NATHÁLIA FERREIRA LIMA

Mansonella ozzardi: uma filaria negligenciada que pode modular a
resposta imune

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Biologia da Relação Patógeno- Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

São Paulo
2017

NATHÁLIA FERREIRA LIMA

Mansonella ozzardi: uma filaria negligenciada que pode modular a
resposta imune

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia
da Relação Patógeno- Hospedeiro do Instituto de Ciências
Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lima , Nathália Ferreira

Mansonella ozzardi: uma filaria negligenciada que
pode modular a resposta imune / Nathália Ferreira Lima ;
orientador Marcelo Urbano
Ferreira. -- São Paulo, 2017.

150 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto
de Ciências Biomédicas.

1. filaria. 2. CD39. 3. resposta imune. 4. Célula T
reguladora. I. Urbano Ferreira, Marcelo , orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nathália Ferreira Lima

Titulo da Dissertação/Tese: *Mansonella ozzardi*: uma filaria negligenciada que pode modular a resposta imune

Orientador: Marcelo Urbano Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de agosto de 2013.

PARECER 1133/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 21.08.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: " *Imunorregulação da malária vivax e mansonelose: linfócitos T reguladores e células produtoras de IL-10* " do pesquisador MARCELO URBANO FERREIRA e aluna NATHÁLIA FERREIRA LIMA

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 21.08.2014.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo Urbano Ferreira pela confiança a qual me depositou durante a realização desse trabalho, permitindo que eu trabalhasse com aquilo que gosto e proporcionado de maneira irrestrita sempre as melhores oportunidades para a minha formação profissional. Te agradeço acima de tudo, pelos seus exemplos diários ao longo desses anos. Você tem a minha admiração e gratidão eterna!

Agradeço também de forma muito especial, a todos os pacientes que fizeram parte do estudo, sem a generosidade dos quais a realização do trabalho não teria sido possível. Gostaria de agradecê-los também pelos momentos enriquecedores, me fazendo lembrar daquilo que é de fato importante da vida e o que é a verdadeira sabedoria.

Um agradecimento especial a Raquel Muller Gonçalves Lopes. Esse trabalho não teria acontecido sem você, dos planos à execução. Através do seu amor e dedicação ao trabalho eu redescobri aquilo que amo fazer!

A todos que fizeram parte do trabalho de campo (Raquel, Ligia Gonçalves, Marcelo, Mauro Tucci e Pablo Fontoura), dividindo o mais árduo e também o mais gratificante dos trabalhos. Agradeço a todos pelas boas memórias.

A toda equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Malária, Maria José Menezes, Anaclara Pincelli, Vanessa Nicolete, Priscila Thihara, Thais Crippa, Lais Salla e Rodrigo Corder, pela ajuda irrestrita sempre, e pelos ótimos momentos ao longo desses anos!

A professora Dra. Maria Yazdanbakhsh e a equipe do Leiden University Medical Center, pela importante colaboração na realização desse trabalho.

A Dra. Silvia Portugal, Dr. Peter Crompton e ao National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), pela oportunidade de ter realizado o estágio .

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Ferreira, do departamento de Microbiologia da USP, pela confiança e acesso ao Citômetro de Fluxo.

Aos professores Dr Gilberto Fontes, Dra. Karina Carvalho Salmazi e Silvia Boscardin, pela participação em meu exame de qualificação e pelas suas sugestões.

A minha família. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida! Obrigada por compreenderem minha ausência e por estarem sempre ao meu lado, me dando todo o suporte na realização dos meus sonhos! Saibam que cada conquista minha é mérito de vocês!

Agradeço à FAPESP pelo fundamental suporte financeiro oferecido para realização desse trabalho. O suporte consistiu na concessão da bolsa de pesquisa no país (2013/26928-0), da bolsa de estágio de pesquisa no exterior (2016/06970-0) e também no subsídio ao projeto FAPESP 2013/12723-7.

RESUMO

LIMA, N.F. ***Mansonella ozzardi*: uma filária negligenciada que pode modular a resposta imune**. 2017. 150f [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

As infecções humanas com a filária *Mansonella ozzardi* ocorrem em focos situados em regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul e frequentemente coexistem com outras doenças endêmicas tropicais. Na Amazônia brasileira, as infecções são geralmente assintomáticas e a maior parte delas, consequentemente, deixa de ser diagnosticada. As filariose crônicas, geralmente não tratadas, podem criar um ambiente imunorregulador, caracterizado pela expansão de linfócitos T produtores de IL-10, que mediam a supressão de respostas proliferativas de células T frente a antígenos específicos bem como a antígenos não-relacionados. Neste trabalho, utilizamos marcadores de ativação celular (CD69 e HLA-DR) e de atividade reguladora (CD39, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, PD-1, LAP-TGF- β e TNFR11) para caracterizar populações de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em indivíduos infectados por *M. ozzardi* bem como em controles saudáveis de uma área endêmica deste parasito na Amazônia Brasileira. A análise de PBMCs, por citometria de fluxo multiparamétrica de 49 pacientes infectados por *M. ozzardi*, mostrou que pacientes e controles apresentam proporções similares de Treg clássicas circulantes. No entanto, indivíduos infectados apresentam um aumento da proporção de células CD4⁺ e células T reguladoras (Tregs) que expressam a molécula CD39 (uma ectonucleotidase que regula o equilíbrio das respostas imunológicas através da fosfohidrolização de ATP, uma molécula inflamatória, em adenosina, uma molécula anti-inflamatória). Células Treg CD39⁺ parecem definir uma população distinta entre as Treg, pois, ao compararmos os marcadores de regulação e ativação entre Tregs CD39⁺ e CD39⁻, encontramos maior frequência de expressão desses marcadores nas Treg CD39⁺. O bloqueio dessa molécula, em condições de reestímulo celular, aumenta a produção de citocinas inflamatórias e diminui a produção de IL-10, confirmando seu papel regulador. Avaliamos também diversas populações celulares (células NK, NKT, células γ - δ , monócitos, células dendríticas, células B e B reguladoras) e suas subpopulações e vimos que a infecção por *M. ozzardi* parece não afetar a frequência dessas populações celulares. Verificamos também as concentrações plasmáticas de várias citocinas, e IL-10 não parece não ser a citocina chave na regulação da infecção nesta filariose crônica, também não observamos um aumento das citocinas que caracterizam a resposta Th2. Ao avaliarmos as respostas proliferativas frente a antígenos específicos, bem como a antígenos não-relacionados e mitógenos, não observamos nos pacientes a supressão da resposta proliferativa característica das filariose por outras espécies; porém, ao bloquearmos essas com anticorpo anti-CD39, encontramos uma drástica redução na proliferação.

Palavras- chave: Mansonelose. Linfócitos T CD4⁺ reguladores. Citocinas. CD39.

ABSTRACT

LIMA, N.F. **Mansonella ozzardi: the neglected New World filarial nematode that can modulate the immune response.** 2017. 150f. [Ph. D. thesis (Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Human infections with the filarial parasite *Mansonella ozzardi* are common in tropical and subtropical areas of Central and South America and often coexist with other endemic tropical diseases, such as malaria. In the Amazon Basin of Brazil, infections are typically asymptomatic and most of them remain undiagnosed and untreated. These chronic, untreated filarial infections are potentially associated with a regulatory immune environment, dominated by IL-10-producing T-cells, which mediate the suppression of T-cell proliferation in response to filarial and non-related antigens. Here, we used markers of cell activation (CD69 and HLA-DR) and regulatory activity (CD39, CTLA-4, OX40, GITR, and TNFR11) to characterize peripheral-blood mononuclear cell (PBMCs) subpopulations in individuals infected with *M. ozzardi* and in healthy controls living in an endemic area of *M. ozzardi* in the Brazilian Amazon. Multiparameter flow cytometry analysis of PBMCs from 49 malaria patients showed that patients and controls have similar proportions of classic Tregs circulating in their peripheral blood. However, we observed an increased proportion, in filarial carriers, of CD4⁺ cells and Tregs expressing CD39, an ectonucleotidase that regulates the balance of immune responses through phosphohydrolysis of ATP, an inflammatory molecule, to adenosine, an anti-inflammatory molecule. Since CD39⁺Treg cells appears to define a distinct population among Tregs; in fact, we found increased frequency of CD39⁺ Tregs, compared to CD39⁻ Tregs, expressing activation and regulatory markers. Moreover, after blocking CD39 under cellular restimulation conditions, we found increased concentrations of inflammatory cytokines and decreased concentration of IL-10, consistent with its regulatory role. We have also shown that *M. ozzardi* infection does not appear to affect the proportion of several cell populations (NK, NKT, γ - δ , monocytes, dendritic cells, B cells and regulatory B cells) and some of their subpopulations. Finally, our comparison of plasma concentrations of several cytokines in infected and uninfected subjects suggested that IL-10 does not seem to play a key role in immunoregulation associated with this chronic filariasis; we did not find increased levels of typical Th2 cytokines in infected subjects. When assessing cell-proliferation responses to specific and unrelated antigens, we did not observe the typical suppression of such responses that appears to be characteristic of filariases caused by other species. Interestingly, however, by adding anti-CD39 antibodies we were able to block cell proliferation by a large extent.

Keywords: Mansonelirosis. Regulatory CD4⁺ T cell. Cytokines. CD39.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo biológico de <i>Mansonella ozzardi</i>	22
Figura 2: Distribuição geográfica de <i>Mansonella ozzardi</i> nas Américas.....	27
Figura 3- Características diferenciais das microfilárias	31
Figura 4- Localização geográfica das comunidades ribeirinhas ao longo do rio Purus participantes do estudo.....	55
Figura 5- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFRII, PD-1 e CTLA-4.....	64
Figura 6- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam os marcadores CTLA-4 (intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR	65
Figura 7- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFRII, PD-1 e CTLA-4.....	66
Figura 8- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores CTLA-4(intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR.....	67
Figura 9- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de células dendríticas..	68
Figura 10- Estratégia de análise utilizada para definir a população de células NK que co-expressam o marcador de ativação CD69 e as subpopulações de células NKT	69
Figura 11- Estratégia de análise utilizada para definir a população de células T γ - δ que co-expressam o marcador de ativação CD69	70
Figura 12- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de monócitos que co-expressam o marcador de ativação CD69.	71
Figura 13- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de células B naïve, células B de memória, clássicas, ativadas e atípicas e plasmócitos.	72
Figura 14- Estratégia de análise usada para definir subpopulações de células B reguladora	74
Figura 15- Estratégia de análise usada para definir subpopulações de células T CD4 ⁺ que produtoras de IFN- γ , TH2 (IL-4, IL-5, IL-13), TNF- α , IL-2 e IL-10.	78
Figura 16- Estratégia de análise utilizada para quantificar a proliferação de linfócitos.....	80
Figura 17- Concentração de IgE e IgG4 BmA específico em indivíduos infectados e não infectados por <i>M. ozzardi</i>	133

Figura 18- Correlação entre a parasitemia (número de cópias) e a concentração de IgG4 BmA específico.....	133
Figura 19- Expressão de CD39 nos linfócitos T CD4 ⁺ e células Treg.....	133
Figura 20- Expressão de marcadores de regulação e ativação celular nas células Treg CD39 ⁺ e Treg CD39 ⁻	133
Figura 21- Correlação entre carga parasitária e a proporção de células TCD4 ⁺ e Treg que expressam moléculas moduladoras.	133
Figura 22- Correlação entre carga parasitária e a proporção de células γ - δ	133
Figura 23- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com <i>M. ozzardi</i> , <i>P. vivax</i> , Fitohemaglutinina (PHA) e <i>T. gondii</i>	133
Figura 24- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com BmA, SEB e SEB + anti-CD39.....	133
Figura 25- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com SEB e na presença de anti- CD39, adenosina, ATP e anti-IL10.	133
Figura 26- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com SEB e na presença de anti- CD39 e adenosina.....	133
Figura 27- Proporção de células T CD4 ⁺ produtora das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após o estímulo com SEB e na presença de anti- CD39.....	133
Figura 28- Proporção de células T CD4 ⁺ produtora das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após o estímulo com SEB e na presença de anti- CD39 e adenosina.	133
Figura 30- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com SEB e SEB combinado com anticorpo purificado anti- CD39	139
Figura 31- Expressão do marcador de proliferação KI67 nas células T CD4 ⁺ e Treg CD39 ⁺ e CD39 ⁻ e nas células T CD4 ⁺ e Treg bloqueadas ou não com anticorpo purificado anti-CD39.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Vetores da <i>Mansonella ozzardi</i> na América Latina.	25
Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ que expressam CTLA-4, TNFRII, PD1, CD39 e moléculas com potencial efeito ativador	60
Tabela 3- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ que expressam moléculas de atividade reguladora.....	60
Tabela 4- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de células dendríticas	61
Tabela 5- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos B, linfócitos NK, células NKT, células γ - δ e monócitos	61
Tabela 6- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos B atípico	62
Tabela 7- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de Tregs que expressam Ki-67.....	62
Tabela 8- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de células B reguladoras.....	73
Tabela 9- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4 ⁺	78
Tabela 10- Características gerais e hematológicas dos pacientes e controles	87
Tabela 11- Frequência de sintomas em indivíduos infectados e não infectados por <i>M. ozzardi</i>	88
Tabela 12- Concentração de IgE total e IgG4 BmA específica em indivíduos infectados e não infectados por <i>M. ozzardi</i>	89
Tabela 13- Características gerais e hematológicas nos grupos baseados na concentração de anticorpos anti-IgG4 <i>B. malayi</i> específico maior que a mediana (High) e menor que a mediana (Low)	91
Tabela 14- Perfil populacional de linfócitos CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺	93
Tabela 15- Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam marcadores de regulação e de ativação.....	93
Tabela 16- Percentual de linfócitos T CD8 ⁺ que expressam marcadores de regulação e de ativação.....	94

Tabela 17- Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ FOXP3 ⁺ (Treg), Treg CD39 ⁺ e Treg CD39 ⁻ que expressam marcadores de atividade reguladora e de ativação.....	96
Tabela 18- Proporção de células NK, NKT e γ - δ na infecção por <i>M. ozzardi</i> em comparação com controles	104
Tabela 19- Proporção de linfócitos B e linfócitos B atípicos na infecção por <i>M. ozzardi</i> em comparação com controles.	106
Tabela 20- Proporção de monócitos na infecção por <i>M. ozzardi</i> em comparação com controles	106
Tabela 21- Percentual de células dendríticas que expressam marcadores de maturação e migração.	109
Tabela 22- Níveis de citocinas circulantes avaliados em plasma de indivíduos infectados e controles expostos.....	111
Tabela 23- Percentual de células B produtoras de IL-10 ou TNF- α intracelular ou que apresentem fenótipo de células B reguladoras.	114
Tabela 24- Percentual de PBMC em proliferação celular após estímulo com antígeno específico, mitógeno e antígenos não relacionados.	117
Tabela 25- Proporção de linfócitos em proliferação após estímulo com BMA, SEB e SEB + anti-CD39	117
Tabela 26- Proporção de linfócitos em proliferação após estímulo com SEB e bloqueio com anti-CD39.....	118
Tabela 27- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular entre indivíduos FIL ⁺ e FIL ⁻	125
Tabela 28- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular entre indivíduos IgG4H e IgG4L.....	126
Tabela 29- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular com SEB e bloqueio com anti-CD39.....	127
Tabela 30- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com SEB, BmA e SEB combinado com anti- CD39 nas amostras Fil ⁺ e FIL ⁻	129
Tabela 31- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com SEB, BmA e SEB combinado com anti- CD39 nas amostras IgG4H e IgG4L.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

χ^2 – qui-quadrado (teste estatístico)

AC - Acre

AM - Amazonas

AMP - Adenosina monofosfato

APC – Aloficocianina

APCCy7- Aloficocianina *Cy-chrome 7*

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

ATP- Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CCR – Receptor de quimiocina

CD - Grupos de diferenciação (moléculas de superfície celular que servem como marcadores, do inglês *cluster of differentiation*)

CEP – Comitê de ética em pesquisas com seres humanos

CO₂ - Dióxido de carbono

CTLA-4 - Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico

DCs - Células dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECD – do inglês *R Phycoerythrin-Texas Red®-X*

ECM- Malária cerebral experimental

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Imunoensaio enzimático

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FOXP3 - do inglês *forkhead box P3*

FSC - do inglês *Forward Scatter*

g – grama

g - Unidade de aceleração gravitacional

GITR - Receptor de TNF induzido por glicocorticóide

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HCl - Ácido Clorídrico

HLA-DR - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

ICOS – Co-estimulador induzível de célula T

IL - Interleucina

INF- γ - Interferon- gama

iRBC – Eritrócitos infectados

km – quilômetros

L - Litro

LAP – Peptídeo associado à latência

LPS - Lipopolissacarídeo

M – molaridade

mg - miligrama

mL - mililitros

mM - milimolar

N - *Normalidade* ou concentração *normal*

NaN₃ – Ázida sódica

NaOH - Hidróxido de Sódio

ng - nanogramas

NK - Célula *Natural Killer*

nm - nanometro

°C – Graus Celsius

OX40 (CD134) - membro da superfamília dos receptores de TNF

PBMCs - Células mononucleares de sangue periférico

PBS - Tampão Salino Fosfatado

PD-1 – do inglês *Programmed cell death protein 1*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PE – Ficoeritrina

PECy7 – Ficoeritrina *Cy-chrome 7*

PerCPCy5.5 – *Peridinin chlorophyll cyanine dye*

PE-TR – *Phycoerythrin-Texas Red*

pg - picogramas

PHA-P – do inglês *Phytohemagglutinin-P*

PMA - Phorbol-12-myristate-13-acetate

RPMI - Meio de Cultura Celular (Roswell Park Memorial Institute)

rpm – rotações por minuto

SAv - HRP- do inglês *streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*

SFB - Soro fetal bovino

SSC – do inglês *Side Scatter*

sTNFRI – Receptor solúvel I do Fator de Necrose Tumoral

sTNFRII – Receptor solúvel II do Fator de Necrose Tumoral

TCR - Receptor da célula T

T γ/δ – Linfócito T gama-delta

TA - Temperatura ambiente

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th1

Th2 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th2

Th3 - Linfócito T regulador Th3 (Linfócito T *helper* com função reguladora)

Th17 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th17

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- alpha

TNFR I – Receptor I do Fator de Necrose Tumoral

TNFR II – Receptor II do Fator de Necrose Tumoral

Tr1 - Linfócito T regulador do tipo 1

T_{reg} - Linfócito T regulador (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺)

UV - Ultravioleta

μ g - micrograma

μ L – microlitro

μ M – micromolar

|

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Histórico	20
1.2 Ciclo e descrição morfológica	21
1.3 Uma distribuição geográfica irregular	26
1.4 Seria <i>M. ozzardi</i> totalmente inofensiva?	28
1.5 Diagnóstico	30
1.6 Abordagens terapêuticas.....	33
1.7 Resposta imune nas filaríoses: inflamação <i>versus</i> regulação	35
1.7.1 <i>Imunorregulação antígeno-específica</i>	37
1.7.2 <i>Imunomodulação em condições de co-infecções, vacinas e alergia</i>	39
1.7.2.1 <u>Co-infecções</u>	39
1.7.2.2 <u>Infecção por filárias e eficácia a vacinação</u>	42
1.7.2.3 <u>Alergias</u>	43
1.8 Células T reguladoras e seu papel nas filaríoses	44
1.9 Marcadores de atividade reguladora nas células Treg	46
1.9.1 <i>CD39</i>	47
1.9.2 <i>CTLA-4</i>	48
1.9.3 <i>LAG-3</i>	49
1.9.4 <i>PD-1</i>	49
1.9.5 <i>LAP-TGF- β</i>	50
1.9.6 <i>OX40</i>	50
1.9.7 <i>GITR</i>	51
1.1 Mansonelose e imunorregulação.....	51
2 OBJETIVOS.....	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 Área e população de estudo	54
3.2 Coleta e processamento de amostras	55
3.2.1 <i>Estudo piloto</i>	55
3.3 Recrutamento dos participantes do estudo de imunidade celular	56

3.4 Diagnóstico de infecções	57
3.5 Obtenção de PBMCs.....	58
3.6 Descongelamento das PBMCs criopreservadas	59
3.7 Caracterização fenotípica de populações celulares na infecção por <i>M. ozzardi</i>	59
3.8 Caracterização fenotípica dos linfócitos B reguladores.....	72
3.9 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção por <i>M. ozzardi</i>	74
3.9.1 <i>Luminex</i>	74
3.10 Quantificação de IgE total e IgG4 específica contra antígenos de <i>Brugia malayi</i>	75
3.11 Detecção de citocinas Intracelulares.....	76
3.12 Ensaio de proliferação celular	79
3.13 Ensaio de detecção de citocinas intracelular e proliferação frente ao bloqueio da molécula CD39.....	80
3.14 Detecção de citocinas em ensaios de re-estimulação	81
3.15 Preparo do extrato de microfilárias de <i>M. ozzardi</i>	82
3.16 Preparo do extrato solúvel de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	83
3.17 Preparo do extrato do verme adulto de <i>B. malayi</i>	83
3.18 Preparo dos eritrócitos infectados de <i>P. vivax</i>	84
3.19 Análise estatística	84
4 RESULTADOS.....	86
4.1 População de estudo	86
4.2 Quantificação de IgE total e IgG4 específica contra antígenos de <i>Brugia malayi</i>	88
4.3 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador e ativador.	91
4.4 Caracterização fenotípica de células NK, NKT e γ - δ	102
4.5 Caracterização fenotípica de linfócitos B e linfócitos B atípicos	105
4.6 Caracterização fenotípica de subpopulações de monócitos.....	107
4.7 Caracterização fenotípica das subpopulações de células dendríticas (mDCs e pDCs)	107
4.8 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção por <i>M. ozzardi</i>	110
4.9 Caracterização de células B reguladoras produtoras de IL-10.....	111
4.10 Ensaio de proliferação celular	112
4.10.1 Ensaio de proliferação frente ao bloqueio da molécula CD39	119

4.11 Detecção de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos T CD4 ⁺	121
4.11.1 Detecção de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos T CD4 ⁺ frente ao bloqueio da molécula CD39	122
4.12 Níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura	128
4.13 Expressão de KI67 e FOXP3 nas células CD39 ⁺ e CD39 ⁻	131
5 DISCUSSÃO	134
6 CONCLUSÃO	137
REFERENCIAS*	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O primeiro relato da presença de microfilárias de *M. ozzardi* foi publicado por Sir Patrick Manson em 1897, com base no exame de amostras de sangue periférico de ameríndios que viviam no interior da antiga Guiana Inglesa, coletadas por Ozzard. Manson descreveu a espécie nova como *Filaria ozzardi* (MANSON, 1897; OZZARD, 1897). Em 1929, Faust, diante da impossibilidade de vincular esta espécie a qualquer outro gênero conhecido da época, criou o gênero *Mansonella* baseado na descrição morfológica das microfilárias e nas descrições preliminares e incompletas dos vermes adultos fornecidos por alguns pesquisadores. Anos mais tarde, Cesare Romiti, em seu trabalho “Filariasis in British Guiana - A comparative study of *Filaria bancrofti* and *Filaria ozzardi* infections”, observou que *M. ozzardi* era mais frequente nas regiões altas dos rios, que as infecções não apresentavam relações com gênero e idade e que as microfilárias não possuíam periodicidade aparente como visto para outras filarioses (ROMITI, 1935). Quase um século depois da primeira descrição de microfilárias, Orihel e Eberhard descreveram os parasitos na fase adulta (vermes machos e fêmeas), recuperados de macacos *Erythrocebus patas* infectados experimentalmente (ORIHIEL; EBERHARD, 1982); assim, estabeleceram a posição taxonômica definitiva deste nematódeo (ORIHIEL; EBERHARD, 1984).

No Brasil, *M. ozzardi* foi encontrada pela primeira vez em 1949 na cidade de Manaus. Um inquérito visando a determinar a frequência do parasitismo por filárias entre a população de Manaus mostrou que 0,6% das 2.045 pessoas examinadas apresentavam microfilárias de *M. ozzardi* (DEANE, 1949).

Até 1950, muito pouco se sabia sobre a distribuição das filarioses no Brasil, com exceção da existência de focos isolados de *Wuchereria bancrofti* em Salvador (BA) e Belém (PA). A partir do final da década de 1940 e início da década de 1950, através do Serviço Nacional de Malária, foram iniciados os primeiros estudos para se conhecer a distribuição geográfica e prevalência dos filarídeos em nosso país. A história inicial da *M. ozzardi* sempre

esteve atrelada ao interesse por outras filárias, em especial *W. bancrofti*, que, em função da maior prevalência e principalmente pelo seu maior impacto clínico, atraíram o interesse assim como todas as ações públicas.

O estudo das mansoneloses de uma maneira geral, e de *M. ozzardi* especificamente, é extremamente necessário para preencher diversas lacunas em nosso conhecimento sobre (a) os aspectos clínicos associados à infecção; (b) a localização anatômica do parasito, já que o hábitat dos vermes adultos em hospedeiros humanos se mantém incerto; (c) o tratamento, pois apesar da evidência recente da eficácia da Ivermectina contra microfilárias (referência), não está claro se este anti-helmíntico, sozinho ou combinado a outras drogas, é capaz de eliminar os vermes adultos e (d) o possível efeito imunorregulador similar ao observado em outras infecções por helmintos. Todas essas incógnitas fazem com que *M. ozzardi* se mantenha como um típico parasito negligenciado que afeta principalmente populações rurais pobres em toda a América Latina e Caribe (LIMA et al., 2016) .

1.2 Ciclo e descrição morfológica

A infecção natural por *M. ozzardi* começa pela a picada de vetores infectados, o “maruim” ou “mosquito pólvora” (a maioria do gênero *Culicoides*) ou o “pium” ou “borrachudo” (gênero *Simulium*), que depositam larvas do terceiro estágio (L3) na pele do hospedeiro humano (Figura 1). Essas larvas (L3) sofrem duas outras mudas e se desenvolvem em vermes adultos. Os adultos são de forma cilíndrica, as fêmeas apresentam corpo branco, transparente, com cutícula lisa e homogênea, medindo o dobro do tamanho dos machos, com 3,22 cm a 6,15 cm de comprimento por 0,013 cm a 0,019 cm de diâmetro (ORIHIL; EBERHARD, 1982). Os machos medem entre 2,4 cm a 2,8 cm de comprimento por 0,007 cm a 0,008 cm de diâmetro e tem sistema reprodutor em tubos simples e testículos dispostos na região esofágica (ORIHIL; EBERHARD, 1982). O hábitat presumido dos vermes adultos em humanos permanece incerto; em macacos patas infectados experimentalmente, um pequeno número de vermes adultos de *M. ozzardi* foi recuperado de tecidos subcutâneos, porém não foram encontrados vermes adultos na cavidade abdominal ou no mesentério

(ORIHEL et al., 1981).

As microfilárias são liberadas pelas fêmeas vivíparas e atingem a corrente sanguínea, onde podem ser detectadas a qualquer hora do dia. Descreveu-se certa variação periódica com relação à densidade microfilarial no sangue capilar de indivíduos infectados (RACHOU; LACERDA, 1954; MORAIS, 1959); essa variação não é necessariamente síncrona e apresenta diferentes horas de pico entre os hospedeiros, originando um padrão de criptoperiodicidade que pode ser difícil de identificar (PINCHON, 1983). As microfilárias de *M. ozzardi* apresentam endosimbiontes bacterianos do gênero *Wolbachia* (CASIRAGHI et al., 2001), com possíveis implicações imunológicas e terapêuticas.

Figura 1- Ciclo biológico de *Mansonella ozzardi*. Fonte: Lima et al., 2016.

As microfilárias medem 207-232 (média, 220) μm de comprimento e 3-4 μm de diâmetro quando fixadas em formalina e coradas com hematoxilina. Possuem cauda fina e curta, terminando em forma de gancho ou foice; os núcleos caudais são reduzidos a uma fileira de sete a nove elementos e a ponta da cauda é desprovida de núcleos (LAURENCE; SIMPSON, 1968; (ORIHIL; EBERHARD, 1982; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997). A extremidade anterior possui um espaço cefálico (7-9 μm) que termina no ponto em que começa a coluna nuclear; seus primeiros núcleos somáticos são tipicamente dispostos em fila única e os dois primeiros formam um par típico, um atrás do outro, onde nas preparações coradas, os núcleos somáticos coram densamente. A sua sobrevida é estimada em 32 meses, com o seu ciclo biológico completado nos simulídeos em nove dias (CERQUEIRA, 1959; SHELLEY; SHELLEY, 1976; TIDWELL; TIDWELL; MUNOZ DE HOYOS, 1980) e nos culicoides em 12 dias (NATHAN; BARTHOLOMEW; MUNROE, 1978). O período pré-patente em infecções humanas é desconhecido, mas em macacos *Erythrocebus patas* as primeiras microfilárias são detectadas na corrente sanguínea 149-186 dias após a inoculação subcutânea de larvas L3 (ORIHIL et al., 1981).

As microfilárias de *M. ozzardi* são geralmente menores do que as de *Onchocerca volvulus* (que causa a oncocercose humana), que medem 1,86 a 2,86 cm de comprimento (POST et al., 2003). No entanto, os tamanhos podem se sobrepor, representando um grande desafio de diagnóstico em locais onde ambas as espécies coexistem (POST et al., 2003; SHELLEY, 2002). Da mesma forma, o diagnóstico diferencial de *M. perstans* também é importante, já que esta é co-endêmica com *M. ozzardi* em toda a Amazônia, no sul da Colômbia (KOZEK et al., 1983), no oeste da Guiana (ORIHIL, 1967), na Venezuela (FORMICA; BOTTO, 1990) e no Brasil (TAVARES da SILVA et al., 2017).

Os vetores pertencentes a duas famílias de dípteros estão envolvidos na transmissão de *M. ozzardi*: Ceratopogonidae, conhecidos como “maruins” ou “mosquito-pólvora” e Simuliidae, conhecidos como “piuns” ou “borrachudos”. Os membros do gênero *Culicoides* e, menos frequentemente, *Leptoconops*, foram identificados pela primeira vez como vetores em várias ilhas do Caribe e no México enquanto são moscas do gênero *Simulium* (Diptera: Simuliidae) as responsáveis pela transmissão na América Central e do Sul (LIMA et al., 2016).

Ambas as famílias de vetores têm ampla distribuição geográfica. Os ceratopogonídeos possuem vinte e sete gêneros, dentre os quais o *Culicoides* é o principal hematófago (MONTEIRO, 2009). Este gênero compreende em torno de 1.000 espécies, sendo 75 encontradas no Brasil (MARCONDES, 2005). Entretanto, até o momento, nenhum culicoide foi descrito como vetor de mansonelose no Brasil. No caso da família Simuliidae, aproximadamente oitocentas espécies foram descritas (CROSSKEY; HOWARD, 2010), sendo noventa delas já identificadas no Brasil (PEPINELLI; TRIVINHO-STRIXINO; HAMADA, 2003). *S. amazonicum*, *S. argentiscutum*, *S. oyapockensis* e *S. roraimense* são as espécies encontradas infectadas com larvas e *M. ozzardi* e designadas como responsáveis pela transmissão da doença no Brasil até o momento (SHELLEY; LUNA DIAS; MORAES, 1980). A Tabela 1 lista os gêneros conhecidos de vetores de mansonelose.

Tabela 1- Vetores da *Mansonella ozzardi* na América Latina.

Região	País	“Maruins”	“Borrachudos / Piuns”	Referências
América do Norte	Mexico	<i>Culicoides furens</i>		Biagi et al. 1958
América Central	Panama		<i>Simulium sanguineum</i>	Petersen et al. 1984
Caribe	Haiti	<i>C. furens, C. barbosai</i>		Lowrie and Raccurt, 1981; Lowrie and Raccurt, 1984; Lowrie et al. 1983
	St. Vincent	<i>C. furens</i>		Buckley 1933; Buckley 1954
	Trinidad	<i>C. phlebotomus</i>		Nathan 1981
América do Sul	Argentina	<i>C. lahillei, C. paraensis</i>	<i>S. exiguum</i>	Shelley and Coscarón, 2001
	Brasil		<i>S. amazonicum, S. argentiscutum, S. oyapockense s.l. or S. roraimense</i>	Cerqueira, 1959; Moraes et al. 1985; Shelley and Shelley, 1976; Shelley et al. 1980
	Colômbia	<i>C. insinuatus, C. caprilesi?</i>	<i>S. amazonicum, S. argentiscutum, S. sanguineum</i>	Tidwell and Tidwell 1982; Tidwell et al. 1980
	Guyana		<i>S. oyapockense s.l.</i>	Nathan et al. 1982
	Suriname	<i>C. guttatus?</i>		Bruijning 1957
	Venezuela		<i>S. oyapockense s.l., S. guyanensis</i>	Yarzabal et al. 1985; González, 1987

Fonte: Lima et al., 2016

1.3 Uma distribuição geográfica irregular

As infecções humanas por *M. ozzardi* vêm sendo diagnosticadas exclusivamente nas Américas, do sul do México ao noroeste da Argentina (Figura 2), com prevalências com base em microscopia variando entre zero a até 96,2% na população. No entanto, a distribuição deste parasito é apenas parcialmente conhecida. Vários fatores contribuem para dificultar o mapeamento geográfico das infecções: (a) a vastidão do território em que pode haver transmissão e a dificuldade de acesso a muitas comunidades afetadas, tipicamente ribeirinhas e desassistidas, (b) a falta de infraestrutura de saúde nessas comunidades, dificultando o acesso ao diagnóstico laboratorial; (c) o número relativamente limitado de levantamentos epidemiológicos realizados, em grande parte, devido ao interesse limitado por este parasito. Os dados disponíveis, por sua vez, são incompletos e devem ser interpretados com cautela, uma vez que os estudos diferem quanto às técnicas de laboratório utilizadas para o diagnóstico (com sensibilidade variável), a composição etária das populações pesquisadas e vários outros fatores que podem também afetar as estimativas de prevalência. Além disso, estudos foram realizados ao longo de várias décadas, e os níveis de transmissão podem ter variado ao longo do tempo em muitas áreas endêmicas (LIMA et al., 2016).

Apesar da versatilidade do parasita em relação à preferência vetorial, a transmissão de *M. ozzardi* é claramente focal, sendo encontrados diversos “hotspots” de transmissão (GODOY et al., 1980; LAWRENCE et al., 1979; MEDEIROS et al., 2007). No Brasil, os níveis de endemicidade variam muito entre comunidades situadas ao longo de um mesmo rio na Amazônia Ocidental (ADAMI et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009), enquanto algumas comunidades ribeirinhas permanecem livres de infecção apesar da presença de vetores simúlideos competentes (BASANO et al., 2011).

A prevalência de *M. ozzardi* é muito variável em regiões distintas de um mesmo país. Por exemplo, em Trinidad registrou-se uma variação de positividade de 4,0% a 16,0% (NATHAN; BARTHOLOMEW; MUNROE, 1978); na Colômbia, de 3,4% a 49,0% (KOZEK et al., 1982, 1984; LIGHTNER et al., 1980) chegando a 96,2% em áreas indígenas (MARINKELLE; GERMAN, 1970); no Haiti, de 30,3% a 53,3% (RACCURT et al., 1980, 1982); e na Argentina, de 15% a 39% (JORG, 1983).

Figura 2- Distribuição geográfica de *Mansonella ozzardi* nas Américas. Fonte: Lima et al., 2016.

Os fatores ambientais que limitam com que *M. ozzardi* se espalhe para além desses “hotspots” ao longo dos principais rios (principalmente Solimões, Purus, Negro e Orinoco) e seus afluentes na Bacia Amazônica permanecem em grande parte indeterminados. Uma distribuição geográfica também descontínua foi descrita no caso de *M. perstans* que é transmitida por ceratopogonídeos na África rural (SIMONESEN; ONAPA; ASIO, 2011). Curiosamente, no Haiti todos os principais focos de infecção são encontrados em áreas costeiras; os vetores responsáveis pela transmissão são *C. furens* cujas larvas se reproduzem

tanto em água doce quanto salobra, e *C. barbosai* que são encontrados exclusivamente nos manguezais (RACCURT; BRASSEUR; BONCY, 2014).

No Brasil, os níveis de transmissão parecem ter aumentado nos últimos anos nas áreas endêmicas. Taxas de positividade substancialmente mais altas foram detectadas por microscopia em comunidades ribeirinhas ao longo do rio Purus nos anos 2000 (ADAMI et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; MEDEIROS; PY-DANIEL; BARBOSA, 2011) em comparação com as taxas de prevalência encontradas no momento da primeira pesquisa, na década de 1970 (SHELLEY, 1975).

A prevalência de microfilaraemia de *M. ozzardi* na maioria das comunidades endêmicas da Amazônia e do Caribe geralmente aumenta com a idade, sendo maior nos adultos entre a terceira e quarta década de vida (ADAMI et al., 2014; LAWRENCE et al., 1979; MARINKELLE; GERMAN, 1970; MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; MORAES et al., 1978; RACCURT; BRASSEUR; BONCY, 2014; RACHOU, 1957; VARGAS et al., 2015). Há também evidência de que a contagem média de microfilárias, entre indivíduos com microscopia positiva, aumenta com a idade, sugerindo que os adultos estejam expostos a infecções sobrepostas (superinfecção) decorrentes da ausência de imunidade efetiva adquirida. Os adultos do sexo masculino são frequentemente mais afetados do que as mulheres (MEDEIROS et al., 2007, 2009), com microfilaremiias médias também maiores (MEDEIROS et al., 2007); esses dados sugerem que o risco de infecção esteja associado à exposição ocupacional, como, por exemplo, a agricultura de subsistência e a pesca.

1.4 Seria *M. ozzardi* totalmente inofensiva?

Sintomas inespecíficos e sinais clínicos classicamente associados com a infecção por *M. ozzardi* incluem febre, dor articular, dor de cabeça, extremidades inferiores frias, erupções cutâneas e linfadenopatia (ADAMI et al., 2014; BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; RESTREPO; OCHOA, 1987). No entanto, as descrições disponíveis dos sintomas clínicos são em sua maioria derivadas de estudos que possuem grupos amostrais relativamente pequenos, sem grupo controle não-infectado, que não consideram a possível co-ocorrência

de outras condições infecciosas e não-infecciosas.

Existem vários trabalhos que relatam os sintomas relacionados a *M. ozzardi*. Segundo Batista, Oliveira e Rabello (1960), as pessoas com mansonelose e com alta densidade de microfilárias apresentam: febre moderada, “frieza nas pernas”, dores articulares, adenite (inflamação dos gânglios linfáticos) e dor de cabeça. Além da sintomatologia já mencionada, em outros estudos há relatos de tonturas, placas eritemato-pruriginosas e adenite inguino-crural (COSTA, 1956; OLIVEIRA, 1963; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

Em Lábrea-AM, os indivíduos infectados relataram apenas “frieza nas pernas” (referida e observada ao tato), dores articulares, febre sem causa aparente referida e eosinofilia (TAVARES, 1981). No entanto, nem todas as pesquisas revelaram associações significativas entre manifestações clínicas e a presença de infecção (ARRÓSPIDE et al., 2015; BARTOLONI et al., 1983; McNEELEY, 1989). Conforme observado por Bartoloni e colaboradores, a idade pode ser um forte fator de confusão dessa associação. Na análise não-ajustada, eles encontraram uma associação significativa entre infecção e manifestações clínicas inespecíficas, como artralgia, dor de cabeça e prurido. No entanto, eles argumentam que esta associação pode ter sido confundida pela idade, uma vez que a prevalência de infecção e a de sintomas inespecíficos na população geral aumenta com a idade. Na análise ajustada por idade e gênero, não foi observada associação entre manifestações clínicas e infecção por *M. ozzardi* na região de Chaco, na Bolívia (BARTOLONI et al., 1983).

Recentemente, uma nova manifestação clínica atribuída a esta infecção foi observada; a presença de lesões oculares. Desde o início dos anos 2000, as lesões oculares foram descritas em indivíduos infectados com *M. ozzardi* em comunidades indígenas e não-indígenas ao longo dos rios Negro e Solimões, na Amazônia brasileira. (COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008; DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GARRIDO; CAMPOS, 2000; VIANNA et al., 2012), sendo que em dois desses estudos, todos os indivíduos tiveram diagnóstico diferencial realizado e apresentaram resultado negativo para microfilárias de *O. volvulus* em biópsias de pele (COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008; DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GARRIDO; CAMPOS, 2000). Garrido e Campos descreveram primeiramente infiltrados numulares múltiplos na córnea, com ≤ 2 mm de diâmetro, em

55% de 140 indivíduos infectados (principalmente Indígenas) no rio Negro, com 2-8 lesões por olho. As lesões, em sua maioria, eram periféricas e não afetavam a acuidade visual dos indivíduos. Nenhum dos 358 indivíduos não-infectados examinados teve lesões similares na córnea (GARRIDO; CAMPOS, 2000). Um inquérito transversal subsequente foi realizado em comunidades ribeirinhas em Coari, ao longo do rio Solimões, onde a taxa de prevalência global por *M. ozzardi* é estimada em 19%. Foram diagnosticadas 76 lesões de córnea em 15% dos 95 indivíduos infectados, mas nenhuma microfilária foi encontrada por raspados da córnea ou reação em cadeia da polimerase (PCR) em biópsias de conjuntivas e limbo. Finalmente, outra pesquisa transversal em Coari encontrou lesões de córnea em 14 de 56 (25%) indivíduos microfilarêmicos e 8 de 156 (5%) nos controles não-infectados (VIANNA et al., 2012). Esses autores também relataram, pela primeira vez, a presença de microfilárias de *M. ozzardi* na córnea; por microscopia confocal, observaram lesões lineares compatíveis com microfilárias de *M. ozzardi* na córnea de sete indivíduos. Em dois deles encontraram microfilárias em esfregaços corados com Giemsa preparados com sangue da conjuntiva de limbo (VIANNA et al., 2012). Embora não haja evidência definitiva de que a microfilária de *M. ozzardi* possa causar diretamente lesões na córnea, é recomendado um exame ocular cuidadoso como parte da rotina clínica no tratamento de indivíduos infectados, independentemente de quaisquer sintomas.

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico parasitológico de *M. ozzardi* pode ser feito através da identificação do parasito no sangue. Via de regra, esse tipo de diagnóstico pode ser realizado por meio das seguintes técnicas: gota espessa (GE) de sangue, filtração de sangue em membrana de policarbonato, técnica de Knott (FONTES; ROCHA, 2005a) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (MORALES-HOJAS et al., 2001).

A microscopia de GE é uma técnica bastante utilizada em inquéritos epidemiológicos, por ser de baixo custo e de grande facilidade na obtenção e processamento das amostras. Com essa técnica, é possível realizar a identificação do filarídeo mediante a observação das características morfológicas específicas das microfilárias, sendo útil em locais onde ocorrem

infecções mistas com outros filarídeos (FONTES; ROCHA, 2005a).

Para o diagnóstico, obtêm-se amostras de 60 a 100 µL de sangue por punção da polpa digital, sem o uso de coagulante. Como as microfilárias de *M. ozzardi* circulam no sangue periférico durante todo o dia não apresentando periodicidade aparente como em outras filarioses, amostras podem ser obtidas a qualquer momento, facilitando o diagnóstico. As lâminas preparadas são então desmoglobinizadas, coradas com solução de Giemsa ou Panótico e analisadas ao microscópio com aumento de 100 x e 400 x para identificação do parasito e diferenciação das espécies baseadas nas características morfológicas das extremidades cefálica e caudal, da distribuição dos núcleos e da presença ou ausência de bainha (Figura 3).

Figura 3- Características diferenciais das microfilárias. Detalhe da porção posterior das microfilárias e distribuição dos núcleos.

A gota espessa de sangue apresenta grande sensibilidade quando o indivíduo infectado tem uma microfilaremia superior a 10 mf/mL de sangue (FONTES, 1996). Métodos de concentração são necessários para diagnosticar microfilaremys de baixa densidade. Uma técnica de concentração amplamente utilizada foi originalmente descrita por Knott em 1939 (KNOTT, 1939; RACCURT et al., 1982). Trata-se de misturar 5 ml de sangue venoso anticoagulado com 50 ml de uma solução de formalina a 2% em um tubo de poliestireno e recuperar microfilárias no sedimento após uma centrifugação breve a 400 g. Uma alíquota cuidadosamente coletada do sedimento é usada para preparar um esfregaço espesso, que é fixado com metanol, corado com Giemsa e examinado em microscópio. No entanto, a sensibilidade da técnica de Knott pode ser afetada pelo fato de as microfilárias se misturarem ao sedimento, dificultando a sua visualização ao microscópio.

Alternativamente, a filtração de membrana de polycarbonato (FMP) pode ser utilizada, permitindo o exame de volumes de sangue relativamente grandes. O sangue venoso anticoagulado (até 10 ml) é diluído em solução salina a 0,85% ou solução salina tamponada com fosfato e filtrada através de uma membrana de polycarbonato com poros de 3 µm a 5 µm de diâmetro adaptada a uma seringa estéril. Essa membrana retém as mf existentes, deixando os elementos figurados do sangue atravessar os poros da membrana. Após este procedimento de filtração, seguido de várias lavagens com solução salina, a membrana é colocada em uma lâmina de vidro, fixada com metanol, corada com Giemsa ou hematoxilina e examinada ao microscópio sob ampliação de 100-400 ×.

Em virtude da FMP utilizar uma quantidade bem maior de sangue em relação à gota espessa, essa técnica possui uma maior sensibilidade (98% FMP e 85% GE) (LEITE, 2005), sendo vantajosa no diagnóstico em pacientes com baixa densidade de microfilárias, bem como em pacientes após tratamento específico. Para alguns autores, a FMP requer pessoal técnico capacitado, sendo de alto custo e execução demorada. Por esses motivos, não é uma técnica rotineiramente utilizada (WEIL; LAMMIE; WEISS, 1997).

O diagnóstico molecular pode ser usado para detectar microfilárias de *M. ozzardi* no sangue periférico, biópsias de pele e outros tecidos. MORALES-HOJAS et al. (2001) descreveram o primeiro método baseado em PCR para a detecção de *M. ozzardi* e comprovaram a eficácia da técnica em um reduzido número de pacientes. A amplificação

baseada em PCR de sequências-alvo espécie específicas permite maior sensibilidade diagnóstica, em comparação com métodos microscópicos e diferenciação confiável entre *M. ozzardi* e outras espécies de filárias co-endêmicas, como *O. volvulus* e *M. perstans* (MEDEIROS et al., 2015; MORALES-HOJAS et al., 2001; TANG et al., 2010; VERA et al., 2011). Fatores como o armazenamento da amostra sanguínea antes da extração do DNA, o volume da amostra e os métodos utilizados no isolamento do DNA podem alterar consideravelmente a sensibilidade diagnóstica da PCR (MEDEIROS et al., 2015; MORALES-HOJAS et al., 2001).

1.6 Abordagens terapêuticas

A ivermectina utilizada em dose única (0,14-0,2 mg / kg) é atualmente o tratamento de escolha no caso de infecção por *M. ozzardi* ((GONZALEZ; CHADEE; RAWLINS, 1999; NUTMAN; KUMARASWAMI; OTTESEN, 1987), já que ao contrário da maioria das outras espécies de filárias, a dietilcarbamazina (DEC) tem pouco ou nenhum efeito sobre as microfilárias de *M. ozzardi* (BARTHOLOMEW; NATHAN; TIKASINGH, 1978), no entanto, a eficiência da ivermectina contra os vermes adultos ainda é incerta.

A ivermectina é uma droga amplamente utilizada no tratamento de filarioses, sendo utilizada isoladamente ou em associação com outros medicamentos. Trata-se de uma lactona macrocíclica que se liga aos GluCL (glutamate-gated chloride channels) fazendo com que esses canais se abram lentamente, de forma irreversível; levando a uma hiperpolarização duradoura ou despolarização do neurônio ou célula muscular ((WOLSTENHOLME; ROGERS, 2005). As proteínas alvo (GluCl) são apenas codificadas no genoma de Nematoda e Arthropoda, restringindo os efeitos da ivermectina a organismos pertencentes a estes filos (GEARY; MORENO, 2012). A eliminação da maioria das espécies de nematódeos se dá por paralisia geral locomotora e faríngea (COOK et al., 2006; GEARY et al., 1993; HOLDEN-DYE; WALKER, 2006). As microfilárias são, desta forma, transportadas para os gânglios linfáticos regionais, onde as larvas imobilizadas são mortas por células efetoras (KWARTENG et al., 2016).

Um mecanismo de ação diferente foi recentemente proposto (CARITHERS, 2017), visto que até então o efeito de imobilização causado pelas lactonas macrocíclicas não foi clinicamente validado *in vitro* (GEARY et al., 2010). O mecanismo de ação alternativo baseia-se na ideia de que a rápida eliminação das microfilárias, após o tratamento com ivermectina, é resultado de uma interação direta ou indireta com o sistema imune do hospedeiro (ALI et al., 2002). Essa interação acontece devido o bloqueio na secreção de proteínas imunomoduladoras pelas microfilárias, responsáveis por sua evasão do sistema imune do hospedeiro. Desta forma, o hospedeiro consegue gerar uma resposta imune eficaz para eliminação do parasito (CARITHERS, 2017).

Como ponto central desta hipótese, Moreno e colaboradores demonstraram que as subunidades de GluCl são especificamente localizadas em tecidos musculares que cercam a vesícula excretora- secretora (ES) nas microfilárias de *B. malayi*. O aparelho ES é o principal sítio de produção e secreção proteica, liberando diversas proteínas, denominadas como proteínas ES. A presença de uma camada muscular que engloba a vesícula ES, implica que o trânsito proteico, da vesícula para o poro exterior do aparelho ES é um processo ativo, e que GluCls regulam a atividade desse musculo. Dessa maneira, o tratamento com ivermectina leva a uma diminuição na liberação de proteína pelas microfilárias (MORENO et al., 2010).

As proteínas liberadas *in vitro* por microfilárias de *B. malayi* diferem daquelas liberadas por adultos e estão em grande parte associadas à modulação e evasão do sistema imune do hospedeiro (BENNURU et al., 2009; MORENO; GEARY, 2008). A redução dessas proteínas compromete principalmente a capacidade das microfilárias em afetar a fixação do complemento, expondo as microfilárias vivas à resposta imune inata do hospedeiro.

O papel do complemento já foi demonstrado em vários estudos *in vitro*, nos quais a adição de ivermectina provocou a morte de diferentes espécies de microfilárias, pelas células hospedeiras, apenas na presença de soro dos pacientes (RAO; CHANDRASHEKAR; SUBRAHMANYAM, 1987; VATTA et al., 2014; ZAHNER; SCHMIDTCHEN; MUTASA, 1997). Uma molécula, a ES-62 presente em proteínas ES das filárias (HARNETT; MCINNES; HARNETT, 2004), é um exemplo da atividade moduladora dessas proteínas. ES-62 reduz a proliferação de células T CD4⁺ e células B, além de diminuir a produção de IL-4 e IFN- γ , aumentar a proliferação e a produção de IL-10 e direcionam, por meio das células

apresentadoras de antígeno, a uma resposta Th2 com a inibição concomitante de respostas Th1 (HARNETT; HARNETT, 2010).

Mostrou-se recentemente que uma dose única de 0,15 mg/kg de peso corporal de ivermectina é eficaz na supressão da microfilaremia de *M. ozzardi* por pelo menos 12 meses, sugerindo dessa maneira, algum efeito sobre a sobrevivência ou fertilidade do verme feminino (BASANO et al., 2014). Efeitos adversos ao tratamento com ivermectina são normalmente relatados e lembram a reação de Mazzotti (FRANCIS; AWADZI; OTTESEN, 1985), com febre, calafrios, mal-estar, dor de cabeça, artralgia, tonturas e dispnéia; no entanto, quase todos os pacientes se recuperam rapidamente sem terapia específica (BASANO et al., 2014; KROLEWIECKI et al., 2011; NUTMAN; KUMARASWAMI; OTTESEN, 1987).

Uma vez que *M. ozzardi* abriga as bactérias endossimbiontes do gênero *Wolbachia* (CASIRAGHI et al., 2001), a doxiciclina pode ser uma terapia efetiva para eliminar os vermes adultos, como mostrado recentemente em *M. perstans* (COULIBALY et al., 2009; HOERAUF, 2009). No entanto, nenhum teste com doxiciclina (sozinha ou em combinação com ivermectina) foi realizado para a infecção por *M. ozzardi*. Da mesma forma, não há dados sobre a eficácia terapêutica de mebendazol ou albendazol contra microfilárias de *M. ozzardi* ou vermes adultos.

1.7 Resposta imune nas filarioses: inflamação versus regulação

As infecções por helmintos teciduais, particularmente as filarioses, têm profundo impacto no sistema imune de seus hospedeiros (LAYLAND; SPECHT, 2014). Como helmintos típicos, as filárias não se replicam no seu hospedeiro mamífero. No entanto, indivíduos infectados apresentam vermes metabolicamente ativos, com fêmeas adultas liberando, de maneira constante, um grande número de microfilárias, expondo o sistema imune a um enorme desafio antigênico (YAZDANBAKHSI, 1999). Assim, a natureza persistente e crônica dessas infecções nos coloca a pensar em pelo menos duas questões: primeiramente, como o sistema imune lida com essa estimulação antigênica implacável e, em segundo lugar, como os parasitas garantem sua longevidade. A chave para responder a essas questões pode estar

na regulação, pelo hospedeiro da resposta gerada contra o parasito, com o intuito de controlar danos teciduais, associado a expressão de moléculas parasitárias que interagem e modificam a resposta imune, bloqueando mecanismos efetores do hospedeiro. Porém, os mecanismos intrínsecos associados são bastante diversos.

Como exemplo clássico de infecções crônicas, nas filariose a eliminação completa dos parasitos raramente é alcançada, uma vez que a imunidade esterilizante pode exigir respostas imunes deletérias ao hospedeiro. Portanto, a patologia imuno mediada é frequentemente associada as manifestações da doença nessas infecções (METENOU; NUTMAN., 2013). A resposta ideal do hospedeiro é aquela que equilibra o controle do parasito, em níveis em que a carga parasitária pode ser tolerada, havendo manutenção da homeostase imune sem danos irreparáveis nos tecidos (YAZDANBAKHS, 1999). As infecções por filárias, para a maioria dos infectados, refletem esse equilíbrio entre o sistema imune e o parasito, uma vez que apenas uma pequena porcentagem de indivíduos em regiões endêmicas desenvolve manifestações clínicas; porém, quando o equilíbrio falha há inflamação e patologia.

Em áreas endêmicas, os estudos epidemiológicos agruparam as pessoas em três categorias principais, com base na presença de parasitas e /ou na apresentação de sintomas clínicos. Os indivíduos endêmicos normais são aqueles que, apesar da exposição crônica aos agentes infecciosos, parecem não ter sinais de infecção ou patologia; o segundo grupo compreende aqueles com patologia ou sintomas clínicos óbvios (por exemplo, linfedema na filariose linfática, doença ocular ou cutânea em oncocercose, edema de Calabar na loíase); o terceiro grupo inclui aqueles com infecção subclínica, que frequentemente possuem microfilárias circulantes ou antígenos parasitários, porém não apresentam sintomas. Acredita-se que cada uma dessas apresentações clínicas, tão variáveis, reflita de certa maneira a natureza da resposta imune, que pode ser: (a) inflamatória, associada a presença de patologia porém com eficácia na eliminação das microfilárias, ou (b) regulatória, caracterizada pela ausência de sintomas porém com manutenção tanto das microfilárias circulantes quanto do verme adulto (NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001; OTTESEN, 1995; YAZDANBAKHS, 1999).

Em modelos animais e seres humanos, a resposta imune inflamatória canônica às filariose é classicamente de tipo T-helper 2 (Th2), envolvendo a produção de citocinas-chave como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, isotipos de anticorpos como IgG1, IgG4 (no caso de seres humanos) e IgE, além de aumento de eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (AAM). A interação inicial de células T com uma variedade de tipos celulares, incluindo células dendríticas, macrófagos e as células ILC2 (group 2 Innate lymphoid cells), mais recentemente descritas, induz e culmina em respostas tipicamente Th2 (ALLEN; MAIZELS, 2011) NAUSCH; MUTAPI, 2017).

As respostas imunes Th2 são induzidas com intuito de eliminar as infecções. São normalmente eficazes, mas os parasitos desenvolveram uma variedade de mecanismos para induzir respostas regulatórias que promovam sua sobrevivência, possibilitando a manutenção da infecção por longos períodos, e contra a patologia mediada pelas respostas inflamatórias. Entre esses mecanismos estão a indução da expansão de células T e B reguladoras e macrófagos (AAMs), associada à produção de uma gama de citocinas, em especial IL-10 e TGF- β (BABU; NUTMAN, 2014). Esses mecanismos, induzidos durante a infecção pelos parasitos, atuam não somente em nível de imunoregulação antígeno-específica, mas podem afetar o organismo como um todo, modulando também a resposta imune contra antígenos não-relacionados (VAN RIET; HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2007). Observam-se efeitos relevantes da imunorregulação induzida por helmintos em situações de co-infecções com diversos patógenos, respostas a vacinas e em distúrbios imunológicos, como as alergias.

1.7.1 Imunorregulação antígeno-específica

Uma característica importante das filariose é a hiporesponsividade imune celular antígeno-específica. Essa hiporesponsividade, na infecção por filarias, foi observada pela primeira vez em seres humanos na década de 1980, quando os linfócitos isolados de indivíduos cronicamente infectados mostraram uma resposta proliferativa diminuída após a estimulação com antígenos do parasito (FRANCIS; AWADZI; OTTESEN, 1985; NUTMAN; KUMARASWAMI; OTTESEN, 1987; SARTONO et al., 1995). A resposta era restaurada após o

tratamento (SARTONO et al., 1995). Posteriormente, em estudos comparativos dos distintos grupos clínicos na filariose linfática, foi estabelecido que não só a proliferação, mas também a liberação de IFN- γ é reduzida em indivíduos microfilarêmicos (NUTMAN; KUMARASWAMI; OTTESEN, 1987; SARTONO et al., 1995), indicando a supressão das respostas Th1 em pacientes infectados. Em contraste, esses indivíduos respondem aos antígenos específicos, liberando IL-4, sugerindo que a resposta Th2 se mantém inalterada (KING et al., 1993; SARTONO et al., 1995). Já as células T de indivíduos com manifestações clínicas mais graves e tardias da filariose linfática, como o linfedema, mas sem microfilárias circulantes, proliferam vigorosamente e produzem níveis mensuráveis de citocinas contra antígenos específicos (LAMMIE; KATZ, 1984; NUTMAN; KUMARASWAMI; OTTESEN, 1987; YAZDANBAKHSI et al., 1993).

Muitos modelos de tolerância imunológica envolvem a produção de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor beta*) (SEMNANI et al., 2003, 2010). O papel de IL-10 e TGF- β na modulação de respostas imunes durante a infecção filarial foi inferido em estudos que demonstram que anticorpos neutralizantes para IL-10 (e, em menor grau, TGF- β) aumentaram significativamente as respostas proliferativas em pacientes com infecção microfilarêmica subclínica por *W. bancrofti* (KING et al., 1993). Já estudos semelhantes realizados no Haiti mostraram que células de indivíduos sintomáticos apresentam maior resposta proliferativa, assim como maior produção de IL-10 que indivíduos assintomáticos (portadores ou não de microfilárias circulantes) (DIMOCK et al., 1994). A partir destes estudos iniciais, outros demonstraram que altos níveis de IL-10 são produzidos tanto espontaneamente quanto em resposta à estimulação antigênica específica (MAHANTY et al., 1996, 1997).

O papel crítico da IL-10 na modulação das respostas imunes durante a infecção filarial crônica foi também observado em modelos experimentais de infecção por *B. malayi*. Camundongos tratados com anticorpo neutralizante anti-IL-10, ou camundongos deficientes para produção de IL-10, apresentaram microfilaremia menor em comparação com o fenótipo selvagem ou com os camundongos tratados apenas com anticorpo controle do mesmo isotipo (SIMONS; GRAY; LAWRENCE, 2010).

Além de reprimir diretamente as respostas imunes, IL-10 e TGF- β podem regular indiretamente a resposta de anticorpos e também a função das células apresentadoras de antígenos (APCs) (KING et al., 1993; KORTEN et al., 2011; LOKE et al., 2000; TAYLOR et al., 2006). Com relação a resposta de anticorpos, demonstrou-se que a IL-10 inibe a produção de IgE pelas células B e induz a produção de IgG4 (JEANNIN et al., 1998). Elevados níveis séricos de IgE são normalmente encontrados muito cedo, sendo associados à fase aguda da infecção. Em contrapartida, a produção de IgG4 aumenta exponencialmente com a microfiliaremia e está associada à infecção subclínica (HUSSAIN; OTTESEN, 1986; KURNIAWAN et al., 1993; SIMONSEN et al., 1996; YAZDANBAKHSI et al., 1993). Além disso, IgG4 pode ser utilizada não só como marcador de diagnóstico das infecção por filárias, mas também como marcador de imunorregulação, já que esse anticorpo pode competir com IgE pelos mesmos sítios de ligação, bloqueando assim sua atividade protetora (ADJOBIMEY; HOERAUF, 2010; NOORDIN et al., 2007).

1.7.2 Imunomodulação em condições de co-infecções, vacinas e alergia

1.7.2.1 Co-infecções

A infecção por filária pode afetar a resposta imune a infecções concomitantes. Este fenômeno adquire importância em contextos em que as co-infecções com diversos patógenos são extremamente comuns, sendo normalmente a regra e não a exceção nas regiões endêmicas (SUPALI et al., 2010). Entre as doenças mais prevalentes nessas regiões, com grande impacto em termos de saúde pública, estão a malária, a tuberculose e a infecção pelo HIV.

Uma vez que as infecções por helmintos são prevalentes em regiões tropicais onde os parasitas da malária são transmitidos, as co-infecções por esses dois parasitos são frequentemente observadas. Com a implementação de programas a nível mundial, para eliminação da filariose e outras infecções por helmintos, surgiram questões sobre o impacto da quimioterapia em massa nas respostas imunes à infecção aguda por malária (HARTGERS;

YAZDANBAKHS, 2006). Em contraste com a infecção por helmintos, a malária é caracterizada por uma resposta inflamatória aguda, com aumento nos níveis séricos de citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10, IL-1ra e IL-12p70 (DAY et al., 1999; ERDMAN et al., 2011), fundamentais no controle da infecção (D'OMBRAIN et al., 2008; HARPAZ et al., 1992) mas também associadas ao aumento da gravidade da doença clínica (DAY et al., 1999; ERDMAN et al., 2011).

Uma série de estudos demonstrou que a infecção filárica crônica pode suprimir as respostas imunes humanas aos antígenos da malária. Por exemplo, Metenou e colaboradores mostraram que indivíduos com filaria assintomáticos, apresentaram diminuição da produção de IL-12p70 / IFN- γ específica ao antígeno da malária (METENOU et al., 2009) e que este efeito foi revertido pela adição de anticorpos neutralizantes de IL-10. Além disso, indivíduos infectados por filária demonstraram ter frequências mais baixas de células Th1 e Th17 específicas aos plasmódios (METENOU; BABU; NUTMAN, 2012).

Os níveis séricos de citocinas inflamatórias previamente associadas à malária grave também foram encontrados diminuídos em indivíduos infectados por filaria, no momento da malária clínica aguda. Embora não tenham sido vistas diferenças entre indivíduos infectados ou não por filária, em relação ao tempo do primeiro episódio de malária, ao número ou gravidade dos episódios de malária, a infecção filárica pareceu proteger contra o desenvolvimento de anemia durante a estação de transmissão. Esses achados demonstram que a infecção filárica crônica modula a resposta imune à malária aguda (DOLO et al., 2012).

No que diz respeito às co-infecções bacterianas, o impacto das infecções por helmintos permanece incompletamente compreendido. As características de polarização Th2 e regulação acima mencionadas podem, teoricamente, prejudicar o desenvolvimento de uma imunidade protetora Th1 em resposta a co-infecções bacterianas (BABU et al., 2009). A proteção contra micobactérias, por exemplo, é sabidamente caracterizada por fortes respostas Th1 específicas, onde as co-infecções com helmintos podem evitar uma resposta Th1 necessária, quer perturbando o equilíbrio Th1 / Th2, quer dirigindo a resposta imune para um *status* antiinflamatório. O primeiro estudo avaliando a co- infecção entre bactérias e filárias mostrou que a incidência de lepra, causada por *Mycobacterium leprae*, era duas vezes maior em áreas onde a oncocercose era hiperendêmica (PROST et al., 1979).

Estudos mais recente mostraram que pacientes co-infectados com *W. bancrofti* e *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) apresentam uma diminuição significativa na expressão de TLR2 e TLR9 e que a presença de infecção filárica alterou profundamente as respostas de citocinas mediadas por TLR em indivíduos com Mtb. Essa modulação é revertida após o tratamento da infecção filárica (BABU et al., 2009). A maturação de células dendríticas (DC) e macrófagos também se mostrou prejudicada quando essas células foram expostas, *in vitro*, a microfilárias vivas e posteriormente infectadas com Mtb, indicando uma ativação comprometida do sistema imune por micobactérias após a interação com helmintos (TALAAT et al., 2006).

Poucos trabalhos mostraram o impacto da co-infecção entre filária e HIV, mas, de uma maneira geral, as co-infecções por helmintos aumentam a susceptibilidade às infecções virais (STELEKATI; WHERRY, 2012). Por exemplo, indivíduos infectados com helmintos foram mais suscetíveis à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KROIDL et al., 2016; WOLDAY et al., 2002), vírus da hepatite C (KROIDL et al., 2016) e papilomavírus humano (GRAVITT et al., 2015) ou tiveram uma patologia exacerbada (KJETLAND et al., 2014; LOFFREDO-VERDE et al., 2015). Porém, nas últimas décadas há controvérsia sobre se a infecção por helmintos tem, de fato, um efeito na susceptibilidade dos indivíduos ao HIV, especificamente. Foi mostrado que o tratamento anti-helmintico diminuiu as cargas do HIV (NIELSEN et al., 2007a; WALSON et al., 2008) em alguns estudos, ou agravou o quadro infeccioso pelo HIV em outros estudos (MODJARRAD et al., 2005). Um estudo transversal no norte da Tanzânia sugeriu uma maior prevalência de HIV em indivíduos com *W. bancrofti*, porém um estudo de seguimento do mesmo grupo não forneceu evidência de uma interação da filariose linfática com o HIV (NIELSEN et al., 2006, 2007b). Relatos recentes da Índia, do Zimbábue e do Sul da Tanzânia não mostraram diferença na prevalência de filariose linfática ou níveis de antígenos circulantes em indivíduos infectados por HIV em comparação com indivíduos não-infectados (KROIDL et al., 2012; TALAAT et al., 2008).

1.7.2.2 Infecção por filárias e eficácia a vacinação

Para uma vacinação bem sucedida contra a maioria das doenças bacterianas e virais, é necessária também, uma resposta Th1 eficiente. Quando se observou que a capacidade imunizante de algumas vacinas, normalmente bastante eficazes, se encontrava prejudicada nos países em desenvolvimento, sugeriu-se a hipótese de que a infecção por helmintos poderia estar correlacionado com essa resposta ineficiente. Por exemplo, na vacinação contra o tétano, a capacidade de resposta ao toxóide tetânico (TT) é diminuída em indivíduos co-infectados por filárias (NOOKALA et al., 2004). Um estudo em áreas onde a oncocercose é endêmica indicou que, após a vacinação com uma dose única de vacina com TT concentrada, 7,1% dos pacientes com oncocercose soroconverteram, contra 44,5% do grupo controle não-infectado (PROST et al., 1983). Embora as infecções com baixas parasitemias de *O. volvulus* não tenham afetado a resposta de anticorpos contra o tétano, aquelas com altas parasitemias prejudicaram a resposta IgG específicas contra a vacina (COOPER et al., 1998).

Trabalhos com outras espécies de helmintos também mostram essa mesma tendência; por exemplo, verificou-se que as infecções por *A. lumbricoides* prejudicam as respostas imunes à vacina oral contra a cólera, diminuindo a taxa de soroconversão e os títulos de anticorpos para a vacina (COOPER et al., 2000a, 2000b). Considerando as vacinas não-orais, em um estudo na Etiópia, a vacinação com Bacille Calmette-Guerin (BCG) induziu a resposta celular imune contra PPD (*tuberculin purified protein derivative*) em adultos infectados com helmintos intestinais e tratados com anti-helmínticos, mas não em indivíduos infectados tratados com placebo (ELIAS et al., 2005).

A influência das infecções por helmintos nas respostas vacinais deve ser levada em consideração também na elaboração de novas vacinas. As vacinas em fase de desenvolvimento contra a malária e a infecção pelo HIV, que geralmente induzem proteção limitada, são testadas inicialmente em países desenvolvidos; no entanto, sua eficácia nos países em desenvolvimento pode ser ainda mais reduzida considerando as infecções por helmintos (HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2006). Isso sugere que uma vacina eficaz para aqueles que vivem em áreas endêmicas pode precisar, por exemplo, de um adjuvante

modificado, em comparação com uma vacina para uso no mundo ocidental (SUPALI et al., 2010).

1.7.2.3 Alergias

A prevalência de doenças alérgicas aumentou em todo o mundo nos últimos 30-40 anos (PEARCE et al., 2007). Embora os motivos subjacentes a este aumento não sejam claros, sugeriu-se que ele esteja em grande parte relacionado ao aumento dos padrões de higiene pessoal e comunitária e aos menores níveis de infecções por causa do uso generalizado de antibióticos e vacinas (BACH, 2002), um conceito conhecido como a "Hipótese de Higiene". Na verdade, a queda da prevalência de infecções, e particularmente das causadas por helmintos, leva a uma perda da supressão de respostas específicas a alérgenos, com consequente aumento da prevalência de doenças alérgicas (MAIZELS, 2005). Muitos trabalhos demonstram uma diminuição da prevalência de alergia em pacientes infectados com helmintos, quando comparados aos controles não-infectados (RUJENI et al., 2012; VAN DEN BIGGELAAR et al., 2000). Há, no entanto, algumas evidências contraditórias que sugerem que a infecção por helmintos pode realmente levar a uma atopia e promover rinite (DOLD et al., 1998), asma alérgica (PALMER et al., 2002) e broncoespasmo não-alérgico (MONCAYO et al., 2013).

Explicações imunológicas foram propostas para a supressão e indução de doenças alérgicas por infecção por helmintos. Por exemplo, vários estudos mostraram que a atividade celular das Treg (tanto por células $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ quanto pelas $Tr1IL10^+$) protege contra doenças alérgicas (UMETSU; DEKRUYFF, 2006). De fato, a imunoterapia contra alérgenos em seres humanos, que leva a uma redução nos sintomas alérgicos, está associada ao surgimento de células Treg produtoras de IL-10 (AKDIS, 2009). A infecção crônica por helmintos, com a expansão da população de células Treg e os elevados níveis de IL-10, pode auxiliar, portanto, na resolução do quadro alérgico. Em contraste, essas infecções também induzem respostas imunes de tipo Th2, incluindo a produção de IgE, que podem reagir contra alérgenos ambientais e mediar as respostas efetoras (URBAN, 1982). Além disso, os parasitas codificam e secretam proteínas com alto grau de similaridade com

alérgenos conhecidos (DA SANTIAGO et al., 2012), de modo que, após a infecção por helmintos, o hospedeiro desenvolve uma resposta de IgE ao parasita que pode reagir de forma cruzada com aerossóis. Assim encontramos um delicado equilíbrio entre os efeitos anti e pro alérgênicos dos parasitas que definem a interface helminto/alergia.

1.8 Células T reguladoras e seu papel nas filarioses

As células T reguladoras (Tregs) correspondem a até 10% do total de células TCD4⁺ do sangue periférico e possuem mecanismos imunossupressores essenciais para a indução e manutenção da tolerância imunológica, bem como para a regulação da resposta imune contra diversos patógenos (SAKAGUCHI et al., 2009; TAAMS et al., 2006).

As células Tregs são CD4⁺ e expressam a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) em altos níveis. No entanto a expressão dessa molécula não é considerada um marcador específico para Tregs, uma vez que linfócitos T ativados também expressam transitoriamente CD25 em sua superfície (SAKAGUCHI et al., 2009). Da mesma maneira, a ausência de CD127, em conjunto com a alta expressão de CD25, tem sido amplamente utilizada nos últimos anos para definir Treg humanas funcionais (LIU et al., 2006; SEDDIKI et al., 2006). No entanto, a expressão de CD127 pode ser regulada negativamente na fase inicial da ativação de células T efectoras (AERTS et al., 2008). Neste contexto, um marcador considerado, até o momento, específico para as Tregs -- e diretamente envolvido em sua atividade supressora -- é o fator de transcrição FoxP3 (*forkhead transcription factor 3*) (SAKAGUCHI et al., 2009; SHEVACH, 2009). A expressão de FoxP3 em células T CD4⁺CD25⁻ periféricas murinas e humanas transfectadas resulta no desenvolvimento de função supressora, sugerindo a importância desse fator de transcrição na atividade imunorreguladora de células Tregs (KRONENBERG; RUDENSKY, 2005).

Com base em sua origem, geração e mecanismos de ação, as células Tregs têm sido descritas como “naturais” (nTregs) e “induzidas” (iTregs). As nTregs originam-se durante os eventos de seleção negativa a partir da diferenciação de alguns clones de linfócitos T CD4⁺ auto-reativos que começam a expressar FoxP3 e não sofrem apoptose (VON BOEHMER;

MELCHERS, 2010). Estas células, além de regularem células T auto-reativas na periferia, estão relacionadas com a manutenção da auto-tolerância. São de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imune, apresentando também capacidade inibitória pela sua atividade de regulação negativa da resposta imune frente a antígenos exógenos (BELKAID, 2007; SAKAGUCHI et al., 1995).

Paralelamente, as Tregs induzidas se desenvolvem na periferia a partir de células TCD4⁺ *naïve* convencionais, que, após a exposição a citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β , ou após o contato com APCs, passam a expressar ou não FoxP3 (SAKAGUCHI, 2004). No entanto, são descritos na literatura dois tipos de Tregs induzidas: Tregs tipo 1 (Tr1) que dependem exclusivamente de IL-10 para sua diferenciação e função; e as células T auxiliares 3 (Th3), cuja diferenciação e função é mediada pela secreção de TGF- β (MILLS, 2004).

A função supressora das Tregs pode ser desempenhada de forma independente de contato com a célula-alvo, através da secreção de citocinas, como IL-10, TGF β , IL-35 e secreção de granzimas e perforinas, e por interação célula-célula, por meio de uma variedade de moléculas que se encontram ancoradas em sua superfície e que vão interagir com a célula efetora.

Com a descrição das células T reguladoras (Treg) e de sua importância na manutenção da homeostase do sistema imune em função de suas características supressora diversas (SAKAGUCHI, 2004), formulou-se a hipótese de que a supressão da resposta imune efetora observada nas filariose poderia ser mediada pela proliferação dessa população. Isso foi confirmado em vários estudos que demonstraram, tanto em modelos experimentais quanto em populações humanas, que a filariose resulta em aumento da frequência das células Tregs (BABU et al., 2006; MCSORLEY et al., 2008; METENOU et al., 2010; TAYLOR et al., 2005, 2007, 2009; WAMMES et al., 2012), assim como da expressão de alguns marcadores regulatórios nessas populações celulares, tais como CTLA-4, LAP-TGF- β e PD1 (BABU et al., 2006). Em estudo realizado no Mali, verificou-se ainda associação entre a infecção humana por filárias e o aumento não apenas de Tregs clássicas com o fenótipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD127⁻, mas também de células CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ produtoras de IL-10 (células reguladoras tipo 1 (Tr1). METENOU et al., (2010), por exemplo, mostraram que pacientes com oncocercose produzem níveis elevados de IL-10 e TGF- β em resposta ao antígeno do parasito, tendo

como fontes células Tr1 (IL-10) ou Th3 (TGF- β). Quando analisados de forma sistemática, estudos em pacientes infectados por filária da África Ocidental demonstraram que, entre as células T, a principal fonte de IL-10 são células CD4⁺ CD25⁻ (provavelmente células Tr1) (MITRE; CHIEN; NUTMAN, 2008). Esses dados também foram confirmados por análise de frequência baseada em citometria de fluxo multiparamétrica (METENOU et al., 2010). Embora essas citocinas regulatórias possam ser produzidas por diferentes tipos de células T CD4, incluindo tTregs e pTregs, no contexto da filariose as principais fontes de IL-10 e TGF- β são células Tr1 e Th3, respectivamente (DOETZE et al., 2000; METENOU et al., 2010; MITRE; CHIEN; NUTMAN, 2008).

Em contextos de filariose crônica, os estudos que investigaram os mecanismos subjacentes à hiporreatividade imune mostraram que as células CD4⁺ de indivíduos infectados por filária não só expressavam altos níveis de CTLA-4, mas o bloqueio utilizando anticorpos anti-CTLA-4 em culturas *in vitro* aumentou a resposta proliferativa e a produção de citocinas após a estimulação antígeno-específica (STEEL; NUTMAN, 2003). Do mesmo modo, demonstrou-se que o bloqueio *in vitro* de CTLA-4 e TGF- β com anticorpos aumentou a expressão do RNA mensageiro de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, GATA-3 e Tbet (BABU et al., 2006).

Embora o efeito direto das Tregs induzidas por filária nas APC não tenha sido avaliado, vários estudos demonstraram que as APCs de indivíduos com infecção patente possuem subpopulações de APCs alteradas e função diminuída e que as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β possam estar envolvidas (ALLEN; LAWRENCE; MAIZELS, 1996; SEMNANI et al., 2008; TAYLOR et al., 2006).

1.9 Marcadores de atividade reguladora nas células Treg

Múltiplos mecanismos de supressão mediados por células Treg foram propostos durante a última década, dentre eles estão a expressão de várias moléculas com diferentes mecanismos de ação que contribuem para atividade reguladora eficaz dessas células.

1.9.1 CD39

ATP e ADP, nucleosídeos tri- e difosfatos desempenham importantes papéis fisiopatológicos. No meio intracelular, são a principal fonte de energia na célula, participando de praticamente todos os processos biológicos, porém em condições de “stress”, ativação ou dano tecidual, vários tipos celulares liberam ATP extracelular (eATP) que atuam como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), ao se ligarem aos receptores purinérgicos do tipo 2 (P2X1-7 e P2Y1,2,4,6,11-14), desencadeando cascatas de sinalização para induzir uma resposta inflamatória (JACOB et al., 2013).

Para evitar os efeitos patológicos induzidos pelo ATP, este pode ser hidrolisado em adenosina por uma cascata de enzimas, das quais a CD39 é a mais importante. CD39, a NTPDase1 (ecto-nucleosídeo trifosfato difosforidrolase), regula o equilíbrio das respostas imunológicas por fosfo-hidrolização de ATP e ADP. CD39 gera AMP, que, por sua vez, é usado pela ecto-5'-nucleotidase CD73 para sintetizar adenosina, um potente imunossupressor, agindo como um mecanismo de feedback negativo para prevenir danos excessivos em processos inflamatórios (TAKENAKA; ROBSON; QUINTANA, 2016). Essas ectonucleotidases têm um grande impacto na dinâmica e equilíbrio entre nucleotídeos pró-inflamatórios (eATP e ADP) versus nucleosídeos imunossupressores, a adenosina (ANTONIOLI et al., 2013).

A expressão de CD39 foi estudada em vários tipos celulares do sistema imunológico, incluindo neutrófilos, monócitos, células B, células NK, células NKT, células e células T. No sangue periférico humano CD39 é constitutivamente expressa em > 90% das células B, > 90% dos monócitos, 20%-30% das células T CD4⁺ (incluindo células T de memória e Tregs), <5% das células T CD8⁺ e 2%-5% das células NK (ALLARD et al., 2017). Sua expressão e atividade podem se alterar durante infecções, podendo ser regulada por citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia (ZHAO et al., 2017). Além das células hospedeiras, muitos agentes patogênicos (por exemplo, *Escherichia coli*, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* e *Trichomonas vaginalis*) possuem o complexo CD39/CD73 utilizando a produção de adenosina em seu próprio benefício como uma estratégia para subverter o

sistema imunológico (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; MAHAMED et al., 2012; TASCA et al., 2005; THAMMAVONGSA et al., 2009).

CD39 e eATP, também desempenham um papel significativo na função supressiva e na estabilidade das Treg FoxP3⁺. CD39 e CD73 são co-expressos na superfície de Tregs FoxP3⁺ humanas e murinas (BORSELLINO et al., 2007; DEAGLIO et al., 2007). Em cooperação com CD73, CD39 contribui para a atividade supressora de Treg FoxP3⁺ promovendo a geração de adenosina, que atua diretamente em células T para modular sua ativação através de cascatas de sinalização controladas pelo receptor de adenosina A2_A (BORSELLINO et al., 2007; DEAGLIO et al., 2007). CD39 também contribui para a estabilidade das Treg FoxP3⁺ evitando a conversão em células Th17 (GU et al., 2016), uma vez que esta diferenciação desencadeada pelo eATP está ligada à diminuição da expressão e da estabilidade da FoxP3 (ZHOU et al., 2009). Assim como nas células Treg FoxP3⁺, CD39 contribui para a diferenciação e função das células Tr1, promovendo sua função supressiva *in vivo* e *in vitro*. Contudo, as células Tr1 induzidas por IL-27 não expressam CD73. Consequentemente, a atividade supressora dependente de CD39 das células Tr1 requer a síntese de adenosina em cooperação com CD73 expressa por células T efectoras e DCs (WU et al., 2011).

1.9.2 CTLA-4

Uma vez que sinais co-estimuladores transduzidos por CD28 são requeridos para ativação e proliferação de células T *naïve*, a inibição da sinalização por CD28 em células T respondedoras pela expressão de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) em células Treg é o mecanismo central de supressão. Como essa molécula compartilha os ligantes CD80 e CD86 com o CD28, porém apresenta maior afinidade por ambos, CTLA-4, altamente expresso em Treg, bloqueia a coestimulação via CD28 em células T convencionais por competir com CD28 pelos ligantes CD80/CD86 na sinapse imunológica (WALKER, 2013). CD80 e CD86 podem ser capturados e degradados por Treg expressando CTLA-4, via trans-endocitose. Além disso, a expressão de CD80 e CD86 pelas DCs pode ser reduzida por regulação da transcrição dependente da atuação do Foxp3 após a ligação entre CTLA-4 e CD80/CD86 (DEJEAN et al., 2009; QURESHI et al., 2011; YOKOSUKA et al., 2010).

A interação de DCs com o CTLA-4 em Treg promove a produção de IFN- γ , que induzirá a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano, sem o qual a ativação e proliferação de linfócitos T e, consequentemente, mecanismos a eles associados podem ser seriamente comprometidos. Os catabólitos gerados pela ação da enzima, como a quinurenina, que é liberada no microambiente, leva à supressão da célula T pela indução da apoptose. Estudos adicionais mostraram que a IDO pode induzir o fenótipo regulador em DCs independente das suas funções catabolíticas. A sinalização por CTLA-4 também contribui para a conversão de células T *naïve* em células T Foxp3+ dependente de TGF- β (PALLOTTA et al., 2011; ZHENG; RUDENSKY, 2007).

1.9.3 LAG-3

LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) é outra molécula com potencial imunorregulador presente na superfície celular tanto das nTregs quanto nas iTregs (HUANG et al., 2004). (WORKMAN et al., 2004) As características e funções de LAG-3 a tornaram um atraente alvo para a modulação imunológica, incluindo o seu papel bem definido na regulação negativa das funções de células T (WOO et al., 2012). Seu bloqueio *in vitro* aumenta a proliferação de células T e a produção de citocinas (HUARD et al., 1994). Dados recentes indicam que a modulação de LAG-3 pode afetar a auto-imunidade, câncer, infecção viral crônica, bem como as infecções parasitárias (ANDERSON; JOLLER; KUCHAROO, 2016).

1.9.4 PD-1

PD-1 (Programmed cell death protein 1) é uma proteína transmembrana do tipo 1 que possui dois ligantes conhecidos como PDL1(CD274) e PDL2(CD273) (ISHIDA et al., 1992). Células T expressam PD-1 somente após a ativação e têm a função de inibir a diferenciação da célula T para sua fase efetora. PD-1 exerce papel fundamental na tolerância a antígenos

próprios; modelos experimentais de infecção crônica demonstram que o bloqueio de interações PD-1 pode reverter a exaustão de células T (DAY et al., 2006; HORNE-DEBETS et al., 2013). O bloqueio de PDL-1 em células Treg CD4⁺CD25^{hi} diminui a supressão das células T efetoras. Além disso, PDL-1 expresso por APCs tem importante papel na indução de células Treg periféricas e na manutenção de sua função supressora (FRANCISCO et al., 2009).

1.9.5 LAP-TGF- β

LAP-TGF- β (peptídeo associado à latência)- TGF- β (fator de crescimento transformante β) é uma citocina multifuncional que regula a proliferação e diferenciação celular. TGF- β é sintetizado como um grande precursor de proteína e, em seguida secretada como um complexo de LAP-TGF- β (peptídeo associado à latência), em que LAP é associado de modo não-covalente ao TGF- β dimérico para impedir a sua atividade (NAKAMURA et al., 2004). TGF- β requer ativação antes de se ligar aos seus receptores e exercer suas funções, desempenhando um papel importante no controle da proliferação e diferenciação de células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, neurônios, osteoclastos, osteoblastos. O complexo LAP-TGF- β é expresso apenas na superfície celular de células Treg ativadas e em uma pequena proporção de células não-T CD4⁺. Células Treg LAP-TGF- β ⁺ desempenham um papel importante na supressão da proliferação de células T ativadas, mas não são necessárias para a supressão da ativação das células T naive (ANDERSSON et al., 2008).

1.9.6 OX40

A ligação de OX40 (CD134), membro da superfamília dos receptores de TNF, promove a ativação da célula T, a sobrevivência, a proliferação e produção de citocinas (SCHAER; HIRSCHHORN-CYMERMAN; WOLCHOK, 2014). OX40 é expresso principalmente nas células T CD4⁺ ativadas (24-48 horas após a ativação), em células T CD8⁺, neutrófilos e Treg (WEINBERG et al., 2011). O ligante natural de OX40, OX40 ligante (OX40L) é mais comum nas APCs, mas também é encontrado em células T ativadas. A expressão de OX40 é induzida pela estimulação via TCR, mas a co-estimulação por meio de outras moléculas, tais como CD28,

ou a exposição a certas citocinas pode regular positivamente a sua expressão (Redmond et al., 2012). Enquanto OX40 tem um papel fundamental no desenvolvimento e na função de Treg, o engajamento de OX40 com um anticorpo agonista também pode desativar a função supressora das Treg (GRISERI et al., 2010; PICONESI et al., 2010).

1.9.7 GITR

GITR, o receptor de TNF induzido por glicocorticóide, é expresso em baixos níveis por células CD4⁺ e CD8⁺ “em repouso”. Sua expressão é regulada positivamente após 24-72 horas de estimulação e continua a ser expresso durante vários dias (LACAL et al., 2013; NOCENTINI et al., 1997; SCHAER; MURPHY; WOLCHOK, 2012). Em contraste com as células T efetoras, T_{reg} expressam constitutivamente GITR, assim como DCs, monócitos e células NK. De modo semelhante ao OX40, a ligação de GITR fornece sinais co-estimulatórios que aumentam a proliferação das células T e a função efetora, e protegem as células T da morte celular induzida por ativação (AICD, Activation-induced cell death) (LACAL et al., 2013; SCHAER; MURPHY; WOLCHOK, 2012). O ligante para GITR (GITRL) é altamente expresso em APCs ativadas e células endoteliais. Curiosamente, enquanto o papel de GITRL nas APCs parece proporcionar a co-estimulação, foi recentemente mostrado que as interações GITRL/GITR nas células endoteliais podem ser importantes para o início da adesão de leucócitos e transmigração (LACAL et al., 2013).

1.10 Mansonelose e imunorregulação

A imunossupressão parece ser a chave nas infecções crônicas por filárias, onde diferentes mecanismos altamente eficazes são utilizados pelos parasitos para promover sua sobrevivência. Com isso, essas infecções acabam apresentando uma característica extremamente relevante que é sua propensão em induzir efeitos regulatórios a uma variedade de respostas imunes, incluindo respostas a vacinas, alérgenos e outros agentes infecciosos.

Muito pouco ainda se sabe sobre as infecções humanas pela filária *M. ozzardi* em seus

diferentes aspectos, mas principalmente, não há nenhum estudo mostrando a maneira como este parasito afeta a resposta imunológica dos indivíduos infectados. Até o momento são 22 os municípios com a presença notificada da mansonelose no Amazonas, com uma estimativa de aproximadamente 160.000 mil infectados e 600 mil pessoas sob o risco de transmissão (BASANO, 2016). Portanto, há um grande número de pessoas expostas a uma infecção crônica que, por ser assintomática ou apresentar poucos sintomas inespecíficos, permanecem não diagnosticadas e consequentemente não tratadas. As consequências imunológicas dessas infecções permanecem desconhecidas, especialmente no que se refere à resposta imune a outros patógenos localmente prevalentes, como os plasmódios.

Este trabalho teve, portanto, como objetivo, verificar se a infecção crônica por *M. ozzardi* cria um ambiente imunomodulador capaz de afetar a resposta a antígenos deste parasito e a antígenos não-relacionados, especialmente aqueles de outros patógenos altamente prevalentes na Amazônia. Baseou-se na caracterização fenotípica e funcional de células T CD4⁺ circulantes com funções imunorreguladoras, como a supressão da proliferação de células efectoras frente a estímulos antigênicos, examinando células Treg clássicas (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) e outras populações celulares que expressam diferentes combinações de marcadores de atividade supressora ou de ativação em sua superfície.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo caracterizar a resposta imune celular induzida pela infecção humana por *M. ozzardi* em comunidades ribeirinhas da Amazônia brasileira verificando se essa infecção crônica cria um ambiente imunomodulador capaz de afetar a resposta a antígenos deste parasito e a antígenos não-relacionados.

Objetiva-se especificamente:

1. Verificar se durante infecção por *M. ozzardi* ocorre expansão de subpopulações de linfócitos T CD4+ que expressam moléculas com potencial imunorregulador e de ativação celular e se a magnitude dessa expansão se correlaciona com a carga de microfilárias circulantes;
2. Avaliar se populações celulares (linfócitos B, linfócitos B atípicos, B reguladores, linfócitos NK, células NKT, células $\gamma - \delta$, monócitos e células dendríticas) se encontram alteradas durante infecção por *M. ozzardi* quando comparadas a indivíduos não infectados;
3. Avaliar se as subpopulações de linfócitos T CD4+ que expressam moléculas imunorreguladoras, expandidas durante a infecção por *M. ozzardi*, são capazes de inibir a proliferação ou interferir na produção de citocinas de células efectoras estimuladas com antígenos de *M. ozzardi* e antígenos não-relacionados;
4. Investigar o padrão de citocinas anti- e pro inflamatórias durante a infecção por *M. ozzardi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e população de estudo

O estudo foi realizado em comunidades ribeirinhas ao longo do rio Purus, no município de Boca do Acre (8°45'19"N; 67°23'50"W), na confluência entre os rios Acre e Purus, estado do Amazonas (Figura). Boca do Acre foi fundada em 1890 e está localizada no sudoeste do Amazonas, distante aproximadamente 950 km de Manaus em linha reta. A população aproximada é de 34 mil habitantes (IBGE, 2016), dos quais a grande maioria são ribeirinhos dispersos em pequenas comunidades às margens do rio Purus. A economia local é baseada na agricultura, pecuária e na pesca, sem um parque industrial significativo e um setor de serviços pouco desenvolvido. Mesmo sendo um município do estado do Amazonas, é altamente dependente da capital do Acre, Rio Branco.

A escolha da área foi baseada em estudo realizado previamente por Medeiros *et al.* (2009b) que observaram prevalência geral de *M. ozzardi* de 27,3% em 9 comunidades ribeirinhas do rio Purus, com base na análise por microscopia convencional de 282 amostras de sangue obtido por punção digital. O número de habitantes do trecho estudado é estimado em aproximadamente 1300 indivíduos (dados não-publicados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Amazonas). A área é considerada também endêmica para malária, sendo observadas infecções esporádicas (principalmente por *P. vivax*) na maioria das comunidades ribeirinhas do rio Purus (dados não-publicados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Amazonas).

Figura 4- Localização geográfica das comunidades ribeirinhas ao longo do rio Purus participantes do estudo. MV: Monte Verde, VP: Valparaíso, BV: Boa Vista, RT: Retiro, NV: Nova Vida e SP: São Pedro.

3.2 Coleta e processamento de amostras

3.2.1 Estudo piloto

Um estudo piloto, compreendendo 287 indivíduos de seis comunidades às margens do rio Purus (Monte Verde, Valparaíso, Boa Vista, Retiro, Nova Vida e São Pedro) (Figura 4) foi realizado por nossa equipe de campo em março de 2013, para estimar a prevalência de infecção por *M. ozzardi* (com base em microscopia convencional e diagnóstico molecular) e selecionar as comunidades com maior prevalência de mansonelose (e os respectivos participantes) para a fase seguinte do estudo.

Amostras de polpa digital foram coletadas em cartões FTA Whatman (Whatman, Estados Unidos), utilizadas no diagnóstico molecular. O DNA destas amostras foram extraídos utilizando-se o QIAamp DNA micro kit (Hilden, Alemanha) e o PCR realizado utilizando como base no protocolo descrito por Morales-Rojas *et al.*, 2001. Com a amostra de sangue capilar, também foi preparada uma gota espessa, corada com corante de Giemsa e posteriormente examinada para a presença de plasmódios e microfilárias por microscopia convencional como descrito no item 3.4.

3.3 Recrutamento dos participantes do estudo de imunidade celular

Uma vez selecionadas as comunidades-alvo e localizados os indivíduos infectados, foi realizada nova viagem à área de campo em setembro de 2013, com o objetivo de recrutar os indivíduos infectados por *M. ozzardi* (que tiveram a infecção confirmada por microscopia e/ou PCR no estudo piloto) e controles não-infectados (ausência de infecção por *M. ozzardi* confirmada por microscopia e PCR no estudo piloto).

Todos os participantes tiveram uma amostra sanguínea coletada, consistindo de 40 mL de sangue venoso coletados em tubos contendo ACD, destinada a obtenção de células mononucleares periféricas (PBMCs) e obtenção de plasma e outros dois mL de sangue, coletados em tubos contendo EDTA, foram destinados à realização de hemograma automatizado (Micros 60) (Horiba, Montpellier, França) e à confirmação diagnóstica de filariose e malária por microscopia e PCR quantitativa (como descrito no item 3.4, a seguir). Todos os pacientes com diagnóstico prévio de infecção por *M. ozzardi* foram tratados com Ivermectina em dose única (0,2 mg/kg) imediatamente após a coleta sanguínea.

Os indivíduos envolvidos nesse estudo (pacientes ou controles) ou o seu representante legal forneceram consentimento para a doação da amostra, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, além de responderem a um questionário clínico-epidemiológico previamente elaborado e testado em campo.

A intensidade de sintomas potencialmente associados à infecção por *M. ozzardi* foi avaliada por meio da aplicação do questionário clínico- epidemiológico. Para este fim, todos os pacientes foram interrogados sobre a percepção dos principais sintomas descritos, associados à infecção por *M. ozzardi* (febre, calafrios, sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, fraqueza e frieza nas pernas). Questões envolvendo a presença de outras infecções (conhecidas pelo paciente) e a exposição prévia a infecções por *Plasmodium* foram também levadas em consideração.

Como helmintos intestinais podem estimular a proliferação de células Treg, amostras de fezes de todos os indivíduos recrutados foram coletadas e analisadas pelas técnicas de

flutuação e de sedimentação por gravidade; a presença de helmintos intestinais foi critério de exclusão de participantes no estudo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (parecer #1133/CEP).

3.4 Diagnóstico de infecções

Uma preparação de gota espessa obtida durante o estudo de campo, de todos os pacientes, foi corada com Giemsa e examinada com objetiva de imersão (aumento total, 1000 ×) por um microscopista local com mais de 10 anos de experiência. Pelo menos 100 campos microscópicos de grande aumento foram examinados em cada preparação antes de definir-se a presença de *Mansonella ozzardi* ou de *Plasmodium*.

Para o diagnóstico molecular da mansonelose, foi padronizada uma PCR quantitativa em tempo real (qPCR), visando à amplificação de um fragmento que codifica a região entre os genes ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico de *M. ozzardi* (MORALES-ROJAS et al., 2001). Essa técnica, além de proporcionar um diagnóstico com maior sensibilidade do que a microscopia convencional, permitiu também estimar a microfilaremia em cada infecção, possibilitando portanto, uma análise de correlação entre a carga parasitária e as alterações imunológicas observadas na infecção por *M. ozzardi*. Para o diagnóstico de *Plasmodium* foi utilizado qPCR quantitativa em tempo real, que tem como alvo o gene 18S do rRNA já padronizada e utilizada rotineiramente pelo laboratório.

O DNA das amostras foi isolado a partir de 200 µl de sangue venoso utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Hilden, Alemanha), sendo a extração automatizada pelo equipamento QIAcube (Qiagen). A reação de PCR em tempo real teve um volume final de 20 µL, sendo: 2µl de DNA, 10 µl de 2 × Maxima SYBR Green qPCR master mixture (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 0.5 µM de cada *primer* (5'-CTT ATC ATC AGG TGA TAT TAA T-3' [anterior] e 5'- TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3' [posterior]) no caso de *M. ozzardi* ou 0,5 µM do primer gênero específico P1 (ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT) combinado com 0,5 µM de um dos primers espécie

específicos V1 (CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A) de *P. vivax* ou F2 (CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG) de *P. falciparum* no caso do diagnóstico para *Plasmodium*.

As curvas padrão foram preparadas com as diluições em série de dez vezes da sequência alvo espécie-específico de 295 pb (*M. ozzardi*) ou de 100 pb (*P. vivax* ou *P. falciparum*) clonados em vetores pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). A PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com as seguintes condições de ciclagem, desnaturação a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 55 °C (*M. ozzardi*) e 60 °C (*Plasmodium*), com aquisição de fluorescência no final de cada etapa de extensão. A amplificação é imediatamente seguida por um programa de fusão, que consiste em 15 segundos a 9 °C, 15 segundos a 55 °C, e um gradual aumento de temperatura de 0,2 °C por segundo até 95 °C, com a aquisição da fluorescência em cada temperatura de transição.

3.5 Obtenção de PBMCs

As amostras sanguíneas coletadas tiveram o processamento para obtenção de PBMCs realizado em até no máximo 6 horas após a coleta. Durante este período ficaram armazenadas em caixa térmica resfriada para que se mantivesse a qualidade das amostras em função das altas temperaturas típicas do local de estudo. No laboratório o sangue foi diluído na proporção de 1:1 em Hanks (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e centrifugado a 500 *g*, durante 17 minutos, em gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) na proporção de 2:1. A seguir, o anel de células mononucleares obtido do gradiente de densidade foi coletado e submetido a duas lavagens sequenciais com tampão salino – Hanks (Sigma-Aldrich), seguidas de centrifugação a 300 *g* por 10 minutos. O sedimento celular foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Escócia, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 µM) (Gibco). A viabilidade celular foi averiguada, utilizando-se azul de tripan (0,04%), e o número de células estimado em câmara

hemocitométrica de Neubauer (diluição 1:20). As amostras foram, então, congeladas a -70 °C em solução contendo 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) e 90% de SFB (Cultilab) em uma concentração celular de 10^7 células/mL. Os tubos contendo as PBMCs foram congelados em recipiente de congelamento, Mr. Frosty (Nalgene® Rochester, NY, Estados Unidos) a -70 °C por 24 horas e foram então criopreservados e transportados em nitrogênio líquido até o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os experimentos propostos por este estudo.

3.6 Descongelamento das PBMCs criopreservadas

Em momento oportuno, durante os ensaios de caracterização fenotípica e cultivos celulares, os criotubos contendo PBMCs, necessários para cada experimento, foram descongelados rapidamente, em banho-maria a 37 °C. A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI completo – (RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina/Estreptomicina/ Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 μ M) (Gibco)) -- seguindo-se de centrifugação a 500 *g* durante oito minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em um mL de meio completo. A viabilidade celular foi averiguada utilizando-se azul de tripan 0,04%, e o número de células viáveis foi estimado utilizando contador automático (*Countess Automated Cell Counter*, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

3.7 Caracterização fenotípica de populações celulares na infecção por *M. ozzardi*

Foi realizado uma ampla caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação periférica durante a infecção por *M. ozzardi* com possível papel regulador, não limitada a examinar somente as células Treg clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺), mas também várias populações celulares que expressam em sua superfície

diferentes combinações de possíveis marcadores de atividade moduladora, como FOXP3, OX-40, TNFRII, GITR, CD39, PD-1, LAG3 e LAP-TGF- β e CTLA-4 e de ativação, como HLA-DR e CD69, além da caracterização fenotípica, utilizando alguns desses marcadores, de subpopulações de células T CD8⁺.

Além de avaliar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos T reguladores ampliamos a caracterização fenotípica das populações celulares presentes na infecção por *M. ozzardi*, definindo outros painéis de anticorpos monoclonais utilizados para analisar subpopulações de células dendríticas, linfócitos B, linfócitos B atípicos, linfócitos NK, células NKT e células γ - δ , para que desta maneira tenhamos uma visão global de como a infecção afeta as populações celulares. Para tal caracterização, cinco painéis de anticorpos monoclonais foram utilizados (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam CTLA-4, TNFRII, PD1, CD39 e moléculas com potencial efeito ativador (Painel 1)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (μ L)	Fabricante
FOXP3	PerCPcy5.5	5	e-Bioscience
CD39	FITC	3	Biolegend
CD4	APCcy7	1	Biolegend
CTLA-4	APC	5	Biolegend
HLA-DR	Alexa 700	3	BD
CD25	BV 605	3	Biolegend
PD-1	BV 650	5	BD Horizon
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
CD127	BV 421	3	Biolegend
CD3	PE-TR	1	Invitrogen
CD69	PEcy7	3	Biolegend
CD8	PEcy5	20	BD
TNFRII	PE	7,5	BD

BV: Brilliant Violet

Tabela 3- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas de atividade reguladora (Painel 2)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (μ L)	Fabricante
FOXP3	Perpcy5.5	5	e-Bioscience
CD39	FITC	3	Biolegend
CD4	APCcy7	1	Biolegend
CTLA-4	APC	5	Biolegend
CD25	BV 605	3	Biolegend

OX40	BV 650	5	BD horizon
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
CD127	BV 421	3	Biolegend
CD3	PE-TR	1	Invitrogen
LAG 3	PEcy7	3	e-Biosciences
GITR	PEcy5	5	Biolegend

BV: Brilliant Violet

Tabela 4- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de células dendríticas (Painel 3)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (µL)	Fabricante
CD11c	PerCPcy5.5	5	Biolegend
Lin 1	FITC	1	BD
CCR7	APCcy7	3	Biolegend
CD123	APC	3	Biolegend
HLA-DR	A700	3	BD
CD69	BV 605	5	Biolegend
CD86	BV 650	5	Biolegend
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
CCR5	BV 421	3	Biolegend
CD80	PEcy5	5	Biolegend
CCR1	PE	3	Biolegend

Lin 1 corresponde ao coquetel de anticorpos anti- CD3, anti- CD14, anti- CD16, anti- CD19, anti- CD20, anti- CD56.

BV: Brilliant Violet

Tabela 5- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos B, linfócitos NK, células NKT, células γ - δ e monócitos (Painel 4)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (µL)	Fabricante
CD14	PerCPcy5.5	5	Biolegend
TRC V β 11	FITC	20	Beckman Coulter
CD16	APCcy7	3	Biolegend
CD1d	APC	3	Biolegend
HLA-DR	Alexa 700	3	BD
CD69	BV 605	5	Biolegend
CD19	BV 570	3	Biolegend
CD4	BV 650	5	Biolegend
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
γ - δ	BV 421	5	Biolegend
CD8	PE-TR	5	Invitrogen
CD56	PEcy7	3	Biolegend
CD3	PEcy5	1	Biolegend

BV: Brilliant Violet

Tabela 6- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos B atípicos (Painel 5)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (µL)	Fabricante
CD20	APCH7	3	BD
CD21	APC	5	e-Biosciences
CD10	Alexa 700	3	e-Biosciences
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
CD27	BV 421	1	Biolegend
CD19	PE-TR	3	Invitrogen

BV: *Brilliant Violet***Tabela 7-** Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de Tregs que expressam Ki-67 (Painel 6)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (µL)	Fabricante
FOXP3	Percpcy5.5	5	e-Bioscience
CD39	BV421	0,5	Biolegend
CD4	PE	1	Biolegend
CD3	Pecy7	1	Biolegend
CD127	APC	1	e-Bioscience
CD25	FITC	0,5	Biolegend

BV: *Brilliant Violet*

A titulação dos anticorpos monoclonais usados em Citometria de Fluxo é uma etapa extremamente importante, não apenas no controle da funcionalidade dos reagentes, mas principalmente para otimizar o volume apropriado de cada anticorpo e definir adequadamente a intensidade de fluorescência positiva da negativa, por este motivo, todos os anticorpos foram titulados utilizando-se células provenientes de pacientes controles não pertencentes ao grupo experimental, mas submetidas às mesmas condições de obtenção, processamento e conservação.

Os volumes dos anticorpos monoclonais, definidos pela titulação, utilizados em cada painel se encontram nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Em cada análise foram utilizadas 10^6 células viáveis, descongeladas como descrito na seção 3.6, transferidas para placa de 96 poços em fundo “V” (Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos), a qual foi centrifugada a 600 *g* por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 200 µL de tampão MACS (PBS pH 7,2, SFB 2%, EDTA 2 mM pH 8,0). A placa foi novamente centrifugada a 600 *g* por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada

total do meio RPMI. O sedimento celular foi ressuspensionado em tampão MACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície (volume final total da solução: 100 μ L). Após ser incubada por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 600 *g*, por cinco minutos. A seguir, as mesmas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de tampão MACS e fixadas em paraformaldeído 1%. No caso dos painéis 1 e 2 anteriormente a fixação iniciou-se a etapa de marcação intranuclear de FOXP3 utilizando-se o kit comercializado pela eBiosciences (eBiosciences, San Diego, CA, Estados Unidos).

Assim, as células foram ressuspensionadas em 200 μ L de solução de fixação e permeabilização (*buffer A*) seguindo-se incubação por 45 minutos, protegidas da luz. Após serem centrifugadas a 600 *g* durante cinco minutos à temperatura ambiente (TA), foram realizadas duas lavagens, utilizando-se 200 μ L de solução de permeabilização, e centrifugação a 600 *g* durante cinco minutos à TA. Por fim, as amostras foram incubadas por uma hora com anticorpo monoclonal anti-FOXP3 marcado com PerCPCy5.5. A seguir, as amostras foram lavadas com 200 μ L de solução de permeabilização e fixadas em paraformaldeído 1% seguindo-se a leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences). Para os painéis 1 e 2 foram adquiridos 300 mil eventos enquanto que para os demais foram adquiridos 600 mil eventos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, Estados Unidos). Apenas nas amostras com viabilidade igual ou maior que 80% consideradas para análise, as com viabilidade inferior foram descartadas.

As Figuras 5 e 6 descrevem as estratégias utilizadas para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR11, PD-1, CTLA-4, CTLA-4 (intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR, enquanto que as figuras 7 e 8 descrevem as estratégias utilizadas para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR11, PD-1 e CTLA-4, CTLA-4 (intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR. As Figuras 9, 10, 11, 12 e 13 mostram a estratégia de análise adotada para definir as subpopulações de células dendríticas, células NK e NKT, células T γ - δ , monócitos e células B respectivamente .

Figura 5- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR11, PD-1 e CTLA-4. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Seleção dos linfócitos T CD4⁺; A expressão de TNFR11 (G) PD-1 (H), CD69 (I), CTLA-4 (J) e HLA-DR (L) foi avaliada em F.

Figura 6- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam os marcadores CTLA-4 (intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR. Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Seleção dos linfócitos TCD4⁺; A expressão de CTLA-4 (intracelular) (G) OX-40 (H), LAP-TGF- β (I), GITR (J) e LAG-3 (L) foi avaliada em F.

Figura 7- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR11, PD-1 e CTLA-4. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células CD4⁺CD25⁺; G- Seleção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ que não expressam CD127; H- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população CD4⁺CD25⁺CD127⁻; H1- Linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD39⁺FOXP3⁺; H2- Linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD39⁺FOXP3⁺; H3- Linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD39⁻FOXP3⁺; A expressão de TNFR11 (I) PD-1 (J), CD69 (L), CTLA-4 (M) e HLA-DR (N) foi avaliada em H1, H2 e H3.

Figura 8- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores CTLA-4(intracelular), OX-40, LAP-TGF- β , GITR e HLA-DR Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células $CD4^+CD25^+$; G- Seleção de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ que não expressam CD127; H- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população $CD4^+CD25^+CD127^-$; H1- Linfócitos T $CD4^+CD25^+CD127^-CD39^+FOXP3^+$; H2- Linfócitos T $CD4^+CD25^+CD127^-CD39^+FOXP3^+$; H3- Linfócitos T $CD4^+CD25^+CD127^-CD39^-FOXP3^+$; A expressão de CTLA-4(intracelular)(I) OX-40 (J), LAP-TGF- β (L), GITR (M) e LAG-3 (N) foi avaliada em H1, H2 e H3.

Figura 9- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de células dendríticas. A- Time; B- Singlets; C- Seleção da população total de PBMCs por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de PBMCs viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Identificação de células dendríticas por meio da exclusão das células $CD3^+$, $CD14^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD20^+$ e $CD56^+$ (negativas para Lin 1) e a expressão de HLA-DR; F- Subpopulações de Células dendríticas; F1- Células dendríticas plasmocitóides ($CD123^+$); F2- Células dendríticas mielóides ($CD11c^+$); A expressão de CCR1 (G) CCR7 (H), CCR5 (I), CD86 (J) , CD80 (L) e CD69 (M) foi avaliada em F1 e F2.

Figura 10- Estratégia de análise utilizada para definir a população de células NK que co-expressam o marcador de ativação CD69 e as subpopulações de células NKT- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão ou não de CD3; F- Dupla marcação para CD16 e CD56, para analisar a população de células NK G- Seleção de células NK que expressam CD69; H- Células NKT que co-expressam Vβ11 e Vα24; Células NKT que são CD8⁺ (I) CD4⁺CD8⁺ (J), CD4⁺CD8⁻ (L) e CD4⁺ (M).

Figura 11- Estratégia de análise utilizada para definir a população de células T $\gamma\delta$ que co-expressam o marcador de ativação CD69. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD8 com seleção das células duplo negativas; G- Seleção de células T $\gamma\delta$; H- Seleção de células T $\gamma\delta$ que expressam CD69.

Figura 12- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de monócitos que co-expressam o marcador de ativação CD69. A- Time; B-Singlets; C- Os monócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de monócitos viáveis e que expressam HLA-DR; E- Seleção de monócitos negativos para expressão de CD3; F- Seleção dos monócitos CD14⁺; G- Seleção dos monócitos CD14⁺CD16⁺; H- Seleção dos monócitos CD16⁺; J- subpopulações de monócitos que co-expressam o marcador de ativação CD69.

Figura 13- Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de células B naïve, células B de memória, clássicas, ativadas e atípicas e plasmócitos. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos B por meio da dupla marcação para CD20 e CD19; F- Seleção das células negativas para CD10; G- Células B Naïve CD21⁺CD27⁻; H- Células B de memória clássicas CD21⁺CD27⁺; I- Células B de memória ativadas CD21⁺CD27⁺; J- Células B de memória atípicas CD21⁻CD27⁺; L- Seleção de células B que expressam CD10) e M- Seleção de plasmócitos por meio da dupla marcação para CD20 e CD19 (seleção negativa).

3.8 Caracterização fenotípica dos linfócitos B reguladores

Para complementar a caracterização fenotípica das populações celulares com papel regulador na infecção por *M. ozzardi*, caracterizamos também a população de linfócitos B reguladores.

Para identificar linfócitos B produtores de IL-10 e TNF- α , PBMCs de pacientes e controles foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco) completo, estimuladas com PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) a 100 μ g/mL combinado com Ionomicina (1 μ g/mL)

(Sigma-Aldrich) e LPS (Lipopolissacarídeo) ultrapura (10 µg/mL) (Life Technologies) por cinco horas. Ao início do estímulo, 10 µg/mL Brefeldina A (Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço (estimulado e não-estimulado) e a placa foi incubada em estufa de CO₂.

Ao término da incubação, as células foram transferidas para placa de 96 poços em fundo "V" (Nunc) e iniciou-se o procedimento de marcação das moléculas de superfície seguido pela marcação de IL-10 e TNF-α intracelular (painel fenotípico definido na Tabela 8). Para tal, a placa foi centrifugada a 600 g por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 200 µL de tampão FACS (PBS pH 7,2, SFB 5%, 0,1% NaN₃). A placa foi novamente centrifugada a 600 g por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada total do meio RPMI completo. O sedimento celular foi ressuspenso em tampão FACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície além de inibidor de ligação a FcγR, (volume final total da solução: 50 µL) e incubadas por 30 minutos no escuro à TA. As amostras foram então fixadas em PFA 1,9% (Sigma-Aldrich) por 1 hora. Após uma etapa de lavagem com 200 µL de tampão FACS, seguidas por centrifugação a 600 g por cinco minutos, iniciou-se a etapa de marcação intracelular de IL-10 e TNF-α. Assim, as células foram ressuspendidas em tampão de permeabilização (Permeabilization buffer, eBioscience) seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos. Após 20 minutos, procedeu-se uma etapa de lavagem com 200 µL de tampão FACS seguindo-se a leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences). Apenas amostras com viabilidade, após o tempo de cultivo, igual ou maior que 80% foram consideradas para análise.

Tabela 8- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de células B reguladoras.

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (µL)	Fabricante
CD19	PerCPcy5.5	1	Biolegend
CD24	APCef780	0,25	EBiociences
CD27	PE	0,25	Biolegend
CD38	FITC	10	BD
CD1d	PEcy7	0,5	Biolegend
IL-10	APC	1	Biolegend
CD39	BV421	0,5	Biolegend
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
TNF-α	BV650	1	Biolegend

A figura a seguir descreve as estratégias de análise utilizadas para identificar subpopulações de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 e TNF- α (Figura 14).

Figura 14- Estratégias de análise usada para definir subpopulações de células B reguladoras. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção de Linfócitos B pela dupla marcação: viabilidade e CD19; F- Co- expressão de CD24⁺ CD38⁺; G- Expressão CD1d⁺; H- Expressão e co-expressão de CD24⁺ e CD27⁺; I- Seleção de células B expressando CD39; J- Células B produtoras de IL-10 e/ou TNF- α .

3.9 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção por *M. ozzardi*

3.9.1 Luminex

Interessados em conhecer o perfil de citocinas liberadas durante a infecção por *M. ozzardi*, assim como verificar se a infecção por este parasito possui o mesmo perfil de produção de citocinas observado nas infecções por outras filárias, examinamos os níveis plasmáticos de diversas citocinas em amostras de pacientes e controles utilizando o kit

Human Cytokine Magnetic 30-Plex Panel da Invitrogen (Carlsbad, EUA), que compreende as seguintes moléculas: EGF, eotaxina, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2r, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α e VEGF.

Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços que contêm uma membrana de filtração na sua base (*Millipore MultiScreen HTS-BV 1.2 μ m Clear non-sterile filter plates*, Millipore) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra as 30 citocinas analisadas foram adicionadas aos poços da placa pré-umedecida. A seguir, as amostras e curvas padrão (entre 0,13 e 2000 pg/mL para cada análise) foram adicionadas a placa, que foi incubada *overnight* a 4 °C. Após este período os poços foram lavados utilizando-se o *Manifold* (*Millipore MultiScreen HTS Vacuum Manifold*, Millipore) e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após incubação por uma hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente R-ficoeritrina (estreptavidina-PE) foi adicionada e a placa foi novamente incubada por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, as amostras foram ressuspensas em uma solução tampão e analisadas no equipamento *Bio-Plex® 200 Systems* disponível no Departamento de Imunologia da USP. Este equipamento analisa a quantidade de fluorescência emitida pelas microesferas associadas a R-ficoeritrina, relatada como a intensidade média de fluorescência. As concentrações desconhecidas das amostras foram estimadas a partir da curva padrão e expressos em pg/mL. As amostras abaixo do limite de detecção do ensaio foram registradas como zero, enquanto que as amostras acima do limite superior da quantificação das curvas-padrão foram atribuídos como o valor mais alto da curva.

3.10 Quantificação de IgE total e IgG4 específica contra antígenos de *Brugia malayi*

As filaríoses linfáticas em humanos estão associadas a níveis elevados de anticorpos imunoglobulina G4 (IgG4) e IgE no sangue periférico, porém não há dados disponíveis nas infecções por *M. ozzardi*. Por esta razão, as concentrações de IgE total e IgG4 (específicos para *B. malayi*) plasmáticas foram medidas por ELISA.

Placas Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpo de captura IgE policlonal anti-humano (Dako, Glostrup, Dinamarca) ou com antígeno BmA (extrato do verme adulto de *B. malayi*) diluídos em tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6, e incubadas por 14 horas à TA 4 °C sob agitação. A seguir, os poços foram aspirados e as placas lavadas três vezes, com 300 µL PBS-Tween 20 (0,05%) sendo, então, bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (2% BSA (Roche, Mannheim, Alemanha) em PBS) por 1 hora à TA. Após descarte da solução de bloqueio, 100 µL de cada diluição da curva padrão, preparadas pela diluição seriada de fator 2, partindo de 200 ng/mL do soro-padrão humano para quantificação de IgE (WHO 3rd International Standard of Human Serum IgE) ou soro de paciente infectado por *B. malayi* com os títulos de anticorpo IgG4 anti-BMA já conhecidos, bem como as amostras de plasma teste (pacientes e controles). Essas amostras foram distribuídas nas placas e incubadas por 1 hora à TA. Para a dosagem de ambos os anticorpos, as amostras foram diluídas 1/20 (em solução contendo 1% BSA em PBS). Após serem lavados, três vezes, com 300 µL de PBS-Tween 20 (0,05%), cada orifício recebeu 100 µL da solução com anticorpo de detecção (anti-IgE humano ou anti-IgG4 anti-humano biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) diluído 1000x em PBS seguindo-se incubação por 1 hora à TA. Realizaram-se novas etapas de lavagens (três vezes), seguidas da adição de 100 µL da estreptavidina-fosfatase alcalina (Roche) a cada poço. As placas foram novamente incubadas à TA por 25 minutos. Finalmente, as placas foram lavadas cinco vezes, com 300 µL de PBS-Tween 20 (0,05%), e incubadas com 50 µL do substrato apropriado (TMB e peróxido de hidrogênio, BD Pharmingen) por 20 minutos, protegidas da luz, à TA. A reação da fosfatase alcalina foi interrompida com 25 µL de H₂SO₄ (2 N) e a leitura das placas foi realizada em leitor automático de ELISA a 405 nm. O limite de detecção foi de 4,0 ng/mL.

3.11 Detecção de citocinas Intracelulares

Com o objetivo de conhecer o perfil de produção de citocinas após re- estimulação celular, PBMCs de pacientes e controles foram cultivadas para identificar a produção de citocinas anti- inflamatórias e inflamatórias que caracterizam a resposta Th1 (IL-2, TNF-α, IFN-γ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) intracelulares (painel fenotípico definido na Tabela 9) sob duas

condições: estimulado com SEB ou BmA, ambos combinados com anti-CD28/CD49d (BD Pharmingen) durante 24 horas.

Em cada cultivo foram utilizadas $0,5 \times 10^6$ PBMCs viáveis. Todas as amostras tiveram o seu respectivo controle de estímulo, isto é, foram cultivadas sob as mesmas condições exceto pela adição do estímulo utilizado. Após terem sua viabilidade averiguada e o número estimado, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo e transferidas para placa de 96 poços em fundo "U" (volume final por poço: 200 μ L), estimuladas com BmA à concentração de 13 μ g/mL ou enteroxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) (Sigma-Aldrich) a uma concentração de 10 μ g/mL, ambos co-estimulados com 10 μ g/mL de CD28/CD49d (BD Pharmingen). Após quatro horas do início do estímulo, 10 μ g/mL Brefeldina A (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço (estimulado e não-estimulado); a seguir, a placa foi incubada em estufa de CO₂ por mais 19 horas.

Ao término da incubação, as células foram transferidas para placa de 96 poços em fundo "V" (Nunc) e iniciou-se o procedimento de marcação das moléculas de superfície seguido pela marcação das citocinas intracelulares (IFN- γ , TH2 (IL-4, IL-5, IL-13), TNF- α , IL-2 e IL-10). Para tal, a placa foi centrifugada a 600 *g* por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 200 μ L de tampão FACS (PBS pH 7,2, SFB 5%, 0,1% NaN₃). A placa foi novamente centrifugada a 600 *g* por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada total do meio RPMI completo. O sedimento celular foi ressuspensado em tampão FACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície além de inibidor de ligação a Fc γ R (volume final total da solução: 50 μ L) e incubadas por 30 minutos no escuro à TA. As amostras foram então fixadas em PFA 1,9% (Sigma-Aldrich) por 1 hora. Após uma etapa de lavagem com 200 μ L de tampão FACS, seguida por centrifugação a 600 *g* por cinco minutos, iniciou-se a etapa de marcação intracelular. As células foram ressuspensas em tampão de permeabilização (Permeabilization buffer, eBioscience), incubadas por 1 hora no escuro à TA, seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos. Após 20 minutos, procedeu-se uma etapa de lavagem com 200 μ L de tampão FACS seguindo-se a leitura no equipamento FACS Canto II (BD Biosciences) e analisadas com o software FlowJo. Assim como nos demais experimentos, apenas amostras com viabilidade igual ou maior que 80% foram consideradas para as análises.

A Figura 15 mostra a estratégia de análise adotada para definir subpopulações de células T CD4⁺ que co-expressam as citocinas IFN- γ , TH2 (IL-4, IL-5, IL-13), TNF- α , IL-2 e IL-10.

Tabela 9- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4⁺

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (μ L)	Fabricante
CD3	APCcy7	0,5	Biolegend
CD4	PerCPcy5.5	0,5	Biolegend
IL-2	FITC	0,25	Biolegend
IL-4	PE	0,5	EBiociences
IL-5	PE	0,5	BD
IL-10	APC	1	Biolegend
IL-13	PE	1	BD
IFN-Y	BV421	0,5	Biolegend
Viabilidade	Acqua	0,67	Invitrogen
TNF- α	Pecy7	0,25	Biolegend

Figura 15- Estratégia de análise usada para definir subpopulações de células T CD4⁺ que produtoras de IFN- γ , TH2 (IL-4, IL-5, IL-13), TNF- α , IL-2 e IL-10. A- Time; B- Singlets; Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção de linfócitos T CD4⁺ pela co- expressão de CD3 e CD4; Expressão de IFN- γ (F) IL-10 (G), IL-2 (H), TNF- α (I) e citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-13) (L) .

3.12 Ensaios de proliferação celular

Para avaliar a capacidade proliferativa dos linfócitos na infecção por *M. ozzardi*, utilizamos o reagente *Cell Trace* (*CellTrace Violet Cell Proliferation Kit*, Invitrogen) para citometria de fluxo. Para tal, os criotubos contendo PBMCs foram descongelados como descrito na seção 3.5.

Para a marcação com o *Cell Trace*, 10^6 células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, centrifugadas a 500 *g* por oito minutos, ressuspendidas em um mL de PBS estéril e incubadas com o reagente (5 mM) por 20 minutos. Após esta etapa de incubação, a marcação foi interrompida adicionando-se 14 mL de RPMI-1640 (Gibco) completo, seguindo-se de incubação por cinco minutos. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 500 *g* por oito minutos e o sedimento celular foi então ressuspendido em meio RPMI suplementado como descrito acima. As células foram então transferidas para placa de 96 poços em fundo “U”, estimuladas com: (a) extrato de microfilárias de *M. ozzardi*, (b) extrato solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* à concentração de 12 µg/mL e (c) PHA (*Phytohemagglutinin*) (Sigma-Aldrich), em uma concentração de 10 µg/mL, além de (d) BmA à concentração de 13 µg/mL associado ao co-estímulo com 10 µg/mL de CD28 / CD49d (BD Pharmingen) e (e) SEB- (Sigma-Aldrich) a uma concentração de 10 µg/mL, também associado ao co-estímulo com 10 µg/mL de CD28 / CD49d, (volume final do poço: 200 µL). Seguiu-se incubação em uma estufa de CO₂ a 37°C durante 72 horas. Todas as amostras tiveram seu respectivo controle sem estímulo, ou seja foram cultivadas nas mesmas condições, exceto pela adição dos estímulos utilizados.

Finalmente, após o período de incubação, as placas contendo as amostras foram centrifugadas a 600 *g* por cinco minutos; essa etapa de lavagem foi repetida para a retirada total do meio RPMI. A seguir, as amostras foram lavadas com 200 µL de tampão FACS e ressuspendidas em PBS, seguidas da leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences) ou *FACSCanto II* (BD Biosciences). Foram adquiridos 300 mil eventos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar). A figura a seguir descreve a estratégia de análise utilizada para avaliar a proliferação celular por citometria de fluxo (Figura 16).

Figura 16- Estratégia de análise utilizada para quantificar a proliferação de linfócitos.

3.13 Ensaios de detecção de citocinas intracelular e proliferação frente ao bloqueio da molécula CD39

Com o intuito de avaliar o potencial efeito imunorregulador da molécula CD39 na infecção por *M. ozzardi* e seu papel na produção de citocinas pró e anti- inflamatórias e na proliferação celular, amostras de paciente e controles foram estimulas com SEB e submetidas ao mesmo protocolo descrito nos itens 3.11 e 3.12 exceto pela presença do anticorpo anti-CD39 purificado, na concentração de 2 µg/mL (Biolegend, San Diego, CA), adicionado a cultura imediatamente após o estímulo.

Este experimento foi realizado concomitantemente e com o mesmo grupo de amostras das demais condições nos experimentos de detecção de citocinas intracelular e proliferação, a fim de que se tivesse uma boa comparabilidade entre eles. A eficiência da

ligação do anticorpo purificado anti- CD39 foi verificada por citometria de fluxo, onde amostras submetidas as mesmas condições de cultivo, foram marcadas com anticorpo anti-CD39 fluorescente, na mesma concentração do anticorpo purificado utilizado. A ausência de marcação (fluorescência) na análise por citometria de fluxo, significa uma ligação eficiente. Como controle de viabilidade do ensaio de proliferação, amostras foram cultivadas sob as mesmas condições com exceção da marcação com *Cell Trace* e verificadas por citometria de fluxo quanto a viabilidade.

ATP ou adenosina (Sigma) na concentração de 2mM foram adicionadas em algumas condições de experimento na tentativa de restaurar as condições obtidas com o bloqueio. O anticorpo purificado anti-IL-10 na concentração de 2 µg/mL (Biolegend) foi também utilizado em um número reduzido de amostras, na ausência do anticorpo anti-CD39, como um dos controles utilizados.

3.14 Detecção de citocinas em ensaios de re-estimulação

Para avaliar o padrão de citocinas produzidas e secretadas durante a re- estimulação celular, as amostras foram cultivadas e estimuladas nas mesmas condições que as destinadas ao ensaio de proliferação. Para este fim, a placa com as amostras destinadas a coleta do sobrenadante de cultura foi centrifugada a 600 *g* por cinco minutos e 150 µL do sobrenadante de cultura foi coletado e imediatamente armazenado à -80 °C. As amostras de sobrenadante tiveram as concentrações das citocinas IL-4, IL-6, IL-13 IL-10 e IFN-γ quantificadas utilizando o kit ELISA PeliKine compact [™] (Sanquin Amsterdam, Holanda), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Brevemente, placas Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de 96 orifícios foram sensibilizadas com 15 µg/mL do anticorpo de captura específico, diluído em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,5) e incubadas *overnight* a 4 °C. A seguir, os poços foram aspirados e as placas lavadas três vezes, com 300 µL PBS-Tween 20 (0,05%) sendo, então, bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (10% de SFB em PBS) por 1 hora à TA. Após descarte da solução de bloqueio, 50 µL de cada diluição da curva padrão, preparadas de

acordo como as recomendações do fabricante, bem como as amostras de plasma teste (pacientes e controles), foram distribuídos por orifício seguindo-se incubação por 2 horas à TA. Após serem lavados cinco vezes com 300 µL de PBS-Tween 20 (0,05%), cada orifício recebeu 50 µL da solução de detecção (anticorpo monoclonal biotilado + SAV-HRP/*streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*) seguindo-se incubação por 1 hora à TA. Finalmente, as placas foram lavadas sete vezes, com 300 µL PBS-Tween 20 (0,05%), e incubadas com 50 µL do substrato apropriado (Tetrametilbenzidina –TMB - e Peróxido de hidrogênio, BD Pharmingen) por 30 minutos, protegidas da luz, à TA. A reação foi finalizada com 25 µL de H₂SO₄ (2 N) e a leitura das placas foi realizada em leitor automático de ELISA a 450 nm.

3.15 Preparo do extrato de microfilárias de *M. ozzardi*

Para que fosse possível avaliar a resposta imune específica gerada por *M. ozzardi*, preparamos um extrato bruto de microfilárias de *M. ozzardi*, utilizado nos experimentos de proliferação celular. Para isso, amostras sanguíneas de pacientes infectados por *M. ozzardi* foram coletadas e submetidas a centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque como descrito no item 3.5. Este procedimento foi realizado na tentativa de remover os leucócitos da amostra, por este motivo o anel de PBMCs foi coletado e descartado; o precipitado restante, contendo os eritrócitos e as microfilárias foi lavado com PBS por duas vezes e lizado com saponina a 1% em solução salina por 15 minutos. As amostras foram então analisadas ao microscópio para verificar sua pureza (ou seja, se os eritrócitos e PBMCs foram adequadamente removidos sem haver lise das microfilárias) e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. No momento do preparo do antígeno, as amostras sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento (banho-maria a 37 °C e nitrogênio líquido a -196 °C) para lisar as microfilárias e sem sequência submetido a ruptura sônica (Branson Sonifier mod. 450, EUA) por 3 períodos de 3 minutos a potência de 10 Mhz. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C, e o sobrenadante coletado mantido congelado até o momento do uso.

3.16 Preparo do extrato solúvel de taquizoítos de *T. gondii*

O antígeno de *T. gondii* foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Heitor Franco de Andrade, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. O preparo do antígeno foi baseado no descrito por Camargo et al., 1978. Resumidamente, os taquizoítos, mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em camundongos Swiss, sorologicamente negativos, foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos dois dias após a infecção. A solução coletada foi passada por colunas *Sephadex G-25*, para remoção de células hospedeiras e os taquizoítos então recuperados por centrifugação. O sedimento contendo 5×10^8 taquizoítos foi resuspenso em 5,0 mL de água e submetido a ruptura sônica de cinco a 10 períodos de 30 segundos a 40 Hz, em um banho de gelo, até a completa lise do parasito, conforme avaliado por observação de contraste de fase. À solução foi adicionada 5 mL de NaCl a 0,3 M, que foi então homogeneizado e centrifugado a 10 000 g durante 30 minutos a 4°C. A concentração de proteína do sobrenadante foi calculada, e este foi distribuído em alíquotas de 0,5 mL, congelado a -70 °C sendo descongelado apenas para o uso nos experimentos.

3.17 Preparo do extrato do verme adulto de *B. malayi*

O antígeno utilizado nos ensaios foi preparado no laboratório de parasitologia da Leiden University Medical Center e preparado com base em MOUSER et al., 2016, resumidamente, vermes adultos de *Brugia malayi* foram comprados dos laboratórios TRS (Atenas, Geórgia, EUA) e o extrato do verme adulto de *B. malayi* (BmA) preparado por homogeneização de vermes adultos machos e fêmeas em PBS contendo 0,5% de n-octilglucósido (PBS-nOG). Os homogeneizados foram centrifugados a 12 000 g, e o *pellet* obtido foi submetido novamente a homogeneização com PBS-NOG para remover qualquer antígeno solúvel restante. Os sobrenadantes foram reunidos e passados através de um filtro de 0,45 µm. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford. O extrato de proteína total BmA foi então dividido em alíquotas e armazenado a -70 °C até o uso, na concentração desejada.

3.18 Preparo dos eritrócitos infectados de *P. vivax*

Para o preparo dos eritrócitos infectados de *P. vivax*, sangue venoso de indivíduos infectados por *P. vivax* diagnosticados por exame de gota espessa, nas unidades de saúde da cidade de Mâncio Lima (AC), foram coletadas e leucodepletadas utilizando o filtro BioR 01 Plus ou Max (Fresenius Kabi). O produto foram eritrócitos com aproximadamente 95% de pureza (ausência de leucócitos), que foram mantidas criopreservadas até o preparo do antígeno.

O processo de descongelamento se iniciou mantendo esses criotubos a temperatura ambiente após retirados do nitrogênio, por 1 minuto, seguido de 1 minuto a 37 °C em banho-maria. O sangue parasitado foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e uma solução de NaCl a 12% foi adicionada gota a gota, misturando suavemente. Para essa etapa, a quantidade de NaCl 12% utilizado foi 1/5 volume da amostra no tubo. Em seguida, foi adicionado volume de NaCl a 1,6% correspondendo a 10x o volume da amostra inicial, sendo a mistura homogeneizada e centrifugada a 180 *g* durante 8 minutos.

O sobrenadante foi aspirado, o precipitado ressuspendido suavemente e as hemácias contendo os parasitos lavadas duas vezes com meio McCoy 5A incompleto (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, as amostras foram submetidas a um gradiente de Percoll a 45% a fim de concentrar as hemácias parasitadas. Lâminas de gota espessa foram então preparadas e coradas com Panótico Rápido LB (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) para observar a quantidade e viabilidade desses parasitos. O concentrado de parasitos foi ressuspendido em meio RPMI completo e adicionado a cultura celular na proporção aproximada de 0,5 parasitos por PBMC.

3.19 Análise estatística

Um banco de dados foi elaborado no software SPSS 16.0 - Statistical Package for the Social Sciences - (SPSS Inc., Chicago, IL). De todas as variáveis contínuas, calcularam-se medianas e intervalos interquartis. Em todas as comparações de variáveis contínuas, foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos. Para as comparações entre mais de dois

grupos de indivíduos, foram utilizados testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparações dois a dois com testes de Mann-Whitney. Variáveis contínuas em amostras pareadas (por exemplo, de indivíduos infectados e controles) foram comparadas com o teste de Wilcoxon. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para correlacionar variáveis quantitativas. Para todos os testes foi estabelecido um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 População de estudo

Foram coletadas amostras de 84 indivíduos, que com base no diagnóstico por PCR quantitativa em tempo real foram separadas em dois grupos: o grupo Fil+ composto por amostras proveniente de indivíduos infectados por *M. ozzardi* (n=50; essas amostras apresentaram na PCR número de cópias do amplicon variando de 1289 a 2973357 cópias do gene/ μ L de sangue entre as amostras, com mediana de 179827,98 cópias/ μ L de sangue); e o grupo Fil-, composto por controles não-infectados (n=34), indivíduos que tiveram resultados do PCR negativo, compatível também com o resultado do diagnóstico por microscopia.

As características gerais da população de estudo, como idade, sexo, carga parasitária, comunidade em que vivem e características hematológicas, estão detalhadas na Tabela 10.

No momento da coleta, houve a tentativa de parear as amostras com relação à idade, sexo e comunidade onde moravam os indivíduos. Porém, por ter sido usado um método diagnóstico mais sensível, o número de indivíduos infectados encontrado através da PCR em tempo real foi maior do que aquele previamente estabelecido através do diagnóstico por microscopia e PCR convencional de amostras armazenadas em papel filtro durante o estudo piloto. Ainda assim, como pode ser observado, não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao sexo e idade; no entanto observamos diferença com relação a comunidade na qual os indivíduos vivem.

Utilizamos como critério de exclusão do estudo a presença de co-infecções. Por este motivo, as amostras foram também submetidas a PCR quantitativa em tempo real para diagnóstico de malária (GONÇALVES et al., 2012), já que infecções por *Plasmodium* são bastante frequentes na região; realizamos também exame parasitológico de fezes. Com relação à possibilidade de outras infecções, utilizamos questões específicas no momento da aplicação do questionário clínico epidemiológico, além de ter sido realizada uma rápida anamnese por um dos médicos que compuseram a equipe de campo. Nenhuma amostra mostrou-se positiva para plasmódios ou helmintos ou protozoários intestinais.

Quanto às variáveis hematológicas avaliadas, estas não foram influenciadas pela presença ou ausência da infecção; os números de leucócitos, linfócitos e granulócitos são semelhantes entre os grupos. A ocorrência de anemia, definida com base na concentração de hemoglobina no sangue (g/100 mL), segundo sexo e idade de cada indivíduo (valores de corte: 120 g/L para adolescentes com idade entre 12 a 14 anos e mulheres não-grávidas, e 130 g/L para homens com idade maior ou igual a 15 anos), foi observada em apenas 6% (3/50) dos pacientes infectados e em 3% (1/30) dos controles expostos.

Tabela 10- Características gerais e hematológicas dos pacientes e controles

Características	Valor por grupo		Valor de <i>P</i>
	Fil-	Fil+	
Número de indivíduos	34	50	
Idade (anos)	37,1(7-84)	43,8 (10-98)	0,207
Sexo (% homens)	52,9(18)	56,0(28)	0,722
Comunidade Boa Vista	4	4	
Comunidade Monte Verde	11	5	
Comunidade Nova Vida	11	11	
Comunidade Retiro	3	14	0,013*
Comunidade São Pedro	0	4	
Comunidade Valparaíso	5	12	
Níveis de hemoglobina (g/100 mL)	14,5(11,8-21,2)	14,2(11,7-18,40)	0,665
Percentual de anêmicos	2,9(n = 1)	6,0(n = 3)	0,410
Número de leucócitos (10 ³ /mm ³)	7,8(4,7-11,9)	8,2(3,9-17)	0,658
Número de linfócitos (10 ³ /mm ³)	2,5(1,3-3,5)	2,3(1,2-4,1)	0,193
Número de granulócitos (10 ³ /mm ³)	4,6(2,2-9,10)	5,0(1,9-43)	0,266
Número de células CD3 (10 ³ /mm ³)	1,74(0,94-2,64)	1,54(0,66-3,58)	0,271
Número de células CD4 (10 ³ /mm ³)	0,98(0,43-1,71)	0,96(0,43-2,13)	0,381

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas) ou pelo teste de χ^2 (proporções). * Diferença estatisticamente significativa (*P* < 5%).

Neste estudo, todos os pacientes foram interrogados sobre a percepção da intensidade dos principais sintomas supostamente associados à infecção por *M. ozzardi* (febre, calafrios, sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, fraqueza e frieza nas pernas). A Tabela 11 mostra a frequência dos sintomas apontados pelos pacientes.

Observamos pequena diferença entre o percentual de pacientes que relataram a sintomas específicos entre os indivíduos infectados e os indivíduos controles. Apenas dor abdominal foi relatada mais frequentemente nos indivíduos infectados; os demais sintomas

aparecem em proporções semelhantes, sendo alguns mais frequentes nos indivíduos não-infectados, como cefaleia e artralgia. Entre os infectados, não foi observada associação entre a presença de sintomas e a carga parasitária ($p=0,335$), o que nos leva acreditar que a infecção por *M. ozzardi* pode de fato, ser uma infecção não-patogênica.

Tabela 11- Frequência de sintomas em indivíduos infectados e não infectados por *M. ozzardi*.

Sintomas	Valor por grupo	
	Fil-	Fil+
Número de indivíduos	34	50
Presença de qualquer sintomas (%)	50 (17)	54 (27)
Febre (%)	5,9 (2)	2 (1)
Cefaleia (%)	20,6 (7)	14 (7)
Mialgia (%)	11,8 (4)	16 (8)
Artralgia (%)	20,6 (7)	14 (7)
Tontura (%)	2,9 (1)	6 (3)
Fraqueza (%)	2,9 (1)	6 (3)
Dor abdominal (%)	2,9 (1)	16 (8)
Vômito(%)	0	2 (1)

4.2 Quantificação de IgE total e IgG4 específica contra antígenos de *Brugia malayi*

As concentrações plasmáticas de IgE total e IgG4 BmA específica foram medidas por ELISA em pacientes e controles a fim de verificar se a infecção por *M. ozzardi* se comporta como as demais infecções por filária, onde normalmente se observa um aumento nos níveis desses anticorpos.

Os resultados mostraram que não há diferença na concentração de IgE total entre os indivíduos infectados com *M. ozzardi* 1526,59 [3,52-17000,00] pg/mL e controles 1987,46 [3,57-17000,00] pg/mL; $p=0,821$ (medianas e intervalo interquartil, respectivamente); por outro lado, IgG4-BmA específica se encontra aumentada durante a infecção (Figura 17) e a concentração de anticorpos é positivamente correlacionada com a carga parasitária (número de amplicons) (teste de correlação de Spearman, $p = 0,315$), como pode ser observado na Figura 18.

Tabela 12- Concentração de IgE total e IgG4 BmA específica em indivíduos infectados e não infectados por *M. ozzardi*.

Concentração (pg/ml)	Valor por grupo		<i>P</i>
	Fil-	Fil+	
Número de indivíduos	33	49	
IgE	1987,46(3,57-17000,00)	1526,59(3,52-17000,00)	0,821
IgG4-BmA	1627,82(100,00-13560,00)	3594,37(100,00-30000,00)	0,004*

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.). * Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

Figura 17- Concentração de IgE e IgG4 BmA específico em indivíduos infectados e não infectados por *M. ozzardi*.

Figura 18- Correlação entre a parasitemia (número de cópias) e a concentração de IgG4 BmA específico. Correlação de Spearman, 0,315, $p = 0,004$.

Com base na literatura, IgG4 pode ser um marcador de infecção nas filariose, caracterizando principalmente as infecções em sua fase crônica e podendo permanecer circulante durante alguns meses após o tratamento da infecção. Como alternativa ao diagnóstico parasitológico, utilizamos as concentrações de IgG4 BmA específica para definir um novo grupo no estudo, visto que a ausência de microfilárias no momento da coleta não nos traz informações sobre o histórico de infecção dos indivíduos -- como, por exemplo, presença de infecções recentes com cura espontânea, infecções com ausência de microfilárias porém presença do verme adulto -- que poderia interferir nos resultados obtidos nos estudos celulares. As análises subsequentes envolveram, então, duas maneiras de classificar a população do estudo: (a) infectados e não-infectados e (b) indivíduos com concentrações de IgG4 BmA específica igual ou maior que mediana (IgG4H) e indivíduos com concentrações de IgG4 BmA específica inferior a mediana (IgG4L).

O grupo IgG4H é composto por 26 indivíduos. Dentre eles, apenas um possui resultado do diagnóstico por PCR em tempo real negativo, os demais são positivos, com parasitemia variando entre 1763 a 396632 (mediana de 40333,09 cópias/ μ L de sangue). Já o grupo IgG4L é composto por 56 indivíduos entre controles e infectados ($n=25$) com a parasitemia entre os infectados variando entre 0 e 2973357 (mediana de 1892,24 cópias/ μ L de sangue). Como pode ser observado na Tabela 13, os grupos IgG4H e IgG4L não possuem diferenças significantes quanto ao sexo e a idade mas sim quanto à comunidade em que vivem.

Diferentemente do grupo baseado no diagnóstico molecular, indivíduos do grupo IgG4H apresentam uma discreta linfopenia, quando comparados com o grupo IgG4L; da mesma maneira, o número de linfócitos T e linfócitos T CD4 estão diminuídos nos indivíduos do grupo IgG4H. Quanto aos níveis de hemoglobina e número de leucócitos e granulócitos, não foi observada nenhuma diferença.

Tabela 13- Características gerais e hematológicas nos grupos baseados na concentração de anticorpos anti-IgG4 *B. malayi* específico maior que a mediana (High) e menor que a mediana (Low).

Características	Valor por grupo		Valor de <i>P</i>
	IgG4L	IgG4H	
Número de indivíduos	56	26	
Idade (anos)	37 (7-89)	44,5(12-98)	0,199
Sexo (% homens)	46,4(n = 26)	69,2(n = 18)	0,284
Comunidade Boa Vista	8	0	
Comunidade Monte Verde	11	5	
Comunidade Nova Vida	15	5	0,014*
Comunidade Retiro	11	6	
Comunidade São Pedro	2	2	
Comunidade Valparaíso	7	8	
Níveis de hemoglobina (g/L)	14,1(11,8-21,2)	14,9(11,7-17,40)	0,059
Percentual de anêmicos	2,9(n = 1)	6,0(n = 3)	0,410
Número de leucócitos (10 ³ /mm ³)	8,1(3,9-17)	7,9(3,9-15,4)	0,668
Número de linfócitos (10 ³ /mm ³)	2,6(1,3-5,6)	2(1,2-3,8)	0,009*
Número de granulócitos (10 ³ /mm ³)	4,6(1,9-13,7)	5(1,9-43)	0,069
Número de linfócitos T (10 ³ /mm ³)	1,74(0,90-3,58)	1,42(0,66-2,75)	0,009*
Número de linfócitos T CD4 (10 ³ /mm ³)	1,05(0,43-2,13)	0,80(0,43-1,70)	0,008*

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas) ou pelo teste de χ^2 (proporções). * Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

4.3 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador e ativador.

Nossa ampla caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação periférica durante a infecção por *M. ozzardi* não se limitou a examinar as células Treg clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺), mas incluiu várias populações celulares que expressam, em sua superfície, diferentes combinações de possíveis marcadores de atividade moduladora, como FOXP3, OX40, TNFR11, GITR, CD39, PD-1, LAG3 e LAP-TGF- β e

CTLA-4 e de ativação, como HLA-DR e CD69 , além da caracterização fenotípica, utilizando alguns desses marcadores, de subpopulações de células T CD8⁺.

A análise teve início avaliando o perfil populacional das células T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção por *M. ozzardi*. Como mostrado na Tabela 14, a porcentagem de PBMCs viáveis que são CD3⁺, bem como a porcentagem de células CD3⁺ que são CD4⁺ e CD8⁺, não estão alteradas na mansonelose .

Tabela 14- Perfil populacional de linfócitos CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺.

% de linfócitos	Valor por grupo				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	33	48	52	24		
CD3 ⁺	68,80(60,90-73,90)	66,55(59,15-72,30)	2,57(0,40-6,64)	3,04(0,62-19,80)	0,257	0,365
CD3 ⁺ CD4 ⁺	63,20(55,50-67,70)	60,90(54,22-65,10)	5,37(0,65-17,40)	4,20(0,77-21,30)	0,160	0,279
CD3 ⁺ CD8 ⁺	30,90(28,25-37,30)	33,50(31,35-39,60)	3,31(0,16-8,79)	2,14(0,35-10,40)	0,890	0,674

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.

Tabela 15- Percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressam marcadores de regulação e de ativação.

% de linfócitos CD4 ⁺	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil+	Fil-	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	33	48	52	24		
CD39 ⁺	5,52(0,59-8,56)	7,23(0,70-13,90)	5,86(0,59-11,70)	7,56(5,09-13,90)	0,005*	0,005*
CTLA4 ⁺	0,56(0,03-9,68)	0,52(0,06-19,80)	0,59(0,03-19,80)	0,41(0,06-11,50)	0,338	0,275
CTLA4 ⁺ intracelular	21,60(0,27-68,80)	20,00(5,77-53,90)	21,40(0,27-68,80)	20,65(5,77-37,70)	0,839	0,621
HLADR ⁺	4,30(1,63-16,60)	4,89(2,11-18,70)	4,44(1,63-18,70)	5,06(2,61-12,40)	0,131	0,229
PD1 ⁺	9,12(1,18-13,40)	9,34(2,51-21,80)	9,34(1,18-21,80)	8,39(2,51-13,90)	0,112	0,356
TNFR11 ⁺	5,66(0,47-25,70)	6,86(1,03-21,90)	5,73(0,47-25,70)	6,54(1,03-17,40)	0,147	0,240
GITR ⁺	0,36(0,10-1,59)	0,51(0,07-2,50)	0,37(0,10-2,08)	0,62(0,07-2,50)	0,082	0,015*
LAG3 ⁺	0,09(0,02-0,26)	0,09(0,01-1,76)	0,08(0,02-0,67)	0,10(0,01-1,76)	0,826	0,954
LAP ⁺	3,96(0,94-16,80)	4,38(1,35-16,40)	4,04(0,94-16,80)	4,36(1,35-16,40)	0,713	0,463
OX40 ⁺	9,22(4,37-17,60)	7,92(3,58-39,10)	8,50(3,58-20,80)	7,72(4,23-39,10)	0,809	0,653
CD69 ⁺	4,21(1,48-39,20)	5,62(0,93-48,70)	4,62(1,48-36,50)	7,32(1,10-48,70)	0,606	0,362

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.). * Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

Tabela 16- Percentual de linfócitos T CD8⁺ que expressam marcadores de regulação e de ativação.

% de linfócitos CD8 ⁺	Valor por grupo				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	33	48	52	24		
CD69 ⁺	2,72(0,62-19,80)	2,64(0,40-15,10)	2,57(0,40-6,64)	3,04(0,62-19,80)	0,665	0,370
HLADR ⁺	4,90(0,68-16,60)	5,38(0,65-21,30)	5,37(0,65-17,40)	4,20(0,77-21,30)	0,874	0,672
PD1 ⁺	3,23(0,42-10,20)	2,80(0,16-10,40)	3,31(0,16-8,79)	2,14(0,35-10,40)	0,762	0,236

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.).* Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

A etapa seguinte foi comparar a expressão de vários marcadores de regulação e ativação pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os grupo Fil+ e Fil- e IgG4H e IgG4L. Pelo teste de Mann-Whitney, como observado na Tabela 15, houve diferença significativa para apenas uma população celular quando comparamos indivíduos infectados e não-infectados: o percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressam CD39, que se encontra aumentado nos indivíduos infectados. Já quando utilizamos a concentração de IgG4 BmA específico para definir os grupos (IgG4H e IgG4L), observamos que a população CD4⁺ que expressa CD39⁺ também se mostras aumentada, além da população T CD4⁺ que expressa GITR. As outras subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ analisadas apresentaram percentuais semelhantes entre o grupo de indivíduos infectados e não-infectados (Tabelas 15 e 16).

Em seguida, analisamos a população de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺, as células Treg clássicas. Observamos que a proporção de células T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ que expressam FOXP3 é semelhante nos dois grupos (Fil+ 92,2[84,30-97,20] e Fil- 93,98[6,30-97,40, p=0,062] e (IgG4H 93,75[85,60-97,70] e IgG4L 95,90[89,40-99,90], p=0,306), representados pela mediana e intervalo interquartil, respectivamente. A mesma tendência é observada quando avaliamos essa população em termos absolutos, ou seja, o número de linfócitos Treg calculado com base no número de linfócitos total encontrado no hemograma de cada paciente (Fil+ 0,027[0,006-0,058] e Fil- 0,028[,0136-0,058], p=0,376) e (IgG4H 0,027[0,006-0,047] e IgG4L 0,028[0,012-0,058], p=0,425), representados pela mediana e intervalo interquartil, respectivamente .

Quando avaliamos a expressão dos marcadores de atividade moduladora e de ativação nas Treg, observamos diferenças significativas nas proporções de células Treg que expressam CD39 (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺CD39⁺) em ambos os grupos, sugerindo que a expressão de CD39 define uma subpopulação distinta de Treg em pacientes com *M. ozzardi* (Figura 19).

Curiosamente, quando avaliamos a população (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺CD39⁺) em termos de números absolutos de células circulantes, não observamos diferença entre os grupos (Fil+ 0,017[0,003-0,057] e Fil- 0,017[,0150-0,040], p=0,452) e (IgG4H 0,020[0,003-0,047] e IgG4L 0,016[0,001-0,052], p=0,257), representados pela mediana e intervalo interquartil, respectivamente.

Tabela 17- Percentual de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺ (Treg), Treg CD39⁺ e Treg CD39⁻ que expressam marcadores de atividade reguladora e de ativação.

% de linfócitos Treg	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	33	48	52	24		
CD69 ⁺	3,51(0,69-29,50)	3,32(,69-18,90)	3,17(1,14-29,50)	3,32(0,69-18,90)	0,592	0,350
CTLA4 ⁺	0,49(0,00-26,30)	0,69(0,00-43,40)	0,40(0,00-12,30)	0,94(0,00-43,40)	0,417	0,542
CTLA4 ⁺ intracelular	78,6(0,0-93,60)	77(58,90-92,60)	80,20(58,90-92,60)	77,10(0,22-93,60)	0,673	0,244
HLADR ⁺	26,75(8,31-70,30)	28,95(13,30-55,20)	30,60(16,20-55,20)	26,65(8,31-48,30)	0,494	0,117
PD1 ⁺	3,37(0,77-11,50)	4,50(0,53-13,30)	4,46(0,53-12,80)	4,22(0,77-13,30)	0,132	0,950
TNFRII ⁺	45,40(4,73-67,90)	42,25(17,20-71,30)	45,40(4,73-67,90)	42,25(17,20-71,30)	0,972	0,972
GITR ⁺	0,33(0,00-1,36)	0,43(0,00-1,71)	0,65(0,00-1,71)	0,33(0,00-1,09)	0,161	0,058
LAG3 ⁺	0,13(0,00-2,26)	0,17(0,00-1,07)	0,15(0,00-1,02)	0,14(0,00-2,26)	0,173	0,718
LAP ⁺	7,08(0,85-21,00)	6,21(0,92-41,80)	7,17(0,92-41,80)	6,10(0,85-21,00)	0,912	0,470
OX40 ⁺	3,62(1,59-25,50)	3,68(0,61-16,60)	3,48(0,61-16,60)	3,84(1,06-25,50)	0,784	0,784
CD39 ⁺	60,90 (45,05-69,40)	69,7 (58,3-75,1)	59,90 (45,05-72,40)	68,2 (55,3-75,1)	0,025*	0,022*
CD39 ⁺ CD69 ⁺	3,31(0,00-28,90)	2,84(0,73-17,50)	3,09(1,04-28,90)	3,42(0,00-17,50)	0,286	0,395
CD39 ⁺ CTLA4 ⁺	0,55(0,00-34,70)	0,91(0,00-55,20)	0,4(0,00-12,30)	1,06(0,00-55,20)	0,967	0,939
CD39 ⁺ CTLA4 ⁺ intracelular	84,80(0,00-95,60)	83,00(62,40-93,30)	84,00(62,40-93,20)	83,90(1,02-95,60)	0,351	0,766
CD39 ⁺ HLADR ⁺	33,80(8,79-71,70)	33,05(16,40-64,30)	35,10(18,00-59,80)	32,45(8,79-64,30)	0,855	0,595
CD39 ⁺ PD1 ⁺	3,55(0,69-17,20)	4,19(0,50-14,30)	3,50(0,50-11,10)	3,76(0,69-17,20)	0,323	0,603
CD39 ⁺ TNFRII ⁺	48,85(4,62-84,80)	44,75(16,10-78,70)	46,10(16,10-61,80)	45,75(4,62-84,80)	0,516	0,814
CD39 ⁺ GITR ⁺	0,35(0,00-1,32)	0,44(0,00-2,26)	0,49(0,00-2,26)	0,36(0,00-1,46)	0,416	0,275
CD39 ⁺ LAG3 ⁺	0,00(0,00-3,94)	0,19(0,00-1,18)	0,13(0,00-0,65)	0,13(0,00-3,94)	0,077	0,757
CD39 ⁺ LAP ⁺	7,710(0,50-27,00)	6,18(0,71-47,10)	6,82(0,71-47,10)	6,16(0,50-27,00)	0,681	0,879
CD39 ⁺ OX40 ⁺	4,53(1,73-40,10)	4,50(0,71-18,30)	4,17(0,71-16,70)	4,55(1,20-40,10)	0,891	0,780
CD39 ⁺ CD69 ⁺	3,34(,61-32,50)	2,47(0,0-33,30)	4,22(1,07-33,30)	2,865(0,00-29,00)	0,210	0,347
CD39 ⁺ CTLA4 ⁺	0,83(0,00-14,00)	0,98(0,00-40,30)	0,48(0,00-14,00)	1,10(0,00-40,30)	0,897	0,461
CD39 ⁺ CTLA4 ⁺ intracelular	61,4(0,00-86,60)	65,5(36,40-87,70)	65,05(36,40-87,70)	64,20(0,00-86,60)	0,176	0,355
CD39 ⁺ HLADR ⁺	12,35(2,30-43,40)	13,4(0,00-40,20)	16,30(4,80-40,20)	11,30(0,00-34,50)	0,435	0,127
CD39 ⁺ PD1 ⁺	4,43(0,00-15,70)	7,79(2,00-31,40)	7,83(0,32-17,70)	5,70(0,00-31,40)	0,001*	0,141
CD39 ⁺ TNFRII ⁺	31,3(3,45-56,60)	33,05(12,40-70,50)	35,85(18,80)	30,30(3,45-70,50)	0,414	0,076
CD39 ⁺ GITR ⁺	0,14(0,00-2,50)	0,11(0,00-2,53)	0,04(0,00-2,53)	0,04(0,00-86,60)	0,520	0,083

CD39 ⁻ LAG3 ⁺	0,00(0,00-2,50)	0,00(0,00-2,76)	0,00(0,00-2,50)	0,00(0,00-2,76)	0,041	0,380
CD39 ⁻ LAP ⁺	4,9(0,00-21,20)	26,50(0,00-2,76)	5,87(0,77-26,50)	5,26(0,00-11,50)	0,895	0,708
CD39 ⁻ OX40 ⁺	2,36(0,00-12,50)	2,93(0,00-16,00)	2,54(0,00-16,00)	2,93(0,00-12,10)	0,645	0,582

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil⁺ e Fil⁻ e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.). Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

Figura 19- Expressão de CD39 nos linfócitos T CD4⁺ e células Treg.

A partir da ideia de que a expressão de CD39 pode definir uma subpopulação distinta de Treg em pacientes com *M. ozzardi*, analisamos a expressão dos marcadores de atividade moduladora e de ativação dentre as Treg CD39⁺ e Treg CD39⁻. Dentre todos os marcadores analisados, apenas a expressão de PD1 se encontra aumentada na população Treg CD39⁻ nos indivíduos infectados em comparação com os controles. No entanto, o mesmo resultado não é encontrado quando analisamos essa população comparando o grupo IgG4H e IgG4L (Tabela 17).

Análises booleanas foram realizadas no software FlowJo, com a finalidade de observar a co-expressão dos marcadores de atividade moduladora e de ativação, dentro das populações T CD4⁺, Treg, TregCD39⁺ e TregCD39⁻, entre os grupos. Por exemplo, analisamos se há diferença na proporção de células TCD4⁺ que co-expressam os marcadores de modulação (CTLA4, PD1, TNFR11, GITR, LAG3, LAP e OX40) ou na proporção de células T CD4⁺ que co- expressam os marcadores de ativação (CD69 e HLADR) entre indivíduos infectados e

não infectados, porém não observamos diferença significativa, na co-expressão de nenhuma combinação de marcadores, em nenhuma das populações analisadas.

A partir destes resultados, calculamos qual a proporção de células CD4⁺ que apresentavam fenótipo de Treg e Treg CD39⁺. A proporção de células CD4⁺ que apresentam fenótipo de células Treg foi de 1,46% e 1,47% (infectados e controles, respectivamente) e de 1,43% e 1,48% (grupo IgG4H e IgG4L, respectivamente). Já a proporção de Treg CD39⁺ foi de 1,03% e 0,94% (infectados e controles, respectivamente) e de 1,10% e 0,92% (grupo IgG4H e IgG4L, respectivamente).

Um análise adicional foi realizada a fim de caracterizar melhor as subpopulações de células Tregs CD39⁺ e CD39⁻. Teve como objetivo verificar se, além da própria atividade moduladora exercida pela molécula CD39, essas células apresentam diferenças quanto à expressão de outros marcadores de regulação. Como pode ser visto na Figura 20, todos os marcadores de regulação avaliados (CTLA-4, LAP-TGF- β , LAG-3, TNFRII, GITR e OX40), com exceção de PD-1, possuem expressão aumentada em comparação com as células Treg que não expressam CD39. Da mesma maneira, os marcadores que caracterizam ativação celular (CD69 e HLA-DR) são também mais expressos nas células Tregs CD39⁺. Esses resultados adicionam evidências de que a expressão de CD39 pode definir, de fato, uma subpopulação de Tregs distintas, com uma possível atividade reguladora mais eficiente.

Figura 20- Expressão de marcadores de regulação e ativação celular nas células Treg CD39⁺ e Treg CD39⁻.

Decidimos, então, avaliar se as subpopulações que se mostraram aumentadas ou diminuídas na mansonelose estavam correlacionadas com a carga parasitária. Observamos correlação positiva significativa entre carga parasitária e a proporção de células $CD4^+$ que expressam $CD39$ (Correlação de Spearman, 0,329; $p=0,003$) ou $GITR$ (Correlação de Spearman, 0,351; $p=0,004$), a proporção de células Treg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{-}FOXP3^+$) que expressam $CD39$ (Correlação de Spearman, 0,348; $p=0,004$), e a de células Treg $CD39^-$ que expressam $PD1^+$ (Correlação de Spearman, 0,280; $p=0,012$) (Figura 21).

Figura 21- Correlação entre carga parasitária e a proporção de células $CD4^+$ e Treg que expressam moléculas moduladoras. $CD4^+CD39^+$ (Correlação de Spearman, 0,329; $p=0,003$), $CD4^+GITR^+$ (Correlação de Spearman, 0,351; $p=0,004$) Treg $CD39^+$ (Correlação de Spearman, 0,348; $p=0,004$), Treg $CD39^-PD1^+$ (Correlação de Spearman, 0,280; $p=0,012$).

4.4 Caracterização fenotípica de células NK, NKT e γ - δ

As células NKT foram identificadas como linfócitos CD3⁺ que co-expressam V α 24/V β 11, além das subpopulações CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ que parecem definir seus perfis de expressão gênica, produção de citocinas e capacidade de ativar células vizinhas (KRONENBERG; GAPIN, 2002). Em seres humanos, as células NKT CD4⁺ produzem níveis maiores de IL-4, IL-13, GMCSF e IL-2 do que as CD4⁻, sendo que ambas as populações produzem IFN- γ e TNF- α em níveis elevados (GUMPERZ et al., 2002). Adicionalmente, algumas evidências indicam uma comunicação entre as células NKT e os linfócitos T reguladores (KRONENBERG; GAPIN, 2002). No entanto, não há nenhuma descrição dessa população celular nas filaríoses.

Ao analisarmos os marcadores celulares V α 24/V β 11, observamos que a proporção de células NKT é bastante semelhante nos infectados por *M. ozzardi* quando estes são comparados com controles expostos, assim como entre o grupo IgG4H e IgG4L. O mesmo perfil é encontrado nas demais subpopulações de células NKT, como pode ser visto na Tabela 18.

Juntamente com as NKT as células NK desempenham um importante papel como células efectoras da resposta imune inata. Para avaliar esta população celular na mansonelose, as células NK foram definidas fenotipicamente pela ausência do marcador de superfície CD3 e co-expressão dos marcadores CD56 e CD16. No entanto nenhuma diferença significativa foi encontrada na proporção de células NK durante a infecção por *M. ozzardi*.

Por outro lado, encontramos uma menor proporção de células γ - δ dentre os infectados (*M. ozzardi* 64,60 [52,52-79,67] e controles 74,70 [60,90-81,65], mediana e intervalo interquartil, respectivamente), porém o mesmo resultado não é observado quando comparamos os grupos IgG4H e IgG4L. Fazendo a correlação dessa população com a carga parasitária observamos então, uma correlação significativa porém negativa (Correlação de Spearman, -0,307; p=0,005) (Figura 22).

Figura 22- Correlação entre carga parasitária e a proporção de células γ - δ (Correlação de Spearman, -0,307; $p=0,005$)

Tabela 18- Proporção de células NK, NKT e γ - δ na infecção por *M. ozzardi* em comparação com controles

% Fenótipo celular	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil- 33	Fil+ 48	IgG4L 53	IgG4H 25		
NKT	0,18 (0,07-0,34)	0,21 (0,11-0,35)	0,20(0,01-1,26)	0,19(0,04-7,78)	0,349	0,589
NKT CD69 ⁺	91,10 (87,75-96,10)	91,10 (76,92-94,70)	91,10(57,60-100,00)	89,70(37,40-98,90)	0,301	0,700
NKT CD8 ⁺	13,80 (7,68-19,55)	14,40 (6,74-20,97)	13,80(1,14-36,20)	14,80(3,16-62,10)	0,901	0,949
NKT CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,95 (0,00-2,08)	0,81 (0,52-1,54)	2,27(0,91-6,84)	0,78(0,00-4,44)	0,881	0,655
NKT CD4 ⁺	39,10 (24,30-65,80)	36,45 (21,75-64,72)	38,30(8,39-87,50)	39,30(3,69-77,40)	0,627	0,444
NKT CD4 ⁺ CD8 ⁻	45,80 (25,25-55,15)	46,00 (23,12-57,52)	46,30(0,00-74,40)	34,20(18,60-53,80)	0,985	0,535
γ - δ (Gamma-Delta)	74,70 (60,90-81,65)	64,60 (52,52-79,67)	72,40(42,30-94,10)	64,70(30,40-93,20)	0,030*	0,138
γ - δ CD69 ⁺	91,20 (88,20-93,60)	90,45 (82,02-94,80)	90,90(60,20-99,50)	90,70(60,30-97,30)	0,590	0,826
NK	20,70 (17,90-26,80)	23,65 (18,60-32,07)	21,70(7,39-50,40)	23,80(10,70-50,30)	0,304	0,134
NK CD69 ⁺	20,20 (14,40-40,70)	20,70 (14,15-35,05)	17,90(3,23-73,80)	26,40(5,08-80,20)	0,384	0,263

Valor de P no grupo 1= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L. Valor de P no grupo 1= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.).* Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

4.5 Caracterização fenotípica de linfócitos B e linfócitos B atípicos

A memória imunológica é extremamente importante na resposta imune aos agentes patogênicos. Para muitas doenças infecciosas, a imunidade humoral protetora de longa duração é induzida após apenas uma única infecção, em um processo que depende da geração de células B de memória (MBCs) e células plasmáticas de longa vida. No entanto, ao longo da última década tornou-se cada vez mais evidente que muitas doenças infecciosas crônicas, onde a imunidade não é prontamente estabelecida, possuem uma característica em comum: uma grande expansão do que foram denominados células B de memória atípica (aMBCs) (PORTUGAL et al., 2015). As aMBCs tem como característica uma de suas características a baixa expressão dos marcadores de superfície celular que definem MBCs clássicas em seres humanos, CD21 e CD27.

Diante desses achados e da ausência de estudos semelhantes nas diversas filarioses, em especial em infecções por *M. ozzardi*, decidimos investigar o perfil fenotípico de células B naive ($CD10^-CD19^+CD20^+CD21^+CD27^-$), células B de memória clássicas ($CD10^-CD19^+CD20^+CD21^+CD27^+$), células B ativadas ($CD10^-CD19^+CD20^+CD21^-CD27^+$) e as aMBCs ($CD10^-CD19^+CD20^+CD21^-CD27^-$).

A infecção por *M. ozzardi* parece não induzir uma diferença significativa na proporção de linfócitos B total e também em nenhuma das subpopulações analisadas (células B naive, plasmócitos, células B de memória ativadas, células B de memória clássicas e células B de memória atípicas) (Tabela 19).

Tabela 19- Proporção de linfócitos B e linfócitos B atípicos na infecção por *M. ozzardi* em comparação com controles.

% Fenótipo celular	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	32	42	49	21		
Plasmócitos	2,02 (1,32-5,53)	2,87 (1,66-6,49)	2,74(0,54-30,60)	2,59(1,00-9,25)	0,173	0,663
CD19 ⁺ CD20 ⁺ (linfócito B)	10,75 (7,89-13,72)	10,40 (7,29-13,72)	10,40(1,70-18,60)	10,80(5,50-16,00)	0,748	0,453
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (MBC ativada)	2,38 (1,72-4,09)	2,55 (1,64-3,30)	2,44(0,57-7,04)	2,50(1,09-5,82)	0,879	1,000
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (MBC clássica)	24,70 (17,77-30,05)	20,20 (16,40-29,17)	22,70(8,97-59,70)	20,50(8,87-48,70)	0,329	0,613
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (MBC naive)	69,50 (63,07-77,12)	71,85 (64,77-76,77)	70,40(27,90-86,40)	73,10(43,70-85,30)	0,380	0,419
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (MBC atípica)	4,09 (2,51-5,41)	3,60 (2,46-4,44)	3,93(1,45-14,80)	3,47(1,90-7,04)	0,305	0,233

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.

Tabela 20- Proporção de monócitos na infecção por *M. ozzardi* em comparação com controles

% Fenótipo celular	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	33	48	53	25		
CD16 ⁺ CD14 ⁺	88,80 (86,85-90,90)	89,80 (86,20-91,47)	89,10(77,60-94,60)	90,60(79,70-94,20)	0,422	0,153
CD16 ⁺ CD14 ⁺	0,82 (0,48-1,49)	0,85 (0,37-1,61)	0,82(0,20-4,17)	0,75(0,12-4,19)	0,627	0,665
CD16 ⁺ CD14 ⁺ CD69 ⁺	70,10 (54,45-79,90)	63,25 (49,92-76,30)	69,40(28,10-89,40)	65,60(37,00-97,90)	0,196	0,797
CD16 ⁺ CD14 ^{low}	1,89 (0,99-3,25)	1,89 (0,76-3,78)	1,97(0,51-11,00)	1,71(0,41-5,65)	0,882	0,444
CD16 ⁺ CD14 ^{low} CD69 ⁺	39,30 (26,90-46,80)	32,45 (25,75-47,95)	33,50(13,20-70,20)	35,40(12,30-69,30)	0,529	0,983

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.

4.6 Caracterização fenotípica de subpopulações de monócitos

No sangue periférico, distintas subpopulações de monócitos podem ser observadas de acordo com a expressão das moléculas CD14 e CD16. Em condições fisiológicas podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14⁺CD16⁻), os intermediários (CD14⁺CD16⁺) e os não-clássicos (CD14^{low/-}CD16⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

Sendo assim, avaliamos as subpopulações de monócitos no sangue periférico de pacientes com mansonelose. Como observado na Tabela 15, não encontramos nenhuma diferença nas subpopulações de monócitos, como também no seu estado ativação, avaliado pela expressão de CD69, quando comparamos pacientes infectados por *M. ozzardi* e controles expostos e também os indivíduos com altas concentrações de IgG4-específica com aqueles com menores concentrações (Tabela 20).

4.7 Caracterização fenotípica das subpopulações de células dendríticas (mDCs e pDCs)

Células dendríticas são caracterizadas como Lin-1⁻HLA-DR⁺. A definição das DC circulantes como mielóides ou plasmocitóides foi baseada na expressão de CD11c e CD123. As DCs mielóides (mDCs) são caracterizadas como sendo células Lin-1⁻HLA-DR⁺CD11c⁺CD123, enquanto que as DCs plasmocitóides (pDCs) são células Lin-1⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺.

Avaliando-se o perfil populacional dessas células observa-se que a infecção por *M. ozzardi* não induz uma diferença significativa na proporção de DCs em relação aos controles (*M. ozzardi* 0,72 [0,52-0,86] e controles 0,67 [0,56-0,75], medianas e intervalo interquartil, respectivamente; p=0,605) e também entre os grupos IgG4H e IgG4L (IgG4H 0,78 [0,54-0,86] e controles 0,65 [0,52-0,73], medianas e intervalo interquartil, respectivamente; p=0,342). Com relação as subpopulações mielóides e plasmocitóides, observamos, novamente, proporções semelhantes entre os grupos analisados (Tabela 21).

DCs são células apresentadoras de antígenos especializadas que precisam ser ativadas a fim de estimular eficientemente células T e induzir sua diferenciação. A maturação de DCs

é essencial para a ativação da resposta imune adaptativa. Sendo assim, para verificar a expressão de marcadores relacionados a esta função analisamos a expressão das moléculas de coestimulação (CD80/B7-1, CD86/B7- 2). Encontramos uma diminuição na proporção tanto das mDCs quanto das pDCs que expressam a molécula CD86 nos indivíduos com altas concentrações de IgG4 BmA específico (IgG4H) comparado com o grupo IgG4L, mas o mesmo não é observado entre o grupo FII+ e FIL- (Tabela 21).

Para melhor avaliar o estado de maturação das DCs (essas células expressam diferentes moléculas do reconhecimento antigênico até a apresentação propriamente dita), analisamos a expressão de alguns receptores de quimiocinas (CCR1, CCR5 e CCR7), já que DCs apresentam uma expressão diferencial desses receptores durante seu processo de maturação. Células dendríticas imaturas que são caracterizadas pela eficiência na captura e processamento de antígenos expressam receptores como CCR1, CCR2, CCR5 para as quimiocinas inflamatórias. Durante a maturação, as DCs perdem a capacidade de internalizar antígenos e ocorre, portanto, uma diminuição da expressão desses receptores e um aumento da expressão de CXCR4, CCR4 e CCR7. Nos pacientes com mansonelose, as subpopulação de mDCs e pDCs que expressam essas moléculas são semelhantes entre os grupos. Quando analisamos a co-expressão dos marcadores de ativação e maturação, observamos que tanto as mDCs quanto as pDCs que co-expressam CCR5 e CD86 se encontram diminuídas nos indivíduos IgG4H (pDCs CCR5+CD86+ (IgG4H 3,23[0,51-14,00] e IgG4L 3,81 [0,21-12,70], $p=0,012$) mDCs CCR5+CD86+ (IgG4H 24,85[0-69,60] e IgG4L 36,8[0-82,90], $p=0,017$) medianas e intervalo interquartil, respectivamente).

Tabela 21- Percentual de células dendríticas que expressam marcadores de maturação e migração.

% de células dendríticas	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil+	Fil-	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	24	39	52	24		
CD123 ⁺ CD11c ⁻	30,20 (20,35-34,40)	32,00 (24,90-38,50)	30,85(10,90-60,50)	34,40(9,83-57,10)	0,436	0,414
CD11c ⁺ CD123 ⁻	55,75 (50,85-65,60)	53,90 (48,60-62,30)	55,00(0,00-77,90)	53,30(32,20-79,10)	0,529	0,244
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CCR1 ⁺	38,30 (16,15-69,12)	32,80 (19,20-57,40)	35,80(0,00-88,70)	35,80(0,00-88,70)	0,713	0,234
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CCR5 ⁺	97,85 (95,22-99,47)	98,80 (98,10-99,50)	98,20(0,00-100,00)	98,95(0,00-100,00)	0,128	0,868
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CCR7 ⁺	2,80 (1,22-5,88)	2,72 (1,79-4,22)	2,90(0,00-14,20)	2,63(0,00-12,90)	0,915	0,616
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CD69 ⁺	45,55 (31,22-55,40)	50,70 (32,70-59,80)	50,30(0,00-91,60)	45,75(0,00-81,20)	0,350	0,161
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CD80 ⁺	1,11 (0,27-1,65)	1,28 (0,63-1,79)	1,28(0,00-5,13)	0,81(0,00-3,04)	0,640	0,817
CD123 ⁺ CD11c ⁻ CD86 ⁺	25,95 (17,65-43,55)	39,20 (26,00-51,80)	37,60(0,00-84,10)	25,2(0,00-70,40)	0,077	0,015*
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CCR1 ⁺	5,52 (2,16-11,32)	3,77 (2,19-8,94)	3,71(0,49-31,10)	5,06(0,14-42,10)	0,479	0,889
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CCR5 ⁺	87,50 (79,25-91,77)	88,80 (85,50-92,40)	89,30(6,64-96,20)	86,80(68,50-93,90)	0,376	0,729
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CCR7 ⁺	2,24 (1,28-3,79)	1,62 (0,97-2,37)	1,68(0,00-16,80)	1,66(0,79-9,62)	0,042	0,121
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CD69 ⁺	76,90 (64,02-83,90)	77,50 (64,10-85,10)	79,15(30,90-97,10)	72,90(44,00-90,60)	0,944	0,061
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CD80 ⁺	4,66 (1,91-6,80)	5,66 (3,19-8,60)	5,52(1,00-26,10)	4,86(0,55-19,10)	0,125	0,125
CD11c ⁺ CD123 ⁻ CD86 ⁺	95,10 (93,12-97,25)	94,60 (91,00-96,10)	95,25(37,90-99,00)	92,10(80,90-97,80)	0,475	0,003*

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.).* Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

4.8 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção por *M. ozzardi*

Para conhecer o perfil de citocinas circulantes durante a infecção por *M. ozzardi*, e também verificar se a IL-10 possui um papel importante na modulação da resposta imune, como encontrado nas outras filariose, examinamos os níveis plasmáticos de diversas citocinas e quimiocinas por *Luminex* (EGF, eotaxina, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α , IFN- γ , IL-1ra, IL-1 β , IL-2, IL-2r, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α e VEGF) nos pacientes infectados por *M. ozzardi* e nos controles.

Como é possível observar na Tabela 22, a concentração plasmática de EGF, FGF basic, GM-CSF, HGF, IFN- α , IFN- γ , IL-1ra, IL-1 β , IL-2, IL-2r, IL-5, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, e VEGF entre os indivíduos infectados mostraram-se equivalentes aos níveis observados dos controles expostos. Por outro lado nota-se, uma diferença significativa quanto nos níveis plasmático de Eotaxina, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, MIP-1 α , MIP-1 β , G-CSF e TNF- α nos indivíduos infectados. Curiosamente, dentre todas as citocinas e quimiocinas em que observamos uma diferença significativa na concentração plasmática entre indivíduos infectados e não-infectados, somente os níveis de Eotaxina mostraram-se positivamente correlacionados com a parasitemia (Correlação de Spearman = 0,358, $p=0,001$). As demais citocinas apresentam níveis menores entre indivíduos infectados em comparação ao grupo controle; este perfil se estende para a maioria das citocinas dosadas. Ao avaliarmos o perfil de citocinas entre os grupos IgG4H e IgG4L, encontramos uma diferença significante apenas com relação a TNF- α , com concentração menor entre os indivíduos IgG4H; a concentração das demais citocinas são semelhantes entre os grupos.

Tabela 22- Níveis de citocinas circulantes avaliados em plasma de indivíduos infectados e controles expostos.

Citocinas pg/ml	Valor por grupo				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	34	49	56	26		
IL-1ra	53,30	46,17	49,13	46,49	0,212	0,739
TNF- α	18,34	9,73	14,49	8,89	0,012*	0,021*
IL-2	0	0	0	0	1	1
IL-7	29,05	17,78	23,67	16,76	0,029*	0,136
IP10	26	22,27	22	23,13	0,869	0,922
IL-2r	206,44	236,01	230,83	215,47	0,157	0,669
MIG	215,20	137,28	144,70	170,76	0,435	0,366
IL-4	9,25	0	2,52	2,08	0,008*	0,948
IL-8	28,53	4,68	10,88	18,33	0,005*	0,728
FGF	2,7	6,11	6,6	1,43	0,465	0,165
IL-1D	0,45	0,44	0,43	0,51	0,720	0,650
G-CSF	101,86	52,36	77,62	44,25	0,016*	0,059
IL-10	13,69	17,45	21,1	5,00	0,052	0,282
IL-13	29,08	10,80	21,68	4,89	0,098	0,123
IL-6	7,99	3,85	5,42	5,16	0,021*	0,0715
IL-12 (p40/p70)	126,98	118,08	112,83	111,22	0,566	0,089
RANTES	230,63	303,80	301,51	219,95	0,501	0,487
EOTAXINA	37	47,72	41,75	46,60	0,006*	0,239
IL-17	2,25	0	0,60	0	0,064	0,471
MIP-1 α	28,92	16,05	23,36	14,94	0,016*	0,061
GM-CSF	0	0	0	0	1	1
MIP-1 β	54,36	31,83	41,62	37,02	0,034*	0,176
MCP-1	121,61	144,24	124,15	157,25	0,198	0,200
IL-15	31,51	22,23	32,94	9,47	0,034*	0,091
EGF	4,64	3,34	4,43	2,45	0,150	0,407
IL-5	7,9	5,4	7,07	4,29	0,176	0,157
HGF	61,81	52,54	55,15	55,60	0,110	0,797
VEGF	0,93	0,57	0,32	0,96	0,836	0,462
IFN- γ	8,3	3,99	6,17	3,28	0,117	0,120
IFN- α	37,64	38,44	41,81	29,69	0,356	0,249

Os dados são apresentados como mediana e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.). * Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

4.9 Caracterização de células B reguladoras produtoras de IL-10

As células B reguladoras (Breg), definidas funcionalmente pela produção de IL-10, são uma importante subpopulação de células B com importante papel imunossupressor em diversas doenças infecciosas, incluindo as infecções por helmintos (VAN DER VLUGT et al., 2012). Neste trabalho, identificamos essa população através da marcação intracelular de IL-

10, após estímulo com LPS combinado com PMA e ionomina por 5 horas. Três principais subpopulações de células B são descritas como tendo importante papel na produção de IL-10: as células B CD1d^{hi}, CD24^{hi}CD38^{hi} e células CD24^{hi}CD27⁺. Por este motivo, avaliamos diferentes subpopulações de células B reguladoras com base na expressão desses marcadores e também as células B que expressam CD39 e as células B produtoras de TNF- α . Como pode ser observado na Tabela 23, não há diferença na produção de IL-10 pelas células B (CD19⁺), viáveis, durante a infecção por *M. ozzardi*. Da mesma maneira as subpopulações de células B (CD1d^{hi}, CD24^{hi}CD38^{hi} e células CD24^{hi}CD27) foram observadas em proporções semelhantes entre os grupos avaliados, assim como a proporção de células B produtoras de TNF- α (Tabela 23).

A supressão de células T por células B ativadas parece ser associada a um aumento na expressão de CD39 na superfície das células B (SAZE et al., 2013); no entanto, a expressão da molécula CD39 parece não aumentar durante a infecção por *M. ozzardi*, sendo expressa em proporções bastante semelhantes nos grupos comparados (Fil+ 87,80 [75,00-95,70] e Fil- 86,30[68,00-93,90] e IgG4+ 87,50[68,00-95,70] e IgG4- 86,90[77,80-93,10] mediana e intervalo interquartil, respectivamente).

4.10 Ensaios de proliferação celular

Após um completo mapeamento de diversas populações celulares e como essas se encontram durante a infecção por *M. ozzardi*, bem como do perfil de citocinas produzidas na infecção, passamos a etapa de caracterização funcional das PBMC. Primeiramente avaliamos a capacidade proliferativa de linfócitos na infecção por *M. ozzardi*. Este experimento foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira, PBMCs de 20 indivíduos infectados e 10 controles foram marcadas com *Cell Trace*, e estimuladas com estímulo específico (extrato de microfilárias de *M. ozzardi*), mitógeno (PHA) e antígenos não-relacionados (*T. gondii* e eritrócitos intactos infectados por *P. vivax*), e cultivadas por 72 horas. Para calcular o percentual de PBMCs em proliferação, subtraímos do valor encontrado nas amostras estimuladas o resultado obtido nas amostras não estimuladas, isto é, o percentual basal de proliferação de cada população. A Tabela 24 e a Figura 23 descrevem os resultados de

medianas e intervalos interquartis após a subtração do percentual basal de proliferação. Observamos que a presença de infecção por *M. ozzardi* não afeta a capacidade proliferativa das PBMCs, independente do estímulo recebido. Quando comparamos indivíduos dos grupos IgG4H e IgG4L, observamos uma resposta proliferativa menor entre os indivíduos IgG4H quando estimulados com mitógeno (PHA) e com antígeno não-relacionado (eritrócitos intactos infectado por *P. vivax*).

Tabela 23- Percentual de células B produtoras de IL-10 ou TNF- α intracelular ou que apresentem fenótipo de células B reguladoras.

% de células B	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil+	Fil-	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	25	37	41	18		
CD1d ⁺	5,09(0,88-15,40)	4,50(1,34-18,90)	4,90(0,88-18,90)	4,78(1,34-12,20)	0,580	0,633
CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	8,99(2,12-21,10)	9,11(0,41-30,00)	9,79(2,12-30,00)	8,28(0,41-22,50)	0,464	0,570
CD39 ⁺	87,80(75,00-95,70)	86,30(68,00-93,90)	87,50(68,00-95,70)	86,90(77,80-93,10)	0,413	0,954
CD24 ⁻ CD27 ⁺	3,42(1,12-8,57)	3,50(0,69-11,50)	3,21(0,69-11,50)	3,53(1,51-7,02)	0,779	0,292
CD24 ⁻ CD27 ⁻	2,65(0,81-10,50)	2,57(0,79-11,20)	2,44(0,91-11,20)	2,83(0,79-9,98)	0,914	0,415
CD24 ^{hi} CD27 ⁻	67,10(28,60-81,20)	73,50(49,70-88,30)	68,80(28,60-88,30)	73,45(50,70-83,90)	0,301	0,798
CD24 ^{hi} CD27 ⁺	27,10(11,70-62,10)	20,60(8,76-44,60)	21,70(8,76-62,10)	20,25(13,20-41,40)	0,089	0,644
IL-10 ⁺	1,59(0,15-5,37)	1,29(0,13-6,16)	1,29(0,13-6,16)	1,21(0,17-3,78)	0,635	0,947
TNF- α ⁺	1,92(0,25-8,41)	2,26(0,64-6,33)	1,92(0,25-8,41)	2,45(1,01-4,61)	0,942	0,581

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.

Figura 23- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com *M. ozzardi*, *P. vivax*, Fitohemaglutinina (PHA) e *T. gondii*.

Por não termos observado uma boa resposta proliferativa ao estímulo específico (o extrato bruto de *M. ozzardi*), assim como aos estímulos não-relacionados (*T. gondii* e eritrócitos intactos infectados por *P. vivax*), novos experimentos foram então realizados. Nesta segunda etapa, utilizamos como estímulos BmA, juntamente com CD28/CD49d como co-estímulo, na tentativa de obter uma boa resposta que simulasse uma resposta específica, alternativamente ao antígeno específico de *M. ozzardi*, e SEB (com CD28/CD49d) um

superantígeno. Da mesma maneira, PBMCs de indivíduos infectados e controles foram marcadas com *Cell Trace* e cultivadas por 72 horas.

Mais uma vez, a infecção por *M. ozzardi* aparentemente não afeta a capacidade proliferativa das PBMCs independente do estímulo, pelo contrário, as células de indivíduos Fil+ parecem apresentar maior responsividade a SEB (Figura 24) .

Figura 24- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com Bma, SEB e SEB + anti- CD39.

Tabela 24- Percentual de PBMC em proliferação celular após estímulo com antígeno específico, mitógeno e antígenos não relacionados.

Estímulos	Valor por grupo*				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil-	Fil+	IgG4L	IgG4H		
Número de indivíduos	10	20				
<i>M. ozzardi</i>	-0,74(-5,24- 2,39)	0,24 (-1,78-2,39)	-0,31(-5,24-2,39)	-0,42(-1,58-3,50)	0,143	0,686
<i>P. falciparum</i>	3,23 (0,28-3,23)	2,81 (0,72-14,08)	3,19(0,30-15,50)	2,82(0,96-4,99)	0,914	0,445
PHA	30,70 (11,54-49,94)	34,27 (16,33-54,70)	34,48(16,88-54,70)	28,24(16,33-43,70)	0,397	0,025*
<i>T. gondii</i>	2,86 (0,06-12,00)	3,09 (-0,78-3,09)	3,09(-0,78-12,00)	3,24(1,86-9,19)	0,948	0,770
NE	2,69(0,83-16,70)	1,24(0,96-8,40)	2,57(1,21-16,700)	1,48(0,83-11,40)	0,237	0,154

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann-Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.).* Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

Tabela 25- Proporção de linfócitos em proliferação após estímulo com BMA, SEB e SEB + anti-CD39

Estímulos	Valor por grupo				Valor de P (grupo 1)	Valor de P (grupo 2)
	Fil+	Fil-	IgG4H	IgG4L		
Número de indivíduos	36	23	17	38		
BMA	2,38(0,58-44,90)	3,89(0,40-31,30)	3,8(0,58-44,90)	2,27(0,40-34,70)	0,654	0,283
SEB	45,25(14,90 -67,10)	31,7(5,93-64,20)	44,00(11,60-67,10)	42,00(5,93-65,30)	0,012*	0,536
SEB + anti-CD39	6,33(0,57-40,00)	4,4(0,29-55,20)	7,44(0,57-25,90)	4,52(0,29-40,00)	0,342	0,387
NE	1,40(0,27-10,00)	1,74(0,11-13,90)	7,44(0,57-25,90)	4,52(0,29-40,00)	0,89	0,125

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Valor de P no grupo 1= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos Fil+ e Fil- e valor de P no grupo 2= teste de Mann- Whitney realizado entre os grupos IgG4H e IgG4L.).* Diferença estatisticamente significativa ($P < 5\%$).

Tabela 26- Proporção de linfócitos em proliferação após estímulo com SEB e bloqueio com anti-CD39.

% de células	Estímulo com SEB				
		Anti-CD39	Anti-CD39/ATP	Anti-CD39/Ad	Anti-IL-10
Número de indivíduos	57	57	24	24	15
Proliferação	43,20 (5,93-67,10) ^{ad}	5,53 (0,29-55,20) ^{abc}	3,88(1,01-7,95) ^b	2,10(0,88-6,70) ^c	53,40(28,3-58,70) ^d

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5%.

^a O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB e grupo estimulado com SEB+anti-CD39 ($p=0,000$).

^b O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB+anti-CD39 e grupo estimulado com SEB+anti-CD39/ATP ($p=0,000$).

^c O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB+anti-CD39 e grupo estimulado com SEB+anti-CD39/Ad ($p=0,000$).

^d O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB e grupo estimulado com SEB+anti-IL-10 ($p=0,000$).

4.10.1 Ensaios de proliferação frente ao bloqueio da molécula CD39

Com o intuito de avaliar se a expressão aumentada da molécula CD39, observada nos ensaios de fenotipagem celular tanto nas células T CD4⁺ quanto nas Treg nos indivíduos infectados por *M. ozzardi*, interfere na capacidade proliferativa dos linfócitos, estimulamos PBMCs de pacientes e controles com SEB, e adicionamos a cultura anticorpo purificado anti-CD39.

A eficiência da ligação do anticorpo anti-CD39, assim como a viabilidade celular, foram verificadas após as 72 horas de cultivo, através da análise por citometria de fluxo. As amostras apresentaram viabilidade acima de 80% e o anticorpo se manteve ligado à molécula CD39 ao longo do cultivo.

De maneira totalmente contrária ao esperado, o bloqueio de CD39 não aumenta a capacidade proliferativa dos linfócitos, mas sim diminui de maneira bastante significativa a proliferação celular, chegando a até 10 vezes quando comparado a condição de estímulo sem anti-CD39. Quando avaliamos entre os grupos (Fil+/FIL- e IgG4H/IgG4L), a redução da capacidade proliferativa parece ser independente da magnitude de expressão de CD39 por células T CD4 e Tregs, já que não observamos diferenças entre os indivíduos infectados ou com altas concentrações de IgG4 BmA específica, comparados com os indivíduos não-infectados ou do grupo IgG4L (Tabela 26 e Figura 25).

Com base no mecanismo de ação conhecido das moléculas CD39 (hidrólise de ATP e produção de adenosina), acrescentamos a cultura ATP ou adenosina para verificar se a diminuição da capacidade proliferativa observada era resultante da ineficiência na hidrólise de ATP por essa molécula, em função do bloqueio pelo anticorpo anti-CD39, e se a adição artificial de ATP ou adenosina restauraria a proliferação. O que observamos foi que, na presença de adenosina, as células proliferam ainda menos; já na presença de ATP, há um aumento na proporção de células em proliferação quando comparada a mesma condição sem ATP (estímulo com SEB com adição de anti-CD39). Porém, os níveis de proliferação são bastante inferiores aos encontradas nas células estimulas apenas com SEB.

Realizamos também, em um pequeno número de amostras, o bloqueio de IL-10,

utilizando anticorpo purificado anti-IL-10 para, além verificarmos se IL-10 tem atividade moduladora na capacidade proliferativa, termos um controle de que o resultado observado utilizando anticorpo anti-CD39 é de fato específico. Apesar do reduzido número de amostras, IL-10 parece de fato, ter um papel importante na regulação da proliferação celular como pode ser visto na Figura 25; o bloqueio dessa citocina aumenta a proporção de células em proliferação.

Figura 25- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com SEB e na presença de anti-CD39, adenosina, ATP e anti-IL10.

Figura 26- Proporção de PBMC em proliferação após o estímulo com SEB e na presença de anti-CD39 e adenosina.

4.11 Detecção de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos T CD4⁺

O próximo passo consistiu em verificar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e inflamatórias que caracterizam as respostas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) pelos linfócitos T CD4⁺, após re-estímulo celular. Para isso, PBMCs de pacientes e controles foram estimuladas com BmA e SEB, ambas associadas a CD28/CD49d como co-estímulo, por 24 horas e analisadas quanto à co-expressão dos marcadores que caracterizam as células T CD4 e dos marcadores das citocinas.

Ao analisarmos os resultados obtidos, utilizando o teste de Mann-Whitney, observamos proporções semelhantes de células T CD4⁺ viáveis produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10 entre os grupos analisados, independentemente do estímulo recebido. Não vemos também, entre os indivíduos infectados, um aumento na produção de IL-10 frente ao estímulo “específico” (BmA), quando comparado ao estímulo inespecífico (SEB) (BmA 1,08[0,20-9,60] e SEB 1,00[0,44-27,40], $p=0,734$, mediana e intervalo interquartil, respectivamente). Da mesma maneira, como pode ser visto nas Tabelas 27 e 28, as células TCD4⁺ produtoras de citocinas inflamatórias que caracterizam tanto a resposta Th1 quanto Th2 não são vistas em proporções diferentes entre os dois grupos analisados. Nas amostras não-estimuladas, o perfil é exatamente o mesmo; a produção basal de citocinas não é alterada em função da presença ou ausência de infecção.

4.11.1 Detecção de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos T CD4⁺ frente ao bloqueio da molécula CD39

Analizamos também se o bloqueio da molécula CD39, interfere no perfil de produção de citocinas após estímulo celular com SEB. Os resultados obtidos mostram, que CD39 parece sim ter um papel na regulação das citocinas inflamatórias, já que observamos um aumento significativo na proporção de células T CD4 produtoras tanto das citocinas que caracterizam o perfil Th1 quanto as do perfil Th2, nas amostras estimuladas com SEB e bloqueadas com anticorpo anti-CD39, quando comparadas com as amostras apenas estimuladas com SEB ($p=0,000$), as medianas e intervalos interquartis estão resumidos na Tabela 29. Por outro lado ao bloquear CD39 encontramos uma redução da produção da citocina anti- inflamatória IL-10 pelas células T CD4 (Figura 27). No entanto, quando comparamos a produção das dessas citocinas entre os grupos Fil+/Fil- e IgG4H/IgG4L, após o bloqueio com anti-39, novamente não observamos nenhuma diferença significativa.

Ao adicionarmos adenosina a cultura, nas amostras bloqueadas com anti-CD39, vemos que a produção das citocinas inflamatórias pelas células T CD4 é novamente inibida e há um aumento na produção de IL-10 (Figura 28). Já na presença de ATP não conseguimos observar uma padrão claro, há uma aumento na proporção de células T CD4 que produzem IL-2 (anti-CD39 17,90[8,03-30,80] e anti-CD39/ATP 20,95[6,58-29,00], $p=0,000$), porém também nas que produzem IL-10 (anti-CD39 0,9 [0,94-27,40] e anti-CD39/ATP 1,70[0,62-4,88], $p=0,000$ mediana e intervalo interquartil, respectivamente), quanto as outras citocinas inflamatórias, IFN- γ , TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α , de maneira diferente do esperado, tem sua produção diminuída quando comparada as amostras com anti-CD39 apenas.

Figura 27- Proporção de células T CD4⁺ produtora das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4, IL-5, IL-13] e TNF- α após o estímulo com SEB e na presença de anti-CD39.

Figura 28- Proporção de células T CD4⁺ produtora das citocinas IFN-γ, IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF-α após o estímulo com SEB e na presença de anti-CD39 e adenosina.

Tabela 27- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular entre indivíduos FIL+ e FIL-.

% de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ produtoras	Valor por grupo*							
	BMA		SEB		SEB+CD39		NE	
	Fil+ (n=40)	Fil- (n=28)	Fil+ (n=40)	Fil- (n=28)	Fil+ (n=40)	Fil- (n=28)	Fil+ (n=40)	Fil- (n=28)
IFN-γ⁺	0,18(0,05-2,57)	0,15(0,05-1,69)	7,4(1,66-17,00)	6,83(2,38-15,70)	8,01(1,76-17,30)	7,78(2,52-17,70)	0,14(0,03-0,58)	0,11(0,04-,68)
IL-2⁺	0,34(0,07-3,51)	0,35(,08-2,73)	15,95(7,22-26,60)	16,35(7,11-28,70)	17,90(8,03-30,60)	18,40(9,22-30,80)	0,20(0,05-3,88)	0,19(0,03-0,42)
IL-10⁺	1,08(0,20-9,60)	0,78(0,21-3,06)	1,00(0,44-27,40)	0,94(0,44-3,21)	1,32(0,45-27,80)	1,56(0,52-4,13)	0,88(0,18-4,95)	1,13(0,27-5,66)
TH2	0,17(0,05-0,67)	0,21(0,07-0,95)	3,45(1,40-7,96)	3,06(1,24-6,83)	3,57(1,32-9,46)	3,60(1,38-6,91)	0,09(0,04-1,50)	0,06(0,03-0,24)
TNF-α⁺	0,18(0,07-1,82)	0,21(0,08-1,81)	9,26(3,45-16,50)	9,27(3,23-12,40)	13,10(5,63-21,10)	13,45(0,43-21,70)	0,09(0,02-3,51)	0,07(0,02-0,20)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa entre o grupo Fil+ e Fil- para proporção da produção de nenhum das citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α) pelos linfócitos TCD4.

Tabela 28- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular entre indivíduos IgG4H e IgG4L.

% de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ produtoras	Valor por grupo*							
	BMA		SEB		SEB+CD39		NE	
	IgG4H (n=18)	IgG4L (n=45)	IgG4H (n=18)	IgG4L (n=45)	IgG4H (n=18)	IgG4L (n=45)	IgG4H (n=18)	IgG4L (n=45)
IFN-γ⁺	0,21(0,06-1,47)	0,17(0,05-2,57)	7,65(2,79-17,00)	6,82(1,66-15,00)	8,21(3,29-17,30)	7,43(1,76-15,90)	0,13(0,06-0,51)	0,14(0,04-0,68)
IL-2⁺	0,39(0,08-1,70)	0,34(0,07-3,51)	16,40(8,74-28,00)	15,90(7,11-24,90)	18,60(12,40-30,80)	17,90(8,03-26,30)	0,18(0,05-0,47)	0,19(0,03-3,88)
IL-10⁺	1,34(0,20-3,02)	1,07(0,21-9,60)	1,20(0,64-2,92)	0,98(0,44-27,40)	1,24(0,77-5,18)	1,48(0,45-27,80)	0,90(0,18-3,92)	1,05(0,25-5,66)
TH2	0,19(0,08-0,64)	0,19(0,05-0,95)	3,66(1,40-7,96)	3,07(1,24-7,05)	3,71(1,32-9,46)	3,40(1,38-9,04)	0,08(0,04-0,15)	0,09(0,03-1,50)
TNF-α⁺	0,24(0,07-1,44)	0,21(0,08-1,82)	9,84(3,45-16,50)	9,14(3,23-15,10)	13,65(5,63-21,10)	13,40(5,03-21,70)	0,05(0,02-3,51)	0,09(0,02-3,51)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa entre o grupo IgG4H e IgG4L para proporção da produção de nenhum das citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α) pelos linfócitos TCD4.

Tabela 29- Proporção de linfócitos T CD4 produtores das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, TH2 [IL-4,IL-5, IL-13] e TNF- α após re- estímulo celular com SEB e bloqueio com anti-CD39.

% de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ produtoras	Estímulo com SEB			
	(n=69)	Anti-CD39 (n=69)	Anti-CD39/ATP (n=24)	Anti-CD39/Ad (n=24)
IFN-γ⁺	7,27(1,66-17,00) ^a	7,78 (1,77-17,70) ^{abc}	7,33(3,65-17,00) ^b	7,02 (1,16-15,69) ^c
IL-2⁺	16 (7,11-28) ^a	17,90(8,03-30,80) ^{abc}	20,95(6,58-29,00) ^b	11,75 (4,88-24,70) ^c
IL-10⁺	1,34 (0,45-27,80) ^a	0,9 (0,94-27,40) ^{abc}	1,70(0,62-4,88) ^b	1,14 (0,41-4,59) ^c
TH2	3,41 (1,24-7,96) ^a	3,61 (1,32-9,46) ^{abc}	2,42(1,15-5,62) ^b	2,34 (0,61-5,31) ^c
TNF-α⁺	9,28 (3,23-16,50) ^a	13,35 (0,43-27,70) ^{abc}	6,69(2,55-15,00) ^b	5,45 (1,69-11,40) ^c

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5%.

^a O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB e grupo estimulado com SEB+anti-CD39 ($p=0,000$).

^b O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB+anti-CD39 e grupo estimulado com SEB+anti-CD39/ATP ($p=0,000$).

^c O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação por grupo estimulado com SEB+anti-CD39 e grupo estimulado com SEB+anti-CD39/Ad ($p=0,000$).

4.12 Níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura

Para avaliar o perfil de citocinas produzidas durante o re-estímulo celular pelas PBMCs de modo geral, e não apenas pelas células T CD4, além de analisar algumas citocinas do perfil Th2 individualmente, amostras estimuladas com SEB e BmA combinadas a CD28/CD49d e também estimuladas com SEB (CD28/CD49d) juntamente com anti-CD39, foram cultivadas por 72 horas e os sobrenadantes de cultura foram avaliadas para IL-6, IL-13, IL-10, IL-4 e IFN- γ , por ELISA.

Como podemos observar na Tabela 30, os níveis dessas citocinas não diferiram entre pacientes e controles, já quando analisamos as concentrações entre os grupos IgG4H e IgG4L, observamos dentre as amostras estimuladas com BmA, temos uma produção significativamente maior de IL-4 nos indivíduos IgG4L, assim como uma produção de IL-13 basal, ou seja entre os não estimulados, diminuída (Tabela 31).

Quando avaliamos as amostras estimuladas com SEB, bloqueadas ou não com o anticorpo anti-CD39, observamos que o perfil é bastante semelhante aos resultados obtidos nos ensaios de detecção de citocinas intracelular nas células T CD4. Os níveis de IL-10 nos sobrenadantes de cultura são maiores nas amostras com anti-CD39 (Figura 30), quando comparadas as apenas estimuladas com SEB. De maneira também semelhante a encontrada nas células T CD4, quando inibimos CD39 temos um aumento na produção das citocinas inflamatórias. Aqui conseguimos observar as citocinas do perfil Th2 separadamente e vemos que IL-4 e IL-13 se encontram aumentas e apenas IL-6 (não avaliada no ensaio de citocinas intracelulares) tem sua produção reduzida quando há o bloqueio da molécula CD39.

Tabela 30- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com SEB, BmA e SEB combinado com anti- CD39 nas amostras Fil+ e Fil-.

(pg/mL)	Valor por grupo*							
	BMA		SEB		SEB+CD39		NE	
	Fil+	Fil-	Fil+	Fil-	Fil+	Fil-	Fil+	Fil-
Número de indivíduos	27	15	27	15	27	15	27	15
IL-6	1329,37(77,0 9-9781,29)	876,24(220,7 8-8339,24)	6539,97(239,4 9-11400,00)	4299,47(441,6 0-11386,87)	5098,07(589,19- 11400,00)	6338,33(104 8,14- 9613,58)	1142,62(73,9 1-11139,28)	902,46(84,00 -7536,53)
IL-13	387,30(65,15 -1677,16)	311,01(52,11 -1046,32)	2382,2(743,21 -3126,13)	2110,80(877,5 2-877,52)	1248,62(394,45- 3057,25)	822,80(277,3 6-3009,94)	55,13(15,00- 410,26)	58,45(15,00- 333,33)
IL-10	174,37(12,00 -1911,88)	132,38(12,00 -1650,82)	1176,39(13,33 -2001,28)	556,92(12,00- 2256,98)	799,41(12,00- 2117,11)	636,54(30,79 -2080,98)	34,24(12,00- 2187,69)	32,73(12,00- 995,66)
IL-4	2,73(1,00- 230,74)	3,26(1,00- 300,89)	122,23(1,00- 522,80)	59,48(1,00- 454,86)	124,55(1,00- 697,13)	90,24(1,00- 721,79)	1,00(1,00- 518,49)	1,00(1,00- 109,09)
IFN-γ	184,34(7,65- 182,43)	213,90(8,32- 181,74)	926,26(34,45- 1650,93)	827,37(32,33- 1240,28)	1310,27(56,93- 2110,26)	1345,29(43,2 8-2170,27)	9,28(2,82- 35,11)	7,34(3,90- 20,78)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa entre o grupo Fil+ e Fil- na concentração das citocinas IL-6, IL-13, IL-10, IL-4 e IFN- γ .

Tabela 31- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com SEB, BmA e SEB combinado com anti- CD39 nas amostras IgG4H e IgG4L.

(pg/mL)	Valor por grupo*							
	BMA		SEB		SEB+CD39		NE	
	IgG4H	IgG4L	IgG4H	IgG4L	IgG4H	IgG4L	IgG4H	IgG4L
Número de indivíduos	12	27	12	27	12	27	12	27
IL-6	1411,076(77,09-9781,29)	1136,60(169,90-8339,24)	7200,18(239,49-11186,13)	5518,49(441,60-11400,00)	4674,89(589,19-11398,99)	5124,79(659,85-11400,00)	1170,041(90,39-11139,28)	1268,63(70,98-7536,53)
IL-13	545,18(65,15-1621,38)	307,90(52,11-1677,16)	2409,90(743,21-3013,00)	2110,80(877,52-3126,13)	1200,16(394,45-2956,27)	1193,66(277,36-3057,25)	190,03(15,00-410,26)*	51,88(15,00-333,33)*
IL-10	158,29(12,00-1911,88)	192,71(12,30-1650,82)	1244,45(225,58-2001,28)	847,67(12,00-2256,98)	837,90(12,00-1689,98)	1042,49(30,79-2177,81)	27,53(12,00-1151,02)	34,24(12,00-2187,69)
IL-4	1,00(1,00-126,88)*	3,29(1,00-300,89)*	122,43(3,01-522,80)	75,38(1,00-454,86)	104,91(1,00-357,32)	111,56(1,00-721,79)	1,00(1,00-518,49)	1,00(1,00-272,51)
IFN-γ	245,99(7,87-1447,54)	216,348,64-1824,29)	984,09(34,53-1650,83)	914,34(323,81510,37)	1365,87(56,34-2110,98)	1340(50,37-2170,77)	5,76(2,56-35,81)	09,45(2,3435,41)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney * Teste de Mann-Whitney com significância estatística ao nível de 5%, (IL4BmA $p=0,016$ e IL-13NE $p=0,025$)

Figura 30- Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura (pg/ml) de PBMCs estimuladas com SEB e SEB combinado com anticorpo purificado anti- CD39.

4.13 Expressão de KI67 e FOXP3 nas células CD39⁺ e CD39⁻

Na tentativa de compreender os resultados observados no ensaio de proliferação, onde foi observada uma redução na capacidade proliferativa das PBMCs após o bloqueio da molécula CD39, avaliamos por citometria de fluxo a expressão de Ki-67. Esta é uma proteína nuclear humana encontrada em todas as partes ativas do ciclo celular, utilizada como um marcador de proliferação, pois está presente nas células em proliferação (células nas fases

G1, S, G2 e M), mas não em células na fase *G0* e também a expressão de FOXP3 nas células T CD4 e Treg que expressam ou não CD39.

Podemos observar claramente, na Figura 31, que a expressão de Ki-67 é maior tanto nas células T CD4 quanto nas Treg CD39⁺, indicando uma maior capacidade proliferativa dessa subpopulação. Observamos também que ao bloquearmos a molécula CD39, as células T CD4 e também as Treg parecem diminuir o estado de proliferação, apresentando uma expressão de Ki-67 menor, quando comparada a mesma amostra na ausência do anticorpo.

Figura 31- Expressão do marcador de proliferação KI67 nas células T CD4⁺ e Treg CD39⁺ e CD39⁻ e nas células T CD4⁺ e Treg bloqueadas ou não com anticorpo purificado anti-CD39.

Ao analisarmos a expressão de FOXP3 entre as células Treg CD39⁺ e Tregs CD39⁻ podemos ver que as Treg CD39⁺ apresentam uma maior expressão de FOXP3 que as Treg CD39⁻ e que esta molécula parece estar associada a expressão de FOXP3, pois este é encontrado diminuído quando CD39 é bloqueada como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32- Expressão do marcador de FOXP3 nas células T CD4⁺ e Treg CD39⁺ e CD39⁻ estimuladas ou não com SEB.

5 DISCUSSÃO

A capacidade supressiva de Tregs tem sido implicada em muitas doenças infecciosas, incluindo as filarioses linfáticas por diversas espécies. A indução de Tregs por agentes patogênicos é considerada como um dos mecanismos para evadir o sistema imune humano (BELKAID, 2007). Em modelos experimentais, o recrutamento inicial de Tregs afeta o curso da resposta imune que leva ao desenvolvimento da filariose crônica, indicando que as Treg são reguladores importantes da resposta imune nas infecções por filárias em camundongos (Taylor et al., 2007). Nas filarioses linfáticas humanas, os diversos subgrupos de Treg têm sido o foco de estudos em diferentes faixas etárias e categorias clínicas. Vários trabalhos mostram a expansão de Treg clássicas ($CD4^+CD25^{high}CD127^-FOXP3^+$) e não clássicas ($FOXP3^-$) como Tr1 e Th3, além da expansão de populações de Treg que expressam altos níveis de moléculas e citocinas reguladoras como CTLA-4, GITR, LAG-3, CCL4, IL-29 e IL-10, CCL4 em infecção por *W. bancrofti*, *M. perstans* e *B. malayi* (MITRE, CHIEN, NUTMAM, 2008; METENOU et al., 2010; WAMMES et al., 2012; METENOU et al., 2014).

Nosso estudo mostrou que na infecção por *M. ozzardi*, diferentemente das espécies de filaria até então estudadas, a população de células Treg clássicas ($CD4^+CD25^{high}CD127^-FOXP3^+$) parece não ser a população principal na regulação da resposta por este parasito, já que não é encontrada aumentada entre os indivíduos infectados. No entanto, algumas características importantes, que podem levar a um viés dos dados disponíveis, são comuns entre os trabalhos que mostram esse claro aumento na população de células Tregs, entre eles estão o baixo número amostral utilizado; a não distinção da espécie de filaria entre o grupo de infectados, onde são analisados da mesma maneira indivíduos infectados por *W. Bancrofti*, *M. perstans* e *B. malayi* ou até mesmo co- infectados; e o principal deles, infecção por outros helmintos, extremamente prevalentes nas regiões em que são realizados os estudos e que sabidamente levam a um aumento no número de tregs, não são analisadas, assim como co- infecções com outros agentes infecciosos.

Mostramos porém, uma diferença significativa nas proporções de subpopulações de células Treg segundo a expressão de CD39, que se mostra aumentada também na população de células $CD4^+$, podendo ser estas, populações chave na regulação da resposta imune na infecção por este parasito.

Entre os mecanismos das Treg relacionados à sua capacidade de supressão, a via CD39/CD73 tem sido alvo de atenção nos últimos anos. Diferentes estudos mostraram que as Tregs CD39⁺ possuem maior capacidade supressora que as Tregs CD39⁻ (LU et al., 2015), através da produção de adenosina, juntamente com a molécula CD73, que atua diretamente em células T modulando sua ativação e capacidade proliferativa (BORSELLINO et al., 2007). Estudos mais recentes mostraram também que CD39 contribui para a estabilidade de Treg FOXP3⁺ e que as células Tregs CD39^{hi} mantêm alta expressão de FOXP3 assim como suas habilidades supressivas mesmo na presença de citocinas inflamatórias *in vitro* (GU et al., 2017). Até então, a capacidade supressora das Tregs CD39⁺ só foi mostrada estando associadas a função desempenhada pela adenosina produzida por essas células, no entanto nossos dados mostram que Tregs CD39⁺ apresentam também, uma expressão aumentada de outras moléculas reguladoras como CTLA-4, TNFR2, LAP-TGF- β , LAG-3, OX40 e também das moléculas de ativação HLA-DR e CD69 colaborando com novas evidências de que a presença de CD39, identifica com maior precisão as células T reguladoras funcionalmente supressoras em seres humanos.

O importante papel dessa molécula já foi mostrado em várias condições fisiopatológicas, como o câncer, 10 doenças auto-imunes e mais recentemente na aterosclerose e infarto do miocárdio.¹², assim como em algumas doenças infecciosas como malária, HIV, HTLV e tuberculose, no entanto nenhum estudo havia avaliado o papel dessa molécula nas doenças causadas por helmintos.

No contexto de doenças infecciosas, nas infecções pelo HIV, por exemplo, é encontrada uma alta expressão de CD39 em células Treg, que permanece inalterada mesmo com a terapia anti-retroviral (PRESICCE et al., 2011; SCHULZE ZUR WIESCH et al., 2010). A frequência e o número de Treg CD39⁺ são elevados em pacientes com HIV e correlacionados negativamente com a recuperação de células T CD4⁺ e positivamente com a carga viral plasmática e ativação de células T (BURTON et al., 2011; NIKOLOVA et al., 2011). Além disso, através de um estudo caso-controle, uma variante genética de CD39 associada a menor expressão dessa enzima foi associada a uma progressão mais lenta para AIDS (NIKOLOVA et al., 2011), podendo destacar um papel negativo das Treg CD39⁺ no controle da progressão do HIV.

Células Treg CD39⁺ também são encontradas aumentadas em crianças infectadas TB (WHITTAKER et al., 2017) e essa população quando depletada resultou em respostas

aumentadas de células T CD4 produtoras de IFN- γ antígeno específicas (CHIAKCHIO et al., 2009). Além de influenciarem as respostas específicas de micobactérias em pacientes com tuberculose as células TregCD39⁺ desempenham um papel influenciando a resposta imune a novas vacinas (DE CASSAN et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Com base neste estudo pode-se concluir que a infecção crônica por *M. ozzardi* parece não induzir um padrão de resposta imuno reguladora similar ao descrito nas infecções por outras espécies de filarias.

Como conclusões pontuais têm-se que:

1. Durante a infecção por *M. ozzardi* humana, não há um aumento das populações de células T CD4⁺ que expressam as moléculas reguladoras TNFRII, PD-1 e CTLA-4, OX-40, LAP-TGF- β e GITR e de ativação (HLA-DR e CD69). Assim como a infecção não altera a proporção de células com fenótipo de Treg clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺) e Treg clássicas que co-expressem os marcadores de regulação e ativação.
2. A infecção por *M. ozzardi*, induz aumento na proporção de células TCD4 e Treg clássicas que expressam CD39. Este aumento é positivamente correlacionado com a densidade parasitária.
3. Células Treg CD39⁺ tem uma expressão aumentada de marcadores de regulação e ativação comparado as células Treg CD39⁻.
4. As populações celulares de linfócitos B, linfócitos B atípicos, B reguladores, linfócitos NK, células NKT, monócitos e células dendríticas assim como suas subpopulações, não são alteradas durante a infecção por *M. ozzardi* com exceção das células γ - δ , que são encontradas diminuídas entre os infectados.
5. Citocinas características do perfil Th2 não são encontradas aumentas no plasma dos pacientes. Da mesma maneira os níveis de IL-10 são semelhantes entre pacientes e controles, não caracterizando uma resposta reguladora.
6. PBMCs de indivíduos infectados por *M. ozzardi* não apresentam hiporesponsividade características às outras espécies de filarias. A capacidade proliferativa e de produção de citocinas não são alteradas após re- estímulo com antígenos próprios e com antígenos não-relacionados.
7. O bloqueio da molécula CD39 diminui a produção de IL-10 e aumenta a produção de citocinas inflamatórias, entretanto, reduz significativamente a capacidade proliferativa das células.

8. Células Treg que expressam a molécula CD39 possuem maior expressão do marcador de proliferação Ki-67 e também de FOXP3.

REFERENCIAS*

- ADAMI, Yara Leite et al. New records of *Mansonella ozzardi*: a parasite that is spreading from the state of Amazonas to previously uninfected areas of the state of Acre in the Purus River region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.87-92, fev, 2014.
- ADJOBIMEY, T.; HOERAUF, A. Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 104, n. 6, p. 455–64, 2010.
- AERTS, N. E. et al. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. **Cellular Immunology**, v. 251, n. 2, p. 109–115, 2008.
- AKDIS, M. **Immune tolerance in allergy** *Current Opinion in Immunology*, 2009.
- ALI, M. M. M. et al. Immunocompetence may be important in the effectiveness of Mectizan® (ivermectin) in the treatment of human onchocerciasis. **Acta Tropica**, v. 84, n. 1, p. 49–53, 2002.
- ALLEN, J. E.; LAWRENCE, R. A.; MAIZELS, R. M. APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. **International Immunology**, v. 8, n. 1, p. 143–151, 1996.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375–388, 2011.
- ANDERSON, A. C.; JOLLER, N.; KUCHROO, V. K. **Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation** *Immunity*, 2016.
- ANDERSSON, J. et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 9, p. 1975–1981, 2008.
- ANTONIOLI, L. et al. **CD39 and CD73 in immunity and inflammation** *Trends in Molecular Medicine*, 2013.
- BABU, S. et al. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 5, p. 3248–3256, 2006.
- BABU, S. et al. Human Type 1 and 17 Responses in Latent Tuberculosis Are Modulated by Coincident Filarial Infection through Cytotoxic T Lymphocyte Antigen–4 and Programmed Death–1. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 2, p. 288–298, 2009.
- BABU, S.; NUTMAN, T. B. **Immunology of lymphatic filariasis** *Parasite Immunology*, 2014.
- BACH, J.-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 12, p. 911–920, 2002.
- BASANO, S. D. A. et al. Sustained clearance of *Mansonella ozzardi* infection after treatment with ivermectin in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 1170–1175, 2014.
- BASANO, S. DE A. et al. Investigation of the occurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of Rondônia, Western Amazonia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 600–603, 2011.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, v.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

7, n. 11, p. 875–888, 2007.

BENNURU, S. et al. Brugia malayi excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: Stage- and gender-specific proteomic profiling. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 4, 2009.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225–1232, 2007.

BURTON, C. T. et al. Altered phenotype of regulatory T cells associated with lack of human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific suppressive function. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 166, n. 2, p. 191–200, 2011.

CARITHERS, D. S. Examining the role of macrolides and host immunity in combatting filarial parasites. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 182, 2017.

CASIRAGHI, M. et al. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. **Parasitology**, v. 122 Pt 1, p. 93–103, 2001.

CHIACCHIO, T. et al. Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 156, n. 3, p. 463–70, 2009.

COHEN, J. M.; RIBEIRO, J. A.; MARTINS, M. [Ocular manifestations in mansonelliasis]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 71, n. 2, p. 167–171, 2008.

COOK, A. et al. Caenorhabditis elegans ivermectin receptors regulate locomotor behaviour and are functional orthologues of Haemonchus contortus receptors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 118–125, 2006.

COOPER, P. J. et al. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 4, p. 1133–1138, 1998.

COOPER, P. J. et al. Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 4, p. 1199–206, 2000a.

COOPER, P. J. et al. Human Infection with Ascaris lumbricoides Is Associated with a Polarized Cytokine Response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 4, p. 1207–1213, 2000b.

COULIBALY, Y. I. et al. A randomized trial of doxycycline for Mansonella perstans infection. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 15, p. 1448–1458, 2009.

D'OMBRAIN, M. C. et al. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 11, p. 1380–1387, 2008.

DA SANTIAGO, H. C. et al. Structural differences between human proteins and aero- and microbial allergens define allergenicity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350–4, 2006.

DAY, N. P. et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1288–1297, 1999.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

DE CASSAN, S. C. et al. Investigating the induction of vaccine-induced Th17 and regulatory T cells in healthy, Mycobacterium bovis BCG-immunized adults vaccinated with a new tuberculosis vaccine,

MVA85A. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 7, p. 1066–1073, 2010.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–65, 2007.

DEJEAN, A. S. et al. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 5, p. 504–513, 2009.

DIMOCK, K. A. et al. Differential proliferative and interleukin-10 responses to fractionated filarial antigens: Preferential recognition by patients with chronic lymphatic dysfunction. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 2, p. 403–412, 1994.

DOETZE, A. et al. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a Th1 to Th2 shift. **International Immunology**, v. 12, n. 5, p. 623–630, 2000.

DOLD, S. et al. Ascaris-specific IgE and allergic sensitization in a cohort of school children in the former East Germany. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 3, p. 414–420, 1998.

DOLO, H. et al. Filariasis Attenuates Anemia and Proinflammatory Responses Associated with Clinical Malaria: A Matched Prospective Study in Children and Young Adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.

ELIAS, D. et al. Schistosoma mansoni infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 23, n. 11, p. 1326–1334, 2005.

ERDMAN, L. K. et al. Combinations of host biomarkers predict mortality among Ugandan children with severe malaria: A retrospective case-control study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FORMICA, S.; BOTTO, C. Filariasis focus due to Mansonella ozzardi and Mansonella perstans in the Amazon Federal Territory of Venezuela. **Tropical Medicine Institute U.C.V**, v. 93, p. 160–165, 1990.

FRANCIS, H.; AWADZI, K.; OTTESEN, E. A. The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine: Clinical severity as a function of infection intensity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 3, p. 529–536, 1985.

FRANCISCO, L. M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 13, p. 3015–29, 2009.

GARRIDO, C.; CAMPOS, M. First report of presumed parasitic keratitis in Indians from the Brazilian Amazon. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 817–819, 2000.

GEARY, T. G. et al. Haemonchus contortus: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Experimental parasitology**, v. 77, n. 1, p. 88–96, 1993.

GEARY, T. G. et al. **Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans** *International Journal for Parasitology*, 2010.

GEARY, T. G.; MORENO, Y. Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 866–72, 2012.

GONÇALVES, R. M. et al. Cytokine Balance in Human Malaria: Does Plasmodium vivax Elicit More Inflammatory Responses than Plasmodium falciparum? **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

GONZALEZ, A. A.; CHADEE, D. D.; RAWLINS, S. C. Ivermectin treatment of Mansonellosis in Trinidad. **West Indian Medical Journal**, v. 48, n. 4, p. 231–234, 1999.

GRAVITT, P. E. et al. Soil transmitted helminth infections are associated with an increase in human papillomavirus prevalence and a Th2 cytokine signature in cervical fluids. **The Journal of infectious diseases**, p. jiv498-, 2015.

- GRISERI, T. et al. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 699–709, 2010.
- GU, J. et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. **Cellular & Molecular Immunology**, n. January, p. 1–8, 2016.
- GU, J. et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 6, p. 521–528, 2017.
- GUMPERZ, J. E. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 5, p. 625–36, 2002.
- HARNETT, W.; HARNETT, M. M. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 4, p. 278–284, 2010.
- HARNETT, W.; MCINNES, I. B.; HARNETT, M. M. **ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential** *Immunology Letters*, 2004.
- HARPAZ, R. et al. Serum cytokine profiles in experimental human malaria: Relationship to protection and disease course after challenge. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 2, p. 515–523, 1992.
- HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHS, M. **Co-infection of helminths and malaria: Modulation of the immune responses to malaria** *Parasite Immunology*, 2006.
- HOERAUF, A. *Mansonella perstans* — The Importance of an Endosymbiont. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1502–1504, 2009.
- HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Actions of glutamate and ivermectin on the pharyngeal muscle of *Ascaridia galli*: A comparative study with *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 395–402, 2006.
- HORNE-DEBETS, J. M. et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. **Cell Reports**, v. 5, n. 5, p. 1204–1213, 2013.
- HUANG, C. T. et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 503–513, 2004.
- HUSSAIN, R.; OTTESEN, E. A. IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. **J Immunol**, v. 136, n. 5, p. 1859–1863, 1986.
- ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–95, 1992.
- JACOB, F. et al. **Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses** *Purinergic Signalling*, 2013.
- JEANNIN, P. et al. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 7, p. 3555–61, 1998.
- KING, C. L. et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 1667–1673, 1993.
- KJETLAND, E. F. et al. Genital schistosomiasis and its unacknowledged role on HIV transmission in the STD intervention studies. **International journal of STD & AIDS**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2014.
- KNOTT, J. A method for making microfilarial surveys on day blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 2, p. 191–196, 1939.
- KORTEN, S. et al. Low levels of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and reduced suppression of Th2-mediated inflammation in hyperreactive human onchocerciasis. **Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 35–45, 2011.
- KOZEK, W. J. et al. Filariasis in Colombia: Prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and

Mansonella (=Dipetalonema) perstans infections in the Comisaria del Guainia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 2, p. 379–384, 1983.

KROIDL, I. et al. Low specificity of determine HIV1/2 RDT using whole blood in South West Tanzania. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

KROIDL, I. et al. Effect of Wuchereria bancrofti infection on HIV incidence in southwest Tanzania: a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 388, n. 10054, p. 1912–1920, 2016.

KROLEWIECKI, A. J. et al. Ivermectin-related adverse clinical events in patients treated for Mansonella ozzardi infections. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 43, n. 1, p. 48–50, 2011.

KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 8, p. 557–568, 2002.

KRONENBERG, M.; RUDENSKY, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 598–604, 2005.

KURNIAWAN, A. et al. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 9, p. 3941–50, 1993.

LACAL, P. M. et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related ligand triggering upregulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 and promotes leukocyte adhesion. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 347, n. October, p. 164–172, 2013.

LAMMIE, P. J.; KATZ, S. P. Immunoregulation in experimental filariasis. IV. Induction of non-specific suppression following in vitro exposure of spleen cells from infected jirds to Brugia pahangi antigen. **Immunology**, v. 52, n. 2, p. 221–9, 1984.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701–11, 2006.

LOFFREDO-VERDE, E. et al. Schistosome infection aggravates HCV-related liver disease and induces changes in the regulatory T-cell phenotype. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 2, p. 97–104, 2015.

LOKE, P. et al. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 9, p. 2669–2678, 2000.

LU, Y. et al. iTreg induced from CD39+ naive T cells demonstrate enhanced proliferate and suppressive ability. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 925–930, 2015.

MAHAMED, D. A et al. CD73-generated adenosine facilitates Toxoplasma gondii differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 40, p. 16312–7, 2012.

MAHANTY, S. et al. High Levels of Spontaneous and Parasite Antigen-Driven Interleukin-10 Production Are Associated with Antigen-Specific Hyporesponsiveness in Human Lymphatic Filariasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 769–772, 1996.

MAHANTY, S. et al. Regulation of parasite antigen-driven immune responses by interleukin- 10 (IL-10) and IL-12 in lymphatic filariasis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1742–1747, 1997.

MAIZELS, R. M. **Infections and allergy - Helminths, hygiene and host immune regulation** *Current Opinion in Immunology*, 2005.

MCSORLEY, H. J. et al. Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 9, p. 6456–6466, 2008.

MEDEIROS, J. F. et al. Epidemiological studies of Mansonella ozzardi (Nematoda, Onchocercidae) in indigenous communities of Pauini municipality, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p.

241–246, 2007.

MEDEIROS, J. F. et al. *Mansonella ozzardi* in Brazil: Prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 74–80, 2009.

MEDEIROS, J. F. et al. A field trial of a PCR-based *Mansonella ozzardi* diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic *M. ozzardi* infections in both venous blood samples and FTA® card dried blood spots. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 280, 2015.

METENOU, S. et al. Patent filarial infection modulates malaria-specific type 1 cytokine responses in an IL-10-dependent manner in a filaria/malaria-coinfected population. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 916–24, 2009.

METENOU, S. et al. At Homeostasis Filarial Infections Have Expanded Adaptive T Regulatory but Not Classical Th2 Cells. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 5375–82, 2010.

METENOU, S.; BABU, S.; NUTMAN, T. B. Impact of filarial infections on coincident intracellular pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 231–8, 2012.

MILLS, K. H. G. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 11, p. 841–855, 2004.

MITRE, E.; CHIEN, D.; NUTMAN, T. B. CD4(+) (and not CD25+) T cells are the predominant interleukin-10-producing cells in the circulation of filaria-infected patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 1, p. 94–101, 2008.

MODJARRAD, K. et al. Treatment of intestinal helminths does not reduce plasma concentrations of HIV-1 RNA in coinfecting Zambian adults. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 7, p. 1277–1283, 2005.

MONCAYO, A. L. et al. Effects of geohelminth infection and age on the associations between allergen-specific IgE, skin test reactivity and wheeze: A case-control study. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 43, n. 1, p. 60–72, 2013.

MORALES-HOJAS, R. et al. Characterisation of nuclear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of a PCR-based method for their detection in skin biopsies. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 169–177, 2001.

MORENO, Y. et al. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 20120–5, 2010.

MORENO, Y.; GEARY, T. G. Stage- and gender-specific proteomic analysis of *Brugia malayi* excretory-secretory products. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. e326, 2008.

MOUSER, E. E. I. M. et al. *Brugia malayi* Antigen (BmA) Inhibits HIV-1 Trans-Infection but Neither BmA nor ES-62 Alter HIV-1 Infectivity of DC Induced CD4+ Th-Cells. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146527, 2016.

NAKAMURA, K. et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, p. 834–842, 2004.

NIELSEN, N. O. et al. Cross-sectional relationship between HIV, lymphatic filariasis and other parasitic infections in adults in coastal northeastern Tanzania. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 543–550, 2006.

- NIELSEN, N. O. et al. Effect of diethylcarbamazine on HIV load, CD4%, and CD4/CD8 ratio in HIV-infected adult Tanzanians with or without lymphatic filariasis: Randomized double-blind and placebo-controlled cross-over trial. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 507–513, 2007a.
- NIELSEN, N. O. et al. Co-infection with subclinical HIV and *Wuchereria bancrofti*, and the role of malaria and hookworms, in adult Tanzanians: infection intensities, CD4/CD8 counts and cytokine responses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 6, p. 602–612, 2007b.
- NIKOLOVA, M. et al. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, 2011.
- NOCENTINI, G. et al. A new member of the tumor necrosis factor nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. **Cell Biology**, v. 94, p. 6216–6221, 1997.
- NOORDIN, R. et al. Multicentre evaluations of two new rapid IgG4 tests (WB rapid and panLF rapid) for detection of lymphatic filariasis. **Filaria journal**, v. 6, p. 9, 2007.
- NUTMAN, T. B.; KUMARASWAMI, V. **Regulation of the immune response in lymphatic filariasis: Perspectives on acute and chronic infection with *Wuchereria bancrofti* in South India** *Parasite Immunology*, 2001.
- NUTMAN, T. B.; KUMARASWAMI, V.; OTTESEN, E. A. Parasite-specific anergy in human filariasis. Insights after analysis of parasite antigen-driven lymphokine production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 5, p. 1516–1523, 1987.
- ORIHIEL, T. C. et al. Susceptibility of laboratory primates to infection with *Mansonella ozzardi* from man. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 4, p. 790–794, 1981.
- ORIHIEL, T. C.; EBERHARD, M. L. *Mansonella ozzardi*: A redescription with comments on its taxonomic relationships. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 6, p. 1142–1147, 1982.
- OTTESEN, E. A. Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 3, p. 659–671, 1995.
- PALLOTTA, M. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 870–878, 2011.
- PALMER, L. J. et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 11, p. 1489–1493, 2002.
- PEARCE, N. et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 758–66, 2007.
- PICONESE, S. et al. A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2902–2913, 2010.
- PORTUGAL, S. et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. **eLife**, v. 4, n. MAY, 2015.
- POST, R. J. et al. The morphological discrimination of microfilariae of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. **Parasitology**, v. 127, p. 21–7, 2003.
- PRESICCE, P. et al. Frequency of circulating regulatory T cells increases during chronic HIV infection and is largely controlled by highly active antiretroviral therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28118, 2011.
- QURESHI, O. S. et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic

Function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600–603, 2011.

RACCURT, C. et al. Mansonella ozzardi in Haiti. III. A comparison of the sensitivity of four sampling methods in detecting infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 2, p. 275–279, 1982.

RAO, U. R.; CHANDRASHEKAR, R.; SUBRAHMANYAM, D. Effect of ivermectin on serum dependent cellular interactions to *Dipetalonema viteae* microfilariae. **Trop Med Parasitol**, v. 38, n. 2, p. 123–127, 1987.

RUJENI, N. et al. Atopy is inversely related to schistosoma infection intensity: A comparative study in Zimbabwean villages with distinct levels of schistosoma haematobium infection. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 158, n. 3, p. 288–298, 2012.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.. **J. Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1152–1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SAKAGUCHI, S. et al. **Regulatory T cells: How do they suppress immune responses?** **International Immunology**, 2009.

SARTONO, E. et al. Elevated cellular immune responses and interferon-gamma release after long-term diethylcarbamazine treatment of patients with human lymphatic filariasis. **J Infect Dis**, v. 171, n. 6, p. 1683–1687, 1995.

SAZE, Z. et al. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. **Blood**, v. 122, n. 1, p. 9–18, 2013.

SCHAER, D. A.; MURPHY, J. T.; WOLCHOK, J. D. **Modulation of GITR for cancer immunotherapy** **Current Opinion in Immunology**, 2012.

SCHAER, D. A; HIRSCHHORN-CYMERMAN, D.; WOLCHOK, J. D. Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 2, n. 1, p. 7, 2014.

SCHULZE ZUR WIESCH, J. et al. Comprehensive Analysis of Frequency and Phenotype of T Regulatory Cells in HIV Infection: CD39 Expression of FoxP3⁺ T Regulatory Cells Correlates with Progressive Disease. **Journal of Virology**, v. 85, n. 3, p. 1287–1297, 2010.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 7, p. 1693–700, 2006.

SEMNANI, R. T. et al. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4⁺ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 4, p. 1950–60, 2003.

SEMNANI, R. T. et al. Inhibition of TLR3 and TLR4 function and expression in human dendritic cells by helminth parasites. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1290–1298, 2008.

SEMNANI, R. T. et al. Expanded numbers of circulating myeloid dendritic cells in patent human filarial infection reflect lower CCR1 expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 10, p. 6364–72, 2010.

SHELLEY, A. J. Human onchocerciasis in Brazil: an overview. **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1167–1177, 2002.

SHELLEY, A. J.; LUNA DIAS, A. P. A.; MORAES, M. A. P. Simulium species of the amazonicum group as

vectors of mansonella ozzardi in the brazilian amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 784–788, 1980.

SHELLEY, A. J.; SHELLEY, A. Further evidence for the transmission of {Mansonella} ozzardi by {Simulium} amazonicum in {Brazil}. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 213–217, 1976.

SHEVACH, E. M. **Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated SuppressionImmunity**, 2009.

SIMONS, J. E.; GRAY, C. A.; LAWRENCE, R. A. Absence of regulatory IL-10 enhances innate protection against filarial parasites by a neutrophil-independent mechanism. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 7, p. 473–478, 2010.

SIMONSEN, P. E. et al. Bancroftian filariasis: The patterns of filarial-specific immunoglobulin G1 (IgG1), IgG4, and circulating antigens in an endemic community of northeastern Tanzania. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 1, p. 69–75, 1996.

STEEL, C.; NUTMAN, T. B. CTLA-4 in Filarial Infections: Implications for a Role in Diminished T Cell Reactivity. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 1930–1938, 2003.

STELEKATI, E.; WHERRY, E. J. **Chronic bystander infections and immunity to unrelated antigensCell Host and Microbe**, 2012.

SUPALI, T. et al. **Polyparasitism and its impact on the immune systemInternational Journal for Parasitology**, 2010.

TAAMS, L. S. et al. **Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulationImmunology**, 2006.

TAKENAKA, M. C.; ROBSON, S.; QUINTANA, F. J. **Regulation of the T Cell Response by CD39Trends in Immunology**, 2016.

TALAAT, K. R. et al. Preexposure to Live Brugia malayi Microfilariae Alters the Innate Response of Human Dendritic Cells to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 2, p. 196–204, 2006.

TALAAT, K. R. et al. Filarial/human immunodeficiency virus coinfection in urban southern India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 558–560, 2008.

TANG, T. H. T. et al. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species Onchocerca volvulus, Mansonella ozzardi and Mansonella perstans in the Amazon Region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 823–828, 2010.

TASCA, T. et al. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of Trichomonas vaginalis. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 1, p. 71–78, 2005.

TAYLOR, M. D. et al. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 8, p. 4924–4933, 2005.

TAYLOR, M. D. et al. F4/80+ Alternatively Activated Macrophages Control CD4+ T Cell Hyporesponsiveness at Sites Peripheral to Filarial Infection. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6918–6927, 2006.

TAYLOR, M. D. et al. CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. **J Immunol**, v. 179, n. 7, p. 4626–4634, 2007.

TAYLOR, M. D. et al. Early recruitment of natural CD4+Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 192–206, 2009.

THAMMAVONGSA, V. et al. Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune

responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 11, p. 2417–27, 2009.

TIDWELL, M. A.; TIDWELL, M. A.; MUNOZ DE HOYOS, P. Development of *Mansonella ozzardi* in a black fly species of the *Simulium sanguineum* group from Eastern Vaupes, Columbia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 6, p. 1209–1214, 1980.

UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. Immune dysregulation in asthma **Current Opinion in Immunology**, 2006.

URBAN, J. F. Cellular basis of the non-specific potentiation of the immunoglobulin E response after helminth parasite infection. **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 2–3, p. 131–140, 1982.

VAN DEN BIGGELAAR, A. H. et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723–7, 2000.

VAN DER VLUGT, L. E. P. M. et al. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e30883, 2012.

VAN RIET, E.; HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHSI, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 475–490, jun. 2007.

VATTA, A. F. et al. Ivermectin-dependent attachment of neutrophils and peripheral blood mononuclear cells to *Dirofilaria immitis* microfilariae in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1–2, p. 38–42, 2014.

VERA, L. J. S. et al. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 380–2, 2011.

VIANNA, L. M. M. et al. *Mansonella ozzardi* corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional study. **BMJ open**, v. 2, n. 6, p. 1–5, 2012.

VON BOEHMER, H.; MELCHERS, F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 14–20, 2010.

WALKER, L. S. K. **Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance** *Journal of Autoimmunity*, 2013.

WALSON, J. L. et al. Albendazole treatment of HIV-1 and helminth co-infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **AIDS (London, England)**, v. 22, n. 13, p. 1601–9, 2008.

WAMMES, L. J. et al. Regulatory T cells in human lymphatic filariasis: Stronger functional activity in microfilaremic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. **The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis** *Parasitology Today*, 1997.

WEINBERG, A. D. et al. **Science gone translational: The OX40 agonist story** *Immunological Reviews*, 2011.

WHITTAKER, E. et al. Regulatory T cells and pro-inflammatory responses predominate in children with tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. APR, 2017.

WOLDAY, D. et al. Treatment of intestinal worms is associated with decreased HIV plasma viral load. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 31, n. 1, p. 56–62, 2002.

WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131 Suppl, p. S85–S95, 2005.

WOO, S. R. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. **Cancer Research**, v. 72, n. 4, p. 917–927, 2012.

WORKMAN, C. J. et al. Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 9, p. 5450–5455, 2004.

WU, H. Y. et al. In vivo induction of Tr1 cells via mucosal dendritic cells and AHR signaling. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

YAZDANBAKHS, M. et al. T Cell Responsiveness Correlates Differentially with Antibody Isotype Levels in Clinical and Asymptomatic Filariasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 4, p. 925–931, 1993.

YAZDANBAKHS, M. **Common features of T cell reactivity in persistent helminth infections: Lymphatic filariasis and schistosomiasis**. Immunology Letters. **Anais**.1999

YOKOSUKA, T. et al. Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 326–339, 2010.

ZAHNER, H.; SCHMIDTCHEN, D.; MUTASA, J. A. Ivermectin-induced killing of microfilariae in vitro by neutrophils mediated by NO. **Experimental parasitology**, v. 86, n. 2, p. 110–7, 1997.

ZHAO, H. et al. **What else can CD39 tell us?****Frontiers in Immunology**, 2017.

ZHENG, Y.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. **Nat Immunol**, v. 8, n. 5, p. 457–462, 2007.

ZHOU, Q. et al. Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations: Brief communication. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 10, p. 2303–2311, 2009.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. **Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood****Blood**, 2010.