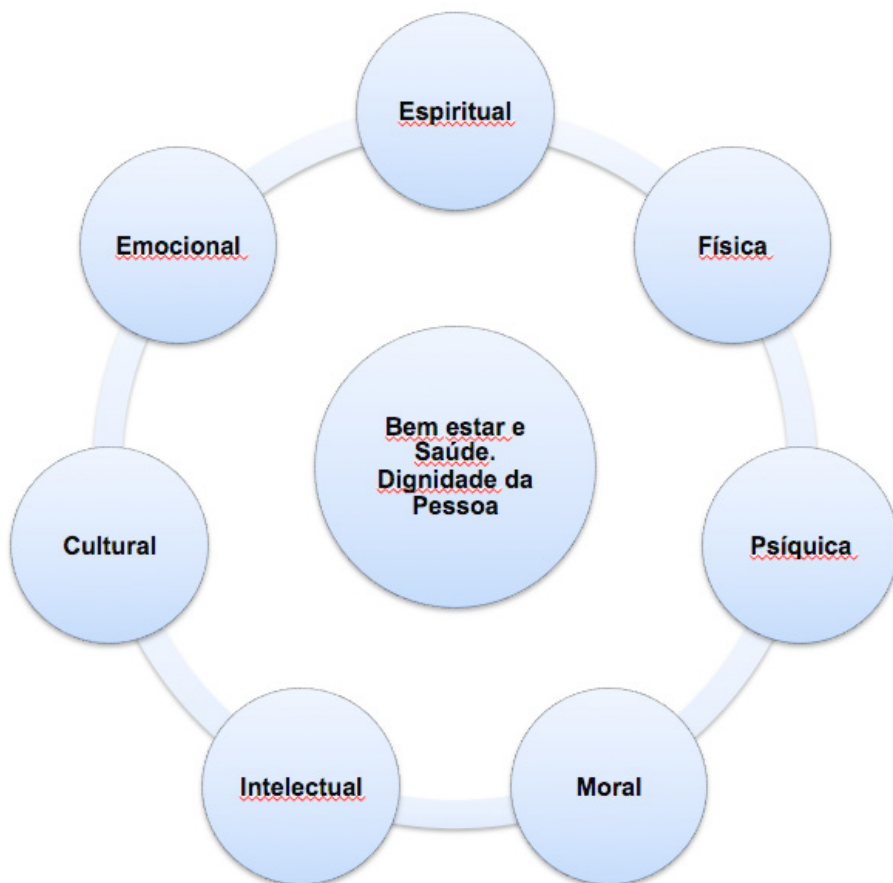


Figura 2–Dimensões da dignidade e saúde da pessoa, segundo a OMS



Quadro 1 – Ementa detalhada dos temas para ICS C52 (carga horária: 34 horas)

*BIOÉTICA: Histórias, paradigmas e modelos explicativos da Bioética. Definições e exemplos de principais conflitos da Bioética e do Biodireito aplicados à pesquisa científica. Marco regulatório, importância do controle social e do sistema CEP/CONEP, SISNEP, a Plataforma Brasil, Biobanco e Biorrepositório. O cadastro e acompanhamento e difusão do conhecimento gerado com a pesquisa com seres humanos. Resolução CNS atualizada o uso de animais em ensino e pesquisa, sistemas de controle e normas, CEUA e CONCEA. Legislação atual de protocolos para experimentação em humanos e experimentação em animal. Importância da cidadania e da responsabilidade pessoal e profissional, envolvimento responsável da população e de agências estatais e empresas públicas/ privadas nos acidentes e nos conflitos e dilemas de acidentes por fenômenos naturais ou por motivos diversos no Brasil e no mundo. Conflito de interesse. Aspectos norteadores e importância da Integridade científica e conduta responsável. Corresponsabilidade no ambiente acadêmico e científico e importância da colaboração multidisciplinar. Autoria, propriedade intelectual e plágio. Como informar o conhecimento e as incertezas científicas ao cidadão e público leigo na área. Identificação e autocritica de pontos de fragilidade e consistência, importância e relevância do projeto de pesquisa. Métodos biotecnológicos atuais: compromisso com o mundo e com o planeta.

*BIOSSEGURANÇA: Marco regulatório, Histórico e definições de Biossegurança, Biosseguridade, Bioterrorismo e Biopirataria. Legislação atual sobre Resíduos e Rejeitos, PGRSS. Agentes nocivos. Aspectos epidemiológicos e infecção. Classificação de Grupos de risco no ambiente de trabalho, métodos de controle e contenção biológica e outros grupos de risco. Contaminação e métodos de descontaminação. Controle e contenção de riscos no Brasil e no mundo. Barreira, contenção e isolamento. Métodos e fundamentos da imunoprofilaxia pré e pós-exposição. Importância, fragilidades e consistências da imunoprofilaxia. Legislação e Lei de biossegurança. Instancias de controle de biosseguridade e biossegurança no Brasil. Métodos de confecção de POPs, EPI e EPC mais comuns e suas exigências – mapa de risco e importância da sinalização. Rota de Fuga. Responsável Técnico, CIPA, CISSP. Legislação e exemplos - Transgênicos e OGM, Papel da CIBIO e CTNBIO. Legislação atual. Biossegurança referente a temas da atualidade: novas tecnologias, biologia sintética e nanotecnologia, Inteligência Artificial, *Machine learning*, *deep learning*, Principais conflitos e princípios éticos e bioéticos na pesquisa e avanços tecnológicos. *Trade Off* – eficiência e segurança, Atualização temática de tópicos referentes a problemas e exemplos práticos nas áreas da Bioética e da Biossegurança.

A ementa da disciplina compreende temas e pontos para discussão dinâmica com exemplos reais, fictícios, mas possíveis, trazendo instrumentos legais, regulatórios e de controle social, elencados na lista que pode ser adaptada numa ordem que varia segundo maturidade e formação de base segundo realidade e interesse da turma de pós-graduandos.

Tabela 1 – A dinâmica das abordagens e temáticas de bioética e de biossegurança até a criação da disciplina obrigatória ICS C52 no PPGIm

Nome da disciplina	Código e anos	Docentes participantes	Destino das disciplinas
Tópicos Especiais em Imunologia – Neuro-Imuno-Endócrino	ICS A702 – anualmente. Início 2000-2006.	Coord. e professor: Songeli Freire Professores: Maria Jose Ramalho, Silvia Costa Fatima Dias Costa, Ramon El Bachá.	Disciplina temática transitória.
Tópicos Especiais em Imunologia – Introdução de tópicos em Bioética e Biossegurança		Songeli Freire, Antônio Fabio Medrado. Alternativamente nos anos 2006/7 – 2011. Em 2010 já aguardávamos a resultado do processo de criação da disciplina nova.	A colaboração se deu com aulas esporádicas sem qualquer conotação vinculativa, como colaborações científicas comumente praticadas na academia. Tal colaboração durou alguns semestres. posteriormente houve interrupção da colaboração na docência, por indicação da procuradoria jurídica da UFBA, visto que o professor convidado não fazia parte do corpo docente da Instituição.
Tópicos avançados em Biossegurança e Bioética	ICS A52 – disciplina obrigatória. Mestrado e Doutorado. Aprovada em 2012.	Songeli Menezes Freire e convidada especial Dra. Clarisse Cerqueira UEFS com capacitação especial no Sistema CEP/CONEP. Convidados especiais.	Anualmente oferecida aos pós-graduandos (de mestrado e doutorado) no segundo semestre. Oferta de vagas a alunos especiais e pós-graduandos de outros PPG, sob demanda institucional.

Tabela 2 – A dinâmica da capacitação na área da Biossegurança e formação acadêmica da docente coordenadora da disciplina ICS C52 do PPGIm

Ano	Atividades e assistência a cursos de capacitação e educação formal em Biossegurança	Carga horária/ Período	Instituição de realização
2014	Curso de capacitação em riscos químicos.	20h	UFBA – Coordenação de Desenvolvimento Humano (CDH)/Pró-Reitoria de Desenvolvimento de Pessoas (Prodep).
2014	Curso de engenharia de segurança do trabalho.	20h	UFBA–CDH/Prodep
2012	Formação de inspetores e fiscais em biossegurança.	40h	ANBio, UFBA
2012	Biossegurança em laboratórios NB3		Instituto Evandro Chagas – PPGIm – UFBA.
2011	Cursos avançados em Biossegurança: capacitação. Atividade Pós-Doutoral em Biossegurança.	140h	ANBio, Rio de Janeiro, Brasil.
2011	Atualização e ações de biossegurança-biosseguridade. Atividade Pós-Doutoral em Biossegurança.	104h	ANBio, Rio de Janeiro, Brasil.
2010	Curso de transporte de substâncias infecciosas.	20h	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz, Fiocruz-Bahia.
2009	13º Curso de Biossegurança hospitalar.	32h.	Fundação Oswaldo Cruz, (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil.
2006	Passo a Passo na Elaboração de PGRSS.	8h	Fiocruz-Bahia e Rio de Janeiro.
2000	Curso de formação e capacitação de profissionais da saúde e ciências biológicas em Biossegurança	120 h	PPGIm – UFBA e Instituições parceiras: Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Fiocruz.
1999	Curso de sensibilização em Biossegurança.	40h	Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.
1999	Adequação física e de procedimentos laboratoriais.	10h	ANBio, Brasil.

Tabela 3 – A dinâmica da capacitação na área da Bioética e formação acadêmica da docente coordenadora da disciplina ICS C52 do PPGIM

Ano	Atividades e assistência a cursos de capacitação e educação formal em Bioética	Carga horária/ Período	Instituição
2016	Atividade pos-doutoral no Observatorio de Bioetica y Derecho – OBD.	Carga horaria integral semanal no mês de maio.	Cátedra de Bioética Unesco – Universidad de Barcelona, Barcelona, Espanha.
2012	Curso na Faculdade de Filosofia.		Grupo de Pesquisa em Filosofia-CEP/Faculdade de Medicina da Bahia (FAMEB) e Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde (PG-MS).
2011	Pós-Graduação de Medicina – Dra Eliane Azevedo e Dr. Eduardo Netto. Dra. Gloria Sampaio.		PPGMS – Disciplina Bioética.
2010 – Atual	Atividade de formação e capacitação em Bioética: seminários e discussão como membro do NETBio.	6h/mês/ano letivo	NETBio-FAMEB-UFBA
2009	Abordagem integral dos cuidados paliativos.	8h	Universidade Católica do Salvador (UCSAL), Bahia, Brasil.
2005	<i>Organ Transplantation “From bench to bedside”</i>	8h	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, ABTO, Brasil. -EBMSP-Salvador -Brasil.
1996	Terapia Gênica	4 h	Buenos Aires

Sobre os autores

Adenilma Duranes Sousa

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ade_ufba@yahoo.com.br

Ajax Mercês Atta

Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ajaxmatta@gmail.com

Alessandra Bispo da Silva

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: alebispo18@hotmail.com

Alex Barbosa dos Santos

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: barbosaalex@hotmail.com

Alexandre Moraes Pinheiro

Laboratório de Bioquímica e Imunoparasitologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: amp1@uol.com.br

Ananda Isis Lima de Marinho

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ananda-biologa@gmail.com

Anaque de Oliveira Pires

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: anaque.pires@gmail.com

Ana Tereza Cerqueira Lima

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: anaterezacl@gmail.com

Balbino Lino dos Santos

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: balbinolino26@gmail.com

Bianca Sampaio

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: b.sampaiofiuza@gmail.com

Bruno Penas Seara Pitanga

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: pitangabruno@gmail.com

Camila Alexandrina Figueiredo

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: cavfigueiredo@gmail.com

Cátia Suse de Oliveira Ribeiro

Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: catiasuse@ufba.br

Cintia Rodrigues Marques

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: cintiabiomedica@yahoo.com.br

Cleide dos Santos Souza

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: souzacs14@gmail.com

Cleonice Creusa dos Santos

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: cleonicemev@gmail.com

Danielle Christine Chaves Teixeira

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: daneteixeira@hotmail.com

Diego Mota Lopes

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: diegolopesbiomedico@gmail.com

Edgar Marcelino de Carvalho

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: edgar@ufba.br

Emilia Maria Medeiros de Andrade Belitardo

Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: emilia_mandrade@hotmail.com

Érica Etelvina Viana de Jesus

Centro Universitário Jorge Amado, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ericaviana@yahoo.com.br

Érica Patrícia Pereira

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: epereira229@gmail.com

Fabine Correia Passos

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: fabine-passos@yahoo.com.br

Fillipe Mendes de Araújo

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: fillipe_mendes@icloud.com

Gerson Queiroz

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: enfo.queiroz@gmail.com

Gyselle Chrystina Baccan

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: gbaccan@ufba.br

Hellen Freitas

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: hellenbiomedicina@yahoo.com.br

Hugo Bernardino Ferreira Silva

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: hugo.bernardinos@gmail.com

Icanaã Solon

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: icanaa.solon@hotmail.com

Isaac Suzart Gomes-Filho

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil. E-mail: isuzart@gmail.com

Jamille Souza Fernandes

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: millesf182@gmail.com

Laise Cedraz Pinto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: lcedraz@hotmail.com

Louise Correia de Lima

Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: louselima13@hotmail.com

Luciana Santos Cardoso

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: lucianac@ufba.br

Márcia Tosta Xavier

Curso de Odontologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: tostamarcia@gmail.com

Marcienne Tardy

Universidade de Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Paris, França. E-mail: marcienneTardy@aol.com

Marcos Borges Ribeiro

Laboratório de Imunologia e biologia Molecular, Instituto de Ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ribeiromb@hotmail.com

Maria de Fátima Dias Costa

Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: costasl@ufba.br

Maria Ilma Araujo

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brasil. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: mariailma.araujo@gmail.com

Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: mluiza@ufba.br

Milca de Jesus Silva

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
E-mail: milcajsilva@gmail.com

Milena Clementino

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: milenaclementino@yahoo.com.br

Monique Marylin Alves de Almeida Carneiro

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: moniquemarylin27@gmail.com

Monique Salles de Souza

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: moniquesalles@hotmail.com

Natali Alexandrino Cerqueira

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: natali.alexandrino@yahoo.com

Neuza Maria Alcântara Neves

Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Instituto de Ciências da Saúde E-mail: neuza@ufba.br

Noélio de Jesus Menezes

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: njmfba@gmail.com

Norma Vilany Queiroz Carneiro

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: normavilany@hotmail.com

Paulo Cirino de Carvalho-Filho

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil. Curso de Odontologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: pauloccf@yahoo.com

Paulo Lucas Cerqueira Coelho

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: paulocoelhoba@gmail.com

Raimon Rios da Silva

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: raimonrios@gmail.com

Ramon dos Santos El-Bachá

[Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ramon@ufba.br

Ramon Mendes dos Santos

União Metropolitana de Educação e Cultura, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ramon.bio.ms@gmail.com

Regina Nascimento

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: regina.bmd@gmail.com

Ricardo Riccio Oliveira

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ricardoriccio@gmail.com

Roberto José Meyer Nascimento

Departamento de Biointeração, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: meyer@ufba.br

Rosângela Gomes de Lima

Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: roseli-ma@ufba.br

Ryan dos Santos Costa

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ryan.costa@ufba.br

Silvane Maria Braga Santos

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil. E-mail: silvane@ufba.br

Silvia Lima Costa

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: costasl@ufba.br

Songelí Menezes Freire

Laboratório de Imunologia e biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: songeli@ufba.br

Soraya Castro Trindade

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil. E-mail: soraya@uefs.br

Talita Santos

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: talitasj07@gmail.com

Tamires Cana Brasil

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: tam_brasil@hotmail.com

Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida

Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: tarcisiovvs@hotmail.com

Thales Fonseca

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: thalesfonseca@live.com

Valdirene Leão Carneiro

Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia,
Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: valeao@hotmail.com

Victor Diogenes Amaral da Silva

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento
de Biofunção, Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da
Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: vdsilva@ufba.br

Vivaldo Moura-Netto

Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer. E-mail: vivaldo-
mouraneto@gmail.com