

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia
Áreas de Concentração: Parasitologia e Imunologia Aplicadas

**Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e
receptores *Toll* envolvidos na resposta
imunológica *in vitro* à *Cystoisospora belli***

Fernanda Gonçalves Garcia

Uberaba
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA GONÇALVES GARCIA

**Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e
receptores *Toll* envolvidos na resposta
imunológica *in vitro* à *Cystoisospora belli***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração em Parasitologia e Imunologia Aplicadas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical e Infectologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Benedita de Oliveira Silva

Co-orientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

Uberaba
2010

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

G199i Garcia, Fernanda Gonçalves
Identificação do perfil de citocinas, quimiocinas e receptores *Toll*
envolvidos na resposta imunológica *in vitro* à *Cystoisospora belli* / Fernanda
Gonçalves Garcia. -- 2010.
113 f. : graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Parasitologia e Imunologia Aplicadas) -
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Benedita de Oliveira Silva.
Coorientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira.

1. Infecções por protozoários. 2. *Cystoisospora belli*. 3. Citocinas.
4. Quimiocinas. 5. Receptores *Toll-like*. 6. Espécies de oxigênio reativas.
I. Título. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Silva, Márcia
Benedita de Oliveira. IV. Teixeira, David Nascimento Silva.

CDU 616.993.1

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da CAPES/REUNI, FAPEMIG e UFTM.

Dedico este trabalho,

Aos meus queridos pais, Wilton e Ivone, os eternos amores da minha vida. Por todo o amor, carinho, paciência e pela confiança depositada em mim. Por sempre estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Amo vocês!

Ao Adriano, sempre me incentivando e me apoiando em todos os momentos dessa conquista. Agradeço-o por fazer parte da minha vida!

Agradecimentos

A Deus, pela vida e proteção e por iluminar os meus passos.

À Prof. Dra. Márcia Benedita de Oliveira Silva, pela competente orientação, pelos ensinamentos, paciência e acima de tudo pela confiança depositada em mim. Obrigada também, pela amizade, carinho e pela boa convivência durante essa trajetória.

Ao Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira, pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelas sugestões e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Ramírez Giraldo, por me acolher e abrir as portas da Universidade o que me levou rumo a essa inesquecível realização. Obrigada ainda, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira, pelo valioso auxílio neste trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Dalmo Correia Filho, que sempre me possibilitou a coleta de material dos pacientes HIV/AIDS. Obrigada ainda, pelos conhecimentos compartilhados, pelas críticas e sugestões.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, pelos ensinamentos e convivência.

À Deisy, pela preciosa ajuda neste trabalho e pelo companheirismo e amizade.

À Ana Carolina, Sílvia Baldan e Paulo Roberto, pelo carinho, amizade e pela valiosa ajuda neste trabalho, sempre com muita dedicação e disposição.

À Karine pela amizade, sugestões e críticas que foram importantes na realização deste trabalho.

À Daniela Marquez, por ter me apresentado ao Prof. Dr. Luís Eduardo Ramírez.

À Giovana, pela ajuda na formatação deste trabalho, pelo carinho e amizade.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Imunobiologia e Pesquisa em Ativação Celular, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo companheirismo.

À Joyce Nascimento, secretária da Pós-Graduação, pela competência e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCAR) e Dr. Dalmo Correia Filho (UFTM), aos suplentes Dra. Karine Rezende (UFU) e Dr. Virmond Rodrigues Júnior (UFTM).

A todos os funcionários do Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Imunobiologia e Pesquisa em Ativação Celular, cuja contribuição foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus irmãos, Frederico e Wilton Filho, pelo carinho, amor, convivência e compreensão durante esta trajetória.

A CAPES/REUNI, pela bolsa de estudo concedida.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

Cystoisospora belli é um protozoário intracelular obrigatório, monoxeno, responsável pela cistoisporose humana. A cistoisporose humana é caracterizada por diarreia, esteatorréia, dor abdominal, febre e perda de peso que pode levar a desidratação e caquexia. Os sintomas são mais graves em indivíduos com debilidades do sistema imune, principalmente durante a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). Até o momento não está caracterizado o tipo de resposta imune envolvida na infecção por *C. belli*. A ausência de um modelo experimental para o estudo da cistoisporose tem dificultado o conhecimento da biologia deste parasito e sua relação nas infecções humanas. Estudos *in vitro* podem auxiliar no conhecimento dos mediadores envolvidos na relação parasito/hospedeiro. Neste estudo, avaliamos a produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e expressão de receptores *Toll* após estimulação de PBMCs com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*. As citocinas e quimiocinas foram avaliadas por ELISA, a participação de receptores *Toll-like* (TLRs) foi investigada utilizando-se anticorpos neutralizadores em culturas de células mononucleares (PBMCs) e a produção de ROS por granulócitos humanos (PMNs) foi realizada por quimioluminescência. Os resultados obtidos demonstram que *in vitro* PBMCs estimulados com antígenos de *C. belli* induz a secreção de TNF- α , CXCL8 e IL-1 β , sendo que a estimulação com oocistos também aumentou a liberação de IL-1 β . No entanto, IL-10, CCL2 e CXCL10 apresentaram-se diminuídas em comparação às células cultivadas na ausência de antígenos de *C. belli*. Os níveis de IL-12p40, IFN- γ , IL-13, IL-4, IL-6, CCL11(eotaxina), e CCL3 (MIP-1 α) não foram alterados após o estímulo com oocistos e/ou antígenos solúveis de *C. belli*. Não foi observada participação de TLR2 e TLR4 na produção das quimiocinas CXCL8 (IL-8) e CCL2 (MCP-1) estimuladas por antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*. A produção de ROS por PMNs humanos foi estimulada por oocistos, mas não por antígenos solúveis de *C. belli*. O bloqueio dos receptores TLR2 e TLR4 com anticorpos neutralizadores específicos (anti-TLR2 e anti-TLR4) inibiu a produção de ROS por granulócitos humanos estimulados com oocistos de *C. belli*. A investigação dos mecanismos envolvidos na inibição da produção de CXCL10 e CCL2, assim como a participação dos TLRs na produção de ROS, pode contribuir para o conhecimento das estratégias de escape deste parasito à resposta imunológica do hospedeiro. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o aumento dos conhecimentos sobre a interação entre *C. belli* e células imunes do hospedeiro.

Palavras-chave: *Cystoisospora belli*, citocinas, quimiocinas, receptores *Toll-like*, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Cystoisospora belli is an obligatory intracellular protozoan, monoxenous, responsible for human cystoisosporosis. This infection is characterized by diarrhea, steatorrhea, abdominal pain, fever and weight loss leading to dehydration and cachexia. Symptoms are more severe in individuals with disorders of the immune system, particularly the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Until present, there is no information about cytokine and chemokine profile secreted by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in response to *C. belli* antigens. Besides that the absence of an *in vivo* experimental model has hampered the knowledge parasite's biology. Data obtained from *in vitro* studies may help to identify important soluble mediators produced during parasite/host interaction. The present study evaluated some aspects of *in vitro* immune response, such as: cytokines, chemokines and reactive oxygen species (ROS) production and involvement of Toll-like receptors. Cytokine and chemokine production were evaluated by ELISA and the involvement of Toll-like receptors (TLR) was investigated using neutralizing antibodies in PBMC cultures. ROS production by human granulocytes (PMN) was assessed by luminol dependent cellular chemiluminescence. The results showed an increase production of TNF- α and CXCL8 (IL-8) by human PBMCs stimulated with *C. belli* soluble antigens. We detected an inhibition of IL-10 and CCL2 (MCP-1) production after stimulation with *C. belli* oocysts. Stimulation with oocysts or *C. belli* soluble antigens increased IL-1 β and inhibited CXCL10 (IP-10) production by human PBMCs. The levels of IL-12p40, IFN- γ , IL-13, IL-4, IL-6, CCL11 (eotaxin) and CCL3 (MIP-1 α) were not altered after *in vitro* stimulation with *C. belli* soluble antigens and oocysts. Our results also suggest no major involvement of TLR2 and TLR4 on CXCL8 and CCL2 production in response to *C. belli* antigens and oocysts. PMN ROS production was induced by *C. belli* oocysts but not by *C. belli* soluble antigens. TLR2 and TLR4 blockade with specific neutralizing antibodies (anti-TLR2 and anti-TLR4) inhibited PMN ROS production stimulated with *C. belli* oocysts. Investigation of mechanisms involved on CXCL10 and CCL2 inhibition by *C. belli* antigens, as well as the role of TLRs on PMN ROS production may contribute to increase the knowledge about *C. belli* evasion strategies. The results obtained on the present work may lead to improve the understanding of *C. belli*/hosts cells interactions.

Key words: *Cystoisospora belli*, cytokines, chemokines, Toll-like receptors, reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Produção de TNF- α por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com meio de cultura (controle), 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (Oocistos) ou LPS (5 μ g/ml) na ausência (A) ou presença (B) de 10 μ g/ml de Polimixina B (PMB).....69
- Figura 2: Produção de IL-1 β por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....70
- Figura 3: Produção de IL-10 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....71
- Figura 4: Produção de IFN- γ por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....72
- Figura 5: Produção de IL-12 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....73
- Figura 6: Produção de IL-6 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....74
- Figura 7: Produção de IL-4 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....75

Figura 8: Produção de IL-13 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	76
Figura 9: Produção de CXCL10 (IP-10) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	78
Figura 10: Produção de CCL2 (MCP-1) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	79
Figura 11: Produção de CXCL8 (IL-8) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	80
Figura 12: Produção de CCL3 (MIP-1α) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	81
Figura 13: Produção de CCL11 (eotaxina) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=12) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle).....	82
Figura 14: Efeito do bloqueio de receptores <i>Toll</i> 2 e 4 com anticorpos monoclonais (Anti-TLR2 e Anti-TLR4) sobre a produção de CXCL8 (IL-8) por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com 20µg/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag) ou somente meio de cultura (controle).....	83

Figura 15: Efeito do bloqueio de receptores <i>Toll 2</i> e 4 com anticorpos monoclonais (Anti-TLR2 e Anti-TLR4) sobre a produção de CCL2 (MCP-1) por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com 20000 oocistos/ml de <i>C. belli</i> (oocistos) ou somente meio de cultura (controle)	84
Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com zymosan (controle positivo), 20µg/ml de antígenos solúveis de <i>C. belli</i> (Ag) e 20000 oocistos de <i>C. belli</i> (Oocistos). A figura mostra a cinética de um experimento representativo de quatro experimentos similares realizados.	86
Figura 17: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com zymosan (controle positivo), 20µg/ml de antígenos solúveis de <i>C. belli</i> (Ag) e 20000 oocistos de <i>C. belli</i> (Oocistos). Os resultados estão expressos em pico máximo (A) e área total (B).	86
Figura 18: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com 20000 oocistos de <i>C. belli</i> (Oocistos) na presença de anticorpos neutralizadores de TRL2 (anti-TLR2 + Oocistos) e TLR4 (anti-TLR4 + Oocistos). A figura mostra a cinética de um experimento representativo de quatro experimentos similares realizados.	87
Figura 19: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=5) após estimulação <i>in vitro</i> com 20000 oocistos de <i>C. belli</i> (Oocistos) na presença de anticorpos neutralizadores de TRL2 (anti-TLR2 + Oocistos) e TLR4 (anti-TLR4 + Oocistos). Os resultados estão expressos em pico máximo (A) área total (B).....	87
Figura 20: Modelo esquemático proposto para os efeitos de antígenos de <i>C. belli</i> sobre células mononucleares humanas. A estimulação de células mononucleares do sangue periférico humano com antígenos solúveis e oocistos íntegros de <i>C. belli</i> provoca a diminuição da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD119) e diminuição da produção das quimiocinas CXCL10 e CCL2 e de espécies reativas de oxigênio (ROS), porém, sem alterar a produção de IFN- γ e IL-12.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
A549	<i>Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cell</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BEK	<i>Bovine Epithelial Kidney Cells</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CMV	Cytomegalovirus
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
GPI	<i>Glicosilfosfatidilinositol</i>
h	horas
HCT-8	<i>Human Colorectal Adenocarcinoma</i>
HEP-2	<i>Human Larynx Carcinoma</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IEC	<i>Intestinal Epithelial Cell</i>
IFN-γ	<i>Gamma-interferon</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LB	Linfócito B
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
LT	Linfócito T
MAL	<i>Myelin and Lymphocyte Protein</i>
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney Cells</i>
mg	miligrama
MK2	<i>Monkey Rhesus Kidney</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88)</i>
NF-Kb	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
NK	<i>Natural killer cells</i>

NO	<i>Nitric oxide</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
SSU-rDNA	<i>Small Subunit Ribosomal DNA</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T Helper Cell</i>
TIR	<i>Toll Interleukin 1 Receptor domain</i>
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
Treg	<i>Regulatory T cells</i>
TRIF	<i>TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon-β</i>
VERO	<i>African Green Monkey Kidney</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
CXCL8 (IL-8)	<i>Interleukin 8</i>
CXCL1 (GRO- α)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
CCL2 (MCP-1)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemotactic protein-1)</i>
CXCL2 (MIP-2 α)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (macrophage inflammatory protein 2-alpha)</i>
CCL3 (MIP-1 α)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Macrophage inflammatory protein 1-alpha)</i>
CXCL10 (IP-10)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Interferon gamma-induced protein 10 kDa)</i>
CCL4 (MIP-1 β)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4 (Macrophage inflammatory protein 1-beta)</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
CCL5 (RANTES)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CCL11 (Eotaxina)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 11</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
NADPH	<i>Phosphate-Oxidase Dinucleotide Adenina Nicotinamide</i>
NADP+	<i>2-Oxoaldehyde Dehydrogenase</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Histórico	19
1.2 Classificação taxonômica	21
1.3 Ciclo biológico	24
1.4 Epidemiologia	27
1.5 Patogenia e Manifestações clínicas	30
1.6 Disseminação extraintestinal	32
1.7 Cultivos <i>in vitro</i>	35
1.8 Diagnóstico laboratorial	37
1.9 Tratamento	39
1.10 Resposta imunológica.....	40
2 JUSTIFICATIVA	53
3 HIPÓTESE	54
4 OBJETIVO GERAL	55
4.1 Objetivos específicos.....	55
5 MÉTODOS.....	57
5.1 Amostras biológicas de paciente com cistossporose.....	57
5.2 Purificação dos oocistos de <i>C. belli</i>	58
5.3 Extração dos antígenos solúveis de oocistos/espocistos/esporozoítos de <i>C. belli</i>	59
5.4 Determinação da concentração de proteínas de <i>C. belli</i>	59
5.5 Obtenção de células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico humano.....	59
5.6 Ensaio de estimulação com oocistos e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos de <i>C. belli</i>	61
5.7 Opsonização do zymosan	62
5.8 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	62
5.9 ELISA (<i>Enzime Linked Immunosorbent Assay</i>)	63
5.10 Condições livres de endotoxina	65
5.11 Aspectos éticos.....	65
5.12 Análise estatística.....	66
6 RESULTADOS	67

6.1 Avaliação da produção de citocinas após estimulação <i>in vitro</i> de PBMCs frente a antígenos solúveis e oocistos de <i>C. belli</i>	68
6.2 Avaliação da produção de quimiocinas após estimulação <i>in vitro</i> de PBMCs frente a antígenos solúveis e oocistos de <i>C. belli</i>	77
6.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por PMNs após estimulação com antígenos solúveis e oocistos de <i>C. belli</i>	85
7 DISCUSSÃO	88
8 CONCLUSÕES	98
9 REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O primeiro encontro de *Isospora* em vilosidades intestinais humanas foi feito por KJELLBERG (1860 apud WENYON, 1923). Entretanto, o primeiro relato de *Isospora* foi realizado por VIRCHOW (1860 apud WENYON, 1923), que durante uma necropsia humana observou parasitos nas vilosidades intestinais, aos pares e com uma membrana de duplo contorno, semelhantes aos parasitos que ele havia observado em cães e aqueles anteriormente encontrados por KJELLBERG. Posteriormente EIMER (1870 apud WENYON, 1923), durante uma necropsia de dois homens, observou parasitos nas vilosidades intestinais que eram semelhantes aos observados por ele em camundongos e outros animais. RIVOLTA (1873) propôs o nome *Cytospermium hominis* para aqueles parasitos observados por EIMER. Todavia, o achado de oocistos do parasito nas fezes humanas somente ocorreu em 1890 quando RAILLIET & LUCET descrevem o caso de dois indivíduos que sofriam de diarreia crônica com a presença de parasitos intestinais semelhantes àqueles encontrados em cães, gatos e outros carnívoros, nomeando-os de *Coccidium bigeminum varietas hominis*.

WOODCOCK (1915) analisando fezes de soldados durante a primeira guerra mundial encontrou oocistos de *Isospora* em várias ocasiões e observou que esses eram diferentes dos parasitos encontrados em cães e gatos. DOBBEL em 1919 renomeou a espécie descrita por VIRCHOW e WOODCOCK de *Isospora hominis* e esse permaneceu assim até 1923, quando WENYON sugeriu o nome *Isospora belli* (atual *Cystoisospora belli* – FRENKEL, 1977) para as espécies encontradas em

soldados durante a primeira guerra mundial e *Isospora hominis* para a espécie descrita por VIRCHOW.

Havia uma série de dúvidas sobre o parasito, e dentre elas a existência de uma ou duas espécies capazes de infectar o homem, que apesar de alguns autores como MEIRA & CORRÊA (1950) defenderem a dualidade parasitária, esta era negada por outros protozoologistas como KUDO (1954 apud FERREIRA, 1962) e NIÑO (1958 apud FERREIRA, 1962) que consideravam as duas como sendo uma única espécie.

MEIRA & CORRÊA (1950) chamaram a atenção para o fato de que durante a infecção por *Isospora hominis* freqüentemente não se observava oocistos (devido à fragilidade da membrana), mas, sim esporocistos isolados ou aos pares e já completamente desenvolvidos em fezes recentemente eliminadas. Segundo esses autores, diferentemente de *I. hominis*, os oocistos de *Isospora belli* seriam eliminados na forma imatura, contendo no seu interior massa granulosa e hialina ou apenas dois esporoblastos, completando a evolução somente no meio exterior.

Atualmente sabe-se que a espécie *Isospora hominis* é na verdade um sinônimo de *Sarcocystis hominis* ou *Sarcocystis suihominis*, espécies adquiridas pela ingestão de cistos do parasito em carne crua ou mal cozida de bovino e suíno, respectivamente, cujos oocistos contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos assim como aqueles de *Cystoisospora belli* são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo.

Outra espécie descrita em humanos, *Isospora natalensis*, descrita por ELSDON-DEW (1953) em um paciente de 21 anos de idade sofrendo de disenteria amebiana que apresentava oocistos semelhantes àqueles de *Isospora ohioensis* observada em cães, *Isospora rivolta* em gatos e *Isospora suis* de suínos, atualmente parece não ser uma espécie de *Isospora* humana e sim apenas um pseudo-parasito

originado de um desses animais. De acordo com LINDSAY et al. (1997) a isosporose humana é causada apenas por *Cystoisospora belli*.

1.2 Classificação taxonômica

O protozoário *Cystoisospora belli* pertence ao filo Apicomplexa, de acordo com a classificação de LEVINE (1988), devido à presença do complexo apical na porção anterior de suas formas infectantes, sendo este complexo formado por anel polar, roptrias, micronemas, grânulos densos, conóide e microtubulos subpeculiares; classe Esporozoasida (LEUKART, 1879) por apresentar reprodução assexuada e sexuada em seu ciclo de vida com formação de oocisto; subclasse Coccidiasina (LEUKART, 1879) por apresentar merogonia, gametogonia e esporogonia em seu ciclo de vida; ordem Eucoccidiorida (LÉGER & DOBOSCQ, 1910) por apresentar merogonia; subordem Eimeriorina (LÉGER, 1911) pelo desenvolvimento independente de macrogameta e microgameta; família Eimeriidae (MINCCHIN, 1903) pela presença de microgametas biflagelados; e gênero *Isospora* (SCHNEIDER, 1881) por possuir oocistos diploesporocísticos e tetraesporozóicos.

O gênero *Isospora* foi primeiramente descrito por SCHNEIDER em 1881 e sua taxonomia tem sido uma fonte de controvérsia desde então. FRENKEL (1977) propôs o gênero *Cystoisospora* para as espécies de *Isospora* capazes de formar estágios extraintestinais (cistos monozóicos) em hospedeiros definitivos e/ou paratênicos.

BOX et al. (1980) reconheceram semelhanças no processo de excitação de algumas espécies de *Isospora* com *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis sp*, concluindo que a presença ou não de corpo de *Stieda* (estrutura do esporocisto que corresponde a

abertura por onde saem os esporozoítos durante o processo de excistação) correlacionava-se com certas características do ciclo de vida desses parasitos. Eles acreditavam que as espécies de *Isospora* cuja excistação ocorria através do corpo de *Stieda* eram monoxenas e as espécies de *Isospora* cuja excistação ocorria através do rompimento de placas que formam a parede do oocisto eram heteroxenas. Portanto, esses autores sugeriram que aqueles parasitos que apresentassem oocistos diploesporocísticos e tetraesporozóicos com corpo de *Stieda*, monoxenos, deveriam permanecer dentro da família *Eimeriidae* com o nome de *Isospora* e aqueles coccídios que apresentassem oocistos diploesporocísticos e tetraesporozóicos sem corpos de *Stieda*, heteroxenos, deveriam pertencer à família *Sarcocystidae*, apoiando assim a classificação taxonômica proposta por FRENKEL (1977).

O gênero *Isospora* havia sido classificado como monofilético dentro da família *Eimeriidae*, juntamente com *Eimeria*, *Caryospora*, *Cyclospora* e *Cryptosporidium*, baseado na similaridade do ciclo de vida monoxeno de espécies de *Eimeria* (LEVINE, 1988). Contudo, estudos usando análises filogenéticas têm mostrado que *Isosporas* de cães, gatos e a *Cystoisospora belli* estão mais estritamente relacionadas com *Toxoplasma* e *Neospora* do que *Eimeria*, indicando que essas espécies deveriam pertencer a um gênero à parte (*Cystoisospora*) dentro da família *Sarcocystidae* ao invés da família *Eimeriidae* (CARRENO et al., 1998; FRANZEN et al., 2000).

Há alguns anos, BARTA et al. (2005) baseando-se em análises filogenéticas e dados preexistentes da estrutura dos oocistos das diferentes espécies de *Isospora* que infectam pássaros e outros hospedeiros, subdividiram este gênero em dois grupos monofiléticos. Estes autores atribuíram todas as espécies com oocistos diploesporocísticos e tetraesporozoicos de mamíferos sem corpo de *Stieda* em seus esporocistos ao gênero *Cystoisospora* (*Sarcocystidae*), e todos os oocistos

diplosporocísticos e tetraesporozoicos de aves com corpo de *Stieda* em seus esporocistos ao gênero *Isospora* (*Eimeriidae*).

SAMARASINGHE et al. (2008) após a análise filogenética de diferentes espécies de *Cystoisospora* e outros coccídios, por meio de estudos moleculares, observaram que a similaridade entre *C. belli*, *T. gondii* e *N. caninum* foi de 76.7% e 75.5%, respectivamente. A similaridade entre *C. belli* e *Sarcocystis sp* foi de 69.4%-71.1%, enquanto a similaridade entre *C. belli* e *Eimeria sp* foi de 61.8%-64%. Estes resultados confirmam estudos anteriores, sugerindo que o gênero *Cystoisospora* não pertence à família *Eimeriidae*, devendo, portanto, ser reclassificado na família *Sarcocystidae*.

Diferenças intraespecíficas têm sido propostas para explicar o número de zoítos por cisto em casos de disseminações extraintestinal (LINDSAY et al., 1997). No estudo de RESENDE et al. (*in press*) foi avaliado a heterogeneidade intraespecífica no gene que codifica a subunidade ribossomal menor (SSU rDNA) de *C. belli* entre os isolados clínicos deste parasito e algumas características clínicas da cistoisporose em pacientes HIV-positivos. A síndrome diarréica foi observada em todos os pacientes com cistoisporose e muitos deles apresentaram episódios de diarréia de longa duração (2 a 12 dias), além da baixa contagem de linfócitos TCD4⁺ (menos de 100 células/mm³), resultados que confirmam o caráter oportunista desta infecção. Embora fatores como o número de oocistos ingeridos e o estado imunológico do hospedeiro possam estar associados a diferenças nas manifestações clínicas da cistoisporose, fatores relacionados ao genótipo do parasito não podem ser descartados. A caracterização das populações de *C. belli* por PCR-RFLP demonstrou a heterogeneidade genética entre isolados clínicos do parasito. No entanto, o polimorfismo genético observado, abre

novas perspectivas para a identificação de possíveis genótipos de *C. belli*, que podem apresentar diferentes manifestações clínicas (RESENDE et al., *in press*).

1.3 Ciclo biológico

Atualmente, apesar dos relatos de presença de cistos extraintestinais em humanos e a aceitação da classificação em *Cystoisospora belli* ainda é determinada como parasito monoxeno, em que todos os estágios de vida do parasito ocorrem em um único hospedeiro, e a forma de infecção é atribuída pela ingestão de oocistos esporulados presentes em água e/ou alimentos contaminados com fezes de indivíduos infectados. O ciclo de vida de *C. belli* é composto por uma fase exógena e uma fase endógena. Toda a fase exógena ocorre no ambiente externo e corresponde ao processo de esporogonia (formação de esporocistos e esporozoítos dentro dos oocistos), sendo este dependente de umidade, temperatura e oxigenação adequada (LINDSAY et al., 1997). Diversos estudos foram realizados utilizando oocistos de *Isospora* de cães (LEPP & TODD, 1976; MAHRT, 1968), gatos (SHAH, 1970) e suínos (LINDSAY et al., 1982), indicando que temperaturas maiores que 40°C e menores que 20°C inibem a esporogonia. Estes estudos mostraram que uma rápida esporogonia (<16h) ocorreu em temperaturas entre 30°C e 37°C (LONG, 1990).

Os oocistos são eliminados nas fezes, geralmente, na forma de esporonte (massa hialina sem divisão) e poucos oocistos são eliminados na forma de esporoblasto (parcialmente esporulados). O núcleo do esporonte se divide formando dois esporoblastos uninucleares. Divisão nuclear ocorre novamente, e então, os esporoblastos se tornam alongados e formam os esporocistos. Outra divisão nuclear

ocorre, e as linhas gerais de desenvolvimento dos esporozoítos logo se tornam visíveis. Quando os esporozoítos se tornam completamente visíveis, o oocisto é considerado infectivo (esporulado) e são caracterizados por conter dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Em condições normais, uma pequena porcentagem dos oocistos eliminados nas fezes (<2%) é denominada de “*Caryospora-like*” por apresentarem apenas um esporocisto com oito esporozoítos (LINDSAY et al., 1982). O significado biológico destes oocistos é ainda desconhecido. O número destes oocistos “*Caryospora-like*” pode ser aumentado pelo aquecimento dos oocistos não esporulados recém excretados a 50°C durante cinco minutos *in vitro*, e em condições normais, a 25°C a maioria encontrada é de oocistos diploesporocísticos tetraesporozóicos. Oocistos de *I. rivolta* (uma espécie patogênica de gatos) tratados a 50°C são infecciosos para ambos os hospedeiros, definitivos e paratênicos (MATSUI et al., 1993).

A excitação é o processo pelo qual os esporozoítos são liberados de dentro dos esporocistos/ooocistos no trato gastrointestinal do hospedeiro, mais precisamente na porção final do duodeno e inicial do jejuno, sendo dependentes de CO₂, sais biliares e tripsina (LINDSAY et al., 1997). Estas substâncias auxiliam na ativação dos esporozoítos e na formação de pequenas fissuras nas porções finais da parede do oocisto, por onde os mesmos saem. Este movimento não é contínuo, mas é interrompido por períodos de inatividade. A exposição dos oocistos ou esporocistos a soluções ácidas (pH~2) de taurocolato de sódio, sais biliares e tripsina mimetizam a passagem dos mesmos pelo estômago e intestino delgado, possibilitando o processo de excitação *in vitro* (MCKENNA et al., 1982).

As formas invasivas dos protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa* possuem um conjunto de organelas localizadas na porção anterior do zoóito, denominadas de complexo apical que inclui o anel polar, conóide, micronemas,

grânulos densos e roptrias. Estas estruturas estão envolvidas no processo de invasão e internalização do parasito na célula hospedeira, assim como no processo de formação e manutenção do vacúolo parasitóforo, local onde ocorre todo o ciclo intracelular, sendo formado por uma membrana que deriva do plasmalema da célula hospedeira (ORENSTEIN, 1997).

A interação inicial do parasito pode envolver uma ou mais moléculas receptoras da membrana da célula hospedeira que geram uma cascata de eventos levando a penetração do parasito e a formação do vacúolo parasitóforo. Atualmente, três tipos distintos de organelas secretoras presentes no zoíto (micronemas, roptrias e grânulos densos) são conhecidos por estar envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo, e a invasão da célula hospedeira é mediada por uma secreção sequencial destas organelas (SAM-YELLOWE, 1996).

A secreção de micronemas precede a exocitose das roptrias que, por sua vez, é estimulada pela mobilização de cálcio intracelular e promove o processo inicial de formação do vacúolo parasitóforo (BECKERS et al., 1994; CARRUTHERS & SIBLEY, 1997). Os grânulos densos são importantes na manutenção do vacúolo parasitóforo e a liberação desses ocorre imediatamente após a invasão da célula hospedeira (DUBREMETZ et al., 1993; CARRUTHERS & SIBLEY, 1997; CARRUTHERS, 2002).

A fase endógena do ciclo de vida se inicia quando os esporozoítos invadem as células do intestino delgado onde iniciam o processo de divisão assexuada. Segundo LINDSAY et al. (1990) a divisão assexuada ocorre por endodiogenia, processo em que a célula-mãe origina duas células-filhas idênticas (merozoítos). Estes merozoítos se dividem, também por endodiogenia, um número indefinido de vezes formando estruturas multinucleadas denominadas esquizontes. Podem ocorrer vários destes na

mesma célula (OLIVEIRA-SILVA et al., 2006). A reprodução sexuada (gametogonia) ocorre quando um merozoíto penetra na célula e se diferencia em microgamonte (célula reprodutora masculina) ou macrogamonte (célula reprodutora feminina). Microgamontes são multinucleados e produzem microgametas biflagelados. Os macrogamontes não sofrem divisões mitóticas, formando uma célula única (macrogametas). Microgamontes e macrogamontes podem ocorrer na mesma célula. O zigoto, proveniente da união de um microgameta com um macrogameta, se desenvolve de forma assexuada por esporogonia de modo a formar o oocisto, forma de resistência ao ambiente, que é excretado nas fezes do hospedeiro (LINDSAY & BLAGBUERN, 1994; LINDSAY et al., 1997).

Os oocistos de *C. belli* são elipsóides e medem de 20 a 30 µm de comprimento por 10 a 19 µm de largura, possuem uma parede celular trilaminar (típica dos coccídios), núcleo esférico, nucléolos proeminentes, mitocôndria, ribossomos e grânulos citoplasmáticos (ORENSTEIN, 1997). Segundo FAYER (1980), a imunidade e o estado nutricional do hospedeiro, a competição com outras espécies de coccídios ou agentes infecciosos e as diferenças entre cepas são fatores que alteram o número de oocistos liberados e influenciam na epidemiologia da doença.

1.4 Epidemiologia

A infecção por *C. belli* é cosmopolita, sendo mais comum em regiões tropicais e subtropicais, especialmente no Haiti, México, Brasil, El Salvador, África, Oriente Médio e Sudeste da Ásia (LINDSAY et al., 1997). A rápida disseminação do

vírus HIV deu origem a uma considerável incidência deste patógeno intestinal, que foi considerado até a década de setenta (pré- AIDS) ser um parasito de baixa frequência.

Cystoisospora belli, que é menos comum que *Cryptosporidium* sp, é endêmico em muitas partes da África, Ásia e América do Sul. Em pacientes com AIDS no Haiti, a frequência de cistoisosporose é de 15% e nos Estados Unidos é de apenas 0,2%. Nos EUA surtos esporádicos ocorreram em instituições para doentes mentais e creches. Infecções por *Cystoisospora belli* associadas à HIV/AIDS ocorrem em 2% da população nos EUA e na Europa, enquanto que em países como Brasil, Zaire e Zâmbia a porcentagem em pacientes com AIDS e diarreia é de 9,9%, 12% e 12% respectivamente (BENATOR et al., 1994, GOODGAME et al., 1996).

Na Tailândia, um estudo com pacientes infectados pelo HIV foi realizado durante o período de março a abril de 2000, demonstrando prevalência de *C. belli* de 5%. Infecções parasitárias intestinais oportunistas mostraram uma maior prevalência em pacientes com baixo nível imunológico ($CD4^+ < 200$ células/mm³) e com diarreia (WIWANITKIT, 2001).

GUK et al. (2005) investigaram a prevalência de infecções parasitárias em pacientes HIV/AIDS em Seoul (República da Coreia), encontrando uma prevalência de 7,5% de cistoisosporose entre os pacientes estudados.

ESCOBEDO et al. (1999) encontraram uma prevalência de 1,5% de infecção por *C. belli* em pacientes HIV/AIDS analisados em Havana (Cuba), no período de setembro de 1994 e janeiro de 1995. Segundo estes autores, as taxas reais da infecção em indivíduos imunocompetentes e pacientes infectados pelo HIV, provavelmente estão subestimadas, por causa da eliminação assintomática de oocistos, tratamento com sulfametoxazol-trimetropim para outras infecções, baixo número de oocistos excretados além do processamento inadequado das amostras fecais.

Em Chicago (EUA), uma análise retrospectiva de infecção parasitária entre homens homossexuais que apresentavam diarreia, demonstrou uma prevalência de *C. belli* de 0,7% (PETERS et al., 1986).

No Brasil, cistoisporose é estimada ser a segunda doença gastrointestinal por protozoário em pacientes HIV/AIDS, ultrapassado apenas pela criptosporidiose. Em Campinas (SP), GARLIPP et al. (1995) analisaram amostras de fezes de 111 pacientes com diarreia, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, no período de julho de 1991 a maio de 1993. *Cystoisospora belli* foi observado somente nos 92 pacientes HIV soropositivos com uma prevalência de 6,5%. Este estudo ressalta a importância da investigação etiológica apropriada em casos de diarreia prolongada, especialmente em pacientes imunossuprimidos. SAUDA et al. (1993) analisaram amostras de fezes de pacientes atendidos no Centro de Referência para AIDS, em Santos (SP) para a prevalência de *Cryptosporidium sp* e *C. belli*. A prevalência de ambos coccídios entre pacientes com AIDS foi de 25,9% (34 de 131) sendo *Cryptosporidium sp* 19,1% e *Cystoisospora belli* 9,9%. Entre julho de 1990 e junho de 1997, CAPUANO et al. (2001) examinaram amostras de fezes de 1833 pacientes soropositivos para o vírus HIV, na Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Dos 1833 pacientes, 81 (4,4%) apresentaram infecção por *C. belli*.

No Rio de Janeiro, MOURA et al. (1989) encontraram uma prevalência de 10,1% de cistoisporose em pacientes HIV/AIDS.

OLIVEIRA-SILVA et al. (2007) encontraram uma prevalência de 10,3% de *C. belli* em amostras de fezes de 359 pacientes atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, no período de julho de 1993 a 2003. A prevalência de *C. belli* no Triângulo Mineiro (10,3%) foi maior

que a detectada em São Paulo (5,7%), ou Ribeirão Preto (4,4%), semelhantes às taxas no Rio de Janeiro (10,1%) e Santos (9,9%) e foi somente menor que em Campinas (18%). OLIVEIRA-SILVA et al. (2007) demonstraram correlação positiva entre a presença de *C. belli* em pacientes HIV/AIDS com diarreia e contagem de linfócitos $TCD4^+ \leq 200$ células/mm³.

Na região nordeste do Brasil, WUHIB et al. (1994) examinando amostras de pacientes HIV/AIDS e sem diarreia em Fortaleza encontraram uma prevalência (2,4%). ROCHA & SANTOS (2002) analisaram 422 amostras de pacientes com HIV/AIDS internados na cidade de Natal, com quadro de diarreia crônica, e encontraram oocistos de *C. belli* em 56 pacientes (13,3%).

LAINSON & SILVA (1999) examinaram amostras de fezes de 34 indivíduos adultos HIV soropositivos com diarreia persistente em Belém (Pará) e observaram uma prevalência de *C. belli* de 32,3%.

1.5 Patogenia e Manifestações clínicas

A infecção por *C. belli* tem sido associada a alterações substanciais na estrutura e função intestinal, mas a patogênese do sintoma predominante, a diarreia, não é completamente compreendida. Danos ou morte do enterócito pode ser uma consequência direta da invasão e multiplicação do parasito. Segundo FERREIRA et al. (1962) a patogenicidade da isosporose está fundamentalmente ligada à ação traumática do parasito, destruindo as células do epitélio intestinal. Alternativamente, o dano celular pode ser uma consequência de inflamação, mediada por células T ou proteases e oxidantes liberados pelos mastócitos (GOODGAME, 1996). Mesmo sem danos diretos,

células T ativadas podem afetar crescimento celular epitelial e produzir atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas. Independente dos mecanismos específicos, marcada distorção da arquitetura das vilosidades é acompanhada por má-absorção de nutrientes e diarreia osmótica (GOODGAME, 1996).

As principais alterações microscópicas durante a fisiopatogênese da cistoisporose são atrofia das microvilosidades e hiperplasia das criptas. O grau de atrofia das vilosidades pode variar de leve até o achatamento total, que pode ser visto em casos mais crônicos. Pode se detectar a desorganização do epitélio e perda de polarização nuclear. A celularidade da lâmina própria é aumentada por um infiltrado misto de neutrófilos, células plasmáticas, linfócitos e eosinófilos. Em pacientes HIV/AIDS, o infiltrado celular não é muito intenso, devido à leucopenia. (LINDSAY et al., 1997; ORENSTEIN, 1997).

Os sinais clínicos na cistoisporose variam de acordo com o estado imunológico do paciente, podendo persistir por semanas a meses. A cistoisporose geralmente causa uma infecção aguda e autolimitada. Os sinais clínicos mais comuns em pacientes imunocompetentes são diarreia (sem sangue), geralmente acompanhada por esteatorreia, perda de peso, dor abdominal, febre, cefaléia, náusea, vômito e mal-estar. Enquanto infecções em pacientes imunodeprimidos especialmente aqueles com HIV/AIDS os sintomas clínicos são mais graves (LYNDSAY et al., 1997). Nestes pacientes a diarreia é muito fluida e secretória, semelhante à cólera com vários episódios diários podendo levar a desidratação requerendo hospitalização.

Em pacientes HIV/AIDS, a diarreia é o sintoma digestivo mais frequente, afetando de 50 a 90% desses pacientes (OLIVEIRA-SILVA et al., 2007). Na fase precoce, após a conversão sorológica do HIV, a diarreia pode estar relacionada à liberação de citocinas como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α). Na fase intermediária da infecção, além de ser um sítio de imunodepressão, a mucosa intestinal também funciona como um reservatório para o HIV. Em fases mais tardias, os distúrbios nas defesas inespecíficas, na produção da imunoglobulina A (IgA) e a diminuição das respostas celulares imunes locais também progridem, aumentando assim a susceptibilidade a vários patógenos oportunistas intestinais (SOARES et al., 1996), como *C. belli*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma*. Recorrências na infecção por *C. belli* tem sido observadas tanto em pacientes imunocompetentes quanto naqueles com HIV/AIDS (LINDSAY et al., 1997).

1.6 Disseminação extraintestinal

Estágios extraintestinais ocorrem frequentemente nos tecidos de hospedeiros definitivos em espécies de *Cystoisospora* de cães e gatos. FRENKEL & DUBEY (1972) foram os primeiros a observar estágios extraintestinais em hospedeiros definitivos. Estes autores infectaram gatos recém-nascidos com esporocistos e/ou tecidos de gatos previamente infectados com *C. felis* e *C. rivolta*, duas espécies patogênicas de gatos, e encontraram parasitos no fígado, baço e linfonodos mesentéricos. Os mesmos autores também observaram cistos extraintestinais de diferentes espécies de *Cystoisospora* em hospedeiros não-definitivos como camundongos, ratos e *hamsters*. Estes hospedeiros, também conhecidos como hospedeiros paratênicos, não desenvolvem a doença, mas transmitem o parasito para o hospedeiro definitivo quando este se alimenta de tecido infectado. DUBEY & MEHLHORN (1978) observaram que cães alimentados com camundongos que foram previamente inoculados com *I. ohioensis*, espécie patogênica de cães, eliminaram oocistos nas fezes dentro de cinco dias. Os autores observaram

também que parasitos únicos foram vistos em esfregaços de linfonodos mesentéricos de todos os camundongos alimentados com oocistos de *I. ohioensis*. Os resultados desta investigação mostram que *I. ohioensis* podem invadir e persistir por vários meses em órgãos extraintestinais de camundongos. O ciclo endógeno em animais que ingerem oocistos e em animais que ingerem hospedeiros paratênicos é similar. Contudo, o período prepatente pode ser mais curto em infecções adquiridas por esta última via (LINDSAY and BLAGBURN 1994).

Alguns pesquisadores acreditavam que as infecções humanas poderiam também se originar das infecções de animais. Baseado nisso, WENYON (1916) e WENYON e O'CONNOR (1917) tentaram infectar gatos com oocistos maduros de *C. belli*, mas a infecção não ocorreu. FONER et al. (1939) também tentaram infectar macacos, cães e gato com oocistos maduros de *C. belli*, entretanto nenhum parasito foi encontrado nas fezes destes animais, apesar de terem recebido milhares de oocistos. JEFFREY (1956) inoculou oocistos esporulados de *C. belli* em macacos, cães, suínos, ratos, camundongos, coelho e *hamster*, também sem sucesso. FRENKEL et al. (2003) encontraram uma estrutura semelhante a um zoóto em linfonodo mesentérico de um bezerro previamente infectado com oocistos esporulados de *C. belli*, mas a estrutura encontrada era morfológicamente diferente daquelas observadas pelos autores em linfonodos de um paciente com cistisporose extraintestinal. Até o momento, hospedeiros paratênicos para *C. belli* não foram encontrados, entretanto, a possibilidade de um novo modo de transmissão de cistisporose (além da transmissão fecal-oral) não é descartada.

Acredita-se que ao invés de sofrer o ciclo de desenvolvimento normal no trato intestinal, alguns esporozoítos ou possivelmente merozoítos invadem sítios extraintestinais no hospedeiro definitivo formando os chamados “cistos unizóicos

extraintestinais”. Não é possível determinar se os estágios são esporozoítos ou merozoítos porque ainda não existe marcador estrutural definitivo para estes estágios. Linfonodos mesentéricos são os órgãos mais frequentemente infectados, mas outros tecidos como fígado e baço podem também ser infectados (LINDSAY et al., 1997). RESTREPO et al. (1986) descreveram o primeiro caso de cistosisporose humana com evidência histológica de disseminação extraintestinal. A característica mais notável deste caso foi a demonstração do parasito em linfonodos. MICHIELS et al. (1994) descreveram o segundo caso de cistosisporose extraintestinal com acometimento de linfonodos mesentéricos e mediastinais, fígado e baço, em um paciente com AIDS.

Cinco casos de cistosisporose extraintestinal em pacientes HIV/AIDS já foram relatados no mundo, sendo um deles no Brasil (FRENKEL et al., 2003). Em todos os cinco casos ocorreu invasão preferencial de linfonodos mesentéricos, traqueobronquiais, fígado e baço, com formação de cistos unizóicos de *C. belli* contendo um zoíto no seu interior.

As formas extraintestinais são consideradas como etapas de espera ou “zoítos dormentes” porque eles podem permanecer infectantes por um longo tempo nos tecidos, sem sofrer divisão. Acredita-se que a causa de recorrência da infecção por *C. belli* em pacientes imunocompetentes e/ou com HIV/AIDS é devido à presença de cistos extra-intestinais que provavelmente não são susceptíveis ao tratamento anticoccidiano. Esta situação é semelhante à observada em pacientes com neurotoxoplasmose em pacientes com HIV/AIDS, onde a recorrência é comum e é causada pelo estágio dormente do cisto tecidual com bradizoítos (LINDSAY et al., 1997).

Segundo RESTREPO et al. (1987) o profundo desarranjo do sistema imunológico em pacientes com HIV/AIDS é responsável pelo estabelecimento de

infecções oportunistas, incluindo a presença de Citomegalovírus (CMV) intestinal e as ulcerações intestinais causadas por este podem promover o acesso de outros microrganismos intestinais, como a *Cystoisospora belli*, em linfonodos e canais vasculares, culminando em disseminação linfohematogênica das infecções intestinais.

MARKUS (1991) sugere que a ocorrência extraintestinal de *C. belli* em tecidos linfóides humanos não é o resultado da multiplicação do parasita no intestino e sim uma consequência da ingestão de um grande número de oocistos esporulados, originados das próprias fezes do paciente ou das fezes de outras pessoas. Esporozoítos migram então, ou são levados para os linfonodos antes que aconteça a reprodução assexuada de *C. belli*. Apesar disso, até o momento a origem dos cistos unizóicos de *C. belli* em tecidos extraintestinais de pacientes HIV/AIDS não foi totalmente elucidada.

1.7 Cultivos *in vitro*

Várias espécies de *Isospora* vêm sendo estudadas em cultura de células. Esporozoítos penetram nas células hospedeiras e sofrem várias divisões por endodiogenia. LINDSAY et al. (1987) observaram que em culturas celulares primárias bovinas e suínas, merontes binucleados e merozoítos de *Isospora suis* possuíam motilidade e foram observados saindo e entrando nas células. FAYER (1972) observou que *C. rivolta* e *I. suis* produziram merontes multinucleados em culturas de células e esses merontes não atingiram a maturidade. GUTIERREZ et al. (1987) estudaram o desenvolvimento de *C. felis*, *C. rivolta* e *I. suis* utilizando membrana corioalantóide de embrião de galinha. Estes autores observaram que o desenvolvimento, normalmente, foi limitado aos tecidos da membrana corioalantóide, mas merontes de *C. felis* foram

observados no fígado e intestino de embriões de galinha que foram imunossuprimidos com acetato de cortisona (LINDSAY et al., 1997).

SIRIPANTH et al. (2004) estudaram o desenvolvimento de *C. belli* em diferentes linhagens de células, HCT-8 (human ileocecal adeno carcinoma), HEP-2 (human larynx carcinoma), fibroblastos humanos, BEK (Bovine Epithelial Kidney cells) e VERO (African Green monkey kidney). Merozoítos foram observados em todos os tipos de células, com exceção dos fibroblastos humanos. Em células HCT-8, houve a formação apenas de microgametócitos, mas apenas reprodução assexuada foi observada nos demais tipos celulares. Os parasitos penetravam preferencialmente em cultura de células jovens. Estes dados implicam que, não somente linhagens celulares humanas podem ser infectadas, mas também algumas linhagens celulares de animais.

OLIVEIRA-SILVA et al. (2006) avaliaram a capacidade de esporozoítos de *C. belli* de penetrar e se multiplicar em quatro tipos celulares (VERO, HCT-8, A549 e MDBK). Estes autores observaram que esporozoítos de *C. belli* invadiram todos os tipos celulares entre 4 e 12h após a exposição com posicionamento perto do núcleo da célula hospedeira e, na maioria das células, no interior dos vacúolos. Multiplicação por endodiogenia foi observada 24h após a exposição, produzindo merozoítos emparelhados. Merozoítos livres foram observados no meio de cultura e penetrando em outras células, e não houve formação das fases sexuais (gamontes e oocistos) em nenhum dos tipos celulares utilizadas. Depois de vários ciclos de penetração e multiplicação nas células, a mobilidade dos zoítos diminuiu ocorrendo a morte dos mesmos. Os autores sugerem que a invasão *in vitro* destas células, observadas nesse estudo, é devida à existência de receptores-likes envolvidos na adesão e penetração de diferentes linhagens celulares e diferentes hospedeiros.

RESENDE et al. (2009) observaram que esporozoítos de *C. belli* foram capazes de sobreviver e se multiplicar em macrófagos humanos, que corrobora a hipótese de que estas células poderiam acolher cistos unizóicos deste parasito em sítios extraintestinais, mantendo a capacidade de reciclar e retornar para o intestino delgado, provocando assim, recorrências da infecção durante meses ou anos. Os mesmos autores observaram também que *C. belli* foi capaz de sobreviver e multiplicar em macrófagos murinos, hospedeiros não-naturais deste parasito. Parasitos provenientes da multiplicação em macrófagos murinos e humanos penetraram em células MK2 entre 14 e 19h após a exposição e se estabeleceram em vacúolos perinucleares bem desenvolvidos. Este achado corrobora com a hipótese de FRENKEL et al. (2003b), que *C. belli*, como outras espécies de *Cystoisospora*, poderia apresentar um ciclo de vida heteroxeno facultativo, com formação de cistos unizóicos nos tecidos de hospedeiros paratênicos e/ou intermediários.

1.8 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da cistoisosporose é baseado na história do paciente, sinais clínicos e através da demonstração de oocistos em amostras fecais. Do ponto de vista clínico, o diagnóstico é dificultado pelos inúmeros agentes capazes de conduzir aos mesmos quadros clínicos. Como a diarreia aquosa é a principal manifestação clínica das infecções causadas pelos coccídios intestinais dos gêneros *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* e *Cyclospora*, o diagnóstico clínico não permite uma diferenciação específica do agente causal. A confirmação laboratorial constitui uma ferramenta imprescindível para estabelecer o diagnóstico diferencial e requer, no caso desses

protozoários, o uso de técnicas específicas de concentração e coloração (GOODGAME, 1996).

Os oocistos podem ser identificados com o exame direto do sedimento fecal ou através de métodos de concentração por sedimentação ou flutuação. Os métodos de concentração mais utilizados em laboratórios de análises clínicas são o método de Ritchie (RITCHIE, 1984) que consiste na centrifugação da amostra de fezes em uma solução composta de formol e éter, o método de Hoffman, Pons & Janer (HOFFMAN et al., 1934) que consiste na sedimentação espontânea das fezes diluídas em água destilada e posteriormente filtradas, e também, a técnica de flutuação em solução saturada de sacarose (SHEATER, 1923). Esfregaços a partir do sedimento fecal e coloração são muito utilizados no diagnóstico da cistoisporose. Desde que se descobriu a natureza ácido-resistente dos oocistos de diversos coccídios, os métodos ácido-resistentes são os mais recomendados para a detecção destes parasitos. As técnicas de coloração mais utilizadas são a de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEM & POLLENS, 1920), onde os oocistos aparecem avermelhados em um fundo esverdeado, e a coloração do ácido tricrômico, onde os oocistos aparecem avermelhados com um fundo cinza (RIGO & FRANCO, 2002). Cristais de *Charcot-Leyden* (formados a partir de grânulos eosinofílicos) presentes nas fezes, geralmente refletem a eosinofilia periférica que muitas vezes acompanha a infecção por *C. belli*.

Aspirados duodenais são úteis no diagnóstico da cistoisporose, quando os oocistos não são encontrados em amostras fecais. O teste de corda duodenal (Enterotest) também pode ser utilizado, onde os oocistos são concentrados no muco que adere ao fio e, em seguida, submetidos a uma das técnicas de coloração mencionadas anteriormente. Quando os oocistos não podem ser identificados em amostras fecais, ou aspirado

duodenal, ou pelo teste da corda, uma endoscopia digestiva com biópsia intestinal é o método diagnóstico de escolha (ORENSTEIN, 1997).

Outro método simples, barato, de fácil aplicação e altamente sensível para a detecção de oocistos de *C. belli* é a técnica de autofluorescência. Nesta técnica, os oocistos aparecem corados de azul ou de verde, quando excitados com a luz violeta. BIALEK et al. (2002) demonstraram que esta técnica é mais sensível (95,7%) do que a coloração com iodo (48,4%) para a detecção de oocistos de *C. belli* em amostras de fezes concentradas.

MÜLER et al. (2000) desenvolveram uma técnica molecular para o diagnóstico de infecção por *C. belli*. Os autores, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), descreveram pares de *primers* específicos e uma sonda para hibridização para a detecção de *Cystoisospora belli* em amostras humanas. As sondas de hibridização e pares de *primers* são baseadas nas regiões variáveis da subunidade ribossômica menor (SSU-rDNA) de *C. belli*. Os pares de *primers* amplificaram o fragmento de DNA de amostras clínicas de pacientes com cisticose, assim como clones de SSU-rDNA de *C. belli*.

1.9 Tratamento

Antes do surgimento da AIDS, o tratamento específico para a cisticose não era indicado, por ser uma doença autolimitada e os sintomas declinarem independentemente de qualquer terapêutica. Com o advento da AIDS, a cisticose passou a ser a segunda infecção gastrointestinal que acomete os pacientes portadores do vírus HIV e, portanto, seu tratamento passou a ser imprescindível, uma vez que os

pacientes HIV/AIDS desenvolvem sintomatologia grave (VERONESI, 1996; ANDRADE et al., 2002). *Cystoisospora belli* é um parasito difícil de ser erradicado, embora sensível ao sulfametoxazol-trimetropim. Recorrências são comuns e a natureza crônica da doença contribui para a morbidade e mortalidade entre pacientes imunodeprimidos (FRENKEL et al., 2003a,b; OLIVEIRA-SILVA et al., 2006).

A recomendação terapêutica para cistoisosporose é a associação de sulfametoxazol (800mg) e trimetropim (160mg) durante dez dias, seguido de profilaxia por mais três semanas. A resposta geralmente ocorre dentro de 24 horas. Pacientes que não respondem a esta terapia devem receber outros fármacos como pirimetamina, isoladamente ou em associação com sulfadiazina ou metronidazol. Drogas como tetraciclina, ampicilina, nitrofurantoína, quinacrina e furazolidona já foram utilizadas, mas não mostraram sucesso terapêutico (VERONESI, 1996; ANDRADE et al., 2002; CIMERMAN et al., 1999).

VERDIER et al. (2000) compararam trimetoprim-sulfametoxazol (160mg e 800mg) com ciprofloxacina (500mg) para o tratamento e profilaxia de infecção por *Cystoisospora belli* e *Cyclospora cayetanensis* em pacientes infectados com o vírus HIV. Os autores observaram que a diarreia cessou mais rapidamente com trimetoprim-sulfametoxazol (média de 2 dias) do que com ciprofloxacina (média de 4,5 dias). Embora a ciprofloxacina não seja tão eficaz, é aceitável para pacientes que não toleram a terapia com trimetoprim-sulfametoxazol.

1.10 Resposta imunológica

O sistema imune inato desempenha um papel crucial no reconhecimento inicial e posteriormente no desencadeamento de uma resposta a patógenos invasores (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). O sistema imunológico adaptativo, por outro lado, é responsável pela eliminação de patógenos na fase tardia da infecção e na geração de memória imunológica. Enquanto a resposta imune adaptativa é caracterizada pela especificidade ao antígeno desenvolvida por rearranjos gênicos a partir de um amplo repertório de receptores nos linfócitos, a resposta imune inata é mediada principalmente por células fagocíticas e células apresentadoras de antígenos, como os granulócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs) (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004).

A resposta imune inata depende do reconhecimento de estruturas conservadas em patógenos, denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS), através de um número limitado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) codificados na linhagem germinativa das células do sistema imune inato, ao contrário do grande repertório de receptores reorganizados utilizados pelo sistema imune adquirido (AKIRA et al., 2006; MOGENSEN, 2009), sendo a família de receptores *Toll-like* (TLRs) a mais extensivamente estudada na resposta imune inata (AKIRA & TAKEDA, 2004). Após o reconhecimento de PAMPs, os PRRs expressos pelas células do sistema imune inato presentes na superfície celular ou intracelular sinalizam a presença do patógeno e desencadeiam respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas ativando vias de sinalização intracelulares, incluindo moléculas adaptadoras, quinases e fatores de transcrição (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; AKIRA et al., 2006). Vias de transdução de sinal induzida por PRRs resultam na ativação da expressão gênica e na síntese de uma ampla gama de moléculas, incluindo citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular e imunoreceptores (AKIRA et al., 2006), que juntos direcionam a resposta inicial do hospedeiro à infecção e, ao mesmo

tempo, representam um elo importante entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

Dentro deste contexto, o reconhecimento de microorganismos patogênicos por receptores *Toll-like* (TLRs) em células humanas tem sido apontado como um campo de investigação altamente promissor (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2003; ROEDER et al., 2004). Os TLRs são proteínas transmembranas do tipo I (domínio N-terminal extracelular) caracterizadas estruturalmente por possuírem seqüências extracelulares repetidas ricas em leucina, região diretamente envolvida no reconhecimento de PAMPs, e o domínio citoplasmático que possui homologia com o receptor de interleucina-1 (IL-1R) e interleucina-18 (IL-18R) por possuírem uma região conservada de aproximadamente 200 aminoácidos em suas caudas citoplasmáticas, denominada como domínio TIR (Toll/IL-1R), sendo este responsável por mediar a sinalização intracelular (AKIRA & HEMMI, 2003). Os receptores *Toll-like* são capazes de reconhecer um amplo grupo de PAMPs de diferentes espécies de microorganismos que são fundamentais para a ativação da resposta imune inata (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2003). Até o presente momento, pelo menos 10 receptores *Toll-like* têm sido identificados em humanos, e estes podem ser agrupados com base na sua distribuição celular. Certos TLRs (TLR-1, 2, 4, 5, 6 e 10) são expressos na superfície celular e reconhecem principalmente produtos bacterianos, enquanto outros (TLR-3, -7, -8 e -9) são localizados quase que exclusivamente em compartimentos intracelulares, incluindo endossomos e lisossomos, e são especializados no reconhecimento de ácidos nucléicos (MOGENSEN, 2009). Os tipos celulares mais importantes que expressam TLRs são as células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo macrófagos, DCs e linfócitos B (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004).

O envolvimento dos PRRs durante a infecção por protozoários é menos descrito do que em infecções por bactérias e vírus, embora os princípios gerais pareçam ser semelhantes aos descritos para outras classes de patógenos. Existem evidências de que moléculas associadas à glicoproteína GPI (glicosilfosfatidilinositol) presentes em alguns patógenos desencadeiam a ativação de TLR2 e TLR4. Por exemplo, é sabido que as GPIs derivadas de *Toxoplasma gondii* promovem a translocação de NF- κ B para núcleo celular, onde este se liga a sequências promotoras no DNA, induzem a expressão gênica e ativam macrófagos para produzirem citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , uma citocina essencial para a ativação de macrófagos e inibição da replicação do parasito (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003). DEBIERRE-GROCKIEGO et al. (2007) avaliaram a capacidade das GPIs de *Toxoplasma gondii*, intactas ou de seus fragmentos, de promover a translocação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) em células CHO (*Chinese hamster ovary*) expressando TLR2 ou TLR4. Os autores sugerem que ambos os receptores TLR2 e TLR4 podem participar na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Toxoplasma gondii* através de sua ativação pelas GPIs. Similar ao *Toxoplasma gondii*, as GPIs de outros protozoários como *Trypanosoma spp*, *Leishmania spp* e *Plasmodium spp* também desencadeiam a ativação de TLR2 e/ou TLR4 (GAZZINELLI & DENKERS, 2006).

As mucosas das vias aéreas, do trato reprodutivo e intestino estão em contato direto com o ambiente externo e, portanto, são suscetíveis à colonização e invasão por vírus, bactérias, fungos e parasitos. Além da exposição constante a antígenos ambientais, o intestino adulto humano é um ambiente colonizado pela microbiota residente. Frente a este desafio antigênico, células imunes distribuídas por todo o intestino, associado aos tecidos linfóides locais, devem permanecer imunologicamente hiporresponsivos a bactérias comensais, entretanto, mantendo a sua

capacidade de responder a um patógeno. Certo grau de reconhecimento imunológico inato de bactérias comensais é necessário para o desenvolvimento normal e a função do sistema imune da mucosa intestinal e sistema imune periférico. Somente as bactérias patogênicas desenvolveram mecanismos de invadir a barreira de células epiteliais e sobreviver dentro dos tecidos do hospedeiro onde seriam reconhecidas por células do sistema imunológico inato localizado em placas de Peyer, folículos linfóides ou lâmina própria. (ARTIS, 2008; WELLS et al., 2009). A expressão e localização dos TLRs em células epiteliais intestinais (IECs) têm sido propostas para explicar o reconhecimento imune inato de bactérias comensais. Por exemplo, tem sido relatado que em condições basais e na ausência de estados inflamatórios, as IECs expressam pouco ou nenhum TLR2, TLR4 e CD14 (glicoproteína de membrana celular associada ao TLR4) minimizando o reconhecimento de LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano. A localização subcelular de outros TLRs pode facilitar a discriminação entre bactérias patogênicas e bactérias comensais. Por exemplo, o TLR5 que reconhece flagelo bacteriano, parece estar expresso exclusivamente na superfície basolateral das IECs, fornecendo assim um mecanismo pelo qual apenas patógenos invasores, mas não bactérias comensais, são capazes de induzir uma resposta inflamatória (GEWIRTZ et al, 2001). Os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em organelas endossomais intracelulares (MEDZHITOV, 2007), e, portanto, não encontram bactérias comensais no lúmen intestinal ou aquelas associadas à superfície apical das IECs, reconhecendo apenas as bactérias patogênicas que invadem ativamente a barreira de células epiteliais (ARTIS, 2008).

Os receptores *Toll-like* recrutam um conjunto de proteínas adaptadoras que contém domínios TIR desencadeando cascatas de sinalização levando à ativação de NF- κ B, que controla a indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que são fundamentais na indução de resposta imune adaptativa e inflamatória contra patógenos

(WELLS et al., 2009). A especificidade das respostas celulares é feita pelo recrutamento diferencial de proteínas adaptadoras como o fator 88 de Diferenciação Mielóide (MyD88), proteína de mielina e linfócitos (MAL), proteína adaptadora do domínio TIR (TRIF) e a molécula adaptadora relacionada com o TRIF (TRAM) que formam um complexo com o domínio C-terminal de diferentes TLRs (AKIRA & TAKEDA, 2004).

As células epiteliais da mucosa intestinal são essenciais para o início da resposta imune da mucosa a diferentes patógenos entéricos. Não só formam uma barreira que separa o meio interno do hospedeiro do ambiente exterior, como também produzem uma série de citocinas e quimiocinas em resposta a componentes microbianos. O controle das infecções parasitárias, de forma geral, é dependente da produção de várias citocinas que ativam mecanismos de defesa do hospedeiro, limitando a invasão, a reprodução ou a sobrevivência dos parasitos (DENG et al., 2004). O perfil de produção de citocinas é largamente dirigido pelos mediadores produzidos pelas células ativadas durante a resposta inata e adaptativa. MOSMANN et al. (1986) revelou que os perfis de citocinas podem ser usados para categorizar células TCD4⁺ efectoras, ou seja, células T helper-1 e T helper-2 (Th1 e Th2), que possuem diferentes funções imunológicas. Desde então, um grande progresso tem sido feito na identificação de novos tipos de células T efectoras e na caracterização de suas funções e regulação. Vários tipos de células T efectoras foram documentados com funções biológicas distintas. Células Th1 são definidas com base na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α , e são importantes na proteção do hospedeiro a patógenos intracelulares obrigatórios (MICALLEF et al., 1997). Células Th2 são definidas como produtoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, e são importantes na resposta a patógenos extracelulares como helmintos e imunidade das mucosas (FINKELMAN et al., 1991; SHER & COFFMAN, 1992). Um subconjunto adicional de

células T, Th3, foi descrito como produtoras de TGF- β , uma importante citocina antiinflamatória. Células Th17 foram recentemente identificadas e, conforme indicado pelo nome, são produtoras de IL-17, assim como IL-21 e IL-22 (LIANG et al., 2006; NURIEVA et al., 2007; KORN et al., 2007; ZHENG et al., 2007). A expressão de IL-17 tem sido associada a doenças auto-imunes como esclerose múltipla, psoríase, bem como reações alérgicas crônicas. A IL-21 é uma citocina regulatória e tem sido associada a doenças alérgicas (diminuição de IgE), infecções virais e imunoterapia do câncer, e a IL-22 (Th22) é uma citocina pró-inflamatória que faz parte da superfamília da IL-10 e também possui um papel na resposta imune inata contra bactérias patogênicas em células epiteliais (LANGRISH et al., 2005; YEN et al., 2006). Células T reguladoras (Tregs) se desenvolvem no timo e compreendem 5 a 10 % das células TCD4⁺ periféricas, e produzem grandes quantidades de IL-10 e TGF- β (WEINER, 2001; STASSEN et al., 2004) e sua função mais importante é manter a autotolerância e homeostasia imune. Células Th9 foram recentemente relatadas (DARDALHON et al., 2008; VELDHOEN et al., 2008) e geram altos níveis de IL-9 e IL-10 e são importantes para a diferenciação de Th17. KHAN et al. (2003) sugerem que as células Th9 estão envolvidas em respostas a helmintos intestinais, contudo, mais estudos são necessários para revelar a função deste tipo de células contra agentes patogênicos e doenças inflamatórias.

Não existem estudos na literatura atual, que sejam do nosso conhecimento, abordando a produção de citocinas e quimiocinas por células do sistema imunológico humano em resposta aos antígenos de *C. belli*. Na infecção murina por *Toxoplasma gondii*, um coccídio estreitamente relacionado com *C. belli* em estudos filogenéticos, tem sido observado que a imunidade é mediada por uma resposta imune celular específica, dependente principalmente da produção de IFN- γ . No início da infecção,

Toxoplasma gondii estimula macrófagos, células dendríticas e neutrófilos a liberarem IL-12 e TNF- α . A IL-12, por sua vez, induz células “Natural Killer” (NK) a produzirem IFN- γ , que age sinergisticamente com TNF- α , aumentando a atividade microbicida dos macrófagos (BLISS et al., 1999; BOURGUIN et al., 1998; GAZZINELLI et al., 1994), e leva a proliferação de células T CD4+ e T CD8+, que produzem mais IFN- γ . Essas células produtoras de IFN- γ têm uma importante função na indução e manutenção do controle da infecção aguda e crônica por *Toxoplasma gondii* (YAP & SHER, 1999). Macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii* e ativados por IFN- γ produzem óxido nítrico (NO), substância de conhecida atividade citotóxica, responsável pelo controle da replicação do parasito (ADAMS et al., 1990; LANGERMANS et al., 1992). Embora os mecanismos induzidos por IFN- γ sejam potentes, segundo YAP e SHER, 1999, eles não são completamente efetivos na eliminação de *Toxoplasma gondii*.

Acredita-se que a patologia e a necrose intestinal observadas em camundongos infectados com cistos teciduais de *Toxoplasma*, são dependentes de linfócitos T CD4+, do aumento das citocinas IFN- γ , TNF- α e da enzima sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), (LIESENFELD, 2002). LIESENFELD et al. (1999) observaram que em camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-TNF- α ou anti-IFN- γ , houve a prevenção do desenvolvimento de necrose intestinal, indicando que ambas as citocinas, IFN- γ e TNF- α , estariam envolvidas neste processo em camundongos C57BL/6 infectados com cistos teciduais de *Toxoplasma gondii*. Tem sido também demonstrado que as citocinas, TGF- β e IL-10, induzem efeitos antiinflamatórios, importantes na prevenção de necrose intestinal, sendo o TGF- β um potente agente imunoregulador (AHUJA, et al., 1993).

Em *Cryptosporidium*, outro coccídio intestinal que parasita células do epitélio intestinal em humanos, tem sido evidenciado que a produção inata de IFN- γ é

importante no controle dos estágios iniciais da infecção. O IFN- γ é um importante inibidor da diferenciação de células Th2 e, em conjunto com a IL-12 proveniente de APCs, é importante para induzir a polarização de células Th0 para o fenótipo Th1. O IFN- γ é uma das primeiras citocinas a aparecer na mucosa intestinal de camundongos infectados com *C. parvum*. Acredita-se que na criptosporidiose o TNF- α está envolvido no recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal (GIBSON, 2004; LAURENT et al., 1997). Biópsias de jejuno de voluntários humanos infectados com *C. parvum* demonstraram altos níveis de TNF- α (ROBINSON et al., 2001). LACROIX et al. (2001) sugerem que a expressão de TNF- α na mucosa intestinal de camundongos susceptíveis ao *C. parvum* correlaciona-se fortemente com a presença de IFN- γ , de modo que um elemento importante no controle da criptosporidiose pode ser a ativação da expressão de TNF- α através de uma alta regulação da transcrição de NF- κ B por IFN- γ (SHTRICHMAN & SAMUEL, 2001). Embora a resposta imune protetora de *C. parvum* seja via Th1 e requeira a produção de IFN- γ , as citocinas IL-4 e IL-10 (Th2) também estão presentes na mucosa intestinal de camundongos e humanos infectados com *Cryptosporidium* (LACROIX et al., 2001). A IL-10 é secretada por uma variedade de células da mucosa intestinal e antagoniza respostas inflamatórias e imunológicas da mucosa (MOORE et al., 2001) e oTGF- β também tem sido relacionado com a redução da inflamação intestinal na criptosporidiose (PODOLSKY, 1997).

As quimiocinas, juntamente com moléculas de adesão, são cruciais durante as respostas inflamatórias para o recrutamento das sub-populações específicas de leucócitos para os locais de lesão tecidual. Os parasitos intestinais podem induzir diretamente a produção de quimiocinas pelas células epiteliais, que são importantes para o início do processo inflamatório da mucosa. Por exemplo, células epiteliais intestinais

humanas infectadas com *C. parvum*, *in vitro*, resultaram na secreção das quimiocinas CXCL8 (IL-8) e CXCL1 (GRO- α) (LAURENT et al., 1998).

Tem sido observado que os enterócitos de camundongos respondem à infecção por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* secretando várias quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CXCL2 (MIP-2), CCL3 (MIP-1 α), CXCL10 (IP-10) e CCL4 (MIP-1 β) e citocinas (IL-1, IL-6, IL-15, GM-CSF). Essas moléculas são essenciais para iniciar uma série de eventos imunológicos que levam a um intenso processo inflamatório no intestino por meio do recrutamento de vários tipos celulares como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (MENNECHET et al., 2002; BUZONI-GATEL et al., 2006). Quando essas células são estimuladas, inicia-se uma ação microbicida, pois elas são grandes produtoras de IL-12, a qual estimula a ativação de células T CD4+, dando início a uma resposta específica à infecção (BUZONI-GATEL et al., 2006). Foi demonstrado que células oriundas de amostras de intestino delgado de animais infectados por *Toxoplasma gondii* apresentam um aumento significativo na secreção da quimiocina Proteína 1 quimiotática de monócito (MCP-1), também conhecida como CCL2 e, em menores proporções, a secreção de quimiocinas como a proteína nº 10 induzível por IFN- γ (CXCL10/ IP-10). Além disso, foi observado que estas células eram capazes de sintetizar proteína 1 α e β inflamatória de macrófago (CCL3 e CCL4/ MIP-1 α e β), CXCL2 (MIP-2) e a quimiocina expressa e secretada por células T normais e regulada após ativação (CCL5/ RANTES) (MENNECHET et al., 2002).

WANG et al. (2007) examinaram a expressão de quimiocinas e citocinas em tecidos intestinais de pacientes HIV/AIDS durante a infecção por *Cryptosporidium*. Em biópsias de pacientes HIV/AIDS, foram detectadas quatro quimiocinas principais: CXCL10 (IP-10), CCL11 (Eotaxina), CCL5 (RANTES) e CCL2 (MCP-1) e três citocinas (IL-1 α , IL-10 e G-CSF). Estes autores observaram que CXCL10 (IP-10) está

associada com a doença sintomática, pois o nível desta quimiocina foi significativamente maior em pacientes HIV/AIDS com criptosporidiose em relação aos pacientes HIV/AIDS sem criptosporidiose ou em voluntários saudáveis. Os autores observaram também a ausência de IFN- γ em biópsias intestinais de pacientes HIV/AIDS com criptosporidiose, sugerindo que os parasitos podem ter induzido diretamente a produção de CXCL10 pelas células epiteliais sem a presença de IFN- γ . Dados epidemiológicos têm mostrado que a evolução da doença é mais rápida em pacientes HIV/AIDS com criptosporidiose. Essa observação pode ser explicada em parte pelo aumento do fluxo de linfócitos e macrófagos CXCL10-dependentes na lâmina própria intestinal e compartimento intra-epitelial, o que pode facilitar a infecção pelo HIV e a destruição de células T. Assim, a depleção de células T CD4⁺ causada pelo HIV em pacientes com AIDS leva a um aumento da carga parasitária intestinal que, por sua vez, induz a expressão de CXCL10 pelas células epiteliais. Em pacientes controles, a CXCL10 pode recrutar células efetoras CXCR3⁺, que eliminam as células infectadas pelo parasito e controlam a carga parasitária. Em contrapartida, um reduzido número de células CXCR3⁺ em pacientes com AIDS são incapazes de eliminar o parasito e são alvos para a infecção pelo HIV (WANG et al. 2007).

A atividade antimicrobiana exercida pelas células do sistema imune também é dependente de outros mediadores solúveis além das citocinas e quimiocinas. A ativação de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, induzem a ativação de compostos antimicrobianos que, uma vez transferidos para o fagossomo desses tipos celulares, desempenham um papel primordial na morte de patógenos fagocitados (FANG, 2004). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são, provavelmente, os mediadores antimicrobianos mais importantes no controle de patógenos invasores durante a inflamação. Após a estimulação por PAMPs,

neutrófilos e macrófagos respondem com um aumento acentuado no consumo de oxigênio (O_2) chamado explosão respiratória, que é a consequência da ativação de um sistema enzimático onde NADPH oxidase oxida o NADPH em $NADP^+$ mais ânion superóxido (O_2^-) (FANG, 2004). O superóxido, além do seu efeito citotóxico, participa da geração de outras moléculas, mais instáveis e nocivas, como os radicais hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCL) (HALLIWELL, 2006, STOWE & CAMARA, 2009).

A RNS é a segunda classe de micromoléculas secretadas por células fagocíticas durante a resposta inflamatória, onde o óxido nítrico (NO) é a principal RNS produzida por neutrófilos e macrófagos (FANG, 2004). O NO tem um efeito citotóxico, mas também pode reagir com ROS para produzir oxidantes mais poderosos, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL, 2006). Na criptosporidiose, enterócitos produzem NO através da ativação de iNOS na presença de $IFN-\gamma$ e outras citocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$, IL-1 e provavelmente a IL-6 (SHTRICHMAN & SAMUEL, 2001).

Até o momento não existem estudos, que sejam de nosso conhecimento, descrevendo o perfil de citocinas e quimiocinas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e participação de receptores *Toll-like* envolvidos nas interações entre *Cystoisospora belli* e células da imunidade inata. Diante disto propusemos neste trabalho investigar, *in vitro*, qual seria o perfil de citocinas e quimiocinas envolvidos na resposta imunológica à *C. belli*, avaliar a participação de receptores *Toll-like* na produção de diferentes citocinas e quimiocinas, assim como, investigar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a estimulação de granulócitos humanos com oocistos e antígenos solúveis deste parasito. Estes estudos podem ampliar o conhecimento existente sobre a resposta imunológica a *C. belli* e levar ao

desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desta infecção em populações de risco.

2 JUSTIFICATIVA

Existe uma grande necessidade de se conhecer a biologia da *Cystoisopora belli* em virtude de sua crescente importância entre indivíduos HIV/AIDS nos dias atuais.

Até o momento, existem poucos estudos envolvendo este protozoário emergente de modo que etapas importantes do seu ciclo de vida, formação de cistos extra-intestinais e sua relação com a célula hospedeira (seus efeitos sobre ela e como ela responde a sua invasão) permanecem desconhecidas. Como em estudos “*in vivo*” torna-se difícil extrair informações básicas e como não existem modelos animais susceptíveis a *C. belli*, a análise destas alterações em cultivos celulares torna-se uma ferramenta importante. A propagação e a resposta em cultura celular simplificam o estudo de parasitos intracelulares e a infecção em cada tipo celular pode ser monitorada sob diversas condições químicas e ambientais.

Ainda não são bem conhecidos os principais mediadores da resposta imune na infecção por *C. belli*. A identificação do perfil de citocinas, quimiocinas, receptores *Toll-like* e produção de espécies reativas de oxigênio envolvidos nas interações entre *C. belli* e as células do sistema imunológico podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desta infecção em populações de risco.

3 HIPÓTESE

Antígenos de *Cystoisospora belli* são capazes de estimular células do sistema imunológico a produzir mediadores solúveis (citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio) através da interação com receptores celulares.

4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas, avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a participação de receptores *Toll-like* envolvidos nas interações entre *Cystoisospora belli* e células do sistema imune.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Avaliar o perfil de produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13) por ELISA após estimulação *in vitro* de células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMC) com oocistos de *C. belli* e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoitos;

4.1.2 Avaliar o perfil de produção de quimiocinas CCL-3 (MIP-1 α), CCL-2 (MCP-1), CXCL-10 (IP-10), CXCL-8 (IL-8) e CCL-11 (Eotaxina) por ELISA após estimulação *in vitro* de células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMC) com oocistos de *C. belli* e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoitos;

4.1.3 Avaliar a participação de receptores *Toll-like* na produção de citocinas e quimiocinas por células mononucleares (PBMC) após a estimulação *in vitro* com oocistos de *C. belli* e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoitos utilizando anticorpos bloqueadores de receptores *Toll-like* e respectivos controles;

4.1.4 Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por leucócitos polimorfonucleares (PMNs) humanos após estimulação “*in vitro*” com oocistos e antígenos solúveis extraídos de oocistos/esporezoítos de *C. belli*

5 MÉTODOS

5.1 Amostras biológicas de paciente com cistoisporose

O estudo foi realizado com amostras fecais de um dos pacientes HIV/AIDS atendido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). A escolha da amostra positiva para *Cystoisospora belli* foi realizada mediante análise prévia de amostras levadas ao laboratório de Criptosporidiose e Isosporose da disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e submetidas ao processo de concentração pelo formol-éter (RITCHIE, 1984) e em seguida, à técnica de Ziehl-Neelsen modificada segundo protocolo de GARCIA & LIMA (1993).

A amostra utilizada neste trabalho foi colhida do paciente 14 (isolado CB14) no dia 24/01/2006 e pertence ao banco de amostras do laboratório de Coccídios da Disciplina de Parasitologia da UFTM. Os dados clínicos e epidemiológicos do paciente e a caracterização molecular da amostra de *Cystoisospora belli* utilizada neste trabalho estão descritos no trabalho de RESENDE et al. (*in press*).

A amostra fecal utilizada neste trabalho foi previamente filtrada em tamis de 40, 48 e 85 *meshes* e submetida ao processo de esporulação em dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5% à temperatura ambiente, sob agitação mecânica. Após esporulação, os oocistos de *C. belli* foram acondicionados em vidros estéreis com tampa de rosca e mantidos a 4°C até o momento do uso.

5.2 Purificação dos oocistos de *C. belli*

A purificação dos oocistos foi realizada utilizando-se o processo descrito por ORTEGA-MORA et al. (1992) com modificações segundo OLIVEIRA-SILVA et al. (2006) seguindo as etapas de eliminação do dicromato de potássio mediante três lavagens através de centrifugação (2205×g por 10 minutos a 4°C) com solução de tampão fosfato (pH=7,2) e Tween 20 a 0,05% (PBS-T20) seguido pela retirada da porção lipídica por lavagem em PBS-T20 e éter sulfúrico PA na proporção 1:7 e centrifugação a 2205×g por 10 minutos a 4°C. A retirada do éter foi realizada mediante três lavagens do sedimento com solução PBS-T20 a 2205×g por 10 minutos a 4°C. Após as etapas de lavagem, o sedimento foi submetido à centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose com soluções de densidades 1,05 g/ml e 1,15 g/ml a 1500×g por 20 minutos a 4°C e a camada rica em oocistos foi retirada na interface entre as duas densidades com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A eliminação da sacarose foi realizada mediante três lavagens com solução salina (0,9%) a 2205×g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os oocistos foram ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 1% em temperatura de 4°C por 15 minutos e centrifugados a 2205×g a 4°C por 10 minutos para a retirada de bactérias remanescentes. A retirada do hipoclorito de sódio foi realizada mediante três lavagens dos oocistos com solução salina a 0,9% estéril a 2205×g a 4°C por 10 minutos. Os oocistos foram mantidos em microtubos tipo eppendorfs com 1 ml de solução salina a 4°C até o momento do experimento. A partir da etapa do hipoclorito de sódio, os tubos foram abertos somente em capela de fluxo laminar em ambiente livre de contaminação microbiológica.

5.3 Extração dos antígenos solúveis de oocistos/espocistos/esporozoítos de *C. belli*

Os oocistos obtidos de acordo com o item 4.2 foram tratados por ultra-som (Dynatech Model 150 Sonic Dismembrator) por 2 períodos de 30 minutos, em amplitude 5, potência alta, em banho de gelo com intervalos de 5 minutos entre cada período. Após a ruptura total dos oocistos, acrescentou-se à solução 5 µl de inibidor de protease (PIC) para cada 500 µl do material. Os antígenos foram mantidos a -20°C até o momento do experimento.

5.4 Determinação da concentração de proteínas de *C. belli*

A determinação da concentração de proteínas nas amostras de antígenos solúveis de *Cystoisospora belli* foi realizada em triplicata utilizando o nanoespectrofotômetro Nanodrop - ND1000 (Nanodrop Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 280nm. Estas dosagens foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart.

5.5 Obtenção de células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico humano

Para os ensaios de estimulação de granulócitos (PMN) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com amostras de *C. belli* foram utilizadas amostras de sangue venoso periférico (20,0 ml) coletado com anticoagulante (heparina) de vinte doadores voluntários saudáveis, maiores de 18 anos, pareados por gênero e idade. Dos 20 doadores, 9 eram do sexo masculino e 11 do sexo feminino, sendo que a idade dos mesmos variou entre 21 a 45 anos de idade com uma média de 30 ± 8 anos para o sexo masculino e 25 a 50 anos com uma média de 33 ± 9 anos para o sexo feminino.

O sangue venoso periférico previamente coletado em tubo com heparina foi cuidadosamente colocado em tubos plásticos cônicos FALCON de 15 ml contendo um gradiente descontínuo de Ficoll (d=1,077) e Histopaque (d=1,119) e centrifugados a $450 \times g$ por 35 minutos a 22°C . Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll (d=1,077) e o plasma e um anel de granulócitos na interface entre o Histopaque (d=1,119) e o Ficoll (d=1,077). O plasma foi retirado cuidadosamente e os anéis de células foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidos separadamente para tubos cônicos FALCON de 50,0 ml. O excesso de Ficoll e Histopaque foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30,0 ml de meio RPMI 1640 (LGC – BRASIL) em cada lavagem, a 22°C em velocidade de $224 \times g$ por 10 minutos. Em seqüência, as células mononucleares foram ressuspensas em 5,0 ml de meio RPMI 1640 (LGC – BRASIL) contendo 25 mM de HEPES, 5% de soro fetal bovino (Hyclone – USA), 2,05 mM de L-glutamina (LGC – BRASIL) e 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Schering-Plough), e os granulócitos foram ressuspensos em RPMI sem vermelho de fenol contendo 2,05 mM de L-glutamina, 2,00 g/L de bicarbonato de sódio e 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. A contagem de células obtidas foi determinada em câmara de Neubauer. Foi considerado 90% de viabilidade celular e esta foi determinada utilizando-se o

teste do azul de tripan. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

5.6 Ensaio de estimulação com oocistos e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos de *C. belli*

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de acordo com o item 4.5 foram colocadas em placas estéreis de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/ml, estimuladas *in vitro* com diferentes concentrações de antígenos solúveis (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) ou oocistos íntegros de *C. belli* (5×10^3 e 20×10^3 oocistos/ml) e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 por 18 e/ou 120 horas, visando estabelecer a concentração ótima a ser utilizada em todos os experimentos.

Para descartar uma possível produção de $\text{TNF-}\alpha$ por contaminação com LPS, também realizamos experimentos adicionais na presença de polimixina B (PMB 10 $\mu\text{g/ml}$), um potente antibiótico que se liga e neutraliza LPS. Analizamos a produção de $\text{TNF-}\alpha$ nas culturas estimuladas com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), oocistos (20×10^3 oocistos/ml) ou antígenos solúveis de *C. belli* (20 $\mu\text{g/ml}$) na presença ou ausência de PMB (PMB 10 $\mu\text{g/ml}$). O uso de PMB nas culturas estimuladas com LPS inibiu a produção de $\text{TNF-}\alpha$, mas não inibiu a produção de $\text{TNF-}\alpha$ por PBMCs estimulados com oocistos e antígenos solúveis de *C. belli*.

Os cultivos celulares foram também realizados na presença de diferentes concentrações de anticorpos monoclonais bloqueadores de receptores TLR-2, [anti-TLR-2 (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$)] e TLR-4 [anti-TLR-4 (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) pré-incubados por 45 minutos a 37°C e 5% de CO_2] além dos isotipos controle IgG1 κ (10 $\mu\text{g/ml}$) e IgG2a (10 $\mu\text{g/ml}$) para

avaliar a participação dos TLRs envolvidos na produção de citocinas e quimiocinas estimuladas pelos antígenos solúveis e oocistos íntegros de *C. belli*.

Os sobrenadantes foram coletados após 18 ou 120 horas de cultivo e armazenados a -20°C, para posterior dosagem das citocinas e quimiocinas.

5.7 Opsonização do zymosan

Como controle positivo dos ensaios de produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado o zymosan (parede de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*). Para a opsonização do zymosan, em um tubo eppendorf contendo 900µl de solução estéril de NaCl a 0,85% foi adicionado 100µl de uma suspensão de zymosan (65 mg/ml em solução NaCl a 0,85%) e posteriormente centrifugado a 120×g por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, e ao “pellet” acrescentou-se 200µl de soro humano e 800µl de solução estéril de NaCl a 0,85%. Após homogenização, incubou-se a solução em banho-maria a 37°C durante 30 minutos com agitações periódicas a cada 5 minutos. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada a 120×g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento acrescentou-se 500µl de solução estéril de NaCl a 0,85%. A concentração do zymosan opsonizado pronta para uso foi de 13 mg/ml.

5.8 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A detecção de radicais livres de oxigênio foi realizada em um luminômetro (Lumat LB 9501 Berthold, GERMANY), segundo Chaves et al. (1998). A suspensão de granulócitos na concentração 5×10^5 células/ml em meio RPMI sem vermelho de fenol foi colocada em 3 tubos diferentes e adicionada de 500 μ l de reagente luminescente (luminol) (10^{-4} M diluído 1:100 em PBS), e a produção basal de ROS foi medida a cada minuto durante 5 minutos, em unidades relativas de luz por segundo (RLU/s). Após estes 5 minutos adicionou-se ao primeiro tubo 25 μ l de zymosan opsonizado (13mg/ml) para o controle positivo, oocistos íntegros de *C. belli* (20×10^3) no segundo tubo e antígenos solúveis de *C. belli* (20 μ g/ml) no terceiro tubo. A medida de ROS foi realizada durante 30 minutos. Os resultados foram expressos em pico-máximo (em RLU/s) e área total sob a curva quimioluminescente (que representa o total de espécies reativas de oxigênio emitidas no período).

Para avaliar a participação dos receptores *Toll-like* na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) as células polimorfonucleares (PMNs) foram pré-incubadas por 35 minutos a 37 °C e 5% de CO₂ na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores de receptores TLR-2 (10 μ g/ml) e TLR-4 (10 μ g/ml) e respectivos isotipos controle IgG1 κ (10 μ g/ml) e IgG2a (10 μ g/ml). Após o período de incubação a solução foi adicionada de 500 μ l de reagente luminescente (luminol) (10^{-4} M diluído 1:100 em PBS) e a produção basal de ROS foi medida a cada minuto durante 5 minutos, em unidades relativas de luz por segundo (RLU/s). Após estes 5 minutos adicionaram-se oocistos íntegros de *C. belli* (20×10^3) e a medida de ROS foi realizada durante 30 minutos. Os resultados foram expressos em pico-máximo (em RLU/s) e área total sob a curva quimioluminescente.

5.9 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

As citocinas e quimiocinas presentes nos sobrenadantes das culturas descritas no item 4.6 foram dosadas por ELISA utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis (BD-PharMingen/OptEIA™). No ELISA foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (NUNC, USA), recobertas com anticorpos monoclonais específicos (concentração final de 1 µg/ml) em tampão carbonato (0,1M, pH=9,5, 7.13g NaHCO₃, 1.59g Na₂CO₃; q.s. para 1.0L; pH para 9.5 com 10N NaOH) e mantidas a 4°C por 18 horas para a captura de citocinas e quimiocinas a serem dosadas. Após este período as placas foram lavadas 5 vezes com uma solução de PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T), bloqueadas com 200 µl/poço de tampão PBS contendo 2% de albumina bovina (SIGMA-USA) por 4 horas à temperatura ambiente. Após esta incubação as placas foram lavadas 5 vezes com solução de PBS-Tween 20 (PBS-T). As colunas 11 e 12 de cada placa correspondiam à curva padrão realizada com a citocina ou quimiocina padrão recombinante. Nestas colunas adicionou-se 100 µl de citocinas ou quimiocinas recombinante, seguindo diluições seriadas de 1:2 em PBS, contendo 5% de soro fetal bovino (FCS) conforme as instruções do fabricante para cada kit. Às demais colunas foi adicionado 50 µl/poço de sobrenadante de cada cultura a ser dosada. As placas foram incubadas a 4°C, por duas horas e lavadas 5 vezes com solução PBS-T. A seguir, foram adicionados 100 µl/poço de anticorpos anti-citocina ou anti-quimiocina a ser dosada, marcados com biotina na diluição 1:1000 em PBS-T. As placas foram reincubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, e novamente lavadas 5 vezes com solução PBS-T. Após esta etapa foram adicionados 100 µl/poço de streptoavidina marcada com peroxidase (BD/OptEIA™) na diluição 1:1000 em PBS-T. As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e lavadas 5 vezes com uma solução PBS-T, quando então foi adicionado 100 µl/poço de substrato TMB (tetrametilbenzidina (BD/OptEIA™)). A leitura foi realizada em leitor automático de ELISA (BIORARD 2550 READER EIA) e os resultados descritos em densidade ótica (D. O.) obtidos

pela diferença entre as absorvâncias medidas a 405 e 490 nm (Abs405 – Abs490). A concentração de citocinas e/ou quimiocinas nos sobrenadantes foi dada em pg/ml e determinada pela comparação entre as absorvâncias obtidas em uma curva padrão com a respectiva citocina ou quimiocina recombinante realizada simultaneamente.

5.10 Condições livres de endotoxina

Para se garantir condições livres de endotoxina toda a vidraria utilizada no preparo de soluções e reagentes foi aquecida a 200°C e posteriormente autoclavada. Todas as soluções foram esterilizadas e filtradas em filtros milipore de 0,22 µm. As ponteiros utilizadas e todos os materiais foram mantidos em condições livres de pirógenos. Os oocistos, antígenos, meios de cultura e sobrenadantes foram testados para a presença de LPS pelo ensaio de “Limulus amoebocyte assay” (SIGMA, USA). Os experimentos também foram feitos por amostragem ao acaso na presença de 10 µg de polimixina B/ml e LPS (5 µg/ml) para comparação de resultados.

5.11 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP-UFTM) com o número de protocolo CEP-UFTM: 882 e todos os indivíduos participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.12 Análise estatística

Os dados obtidos neste projeto foram analisados pelo aplicativo Statview. Para os dados que apresentaram dispersão Gaussiana, foram utilizados testes de análise de variância (ANOVA) com repetição (amostra em triplicata) e testes Bonferroni para comparação do valor obtido de p com o valor esperado $p < 0.05$, e de Tuckey e Dunnet para dados não pareados com significância estabelecida em 5%. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados onde a distribuição não era Gaussiana. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os diferentes grupos e o teste de Mann-Whitney para comparar diferenças entre dois grupos ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

Os seguintes aspectos da resposta imune *in vitro* foram avaliados:

I) quantificação de citocinas pró e antiinflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13),

II) quantificação de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL11, CXCL8 e CXCL10),

III) participação de receptores do tipo *Toll* (TLR2 e TLR4) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta à estimulação *in vitro* com oocistos e antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos de *C. belli*.

6.1 Avaliação da produção de citocinas após estimulação *in vitro* de PBMCs frente a antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*

PBMCs de indivíduos saudáveis estimuladas com antígenos solúveis de *C. belli* produziram níveis mais elevados de TNF- α ($p=0,006$) em comparação às células não estimuladas. Para a estimulação com oocistos de *C. belli*, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,06$) entre PBMCs estimulados ou não (Fig. 1 A). O uso de polimixina-B (PMB) em culturas de PBMCs estimuladas com LPS inibiu a produção de TNF- α , mas, não reduziu a produção de TNF- α em cultura estimulada por oocistos ou antígenos solúveis de *C. belli*, indicando que esta citocina foi realmente produzida em resposta aos antígenos deste coccídio *in vitro* (Fig. 1 B).

Quanto à produção de IL-1 β os antígenos solúveis ($p=0,02$) e oocistos ($p=0,05$) de *C. belli* induziram a liberação de níveis mais elevados desta citocina inflamatória quando comparados com células não estimuladas (Fig. 2).

Baixos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 foram produzidos por PBMCs estimuladas com oocistos de *C. belli* ($p=0,04$) quando comparado com as células não estimuladas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,32$) para a produção de IL-10 entre células estimuladas com antígenos solúveis de *C. belli* e células não estimuladas (Fig. 3).

A produção de IFN- γ após estimulação de PBMCs com antígenos solúveis ($p=0,39$) e oocistos de *C. belli* ($p=0,28$) não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Fig. 04).

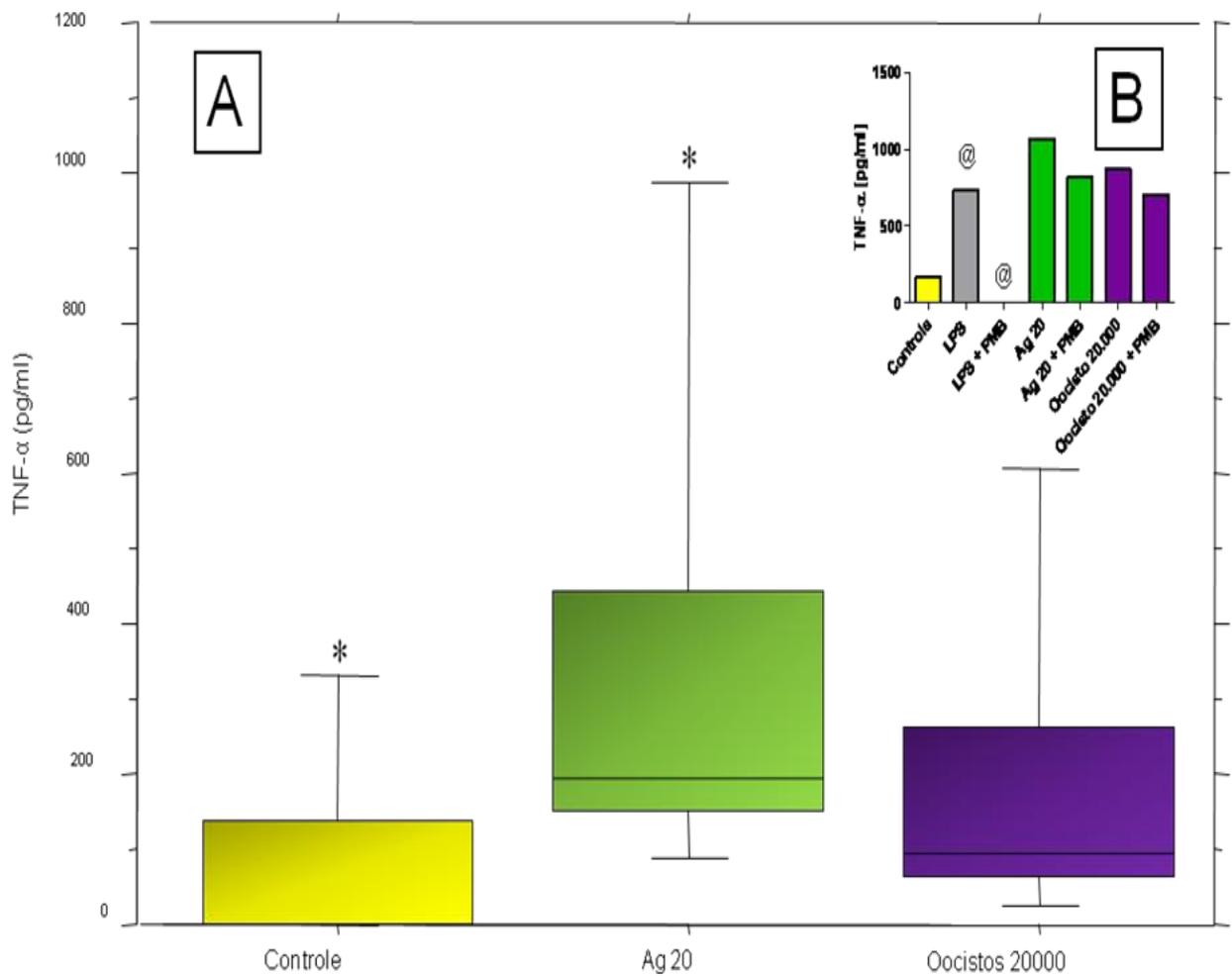


Figura 1: Produção de TNF- α por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com meio de cultura (controle), 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/espococistos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (Oocistos) ou LPS (5 μ g/ml) na ausência (A) ou presença (B) de 10 μ g/ml de Polimixina B (PMB). A produção de TNF- α foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*, @) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

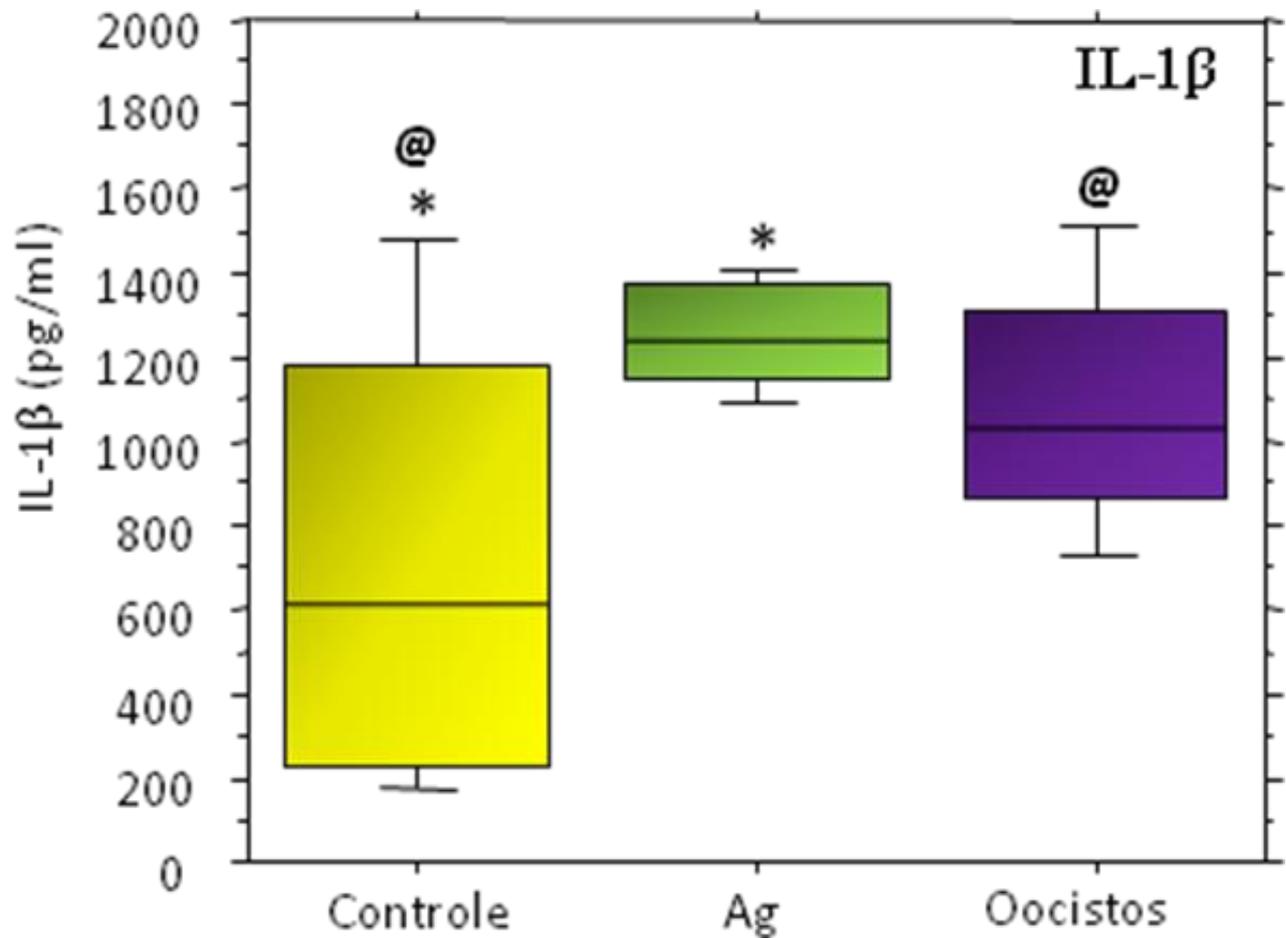


Figura 2: Produção de IL-1 β por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-1 β foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*, @) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

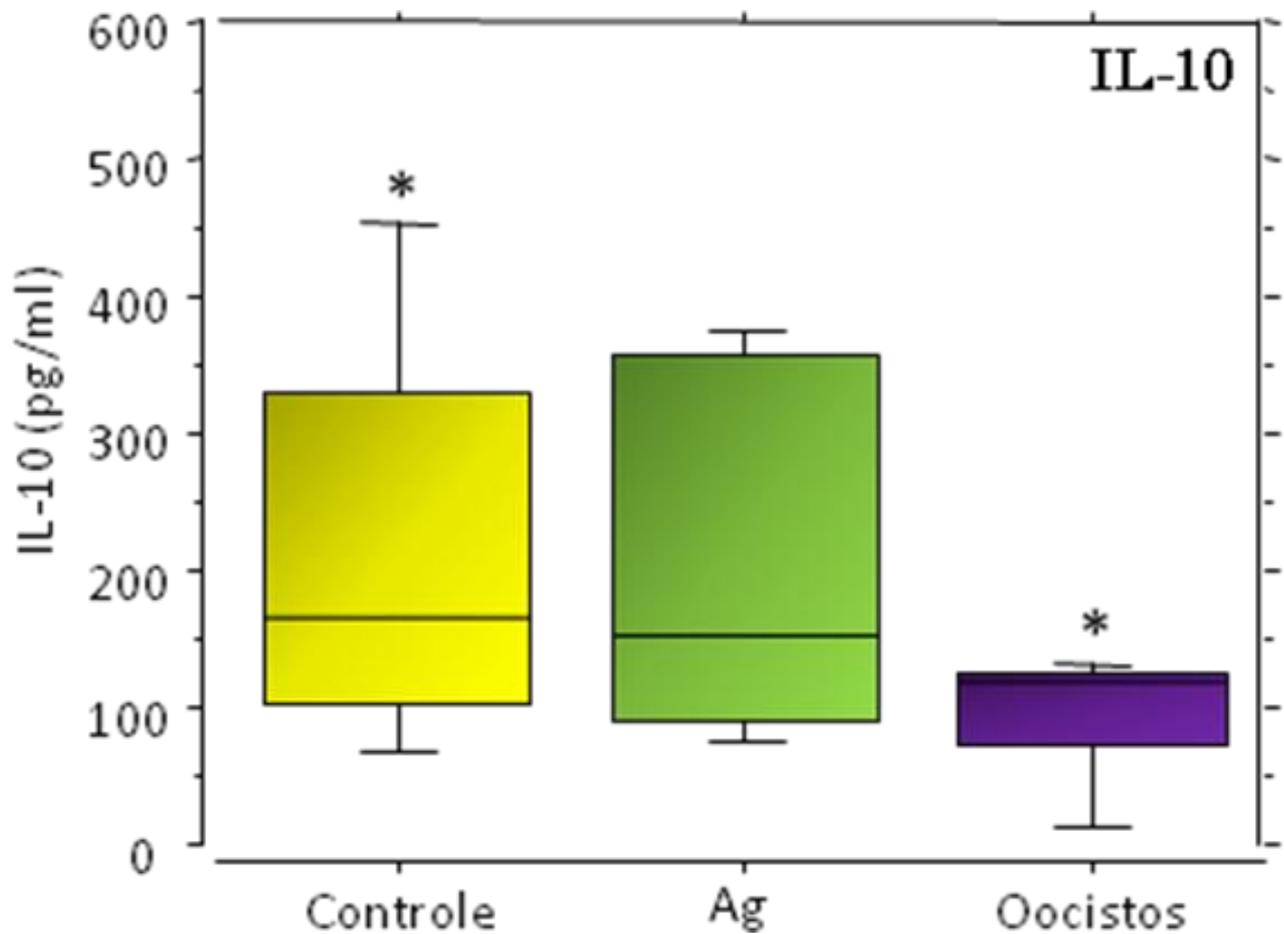


Figura 3: Produção de IL-10 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20 \mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-10 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

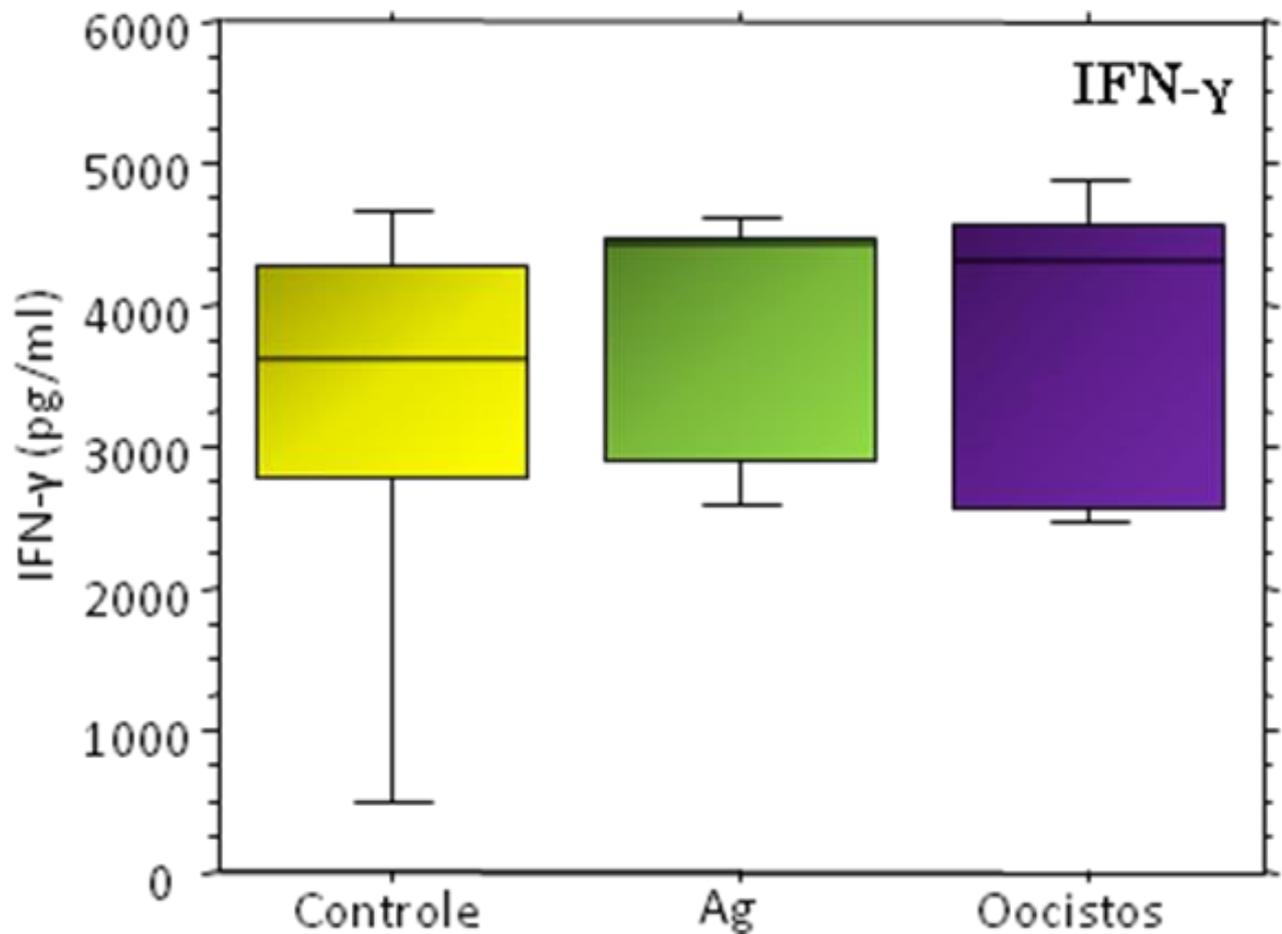


Figura 4: Produção de IFN- γ por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IFN- γ foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 120 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 (Fig. 05) e IL-6 (Fig. 06), e das citocinas de perfil Th2, IL-4 (Fig. 07) e IL-13 (Fig. 08), após estimulação de PBMCs com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

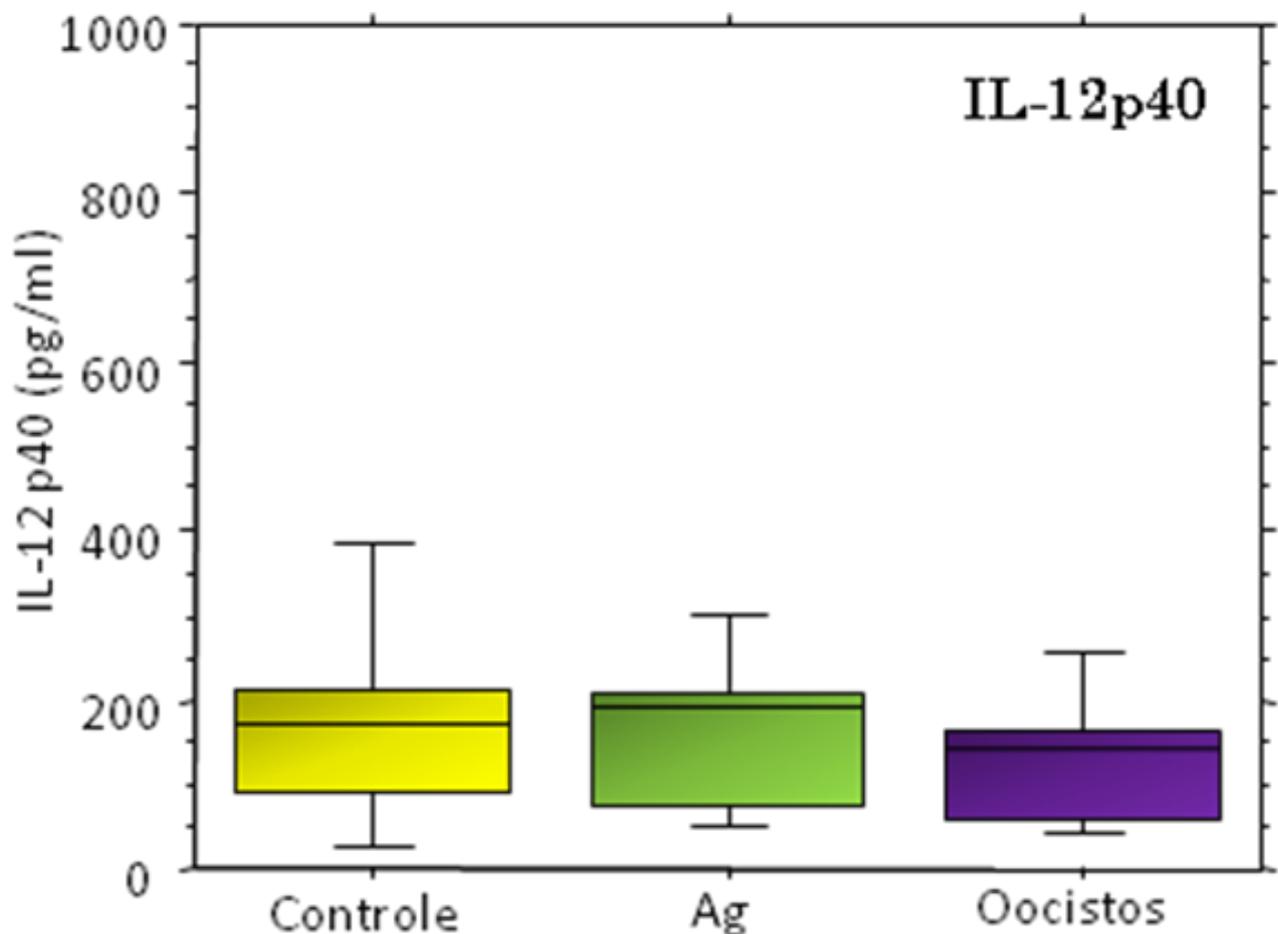


Figura 5: Produção de IL-12 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/esporeocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-12 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p\leq 0,05$).

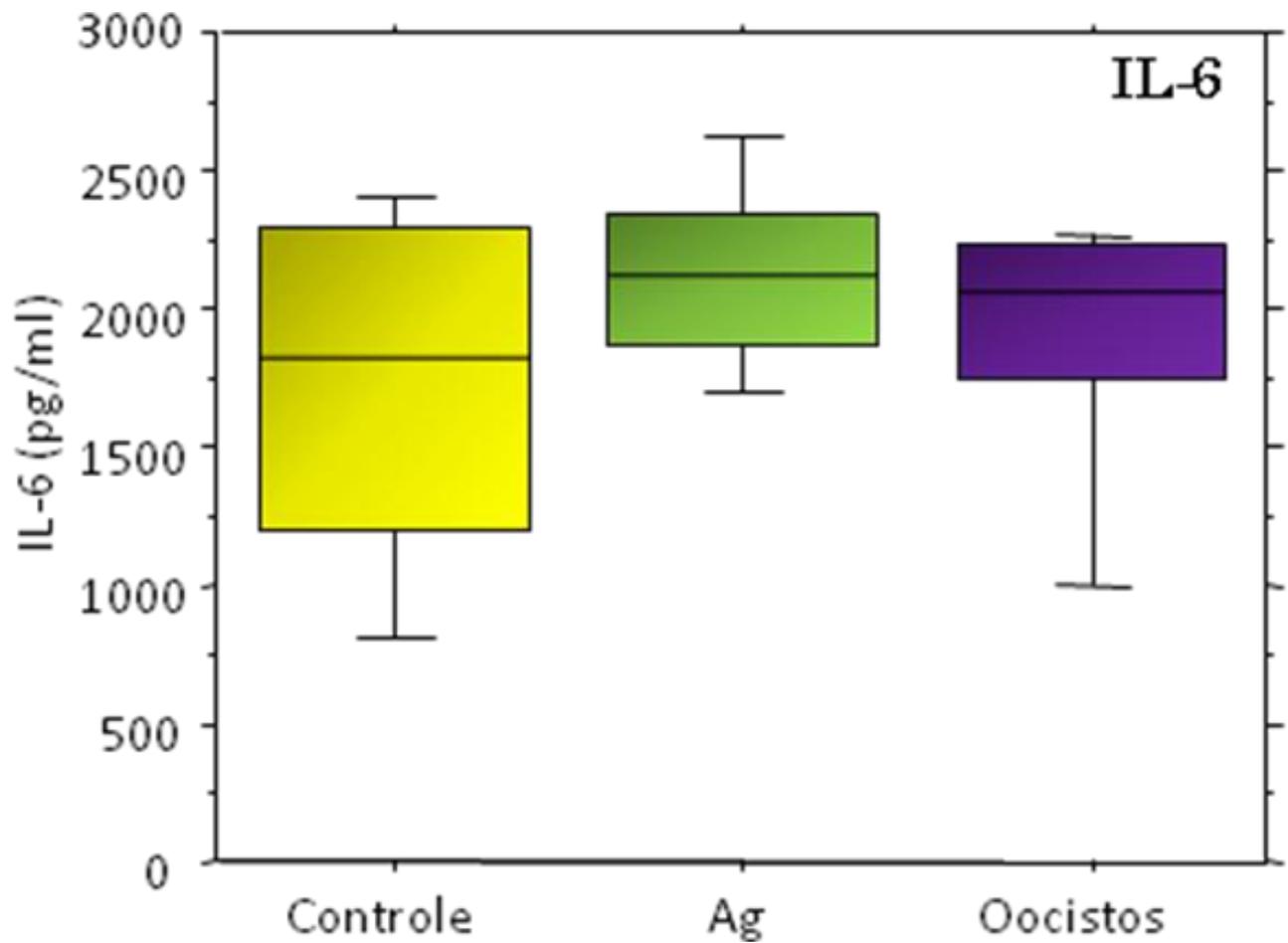


Figura 6: Produção de IL-6 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/esporeocistos/esporeozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-6 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

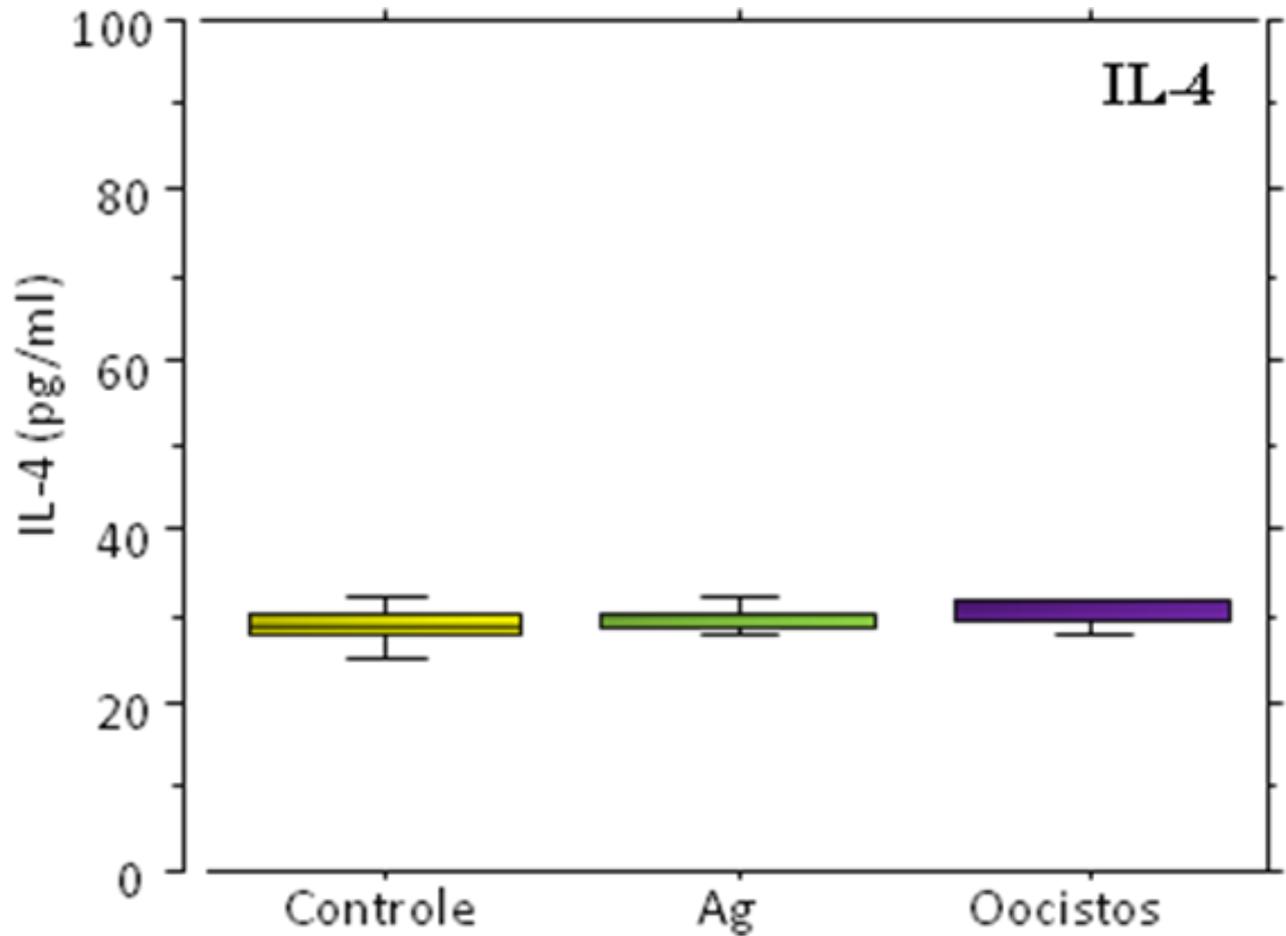


Figura 7: Produção de IL-4 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-4 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 120 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

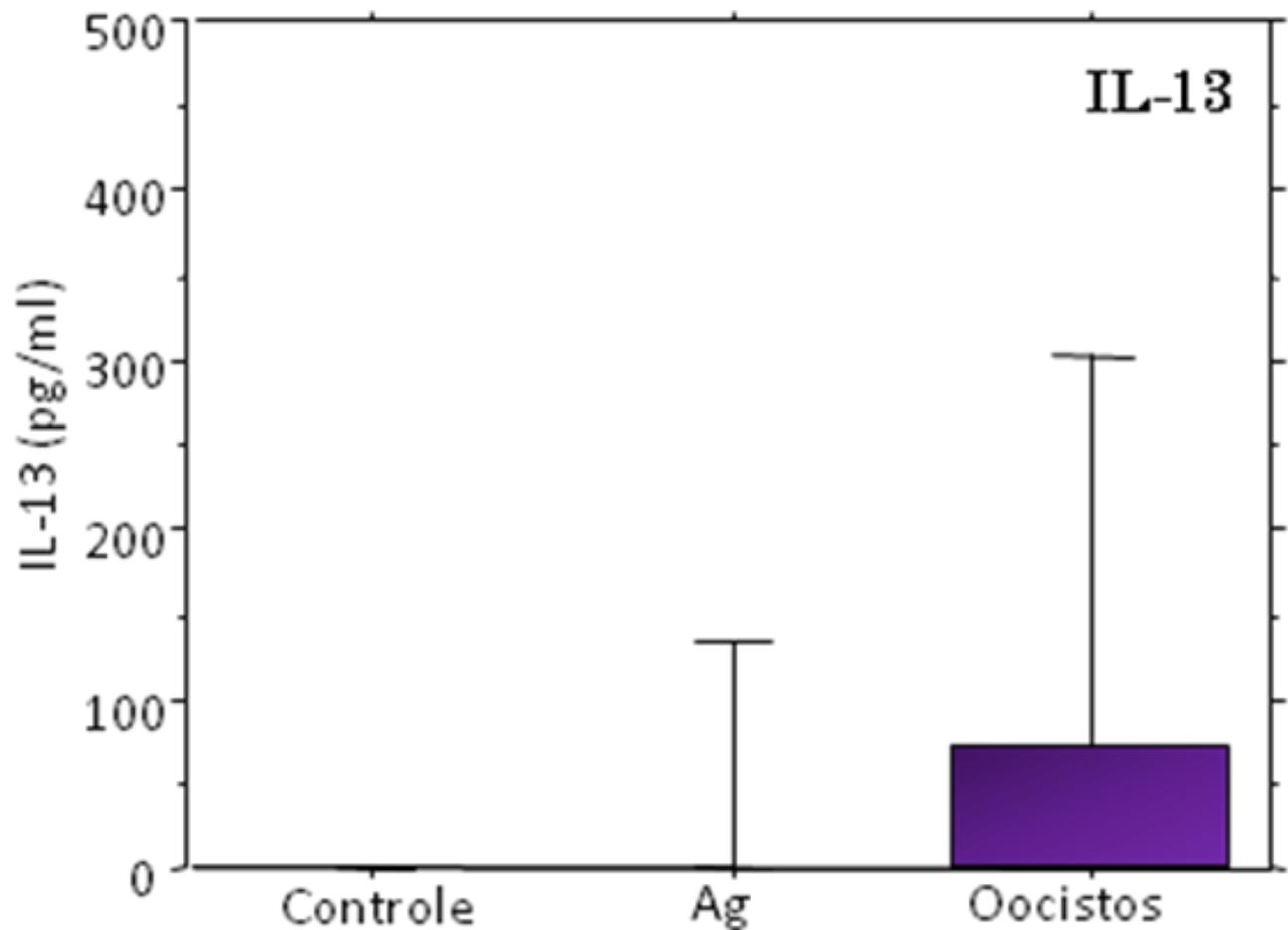


Figura 8: Produção de IL-13 por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de IL-13 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 120 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

6.2 Avaliação da produção de quimiocinas após estimulação *in vitro* de PBMCs frente a antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*

No cultivo *in vitro* de PBMCs com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli* foi observado uma menor produção de CXCL-10 (IP-10) quando comparado à produção desta quimiocina por células não estimuladas ($p=0,0093$) (Fig. 09).

A produção da quimicina quimiotática de monócitos CCL-2 (MCP-1) por PBMCs estimulados com oocitos de *C. belli* também foi mais baixa ($p=0,01$) se comparada com a produção por células não estimuladas (controle) (Fig. 10). O mesmo não foi observado quando o estímulo foi realizado com antígenos solúveis de *C. belli* ($p=0,09$).

As células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos solúveis de *C. belli* apresentaram níveis mais elevados ($p=0,005$) de CXCL-8 (IL-8) se comparado com células não estimuladas (controle) (Fig.11). Oocistos de *C. belli* não induziram a produção de CXCL8 ($p=0,38$).

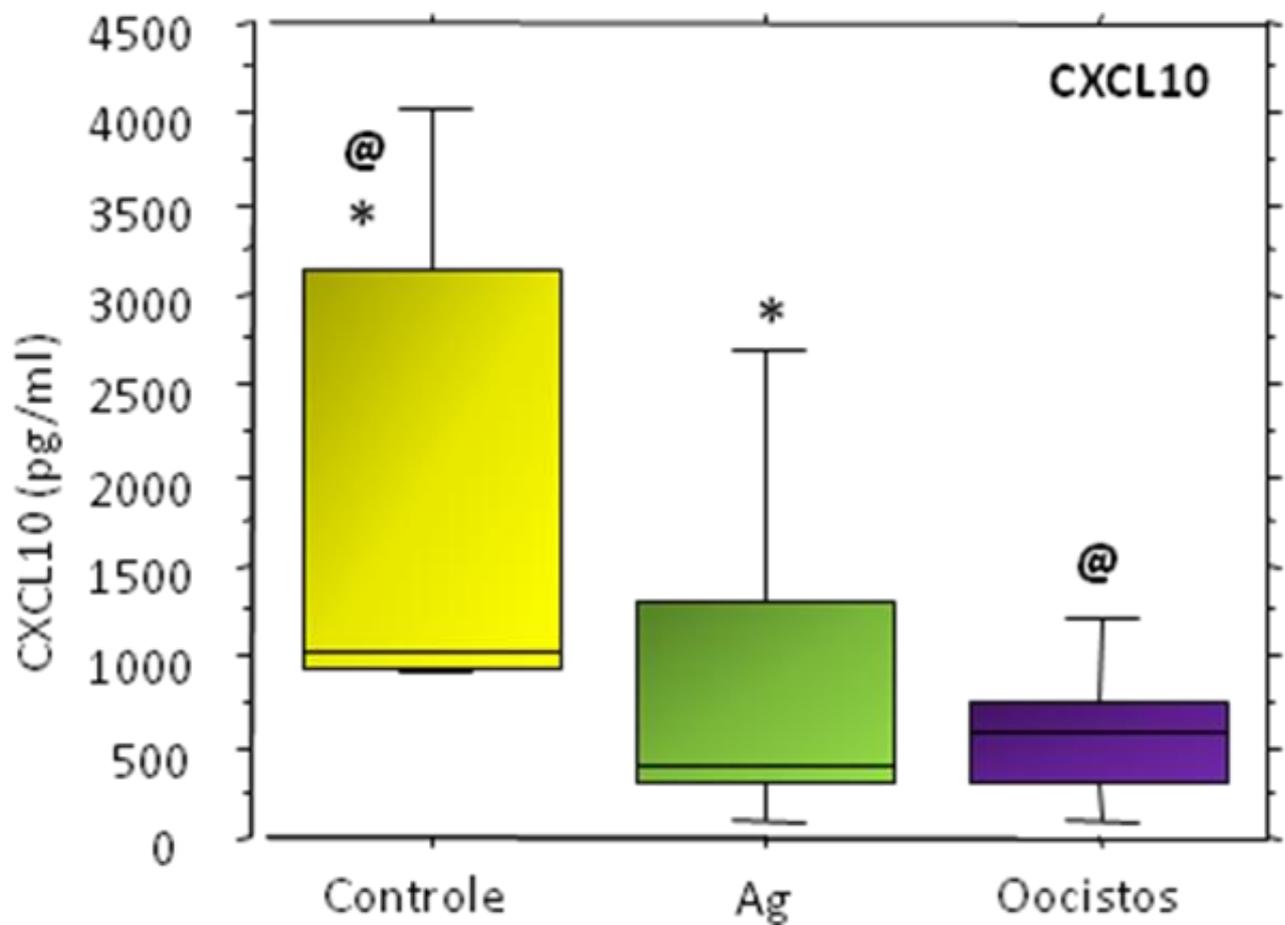


Figura 9: Produção de CXCL10 (IP-10) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CXCL10 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 120 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*,@) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

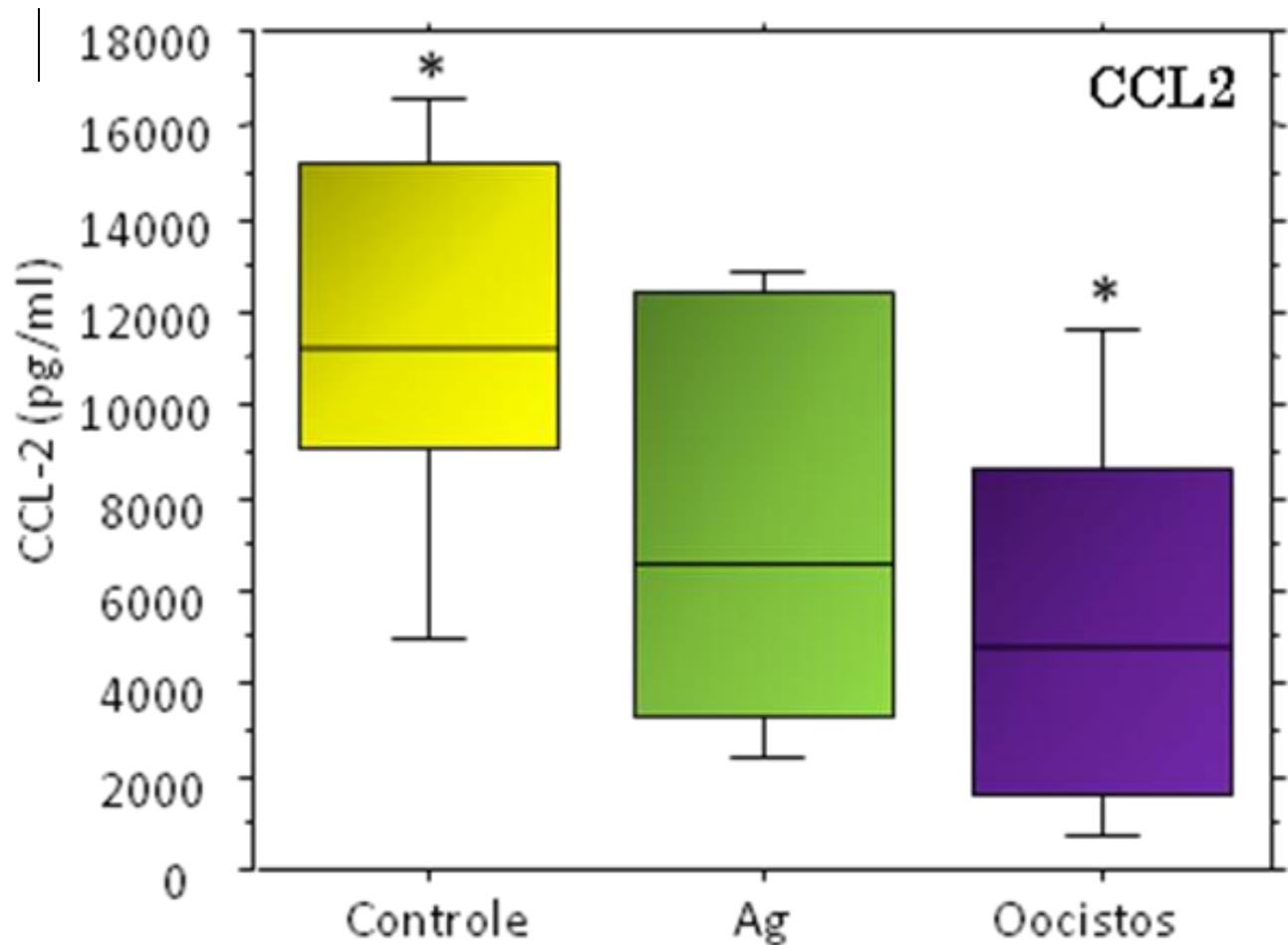


Figura 10: Produção de CCL2 (MCP-1) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CCL2 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

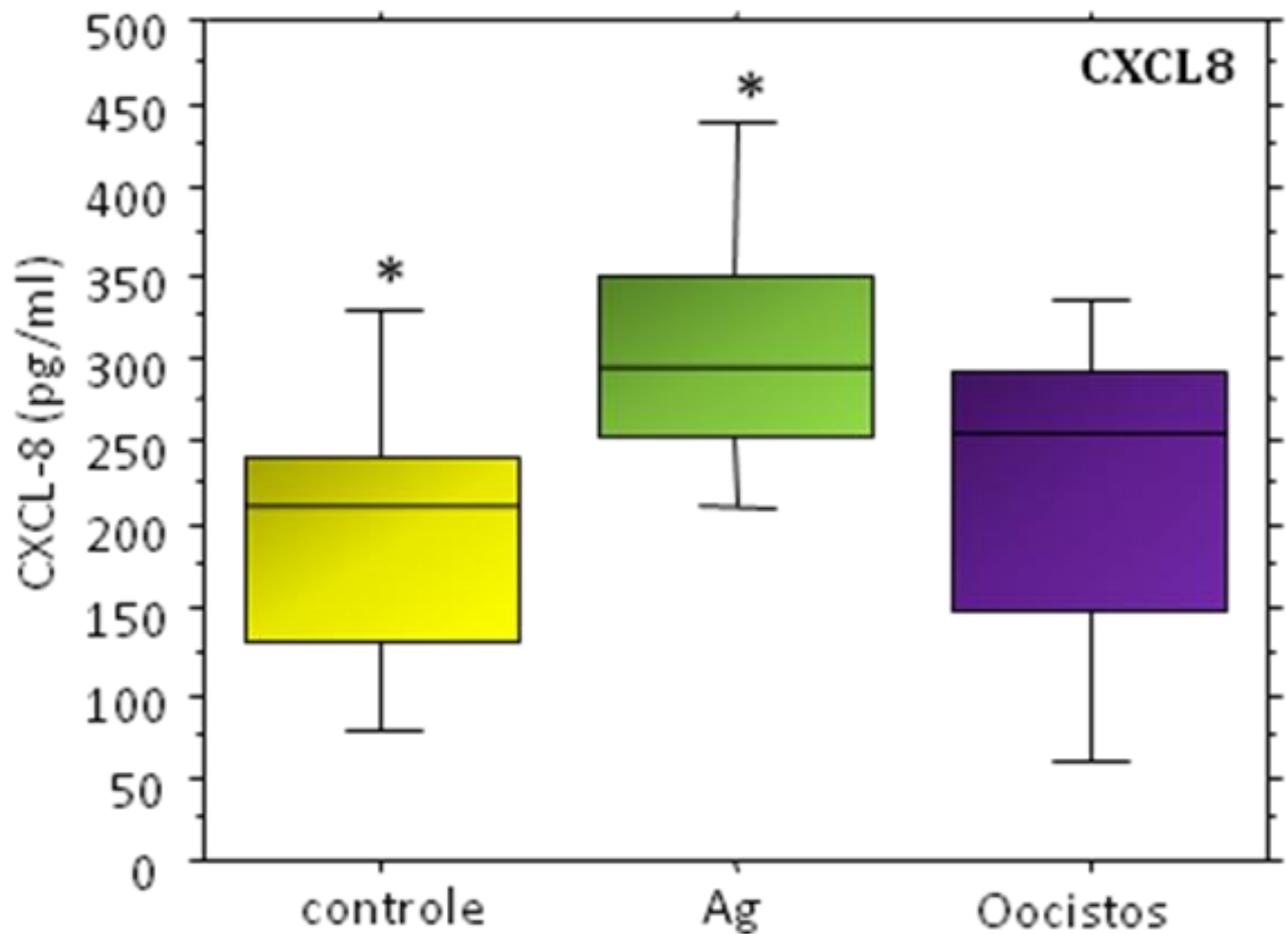


Figura 11: Produção de CXCL8 (IL-8) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CXCL8 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A produção de CCL-3 (MIP-1 α) (Fig. 12) e CCL-11 (EOTAXINA) (Fig. 13) após estimulação de PBMCs com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com células não estimuladas ($p > 0,05$).

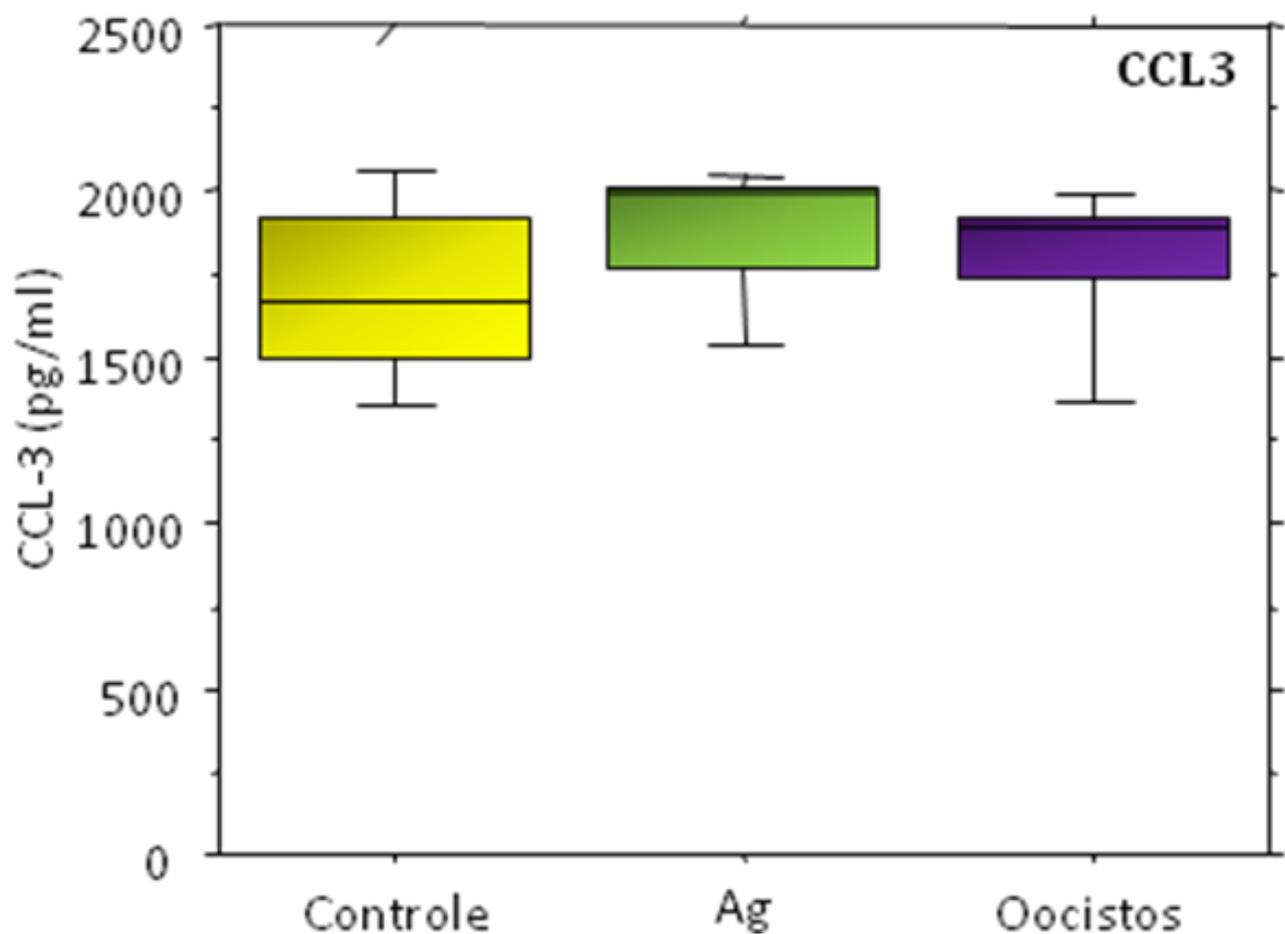


Figura 12: Produção de CCL3 (MIP-1 α) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com 20 μ g/ml de antígenos solúveis extraídos de oocistos/esporeocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CCL3 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

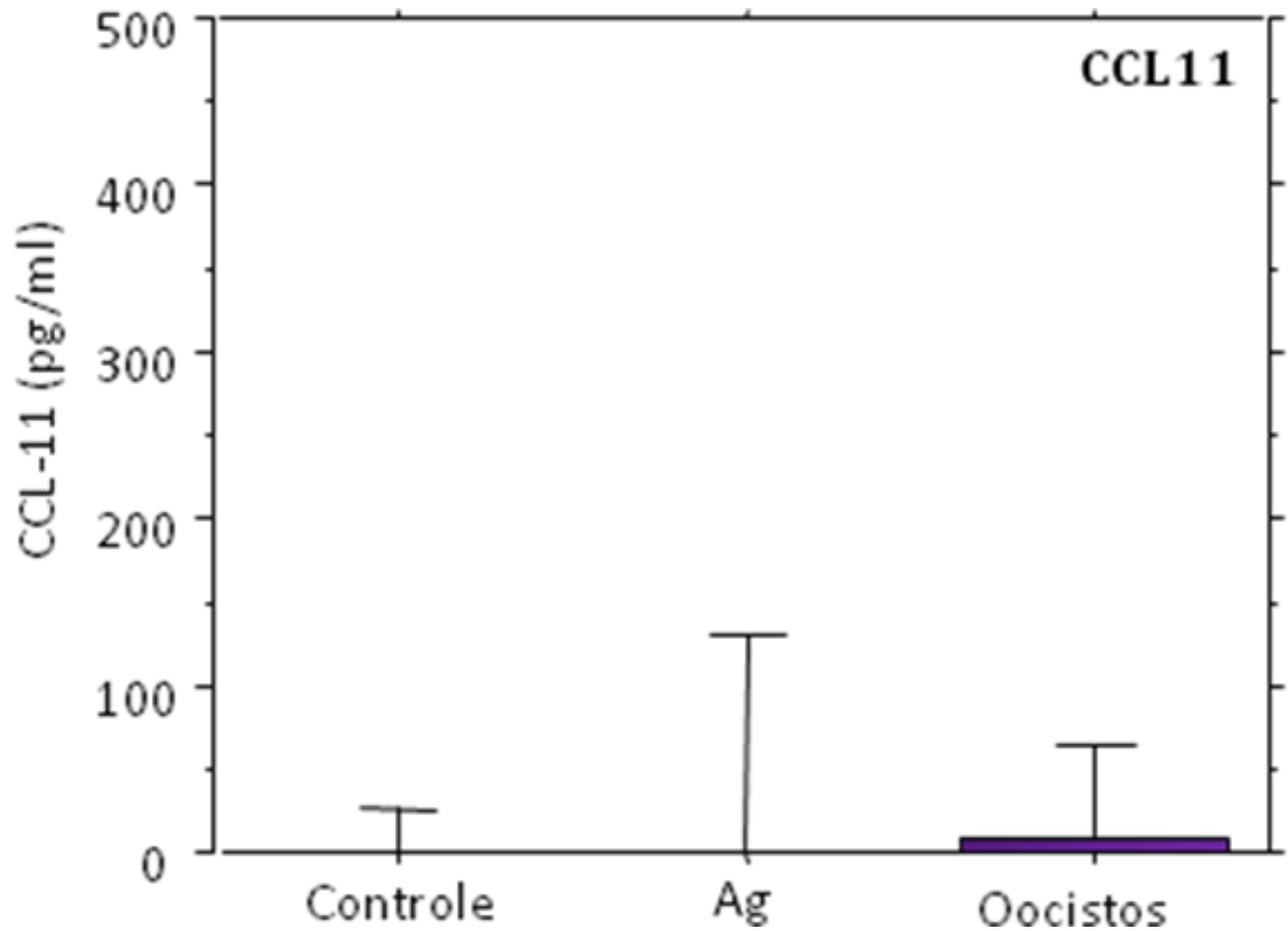


Figura 13: Produção de CCL11 (eotaxina) por células mononucleares humanas (1×10^6 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=12$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/espocistos/esporozoítos (Ag), 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CCL11 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

6.3 Participação de receptores *Toll-like* na produção de quimiocinas após estimulação de PBMCs com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*

A pré-incubação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com anticorpos neutralizadores de TLR2 (anti-TLR2) e TLR4 (anti-TLR4) não influenciou a produção de CXCL8 e CCL2 após a estimulação com oocistos e antígenos solúveis de *C. belli* (Fig. 14 e 15) ($p > 0,05$). Foi observada diminuição na produção de CXCL8 após o bloqueio do TLR2, todavia sem significância estatística ($p = 0,38$).

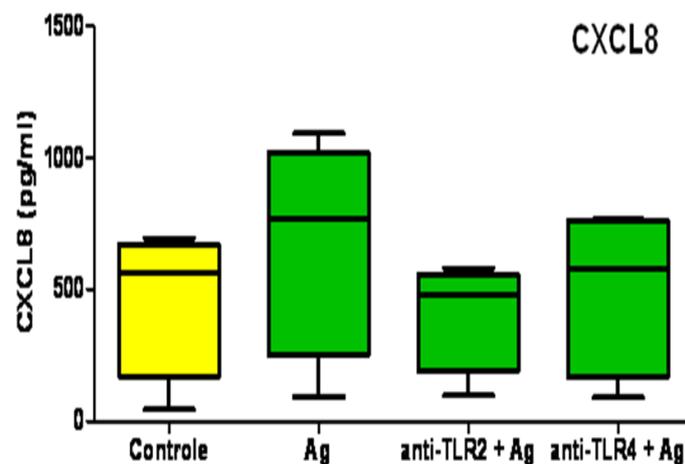


Figura 14: Efeito do bloqueio de receptores *Toll* 2 e 4 com anticorpos monoclonais (Anti-TLR2 e Anti-TLR4) sobre a produção de CXCL8 (IL-8) por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis extraídos de oocistos/esporecistos/esporezoítos (Ag) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CXCL8 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$).

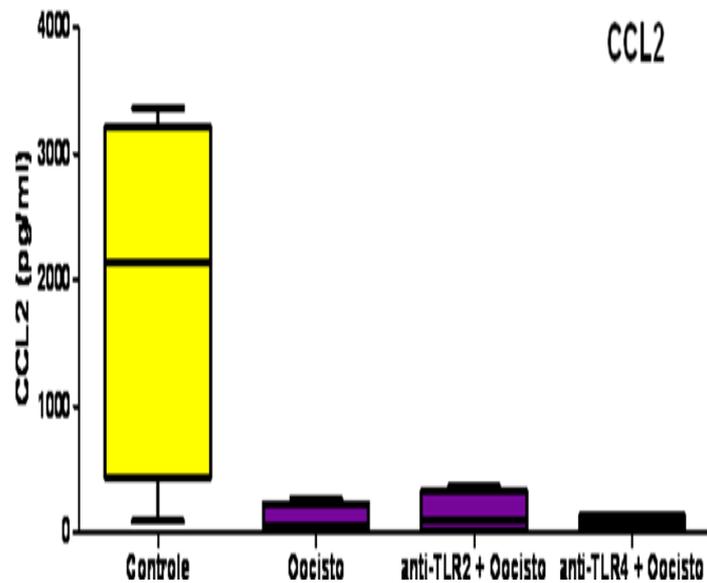


Figura 15: Efeito do bloqueio de receptores *Toll* 2 e 4 com anticorpos monoclonais (Anti-TLR2 e Anti-TLR4) sobre a produção de CCL2 (MCP-1) por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com 20000 oocistos/ml de *C. belli* (oocistos) ou somente meio de cultura (controle). A produção de CCL2 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

6.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por PMNs após estimulação com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*

Os antígenos solúveis de *C. belli* não induziram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células polimorfonucleares do sangue periférico (PMNs) ao contrário dos oocistos íntegros de *C. belli* que induziram a produção de ROS ($p=0,0008$), embora em quantidade bastante inferior à observada na estimulação com zymosan opsonizado (Fig. 16 e 17). A pré-incubação de PMNs com anticorpos monoclonais bloqueadores de receptores *Toll-like* (TLR-2 e TLR-4) inibiu a produção de ROS ($p=0,0097$) por granulócitos humanos estimulados com oocistos íntegros de *C. belli* (Fig. 18 e 19). Este fenômeno foi mais acentuado para o TLR-4.

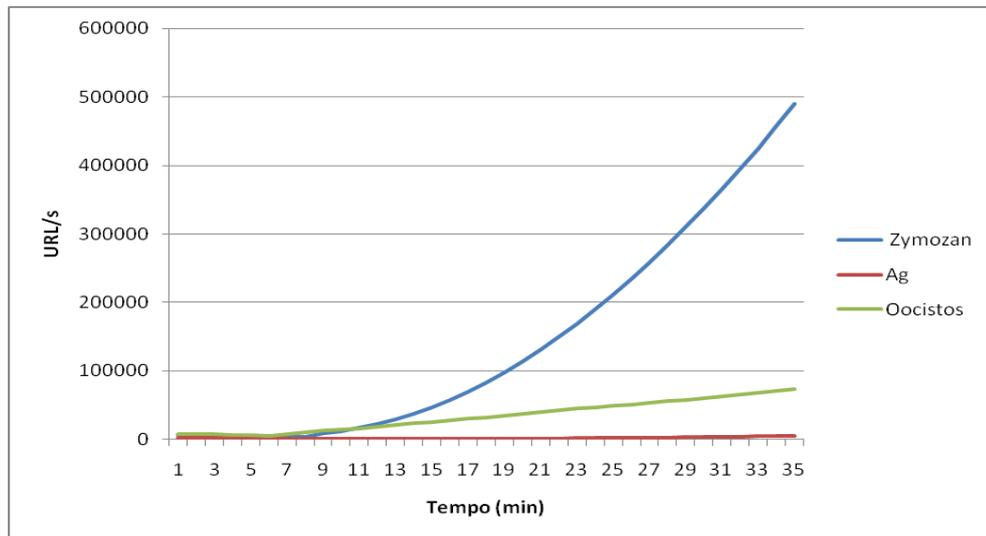


Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com zymosan (controle positivo), $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis de *C. belli* (Ag) e 20000 oocistos de *C. belli* (Oocistos). A produção de ROS foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (35 minutos) em luminômetro (Sirius - Berthold) e os resultados estão expressos em unidades relativas de luz por segundo URL/s. A figura mostra a cinética de um experimento representativo de quatro experimentos similares realizados.

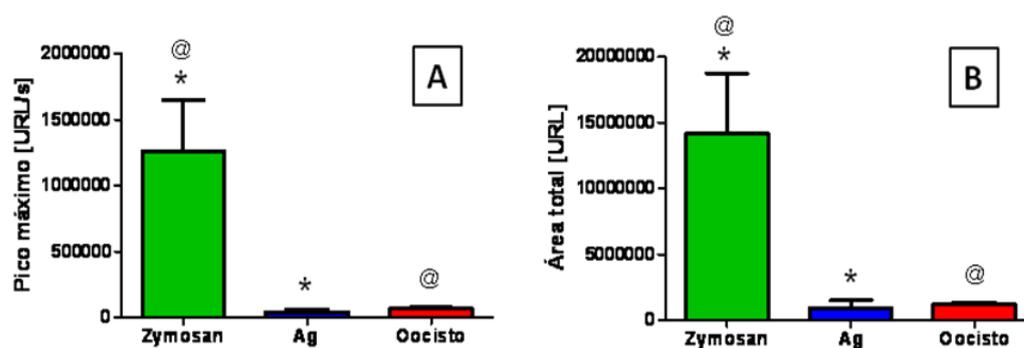


Figura 17: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos (5×10^5 /ml) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com zymosan (controle positivo), $20\mu\text{g/ml}$ de antígenos solúveis de *C. belli* (Ag) e 20000 oocistos de *C. belli* (Oocistos). A produção de ROS foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (35 minutos) em luminômetro (Sirius - Berthold) e os resultados estão expressos em pico máximo (A) e área total (B). A presença de símbolos iguais (*, @) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

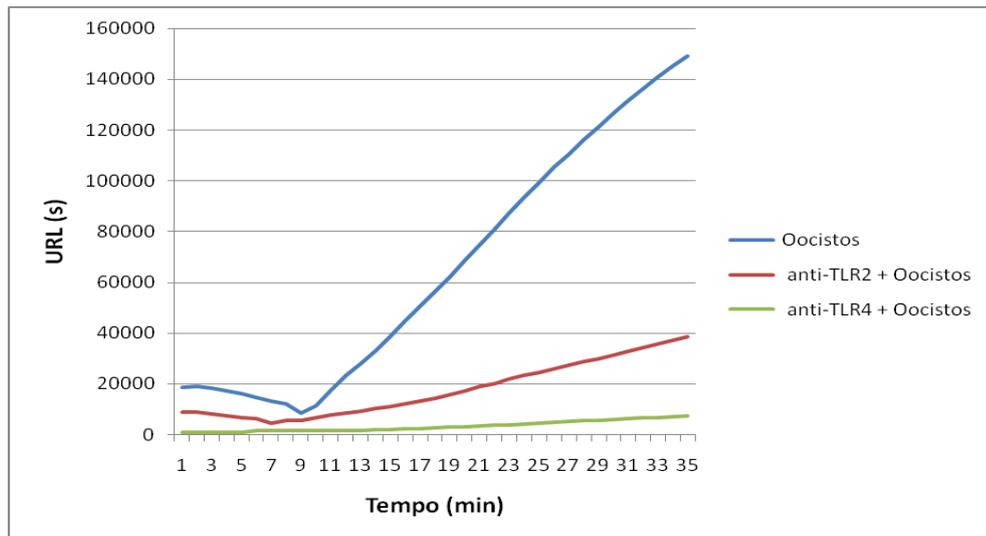


Figura 18: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos ($5 \times 10^5/\text{ml}$) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com 20000 oocistos de *C. belli* (Oocistos) na presença de anticorpos neutralizadores de TLR2 (anti-TLR2 + Oocistos) e TLR4 (anti-TLR4 + Oocistos). A produção de ROS foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (35 minutos) em luminômetro (Sirius - Berthold) e os resultados estão expressos em unidades relativas de luz por segundo URL/s. A figura mostra a cinética de um experimento representativo de quatro experimentos similares realizados.

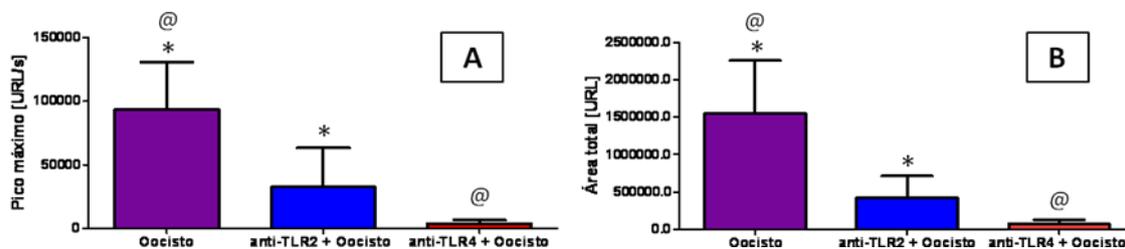


Figura 19: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos ($5 \times 10^5/\text{ml}$) obtidas de doadores voluntários saudáveis ($n=5$) após estimulação *in vitro* com 20000 oocistos de *C. belli* (Oocistos) na presença de anticorpos neutralizadores de TLR2 (anti-TLR2 + Oocistos) e TLR4 (anti-TLR4 + Oocistos). A produção de ROS foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (35 minutos) em luminômetro (Sirius - Berthold) e os resultados estão expressos em pico máximo (A) área total (B). A presença de símbolos iguais (*, @) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

7 DISCUSSÃO

A ausência de um modelo experimental tem dificultado o conhecimento da biologia deste parasito e estudos *in vitro* podem auxiliar no conhecimento dos principais mediadores produzidos na relação parasito/hospedeiro. Entretanto, até o momento não existem estudos, que sejam de nosso conhecimento, descrevendo o perfil de citocinas, quimiocinas e receptores envolvidos nas interações entre *C. belli* e células do sistema imunológico. Estes estudos podem levar a um maior conhecimento da interação entre *C. belli* e células do hospedeiro além do desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desta infecção em populações de risco.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram aumento das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β (Figuras 1 e 2) após a interação entre os antígenos de *C. belli* e PBMCs humanas *in vitro*. Diferentemente de helmintos intestinais que evocam uma resposta do tipo Th2 em humanos (com alta produção de IL-13, IL-4 e IL-5), a resposta ao protozoário *C. belli* parece envolver mediadores com características pró-inflamatórias que, em excesso ou não regulados apropriadamente, poderiam ser responsáveis pelo agravamento de alguns sintomas associados a esta infecção. A IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias que se administradas em humanos produzem febre, inflamação, destruição tecidual e, em alguns casos, choque e morte. É possível que uma forte reação inflamatória causada por *C. belli* possa induzir a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , levando a produção de CXCL8 (Figura 11) capaz de atrair neutrófilos e linfócitos T para o local da inflamação. A indução da produção de CXCL8 pelos antígenos deste protozoário também sugere um papel importante para os neutrófilos nesta infecção, uma vez que CXCL8 é capaz de atrair neutrófilos e o bloqueio com anticorpo anti-CXCL8 diminui a quimiotaxia de neutrófilos

(CHAKRAVORTTY & KUMAR, 1999). Células polimorfonucleares (PMN) foram identificadas como uma fonte de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α durante a infecção com *T. gondii* em humanos e camundongos, um coccídio estreitamente relacionado com *C. belli* em estudos filogenéticos (DENKERS et al., 2004). Assim, PMNs no local da inflamação participam do recrutamento e da ativação de outras células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas que desempenham um papel central como um elo entre a resposta imune inata e adaptativa.

Tem sido proposto que *Cystoisopora belli* é um parasito específico do homem visto que nenhum outro hospedeiro é, até o presente momento, reconhecido como susceptível a este. Esporozoítos são capazes de invadir células epiteliais do intestino delgado humano e embora esta especificidade ocorra “*in vivo*”, a observação feita por OLIVEIRA-SILVA et al (2006) “*in vitro*” que esporozoítos também são capazes de invadir e multiplicar em quatro outros tipos celulares (VERO, HCT8, MDBK e A549) sugere que existam receptores envolvidos na penetração em diferentes tipos celulares e hospedeiros.

No estudo de OLIVEIRA-SILVA et al (2006), embora esporozoítos e merozoítos de *C. belli* tenham penetrado em todas as linhagens celulares estudadas, sua habilidade em invadir e multiplicar variou, sendo melhor em células VERO, onde uma infecção múltipla por esporozoítos e maior número de merozoítos foi observado. Estes resultados, aliados aos estudos preliminares com culturas de macrófagos murinos e humanos, demonstraram que este parasito não apenas penetra, mas também se multiplica nestes tipos celulares, mesmo após ativação (RESENDE et al. 2009), o que reforça a hipótese que diferentes receptores de adesão e internalização estão envolvidos no processo de penetração de esporozoítos e merozoítos de *C. belli* em diferentes tipos celulares.

Quanto às quimiocinas estudadas, os resultados obtidos mostram uma redução na produção da proteína quimiotática de monócitos CCL2 (Figura 10), quando as células

mononucleares foram cultivadas na presença de oocistos de *C. belli*, sugerindo a existência de um possível mecanismo de escape deste parasito. A inibição da produção de CCL2 pode conduzir a uma redução da quimiotaxia e da ação citotóxica de monócitos e macrófagos humanos contra este protozoário. Observamos também que, na presença de antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*, as PBMCs produziram reduzidas quantidades de CXCL10 em comparação ao controle (células não estimuladas) (Figura 9). Esses dados poderiam ocorrer basicamente devido a duas possíveis causas: 1) diminuição da produção de IFN- γ causada pelos antígenos de *C. belli*, uma vez que essa quimiocina (CXCL10) é secretada em resposta ao IFN- γ ; 2) possível alteração no receptor do IFN- γ ou na sua via de sinalização, levando a uma redução na produção de CXCL10, uma vez que esta quimiocina é fortemente induzida por IFN- γ . Os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que antígenos solúveis e oocistos de *C. belli* não alteram a produção de IFN- γ e IL-12p40 por PBMCs (Figuras 4 e 5), mas reduziram a produção de CXCL10 sugerindo que a segunda hipótese seja a explicação mais provável para estes dados. A CXCL10 é uma importante quimiocina de linfócitos T ativados e regula a proliferação celular, apoptose e expressão de moléculas de adesão (NEVILLE et al., 1997). A diminuição da produção desta quimiocina por células infectadas poderia resultar na redução do recrutamento de células efetoras como NK, LTh1 e monócitos/macrófagos, resultando assim na diminuição da resposta celular do hospedeiro ao parasito. KHAN et al. (2000) observaram que em camundongos infectados com cistos teciduais de *T. gondii* a neutralização de CXCL10 inibiu a infiltração de células T efetoras em tecidos infectados, resultando no aumento de mortalidade e também da carga parasitária tecidual, refletindo em diferentes alterações histopatológicas dos órgãos envolvidos. Assim, CXCL10 representa uma ligação funcional entre a produção de IFN- γ e a função de células T efetoras necessárias para a contenção do parasito.

O IFN- γ é um mediador importante para a ativação de mecanismos efetores antimicrobianos em macrófagos infectados com patógenos intracelulares como *Mycobacterium spp*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania spp* (DENKERS & GAZZINELLI, 1998, SOLBACH & LASKAY, 2000; SALGAME, 2005). Para contornar parcialmente a defesa do hospedeiro, esses patógenos desenvolveram mecanismos que interferem em várias etapas da cascata de sinalização do IFN- γ . Um dos principais ativadores de macrófagos é o IFN- γ , que inicia uma sinalização adequada para criar uma resposta funcional que leva à morte de patógenos invasores. A estimulação com IFN- γ resulta na ativação da via de transdução de sinal JAK-STAT (BACH et al., 1997). O IFN- γ se liga ao seu receptor na superfície celular, IFN- γ R, que consiste de duas subunidades heterodiméricas, IFN- γ R1 (α) e IFN- γ R2 (β), que são associados com JAK1 e JAK2, respectivamente. Essa ligação resulta na dimerização do receptor e fosforilação de JAK1 e JAK2. As proteínas tirosina quinases JAK1 e JAK2 fosforiladas são responsáveis pela fosforilação de IFN- γ R1, recrutamento de STAT1 e sua fosforilação. A fosforilação de STAT1 resulta na dimerização e translocação para o núcleo e inicia a transcrição gênica. O IFN- γ R é expresso em células linfóides (como em monócitos/macrófagos, células T, B, NK e PMN) e células não-linfóides (como fibroblastos e células endoteliais) (IGARASHI et al., 1994). Em estudos preliminares, avaliamos a capacidade de antígenos de *C. belli* de afetar a via de sinalização do IFN- γ e verificamos que a estimulação de células mononucleares do sangue periférico humano com antígenos solúveis e oocistos íntegros de *C. belli* provocou diminuição da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (dados não mostrados) e diminuição da produção da quimiocina CXCL10 (Figura 9), porém, sem alterar a produção de IFN- γ e IL-12 (Figuras 4 e 5). Estes dados sugerem possível mecanismo de escape desenvolvido por *C. belli* para favorecer a sua sobrevivência intracelular e o desenvolvimento da doença (Figura 20).

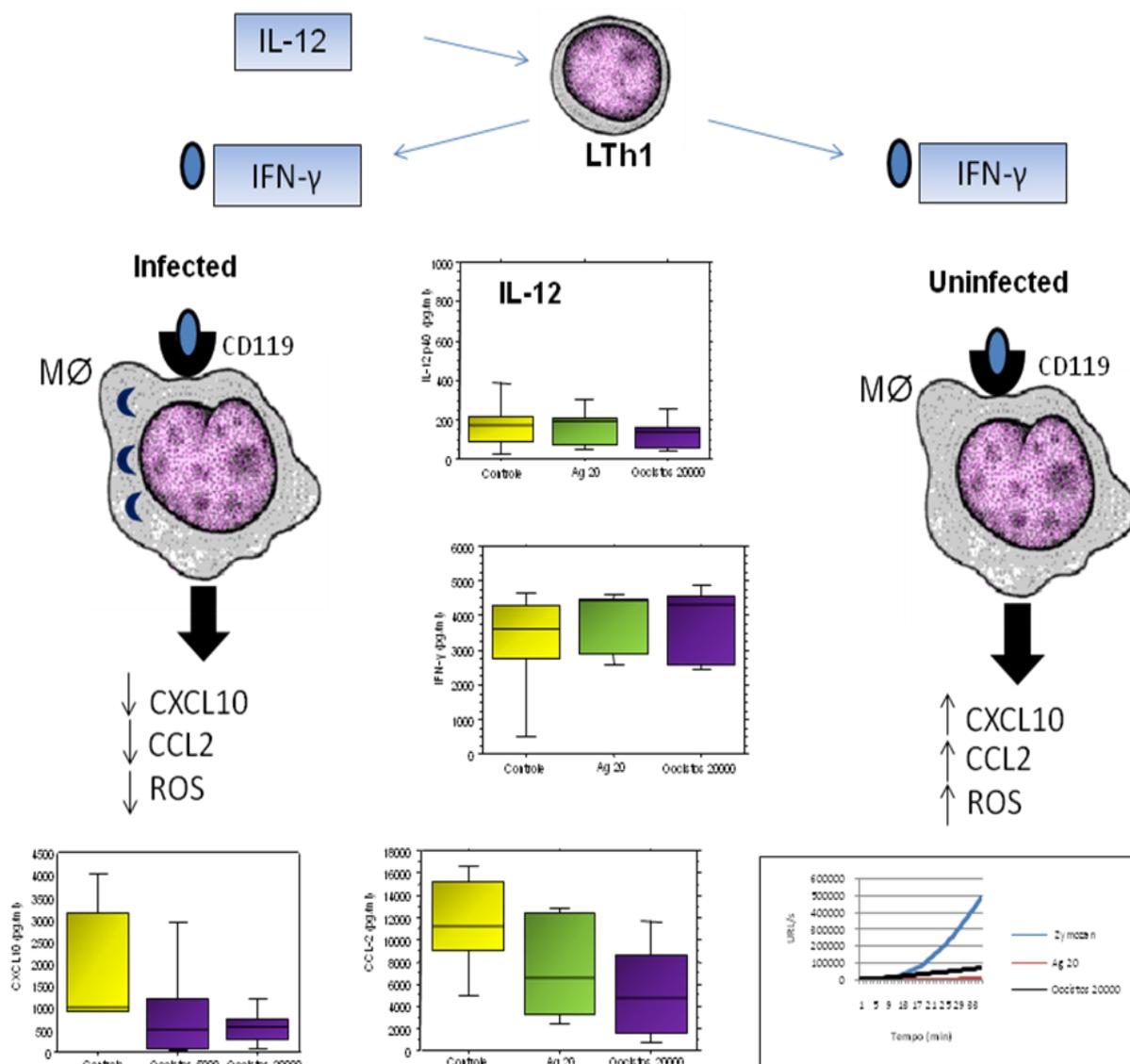


Figura 20: Modelo esquemático proposto para os efeitos de antígenos de *C. belli* sobre células mononucleares humanas. A estimulação de células mononucleares do sangue periférico humano com antígenos solúveis e oocistos íntegros de *C. belli* provoca a diminuição da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD119) e diminuição da produção das quimiocinas CXCL10 e CCL2 e de espécies reativas de oxigênio (ROS), porém, sem alterar a produção de IFN- γ e IL-12.

Várias patógenos como *Leishmania donovani* (RAY et al., 2000), *Trypanosoma cruzi* (KIERSZENBAUM et al., 1995), e *Mycobacterium avium* (HUSSAIN et al., 1999) provocam uma diminuição da expressão de IFN- γ R1. HUSSAIN et al. (1999) observaram que *Mycobacterium avium* inibe a expressão de genes induzíveis por IFN- γ em macrófagos murinos. Este efeito inibitório ocorre devido à baixa expressão de IFN- γ R resultando na diminuição da sinalização JAK-STAT. Estes dados representam um mecanismo pelo qual

micobactérias são capazes de evadir a resposta imune estabelecendo uma infecção crônica. Em outro estudo, SINGHAL et al. (2007) demonstraram que a expressão de IFN- γ R1 em PBMC circulantes e em células CD14+ foi significativamente menor em pacientes com tuberculose pulmonar em relação aos pacientes saudáveis, contudo, após o tratamento anti-tuberculose, houve um aumento da expressão deste receptor em PBMC derivados de pacientes. Segundo os autores, a baixa expressão de IFN- γ R1 pelo *M. tuberculosis* está relacionada com a redução da expressão do gene IFNGR1. BUSSMEYER et al. (2010) observaram que a infecção de PMN com *Anaplasma phagocytophilum*, uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, que infecta polimorfonucleares (PMN), o agente causador da anaplasmose granulocítica humana (AGH), provocou uma diminuição na expressão da cadeia alfa do receptor de superfície celular do IFN- γ (CD119) e diminuição da fosforilação de STAT1. Os autores sugerem que o comprometimento na sinalização do IFN- γ provavelmente favorece a sobrevivência de *Anaplasma phagocytophilum* em neutrófilos, que por sua vez contribui para o desenvolvimento da doença (AGH). Outro estudo demonstrou que macrófagos infectados com *Mycobacterium avium*, *Leishmania major* ou *Leishmania mexicana* mostraram uma redução na expressão do receptor de IFN- γ e comprometimento da fosforilação de JAK1, JAK2 e STAT1 (BHARDWAJ et al., 2005, HUSSAIN et al., 1999). A alteração na regulação de IFN- γ R1 pode ser um dos prováveis mecanismos empregado pelo *M. tuberculosis* para alterar a resposta ao IFN- γ em uma célula infectada, inibindo assim o potencial de funções microbidas de macrófagos mediadas pelo IFN- γ (SINGHAL et al., 2007).

Na criptosporidiose, células T são ativamente envolvidas na resposta inflamatória induzida pelo parasito através da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Após a ligação do IFN- γ com seu receptor, IFN- γ R, e a subsequente ativação da via JAK/STAT, a sinalização nuclear resulta na tradução de um conjunto de genes específicos levando ao controle da

infecção (WEBER-NORDT et al., 1998). O IFN- γ é uma das primeiras citocinas a ser expressa na mucosa intestinal de humanos e animais infectados com *Cryptosporidium* (McDONALD, 2000). Em um modelo, *in vitro*, IFN- γ age diretamente sobre os enterócitos para inibir a invasão e desenvolvimento intracelular do parasito. Nossos resultados sugerem que uma possível alteração na resposta celular ao IFN- γ , com uma conseqüente redução na produção de CXCL10, poderia ser um mecanismo de escape desenvolvido por *C. belli* para prolongar a sua sobrevivência intracelular e contribuir para o desenvolvimento da doença. Portanto, outras investigações devem ser realizadas a fim de se verificar a real importância da sinalização mediada por IFN- γ na cistossporose humana.

O reconhecimento de microorganismos patogênicos por TLRs em células humanas tem sido apontado como um campo de investigação altamente promissor (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2003; ROEDER et al., 2004). Os TLRs são proteínas transmembranas do tipo 1 caracterizadas por seqüências extracelulares repetidas ricas em leucina capazes de reconhecer um amplo grupo de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) de diferentes espécies de microorganismos e fundamentais para a ativação da resposta imune inata (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2003). A estimulação de diferentes tipos de TLRs tem sido associada ao desenvolvimento de respostas pró ou antiinflamatórias, dependendo do tipo de receptor *Toll-like*, da formação ou não de heterodímeros e da via de transdução de sinal utilizada. (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2003). Em um estudo com o fungo *Cândida albicans* mostrou-se que a estimulação do TLR-4 leva a liberação de quimiocinas, recrutamento de leucócitos com conseqüente proteção para o hospedeiro, enquanto que a estimulação do TLR-2 leva a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 que auxilia no escape de *C. albicans* (NETEA et al., 2002). O bloqueio de TLR2 com anticorpo específico (anti-TLR2) inibiu fortemente a liberação de TNF- α e IL-1 β

por células mononucleares humanas estimuladas com *C. albicans*, indicando que a liberação dessas citocinas ocorre através desse receptor (NETEA et al., 2002).

Zymosan, um agonista de TLR2, é um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que tem sido utilizado, *in vitro*, como modelo para o estudo da resposta imune inata, porque é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, mecanismos de fagocitose e ativação do complemento. Assim, a fagocitose do zymosan é mediada por um repertório de receptores que reconhecem a partícula e mediam a sua internalização. UNDERHILL et al. (1999, 2000) demonstraram que a fagocitose do zymosan é acompanhada pelo recrutamento de TLR2/TLR6 ao fagossomo e que a ativação do heterodímero TLR2/TLR6 por zymosan é necessário para a resposta inflamatória, tais como a produção de TNF- α e ativação de NF- κ B. A ativação de TLR não é necessária para a ligação ou internalização da partícula, uma vez que a inibição de TLR2 ou MyD88 (uma molécula adaptadora necessária para a sinalização de TLR) bloqueiam a sinalização pró-inflamatória, mas não altera a absorção da partícula (UNDERHILL et al., 1999). Assim, TLRs mediam as respostas inflamatórias ao zymosan e receptores adicionais de reconhecimento inato mediam a fagocitose. Neste estudo avaliamos o papel do TLR2 e TLR4 na produção das quimiocinas CXCL8 e CCL2 tendo o zymosan como controle positivo da reação. Embora tenhamos observado uma tendência à inibição de CXCL8 (Figura 11) por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas com antígenos solúveis de *C. belli* após bloqueio de TLR2, a pré-incubação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com anticorpos bloqueadores de TLR2 (anti-TLR2) e TLR4 (anti-TLR4) não afetou significativamente a produção de CXCL8 e CCL2 após a estimulação com oocistos e antígenos solúveis de *C. belli* (Figuras 14 e 15). Nossos dados sugerem que os receptores TLR2 e TLR4 não estão envolvidos diretamente na produção das quimiocinas CXCL8 e CCL2 após a interação de *C. belli* com as células do sistema imunológico. Contudo, estudos

adicionais devem ser realizados visando identificar outros receptores envolvidos na resposta a *C. belli*.

A ativação do sistema imune inato resulta em resposta inflamatória, o que é essencial para um rápido controle das infecções. Os fagócitos são especialmente importantes para a resposta inflamatória aguda, devido à sua capacidade de destruir efetivamente uma variedade de patógenos. Entre os fagócitos, os neutrófilos são os mais numerosos, e são geralmente as primeiras células a chegarem ao local da inflamação. Os neutrófilos utilizam uma ampla gama de produtos microbicidas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO), peptídeos microbicidas e enzimas líticas (WITKO-SARSAT et al., 2000). A produção de ROS por neutrófilos resulta da ativação de um complexo enzimático conhecido como NADPH oxidase (QUINN & GAUSS, 2004) capaz de produzir mediadores da morte intracelular de patógenos. Diversos estudos têm demonstrado que um dos principais mecanismos de evasão utilizados por uma variedade de patógenos intracelulares envolve a inibição da NADPH oxidase. Em nosso estudo, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio e observamos que antígenos solúveis de *C. belli* não são capazes de induzir a produção de níveis significativos de ROS por granulócitos humanos (Figuras 16 e 17), provavelmente favorecendo o escape deste parasito ao ataque citotóxico e oxidativo pelas células imunológicas do hospedeiro. Ao contrário dos antígenos solúveis, os oocistos íntegros de *C. belli* são capazes de induzir a produção de ROS por granulócitos humanos (Figuras 16 e 17), embora em níveis não muito elevados se comparados a outros antígenos, tais como o zymosan, um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Com relação ao bloqueio de TLR2 e TLR4 com anticorpos neutralizadores específicos observamos uma inibição da produção de ROS por granulócitos humanos estimulados com oocistos de *C. belli* (Figuras 18 e 19). Os dados sugerem que a produção de ROS induzida por oocistos de *C. belli* é fortemente dependente de TLR4 e em menor grau do

TLR2 sugerindo um papel importante destes receptores neste processo. O LPS, um agonista específico de TLR4 induz a explosão respiratória e produção de espécies reativas de oxigênio em uma linhagem de células monocíticas THP-1, sugerindo que sinalização de ROS depende de TLR4 (RYAN et al., 2004). Uma vez que o estresse oxidativo em neutrófilos é mediado principalmente pela ativação de NADPH oxidase, nossos dados sugerem que TLR2 e TLR4 podem estar envolvidos na ativação de enzimas relacionadas com a defesa do hospedeiro. Contudo, as vias e os mecanismos específicos que levam à ativação desta enzima ainda não são totalmente conhecidos (REMER et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento da produção de TNF- α e CXCL-8 (IL-8) por PBMCs humanas estimuladas com antígenos solúveis de *C. belli*, a inibição da produção basal de IL-10 e CCL2 (MCP-1) quando estimuladas com oocistos de *C. belli*, o aumento da produção de IL-1 β e inibição da produção de CXCL10 (IP-10) por PBMCs estimuladas com antígenos solúveis e oocistos de *C. belli*. Os níveis de IL-12p40, IFN- γ , IL-13, IL-4, IL-6, CCL11(eotaxina), e CCL3 (MIP-1 α) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com as células não estimuladas. Além disto, TLR2 e TLR4 parecem estar envolvidos na produção de ROS estimulada por oocisto de *C. belli*. A investigação dos mecanismos envolvidos na inibição da produção de CXCL10 e CCL2, assim como a participação dos TLRs na produção de ROS, pode contribuir para o conhecimento das estratégias de escape deste parasito a resposta imunológica do hospedeiro.

8 CONCLUSÕES

Em nosso estudo observamos um perfil com elevação de citocinas inflamatórias após a interação entre antígenos de *Cystoisospora belli* e células mononucleares humanas do sangue periférico. Antígenos solúveis de *C. belli* induzem a produção de TNF- α , IL-1 β e CXCL-8 por PBMCs humanas. Oocistos de *C. belli* inibem a produção basal de IL-10 e CCL2 por PBMCs. Antígenos solúveis e oocistos de *C. belli* inibem a produção de CXCL10 por PBMCs humanas sugerindo que estes antígenos podem estar afetando direta ou indiretamente a via de sinalização do IFN- γ . O bloqueio na produção de quimiocinas que ativam monócitos/macrófagos sugere a existência de um possível mecanismo de escape deste parasito *in vivo*.

Em nosso estudo, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio e observamos que antígenos solúveis de *C. belli* não induzem a produção de níveis significativos de ROS por granulócitos humanos, provavelmente favorecendo o escape deste parasito ao ataque citotóxico e oxidativo pelas células imunológicas do hospedeiro.

Nossos dados sugerem que os receptores TLR2 e TLR4 não estão envolvidos diretamente na produção das quimiocinas CXCL8 e CCL2 após a interação de *C. belli* com as células do sistema imunológico. Os resultados deste trabalho sugerem que a produção de ROS induzida por oocistos de *C. belli* é fortemente dependente de TLR4 e em menor grau do TLR2 sugerindo um papel importante destes receptores neste processo.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, L. B., HIBBS, J. B., TAINTOR, R. R., KRAHENBUHL J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **Journal Immun**, v. 144, p. 2725-2729. 1990.

AHUJA, S. S., PALIOGIANNI, F., YAMADA, H., BALOW, J. E., BOUMPAS, D. T. Effect of transforming growth factor- β on early and late activation events in human T cells. **J Immun**, v. 150, p. 1461-1471. 1993.

AKIRA, S., HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunol Lett**, v. 85, p. 85-95. 2003.

AKIRA, S., K. TAKEDA. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 499–511. 2004.

AKIRA, S., S. UEMATSU, O. TAKEUCHI. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801. 2006.

ANDRADE, C. G., GONÇALVES, A. P. C., IGLÉSIAS, J. D. F. Isosporose em Paciente Imunodeprimida - Relato de Caso. **Rev Med Minas Gerais**, v. 12, p. 52-54. 2002.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 411-420. 2008.

BACH, E. A., AGUET, M., SCHREIBER, R. D. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 563. 1997.

BARTA, J. R., SCHRENZEL, M. D., CARRENO, R., RIDEOUT, B. A. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **J Parasitol** v. 91, p. 726–727. 2005.

BECKERS, C. J. et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite and exposed to the host cell cytoplasm. **J Cell Biol**, v. 127, p. 947-961. 1994.

BENATOR, D. A., FRENCH, A. L., BEAUDET, L. M., LEVY, C. S., ORENSTEIN, J. M. *Isospora belli* Infection Associated with Acalculous Cholecystitis in a Patient with AIDS. **Ann Int Med**, v. 121, p. 663-664. 1994.

BHARDWAJ, N., ROSAS, L. E., LAFUSE, W. P., SATOSKAR, A. R. *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN- γ signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant-negative STAT1 by *Leishmania mexicana*. **Int J Parasitol**, v. 35, p. 75–82. 2005.

BIALEK, R., BINDER, N., DIETZ, K., KNOBLOCH, J., ZELCK, U. E. Comparison of Autofluorescence and Iodine Staining for Detection of *Isospora belli* in feces. **Am Soc Trop Med Hyg**, v. 67, p. 304-305. 2002.

BLISS, S. K., ZHANG, Y., DENKERS, E. Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma independent IL-12. **J Immunol**, v. 4, p. 2081-2088. 1999.

BOURGUIN, I., MOSER, M., BUZONI-GATEL, D., TIELEMANS, F., BOUT, D., URBAIN, J., LEO, O. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. **Infec Immun**, v. 66, p. 4867-4874. 1998.

BOX, E. D. et al. Ultrastructure of *Sarcocystis* sporocysts from passerine birds and opossums: Comments on classification of the genus *Isospora*. **J Parasitol**, v. 66, p. 68-74. 1980.

BUZONI-GATEL, D., DEBBAI, H., MENNECLAT, F. D., MARTIN, J., LEPAGE, A. C., SCHWARTZMAN, J. D., KASPER, L. H. Acute inflammatory ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF- β producing intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterol**, v. 120, p. 914-924. 2006.

BUSSMEYER, U., SARKAR, A., BROSZAT, K., LÜDEMANN, T., MÖLLER, S., ZANDBERGEN, G., BOGDAN, C., BEHNEN, M., J. Stephen DUMLER, J. S., LOEWENICH, F. D., SOLBACH, W., LASKAY, T. Impairment of Gamma Interferon Signaling in Human Neutrophils Infected with *Anaplasma phagocytophilum*. **Infec Immun**, vol. 78, p. 358–363, 2010.

CAPUANO, D. M., OKINO, M. H. T., BETTINI, M. J. C. B. Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para HIV na região de Ribeirão Preto, SP – Brasil. Ver **Inst Adolfo Lutz**, v. 60, p. 11-15. 2001.

CARRENO, R. A., SCHNITZLER, B. E., JEFFRIES, A. C., TENTER, A. M., JOHNSON, A. M., BARTA, J. R. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence

comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. **J Euk Microbiol**, v. 42, p. 184–188. 1998.

CARRUTHERS, V. B., SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Biol**, v. 73, p. 114-123. 1997.

CHAKRAVORTTY, D., KUMAR, K. S. N. Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1453, p. 261-272, 1999.

CIMERMAN, S., CIMERMAN, B., LEWI, D. S. Enteric parasites and AIDS. São Paulo **Med J**, v. 117, p. 266-273. 1999.

DARDALHON, V., AWASTHI, A., KWON, H., GALILEOS, G., GAO, W., SOBEL, R. A., MITSDOERFFER, M., STROM, T. B., ELYAMAN, W., HO, I. C., et al. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. **Nat Immunol**, v. 9, p. 1347–1355. 2008.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., AZZOUZ, N., SCHMIDT, J., DUBREMETZ, J. F., GEYER, H., GEYER, R., WEINGART, R., SCHMIDT, R. R., SCHWARZ, R. T. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*: induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. **J Biol Chem**, v. 278, p. 32987–32993. 2003.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., CAMPOS, M. A., AZZOUZA, N., et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 179, p. 1129–1137, 2007.

DENG, M., RUTHERFORD, M., S., ABRAHMSSEN, M., S. Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, p. 869– 884. 2004.

DENKERS, E. Y., BUTCHER, B. A., DEL RIO, L., BENNOUNA, S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 411–421. 2004.

DENKERS, E. Y., GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 569–588. 1998.

DOBBEL, C. A revision of the Coccidia parasitic in Man. **Parasitol**, v. 11, p. 147. 1919.

DUBEY, J. P., MEHLHORN, H. Extraintestinal stages of *Isoospora ohioensis* from dogs in mice. **J Parasitol**, v. 64, p. 689-695. 1978.

DUBREMETZ, J. F., SCHWARTZMAN, J. D. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. **Res Immunol**, v. 144, p. 31-33. 1993.

ELSDON-DEW, R. *Isoospora natalensis* (sp. nov.) in man. **J Trop Med Hyg**, v. 56, p. 149-150. 1953.

ESCOBEDO, A. A., NUNEZ, F. A. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. **Acta Trop**, v. 72, p. 125-130. 1999.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 820-832. 2004.

FATTORI, E., CAPPELLETTI, M., COSTA, P., SELBITTO, C., CANTONI, L., CARELLI, M., FAGGIONI, R., FANTUZZI, G., GHEZZI, P., POLI, V. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **J Exp Med**, v. 180, p. 1243-1250. 1994.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Vet Parasitol**, v. 6, p. 75-103. 1980.

FAYER, R., MAHRT, J. L. Development of *Isoospora canis* (Protozoa; Sporozoa) in cell culture. **Z Parasitenk**, v. 38, p. 313-318. 1972.

FERREIRA, L. F., COUTINHO, S. G., ARGENTO, C. A., SILVA, J. Experimental human coccidial enteritis by *Isoospora belli* Wenyon, 1923. **O Hosp** v. 62, p. 795-804. 1962.

FINKELMAN, F. D., PEARCE, E. J., URBAN, J. F. Jr., SHER, A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. **Immunol Today**, v. 12, p. 62-66. 1991.

FONER, A., M. R. C. S., L. R. C. P., D. T. M., H. Na attempt to infect animals with *Isoospora belli*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 33, p. 357-358. 1939.

FRANZEN, C., MULLER, A., BIALEK, R., DIEHL, V., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isoospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. **Parasitol Res**, v. 86, p. 669-676. 2000.

FRENKEL, J. K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. **J Parasitol**, v. 63, p. 611-628. 1977.

FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P. Rodents as Vectors for Feline Coccidia, *Isoospora felis* and *Isoospora rivolta*. **J Infect Dis**, v. 125, p. 69-72. 1972.

FRENKEL, J. K., et al. *Isoospora belli* infection: Observation of Unicellular Cysts in Mesenteric Lymphoid Tissues of a Brazilian Patient with AIDS and Animal Inoculation. **J Euk Microbiol**, v. 50, p. 682-684. 2003b.

FRENKEL, J. K., SILVA, M. B. O., SALDANHA, J. C., SILVA-VERGARA, M. L., CORREIA, D., BARATA, C. H., SILVA, E. L., RAMIREZ, L. E., PRATA, A. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de *Isoospora belli* em paciente com SIDA. Relato de caso. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 409-412. 2003a.

GARLIPP, C. R., BOTTINI, P.V., TEIXEIRA, A. T. L. S. The relevance of laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis and other coccidia. Ver **Inst Med Trop São – Paulo**, v. 37, p. 467-469. 1995.

GAZZINELLI, R. T., DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, p. 895-906. 2006.

GAZZINELLI, R. T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E. Y., HIENYS, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G., SHER, A. Parasite – induced Il-12 stimulates early IFN γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 153, p. 2533-2543. 1994.

GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T. A., LYONS, S., GODOWSKI, P. J., MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J Immunol**, v. 167, p. 1882-1885. 2001.

GIBSON, P. R. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? **Gut**, v. 53, p. 1724-1725. 2004.

GOODGAME, R. W. Understanding Intestinal Spore-Forming Protozoa: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isoospora*, and *Cyclospora*. **Ann Intern Med**, v. 124, p. 429-441. 1996.

GUITIÉRREZ, F., ARDAY, L. Cultivo de *Cystoisospora felis* (*Isospora felis* WASIELIWSKI, 1904; WENYON, 1923) em la membrana corioalantoidea de embrion de pollo. **Act Cient Ven**, v. 38, p. 474-483. 1987.

GUK, S. M., SEO, M., PARK, Y. K., OH, M. D., CHOE, K. W., KIM, J. L., CHOE, M. H., HONG, S. T., CHAI, J. Y. Parasitic infections in HIV-infected patients who visited Seoul National University Hospital during the period 1995-2003. **Korean J Parasitol**, v. 43, p. 1-5. 2005.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? Trends **Biochem Sci**, v. 31, p. 509–515. 2006.

HENRIKSEN, A., PHOLENZ, J. F. L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet Scand**, v. 22, p. 594-596. 1981.

HOFFMAN, W. A., PONS, I. A., JANER, I. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. The Puerto Rico J **Publ Health Trop Med**, v. 9, p. 283-298. 1934.

HUSSAIN, S., ZWILLING, B. S., LAFUSE, W. P. *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by downregulation of the IFN-gamma receptor. **J Immunol**, v. 163, p. 2041–2048. 1999.

IGARASHI, K., GAROTTA, G., OZMEN, L., ZIEMIECKI, A., WILKS, A. F., HARPUR, A. G., LARNER, A. C., FINBLOOM, D. S. Interferon- γ induced tyrosine phosphorylation of IFN- γ receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, JAK1, JAK2, with its receptor. **J Biol Chem**, v. 269, p. 14333. 1994.

IWASAKI, A., R. MEDZHITOV. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 5, p. 987–995. 2004.

JEFFERY, G. M. Human coccidiosis in South Carolina. **J Parasitol**, v. 42, p. 491-495. 1956.

KHAN, I. A., MACLEAN, J. A., LEE, F. S., CASCIOTTI, L., DEHAAN, E., SCHWARTZMAN, J. D., Andrew D. LUSTER, A. D. IP-10 Is Critical for Effector T Cell Trafficking and Host Survival in *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v. 12, p. 483–494. 2000.

KHAN, W. I., RICHARD, M., AKIHO, H., BLENNERHASSET, P. A., HUMPHREYS, N. E., GRENCIS, R. K., VAN SNICK, J., COLLINS, S. M. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. **Infect Immun**, v. 71, p. 2430–2438. 2003.

KIERSZENBAUM, F., LOPEZ, H. M., TANNER, M. K., SZTEIN, M. B. Trypanosoma cruzi-induced decrease in the level of interferon- γ receptor expression by resting and activated blood lymphocytes. **Parasite Immunol**, v. 17, p. 207–214. 1995.

KORN, T., BETTELLI, E., GAO, W., AWASTHI, A., JAGER, A., STROM, T. B., OUKKA, M., KUCHROO, V. K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. **Nature**, v. 448, p. 484–487. 2007.

LACROIX, S., MANCASOLLA, R., NACIRI, M., et al. Cryptosporidium parvum-specific mucosal responses in C57BL/6 neonatal and gamma interferon-deficient mice: role of tumour necrosis factor in protection. **Infect Immun**, v. 69, p. 1635-1642. 2001.

LAINSON, R., SILVA, B. A. M. Intestinal Parasites of Some Diarrhoeic HIV-Seropositive Individuals in North Brazil, with Particular Reference to *Isoospora belli* wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobbel, 1918. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 94, p. 611-613. 1999.

LANGERMANS, J. A. M., VAN DER HULST, M. B. E., NIBBERING, P. H., HIEMSTRA, P. S., FRANSEN, L., VAN FURTH, R. IFN- γ induced L-arginine- dependent toxoplasma static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **J Immunol**, v. 148, p. 568-574. 1992.

LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A., CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med** v. 201, p. 233–240. 2005.

LAURENT, F., KAGNOFF, M. F., SAVIDGE, T. C., NACIRI, M., ECKMANN, L. Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2a production. **Infect Immun**, v. 66, p. 1787–1790. 1998.

LAURENT, F., L. ECKMANN, T. C. SAVIDGE, G. MORGAN, C. THEODOS, M. NACIRI, M. F. KAGNOFF. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. **Infect Immun**, v. 65, p. 5067–5073. 1997.

LEPP, D. L., TODD, K. S. Sporogony of the oocysts of *Isoospora canis*. **Trans Am Microsc Soc**, v. 95, p. 89-103, 1976.

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **J Protozool**, v. 35, p. 518-520. 1988.

LIANG, S. C, TAN, X. Y, LUXENBERG, D. P, KARIM, R., DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., COLLINS, M., FOUSER, L. A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coex-pressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med**, v. 203, p. 2271–2279. 2006.

LIESENFELD, O. Oral infection of C57Bl/6 mice with *Toxoplasma gondii*: A new model of inflammatory bowel disease? **J Infec Dis**, v. 185, p. 96-101. 2002.

LIESENFELD, O., KANG, H., PARK, D., NGUYEN, T. A., PARKHE, C. V., WATANABE, H., ABO, T., SHER, A., REMINGTON, J. S., SUZUKI, Y. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Paras Immun**, v. 21, p. 365-376. 1999.

LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L. Biology of Mammalian *Isospora*. **Parasitol Tod**, v. 10, p. 214-220. 1994.

LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L. Development of *Isospora suis* of from pigs in primary porcine and bovine cell cultures. **Vet Parasitol**, v. 24, p. 301-304. 1987.

LINDSAY, D. S., CURRENT, W. L., ERNST J. V. Sporogony of *Isospora suis* Biester, 1934 of swine. **J Parasitol**, v. 68, p. 861–865. 1982.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P., BLAGBURN, B. L. Biology of *Isospora* spp. from Humans, Nonhuman Primates, and Domestic Animals. **Clin Microbiol Ver**, v. 10, p. 19-34. 1997.

LONG, P. L. **Coccidiosis of Man and Domestic Animals**. 1.ed.Florida.: CRC Press, Inc, p. 365. 1990.

MAHRT, J. L. Sporogony of *Isospora rivolta* oocysts from the dog. **J Protozool**, v.15, p. 308-312, 1968.

MARKUS, M. B. Origin of extra-intestinal stages of *Isospora belli* in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Med Hyp**, v. 35, p. 278. 1991.

MATSUI, T., ITO S., FUJINIO T., MORII T. Morii. Infectivity and sporogony of *Caryospora*-type oocysts of *Isospora rivolta* obtained by heating. **Parasitol Res**, v. 79, p. 599–602. 1993.

MCDONALD, V. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. **Parasite Immunol**, v. 22, p. 597-604. 2000.

MCKENNA, P. B., CHARLESTON, W. A. G. Activation and excystation of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* sporozoites. **J Parasitol**, v. 68, p. 276–286. 1982.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819–826. 2007.

MEDZHITOV, R., C. JANEWAY, Jr. Innate immunity. **N Engl J Med**, v. 343, p. 338–344. 2000.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A. Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 64, p. 429-435. 1999.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C. A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397. 1997.

MEIRA, J. A., CORRÊA, M. O. A. Isosporose humana: Considerações sobre 28 casos. **Ver Inst Adolfo Lutz**, v. 10, p. 117-139. 1950.

MENNECHET, F. J., KASPER, L. H., RACHINEL, N., LI, W., VANDEWALLE, A., BUZONI-GATEL, D. Lamina propria CD4⁺ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **J Immunol**, v. 168, p. 2988–2996. 2002.

MICALLEF, M. J, YOSHIDA, K., KAWAI, S., HANAYA, T., KOHNO, K., ARAI, S., TANIMOTO, T., TORIGOE, K., FUJII, M., IKEDA, M., et al. *In vivo* antitumor effects of murine interferon- γ -inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic meth a sarcoma malignant ascites. **Cancer Immunol Immunother**, v. 43, p. 361–367. 1997.

MICHIELS, L. A. et al. Intestinal and Extraintestinal *Isospora belli* Infection in na AIDS Patient. A second case report. **Path Res Pract**, v. 190, p. 1089-1093. 1994.

MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, p. 240–273. 2009.

MOORE, K. W., R. MALEFYT, W., COFFMAN, R. L., O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683–765. 2001.

MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, p. 2348–2357. 1986.

MOURA, H., FERNANDES, O., VIOLA, J. P. B., PASSOS, R. H., LIMA, D. B. Enteric Parasites and HIV infection: Occurrence in AIDS Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Instit Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 527-533. 1989.

MÜLLER, A., BIALEK, R., FÄTKENHEUER, G., SALZBERGER, B., DIEHL, V., FRANZEN, C. Detection of *Isospora belli* by Polymerase Chain Reaction Using Primers Based on Small-Subunit Ribosomal RNA Sequences. **Eur J Microbiol Infect Dis**, v. 19, p. 631-634. 2000.

NETEA, M. G., VAN DER GRAAF, C. A. A., VONK, A. G., VERSCHUEREN, I., VAN DER MEER, J. W. M., KULLBERG, B. J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J Infect Dis**, v. 185, p. 1483–1489. 2002.

NEVILLE, L. F., MATHIAK, G., BAGASRA, O. The immunobiology of interferon- gamma inducible protein 10 kD (IP-10): A novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. **Cytok Grow Fact Rev**, v. 8, p. 207-219. 1997.

NURIEVA, R., YANG, X. O., MARTINEZ, G., ZHANG, Y., PANOPOULOS, A. D., MA, L., SCHLUNS, K., TIAN, Q., WATOWICH, S. S., JETTEN, A. M., et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, p. 480–483. 2007.

OLIVEIRA-SILVA, M. B., LAGES-SILVA, E., RESENDE, D. V., PRATA, A., RAMIREZ, L. E., FRENKEL, J. K. *Cystoisospora belli*: In vitro multiplication in mammalian cells. **Exp Parasitol**, v. 114, p. 189-192. 2006.

OLIVEIRA-SILVA, M. B., OLIVEIRA, L. R., RESENDE, J. C. P., PEGHINI, B. C., RAMIREZ, L. E. LAGES-SILVA, E., CORREIA, D. Seasonal profile and level of CD4⁺ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, p. 512-515. 2007.

ORENSTEIN, J. M. Isosporiasis. **Infec Dis**, v. 2, p. 1185-1190. 1997.

RAILLIET, A., LUCET, A. Observations sur quelques coccidies intestinales. **C R Soc Biol**, v. 2, p. 660. 1890.

ORTEGA-MORA, L. M., TRONCOSO, J. M., ROJO-VASQUEZ, F. A., GÓMEZ-BAUTISTA, M. Evaluation of an improved method to purify *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Res Rev Parasitol**, v. 52, p. 127-130. 1992.

PETERS, C. S., SABLE, R., JANDA, W. M., CHITTON, A. L., KOCKA, F. E. Prevalence of Enteric Parasites in Homosexual Patients Attending an Outpatient Clinic. **J Clin Microbiol**, v. 24, p. 684-685. 1986.

PODOLSKY, D. K. Healing the epithelium: solving the problem from two sides. **J Gastroenterol**, v. 32, p. 122-126. 1997.

QUINN, M. T., GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. **J Leukoc Biol**, v. 76, p. 760-781. 2004.

RAY, M., GAM, A. A., BOUKINS, R. A., KENNY, R. T. Inhibition of interferon- γ signaling by *Leishmania donovani*. **J Infect Dis**, v. 181, p. 1121-1128. 2000.

REMER, K. A., BRCIC, M. Thomas W. Jungi. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immun Lett**, v. 85, p. 75- 80. 2003.

RESENDE, D.V, LAGES-SILVA, E., ASSIS, D. C., PRATA, A., OLIVEIRA-SILVA, M. B. Experimental infection of murine and human macrophages with *Cystoisospora belli*. **Acta Trop**, v. 111, p. 177-180. 2009.

RESENDE, D. V., PEDROSA, A. L., CORREIA, D., CABRINE-SANTOS, M., LAGES-SILVA, E., MEIRA, W. S. F., OLIVEIRA-SILVA, M. B. Polymorphisms in the 18S rDNA gene of *Cystoisospora belli* and clinical features of cystoisosporosis in HIV-infected patients. **J Parasitol**, *in press*.

RESTREPO, C., MACHER, A. M., RADANY, E. H. Disseminated Extraintestinal Isosporiasis in a Patient with Acquired Immune Deficiency Syndrome. **Am J Clin Pathol**, v. 87, p. 536-542. 1987.

RIGO, C. R., FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e *Acid-Fast-Trichrome* para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, p. 209-214. 2002.

RITCHIE, L. S. Na ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bull US Army Med Dept**, v. 8, p. 326. 1984.

ROBINSON, P., OKHUYSEN, P. C., CHAPPELL, C. L., et al. Expression of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejuna of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. **Infect Immun**, v. 69, p. 1172-1174. 2001.

ROCHA, L. G., SANTOS, T. J. A., 2002. *Isospora belli* em los pacientes com SIDA – Natal/Brasil. **Parasitol Latinoam**, v. 57, p. 161-165. 2002.

ROEDER, A., KIRSCHNING, C. J., RUPEC, R. A., SCALLER, M., KORTING, H. C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **TRENDS in Microbiol** v. 12, p. 44-49. 2004.

RYAN, K. A., SMITH, M. F. Jr., SANDERS, M. K., ERNST, P. B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. **Infect Immun**, v. 72, p. 2123-2130. 2004.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, p. 374–380. 2005.

SAMARASINGHE, B., JOHNSON, J., RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. **Exp Parasitol** v. 118, p. 592-595. 2008.

SAUDA, F. C., ZAMARIOLI, L. A., FILHO, W. E., MELLO, L. B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J Parasitol**, v. 79, p. 454-456. 1993.

SHAH, H. L. Sporogony of the oocysts of *Isospora felis* Wenyon, 1923 from the cat. **J Protozool**, v. 17, p. 609-614, 1970.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange by a floatation technique. **J Comp Pathol Therap**, v. 36, p. 266-275. 1923.

SHER, A., COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 385–409. 1992.

SHTRICHMAN, R., SAMUEL, C. E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, p. 251-259. 2001.

SHTRICHMAN, R., SAMUEL, C. E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, p. 251-259. 2001.

SINGHAL, A., JAISWAL, A., ARORA, V. K., PRASAD, H. K. Modulation of Gamma Interferon Receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a Potential Immune Response Evasive Mechanism. **Infec Immun**, v. 75, p. 2500–2510. 2007.

SIRIPANTH, C., PUNPOOWONG, B., AMARAPAL, P., THIMA, N. Development of *Isospora belli* in HCT-8, HEP-2, Human Fibroblast, BEK and VERO culture cells. **Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth**, v. 35, p. 796-800. 2004.

SOARES, R. L. S., CAMILLO-COURA, L., MAGALHÃES, L. F., TORRES, M. C., FONSECA, A. G., FONSECA, J. O. Isosporíase como causa freqüente de diarréia crônica em pacientes com AIDS em nosso meio. **An Acad Nac Med** v. 156, p. 24-25. 1996.

SOLBACH, W., LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv Immunol**, v. 74, p. 275–317. 2000.

STASSEN, M., FONDEL, S., BOPP, T., RICHTER, C., MULLER, C., KUBACH, J., BECKER, C., KNOP, J., ENK, A. .H, SCHMITT, S., et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4 \beta 7$ or $\alpha 4 \beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. **Eur J Immunol**, v. 34, p. 1303–1311. 2004.

STOWE, D. F., CAMARA, A. K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. **Antioxid Redox Sign**, v. 11, p. 1373-1414, 2009.

TAKEDA, K., KAISHO, T., AKIRA, S. Toll-Like Receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335–76. 2003.

UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 825–852. 2002.

UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A., HAJJAR, A. M., STEVENS, A., WILSON, C. B., BASSETTI, M. *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, p. 811–815. 1999.

VELDHOEN, M., UYTENHOVE, C., VAN SNICK, J., HEMBLEY, H., WESTENDORF, A., BUER, J., MARTIN, B., WILHELM, C., STOCKINGER, B. Transforming growth factor- β ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nat Immunol**, v. 9, p. 1341–1346. 2008.

VERDIER, R. I., FITZGERALD, D. W., Jr. JOHNSON, W. D., PAPE, J. W. P., Trimethoprim-Sulfamethoxazole Compared with Ciprofloxacin for Treatment and Prophylaxis of *Isospora belli* and *Cyclospora cayetanensis* Infection in HIV-Infected Patients. *Ann Int Med*, v. 132, p. 885-888. 2000.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. V: tratado de infectologia. **São Paulo: Atheneu**, v. 2, 1996.

WANG, H. C., DANN, S. M., OKHUYSEN, P. C., LEWIS, D. E., CHAPPELL, C. L., ADLER, D. G., WHITE, A. C. Jr. High levels of CXCL10 are produced by intestinal epithelial cells in AIDS patients with active cryptosporidiosis but not after reconstitution of immunity. **Infect Immun**, v. 75, p. 481–487. 2007.

WANIDWORANUN, C., STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. **J Immunol**, v. 151, p. 6853-6861. 1993.

WEBER-NORDT, R. M., MERTELSMANN, R., FINKE, J. The JAK-STAT Pathway: Signal Transduction Involved in Proliferation, Differentiation and Transformation. **Leuk Lymphoma**, v. 28, p. 459-467. 1998.

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. **Immunol Rev**, v. 182, p. 207–214. 2001.

WELLS, J. M., LOONEN, L. M P., KARCZEWSKI, L. M. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine.

WENIN, C. M. Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isospora* of man. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 17, p. 231-276. 1923.

WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P., HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, p. 617-653. 2000.

WIWANITKIT, V. Intestinal parasitic infections in Thai HIV-infected patients with different immunity status. **BMC Gastroenterology**, v. 1, p. 3. 2001.

WOODCOCK, H. M. Notes on the protozoan in the excreta, appended to paper by Ledingham and Penfold. **Brit Med J**, v. 2, p. 704. 1915.

WUHIB, T. et al. Cryptosporidial and Microsporidial infections in Human Immunodeficiency Virus-Infected patients in Northeastern Brazil. **J Infect Dis**, v. 170, p. 494-497. 1994.

YAP, G. S., SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiol**, v. 201, p. 240-247. 1999.

YEN, D., CHEUNG, J., SCHEERENS, H., POULET, F., MCCLANAHAN, T., MCKENZIE, B., KLEINSCHEK, M. A., OWYANG, A., MATTSON, J., BLUMENSCHHEIN, W., et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1310–1316. 2006.

ZHENG, Y., DANILENKO, D. M., VALDEZ, P., KASMAN I., EASTHAM-ANDERSON, J., WU, J., OUYANG, W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. **Nature**, v. 445, p. 648–651. 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)