



Daniel de Azevedo Teixeira

IMUNOLOGIA CLÍNICA

IMUNOLOGIA CLÍNICA

Daniel de Azevedo Teixeira

Teófilo Otoni – 2023

Copyright ©: Autores diversos

Projeto gráfico: Núcleo de Investigação Científica e Extensão (NICE)

Diagramação: Núcleo de Investigação Científica e Extensão (NICE)

Capa: Núcleo de Investigação Científica e Extensão (NICE)

ISBN: 978-65-84869-58-5

TEIXEIRA, D. A. (Organizador)

IMUNOLOGIA CLÍNICA - TEÓFILO OTONI - OUTUBRO/2023

ISBN: 978-65-84869-58-5

1. PUBLICAÇÕES 2. CAPÍTULOS 3. COLETÂNEAS

NICE 36

FACULDADE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS DE TEÓFILO OTONI

Núcleo de
Investigação
Científica e
Extensão - NICE

Assinado de forma digital por Núcleo de
Investigação Científica e Extensão - NICE
DN: cn=Núcleo de Investigação Científica
e Extensão - NICE, o=AlfaUnipac,
email=nice@unipacto.com.br, c=BR
Dados: 2022.10.26 15:26:05 -03'00'
Versão do Adobe Acrobat:
2022.003.20263

ISBN: 978-65-84869-58-5



DIREITOS PRESERVADOS – É proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio sem a citação dos autores. A violação dos direitos de autor (Lei Federal 9.610/1998) é crime previsto no art. 184 do Código Penal.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	8
1- PRINCIPAIS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	8
2- IMUNIDADE INATA	9
3- IMUNIDADE ADAPTATIVA	10
4- IMUNIZAÇÃO ATIVA	13
5- IMUNIDADE PASSIVA	14
CAPÍTULO II	19
1- ENSAIOS SOROLÓGICOS	19
2- ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO.....	23
3- IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES	25
4- TÉCNICAS ENVOLVENDO SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA.....	26
5- CONTRAIMUNOELETROFORESE	27
6- IMUNOELETROFORESE	27
7- IMUNOFIXAÇÃO.....	28
8- TURBIDIMETRIA	29
9- NEFELOMETRIA	29
10- REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO	30
11- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO DIRETA	30
12- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA OU INDIRETA	31
13- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA REVERSA	32
14- REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA AGLUTINAÇÃO	32
15- TESTE DE COOMBS DIRETO	33
16- TESTE DE COOMBS INDIRETO.....	34
17- REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (RID).....	35
18- REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RII)	35
19- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	37
20- CITOMETRIA DE FLUXO	39
21- FATOR REUMATÓIDE (FR).....	40
22- WESTERN-BLOT	40
23- PCR- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	41
CAPITULO III	43
1- IMUNOPATOLOGIA.....	43
2- FUNÇÕES DOS LINFÓCITOS CD4 e CD8.....	46
3- PERFIL DE RESPOSTAS TH1 E TH2	47
4- PRINCIPAIS CITOCINAS E SUAS FUNÇÕES	48
5- A RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO FATOR DE PROTEÇÃO.....	49
6- O PAPEL REGULATÓRIO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	50
7- REGULAÇÃO E CÉLULAS T REGULATÓRIAS (TREG)	51
CAPITULO IV	53
1- MECANISMOS IMUNOLÓGICOS EM INVASÕES PARASITÁRIAS.....	53
2- ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INTERAÇÃO PARASITO HOSPEDEIRO	55
3- MODELO IMUNOLÓGICO DOS PARASITOS: LEISHMANIOSE	57
4- PROSPECTOS EXPERIMENTAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS INFECÇÕES POR LEISHMANIOSE.....	59
5- PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DA LEISHMANIA.....	61
6- O PAPEL DAS ECTO-NUCLEOTIDASES NA INFECÇÃO POR PARASITOS.....	62
REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de Barreiras não-imunológicas.	10
Figura 2 - Principais diferenças entre a Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa.	12
Figura 3 - Principais componentes da imunidade passiva e ativa, que contribuem para a imunidade celular e humoral.	12
Figura 4 - Imagem ilustrativa da vacina para Covid-19.	14
Figura 5 - Extração de secreção venenosa da peçonha de cobra.	15
Figura 6 - Esquema representativo do processo de reconhecimento e atuação das células imunológicas. .	17
Figura 7 - Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e imunidade adquirida.	18
Figura 8 - Imagem representativa de tubos de coleta para amostra biológica.	20
Figura 9 - Ilustração alusiva à investigação epidemiológica de patologias clínicas.	23
Figura 10- Curva de formação de imunocomplexo em função da quantidade de antígeno adicionada.	24
Figura 11-Imagem ilustrativa da prova de precipitação de crioglobulinas na investigação de Hepatite C. .	25
Figura 12 - Imagens ilustrativas do ensaio de Imunodifusão radial simples.	26
Figura 13 - Esquema representativo do método de contraimunoeletroforese.	28
Figura 14 - Imagem representativa dos métodos de Nefelometria e Turbidimetria.	30
Figura 15 - Imagem ilustrativa do método de Hemaglutinação.	31
Figura 16 - Imagem representativa do método de Aglutinação passiva indireta.	32
Figura 17 - Imagem representativa do método de Aglutinação passiva reversa.	32
Figura 18 -Imagem representativa do método de Inibição da Aglutinação.	33
Figura 19 -Imagem esquemática do método de Coombs Direto.	34
Figura 20 - Imagem esquemática do método de Coombs Indireto.	35
Figura 21- Imagem esquemática das Reações de Imunofluorescência Direta e Indireta.	36
Figura 22 - Imagem ilustrativa da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI – IgG) positiva, com antígeno de Trypanosoma cruzi.	36
Figura 23 - Imagem esquemática do método de ELISA INDIRETO.	38
Figura 24 - Imagem esquemática dos diferentes tipos de método ELISA.	38
Figura 25 - Imagem esquemática do ensaio de Citometria de Fluxo para identificação células leucocitárias.	39
Figura 26 -Placa de identificação do ensaio de Fator reumatóide.	40
Figura 27 - Imagem esquemática das etapas do método de PCR.	42
Figura 28 - Imagem fotográfica de lâmina citológica com glóbulos vermelhos e células leucocitárias.	45
Figura 29 - Imagem representativa da interação entre linfócitos CD4 e CD8 com uma célula apresentadora de antígenos APCs e célula tumoral.	47
Figura 30 - Imagem representativa dos mecanismos imunológicos de regulação dentre as respostas Th1 e Th2.	48
Figura 31 - Participação das células Treg no controle da resposta imunológica.	53
Figura 32 - Modelo esquemático na atuação da resposta Th1 e Th2.	58
Figura 33 - Modelo esquemático no modelo de resposta imunológica nos camundongos C57/BLACK6 e BALB/c.	61

“A Imunologia Clínica é um campo da ciência médica que desvenda os mistérios do sistema imunológico humano, esse intrincado mecanismo de defesa que possibilita nossa sobrevivência diante de uma miríade de ameaças. Ao explorar os intrincados meandros da nossa resposta imune, este livro traz à luz a importância desse conhecimento para a humanidade. Compreender como esse sistema opera é essencial para diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, assim como para o desenvolvimento de novas terapias e vacinas. A cada avanço científico na área de Imunologia Clínica, desvendamos novas perspectivas e promessas para um futuro mais saudável e livre de enfermidades. Ao adentrar nas páginas deste livro, você será conduzido por uma

jornada fascinante pelos fundamentos e aplicações da Imunologia Clínica. Desde os princípios básicos da resposta imune até as mais recentes descobertas e tratamentos, será possível explorar o papel crucial dessa disciplina na saúde humana. Convidamos tanto estudantes e profissionais da área da saúde quanto leitores curiosos a se aprofundarem neste campo interdisciplinar. A imunologia é uma ciência dinâmica, que se expande constantemente com novas pesquisas e inovações tecnológicas. Esperamos que estas páginas inspirem e motive a comunidade científica, os estudantes e o público em geral a se envolverem ainda mais com a pesquisa e a promoção de uma saúde global”.

Daniel de Azevedo Teixeira

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO A IMUNOLOGIA

1- PRINCIPAIS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A palavra Imunidade é derivada do latim, que se referem à “*immunitas*”, um termo usado para denominar indivíduos que estavam livres de pagar impostos ao império romano. O conceito de imunidade, na atualidade, está relacionado à capacidade do organismo em reconhecer agentes estranhos e desencadear uma resposta eficiente contra esse agente, minimizando ou extinguindo possíveis danos. O sistema imunológico, também chamado de sistema imune, é o que garante a nossa imunidade. Esse sistema é extremamente complexo e possui diversas formas de atuação na proteção do organismo.

O sistema imunológico é provido de inúmeros mecanismos que visam garantir proteção contra agentes que podem provocar patologias ou desequilíbrio à homeostasia. Os mecanismos que compõem a imunidade são formados por moléculas, células, tecidos e órgãos que atuam de maneira conjunta para garantir a proteção do organismo. As agressões sofridas pelo organismo ou possíveis alterações no equilíbrio da homeostasia podem contribuir para a suscetibilidade de doenças.

A resposta imunológica pode ser classificada inicialmente de duas formas: inata ou adaptativa. A imunidade inata é considerada como imunidade natural, configura a resposta imunológica que o indivíduo nasce com ela, enquanto a adaptativa é aquela que adquirimos durante a vida.

2- IMUNIDADE INATA

A imunidade inata é caracterizada por mecanismos que atuam antes da exposição aos agentes agressores e promovem respostas rápidas a estes agentes, porém através de mecanismos padrões para todos esses agentes. Os principais elementos que constituem os mecanismos da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como as mucosas e epitélios produtores de substâncias antimicrobianas; células fagocíticas e células natural killer (NK); componentes do sistema complemento, mediadores da inflamatórios e citocinas, que regulam e coordenam muitas ações das células da imunidade inata. É importante salientar que a resposta inata apresenta uma resposta inespecífica, ou seja, os mecanismos são deferidos contra quaisquer agentes agressores, entretanto, a não especificidade da resposta impacta diretamente na eficiência da defesa.

Os componentes do sistema imunológico que participam na imunidade inata reagem de forma semelhante perante todas as substâncias possivelmente antigênica, e o reconhecimento dos antígenos não varia de pessoa para pessoa. As principais células efetoras da imunidade inata são os neutrófilos, macrófagos, fagócitos mononucleares e células NK. Estas células atuam no combate aos microrganismos que ultrapassam as barreiras não imunológicas do hospedeiro e que possam disseminar pelo organismo. As células NK possuem a capacidade de promover secreção de citocinas que ativam as células efetoras e estimulam a resposta inflamatória. As células fagocitárias que divididos em neutrófilos e macrófagos, são células efetoras da imunidade inata que tem como função identificar, fagocitar e destruir microrganismos. Os neutrófilos constituem a população mais abundante dos leucócitos e são os principais mediadores da resposta inflamatória que por recrutamento chegam até aos locais de infecção por quimiotaxia mediada por quimiocinas. Toda via, os macrófagos apresentam um papel protagonista na imunidade inata e adquirida, sendo considerados como elementos fundamentais na aniquilação de microrganismos. Diante disso, são considerados verdadeiros guardiões do sistema imune dos hospedeiros.

Figura 1 - Tipos de Barreiras não-imunológicas.

<i>Local</i>	<i>Mecanismos de defesa</i>
Pele	Integridade física de proteção aos agentes invasores
Mucosa	Defesa através de secreções como muco, espirro, tosse, urina
Microbiota Normal	Proteção por competitividade
Glândulas sebáceas	Produção de sebo que impede a proliferação de microrganismos
Anticorpo IgA	Imunidade passiva por amamentação

3- IMUNIDADE ADAPTATIVA (resposta imunológica desenvolvida ao longo do tempo pelo organismo)

A imunidade adaptativa é aquela que será adquirida ao longo da existência do indivíduo. Os mecanismos desenvolvidos para proteger os organismos através desta resposta serão obtidos através da posterior exposição aos agentes agressores. O sistema imune aprende a responder a cada novo antígeno que ele encontra. Portanto, a imunidade adquirida é específica contra os antígenos encontrados por um indivíduo durante a vida. O ponto chave da imunidade específica é a sua capacidade de aprender, de adaptar-se e de lembrar-se.

O sistema imune após o primeiro contato com os agentes agressores inicia um processo de registro ou memória de cada antígeno, seja através dos pulmões (respiração), do intestino (alimentação) ou da pele. Os mecanismos da imunidade adaptativa configuram uma resposta específica e por sua vez, mais eficiente em sua proteção. A grande referência celular da resposta adaptativa são os linfócitos, células duradouras que produzem uma memória imunológica responsiva rápida, enérgica e específica contra o mesmo. Essa resposta imune específica explica por que os indivíduos não apresentam varicela ou sarampo mais de uma vez e também elucidada por que a vacinação é tão eficaz na prevenção de doenças. Por

exemplo, para evitar a poliomielite, o indivíduo recebe uma vacina produzida a partir de uma forma atenuada do vírus da poliomielite. Posteriormente, quando ele é exposto ao vírus da poliomielite, o sistema imune pesquisa seus arquivos de memória, encontra os “dados” sobre este vírus e ativa rapidamente as defesas adequadas. Como consequência, o vírus da poliomielite é eliminado por anticorpos específicos que neutralizam o vírus antes que ele tenha a chance de multiplicar-se e de invadir o sistema nervoso.

Os mecanismos de defesa mais altamente evoluídos são estimulados pela exposição aos agentes infecciosos e aumentam em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição sucessiva a um agente agressor específico. Diante disso, entende-se que a resposta adaptativa depende obrigatoriamente de um primeiro contato com o agente agressor para desenvolver uma resposta adaptada. As principais características que constituem a imunidade adquirida são a grande especificidade onde o organismo reconhece e reage com a produção de anticorpos específicos contra determinado agente infeccioso, a diversidade em que o sistema imunológico é capaz de reconhecer milhares de tipos de microrganismos, bastantes diferentes uns dos outros, e de desencadear contra cada tipo uma resposta adequada, a sensibilidade onde as células têm uma grande sensibilidade diante de substâncias estranhas que invadem o corpo. A sensibilidade e especificidade desta resposta é tamanha que mesmo diante de pequenas quantidades de antígenos, as células se excitam e desencadeiam uma intensa mobilização da nossa defesa e ainda a aquisição de memória que profere ao sistema imunológico a capacidade de reconhecer esse agente, mesmo depois de várias décadas.

Figura 2 - Principais diferenças entre a Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa.

<i>Imunidade Inata</i>	<i>Imunidade Adaptativa</i>
<i>Presente desde o nascimento</i>	<i>Reação tardia contra invasores</i>
<i>Resposta padrão para uma variedade de organismos</i>	<i>Respostas específicas contra os antígenos</i>
<i>Não possui memória imunológica</i>	<i>Possui reposta imunológica</i>

Os principais elementos atuantes da imunidade adquirida são os linfócitos e seus produtos. As substâncias estranhas que induzem respostas específicas ou que são alvos dessas respostas, são chamados antígenos. Existem dois tipos de respostas imunes adquiridas, designada imunidade humoral e imunidade celular. A Imunidade humoral é mediada por moléculas do sangue, chamadas anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B. Os anticorpos reconhecem especificamente os antígenos microbianos, neutralizam os ataques patogênicos microbianos e marcam os microrganismos afim de eliminação. A Imunidade celular é mediada por células chamadas linfócitos T; os microrganismos intracelulares, tais como vírus e algumas bactérias, sobrevivem e proliferam dentro dos fagócitos e de outras células do hospedeiro, onde ficam inacessíveis aos anticorpos circulantes.

Figura 3 - Principais componentes da imunidade passiva e ativa, que contribuem para a imunidade celular e humoral.

	<i>Imunidade humoral</i>	<i>Imunidade celular</i>
<i>Imunidade inata</i>	Complemento Neutrófilos	Macrófagos Células Natural Killer
<i>Imunidade adaptativa</i>	Células B Anticorpos (produzidos por plasmócitos)	Células T auxiliares Células T citotóxicas

A defesa contra essas infecções é uma função da imunidade celular, que promove a destruição dos microrganismos que residem nos fagócitos ou a lise das células infectadas. A imunidade adaptativa pode ser ativa ou passiva:

4- IMUNIZAÇÃO ATIVA

As vacinas são o maior exemplo de imunização ativa. O médico rural inglês Edward Jenner (1749-1823) entrou para a história por desenvolver a vacina contra a varíola, epidemia que matou grande parte da população mundial. A “varíola da vaca” foi combatida em um experimento simples realizado pelo médico em expor pacientes saudáveis a materiais extraídos das lesões dos pacientes contaminados. Em sua obra “Investigação Sobre a Causa e os Efeitos da Varíola Vacum” ele também descreve que os pacientes contaminados não apresentavam novas infecções.

A imunidade ativa é a proteção conferida pela estimulação antigênica do sistema imunológico com o desenvolvimento de uma resposta humoral (produção de anticorpos) e celular. Esta estimulação pode ocorrer por infecção natural ou pelo uso de vacina. A vantagem da proteção conferida pela imunização ativa é sua característica duradoura, justificada pela existência de uma memória imunológica (permanência de linfócitos B na circulação e medula óssea que se replicam e produzem rapidamente anticorpos quando há novo contato com o antígeno). Uma limitação deste tipo de imunidade é a demora que há entre a administração do antígeno e a produção de anticorpos, isto é, não há imunidade imediatamente após a injeção do imunobiológico. Devendo a vacinação ocorrer antes da exposição ao patógeno (antígeno) para garantir imunidade (proteção) adequada. Ter infecção natural (exposição natural ao patógeno –antígeno- com ou sem adoecimento clínico) é uma forma de adquirir imunidade ativa também. Após ter certas doenças (varicela, sarampo, hepatite A) o indivíduo fica imunizado (protegido) não tendo mais o risco de adquiri-las, mesmo se exposto ao agente infeccioso novamente. O mesmo princípio acontece na administração de vacinas: o uso de um antígeno (microrganismo, parte dele ou um produto modificado a partir deste microrganismo) com o objetivo de mimetizar a infecção

natural sem causar adoecimento, conferindo assim imunidade de forma segura. Muitos fatores podem interferir na resposta imunológica à vacinação.

Figura 4 - Imagem ilustrativa da vacina para Covid-19.



5- IMUNIDADE PASSIVA

A imunidade passiva é a proteção conferida pela transferência de anticorpos (imunoglobulinas, Ig). Estas podem ser transmitidas artificialmente por administração parenteral (oriundas do processamento de soro humano ou animal) ou naturalmente como a transmissão transplacentária de anticorpos maternos para o feto. A vantagem conferida por este tipo de imunidade é sua ação imediata, isto é: disponibilidade de anticorpos no organismo do paciente logo após a administração do imunobiológico. A desvantagem deste tipo de imunidade é seu caráter temporário, pois os anticorpos circulantes são degradados em semanas ou meses, não restando imunidade depois da diminuição do nível sérico de anticorpo transferido. Em acidentes com animais peçonhentos é necessária a rápida disponibilidade de anticorpos circulantes para neutralização do veneno. Isso é obtido pela administração do soro heterólogo, que contém anticorpos contra a peçonha inoculada, logo após o acidente. De forma semelhante ocorre no uso de imunoglobulina contra hepatite B em profissionais de saúde não imunizados que sofrem acidente perfurocortante com fonte HBSAg positivo. A imunização passiva, isto é, o uso de imunoglobulinas, é utilizada:

- Como profilaxia pré-exposição: em pessoas que não podem ser vacinadas (contra-indicação e falta de tempo hábil entre imunização e exposição ao patógeno)
- Como profilaxia pós-exposição: em pessoas suscetíveis e expostas a certas infecções, tendo assim risco de adoecimento.
- Como terapia: para neutralizar os efeitos de toxinas (botulismo, difteria e tétano) e peçonhas.

Figura 5 - Extração de secreção venenosa da peçonha de cobra.



A imunidade inata e a imunidade adquirida não são independentes uma da outra. Cada sistema atua em relação ao outro e o influencia, seja diretamente ou através da indução de citocinas (mensageiros). Raramente um estímulo desencadeia uma resposta isolada. Ao contrário, ocorrem várias respostas, algumas das quais podem atuar em conjunto ou, ocasionalmente, podem conflitar entre si. De todos os modos, todas as respostas dependem dos três princípios básicos: reconhecimento, mobilização e ataque.

RECONHECIMENTO

Antes do sistema imune conseguir responder a um antígeno, ele deve ser capaz de reconhecê-lo. Ele é capaz de fazer isto por meio de um processo denominado processamento de antígenos. Os macrófagos são as principais células processadoras de antígenos, mas outras células (p.ex., linfócitos B) também podem processá-los.

MOBILIZAÇÃO

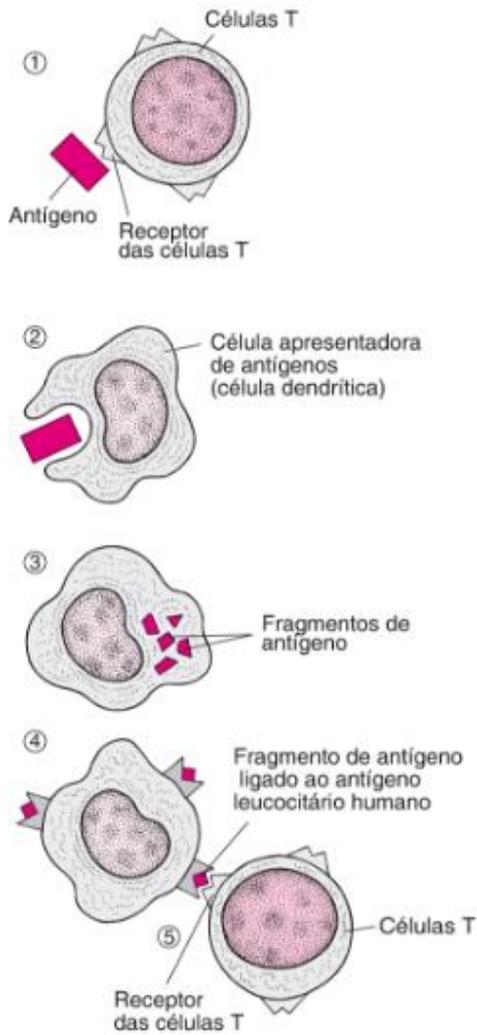
Após um antígeno ser reconhecido por uma célula processadora de antígenos e por um linfócito T, ocorre uma série de eventos para mobilizar o sistema imune.

ATAQUE

Grande parte da maquinaria do sistema imune tem como finalidade destruir ou eliminar os micróbios invasores assim que eles são reconhecidos. Os macrófagos, os neutrófilos e células assassinas naturais são capazes de eliminar muitos invasores estranhos.

Estes dois tipos de imunidade encontram-se relacionados e atuam em simultâneo.

Figura 6 - Esquema representativo do processo de reconhecimento e atuação das células imunológicas.



1. Isoladamente, uma célula T não consegue reconhecer um antígeno que circula no organismo porque o antígeno não se encaixa ao receptor das células T, uma molécula especial localizada na superfície das células T.

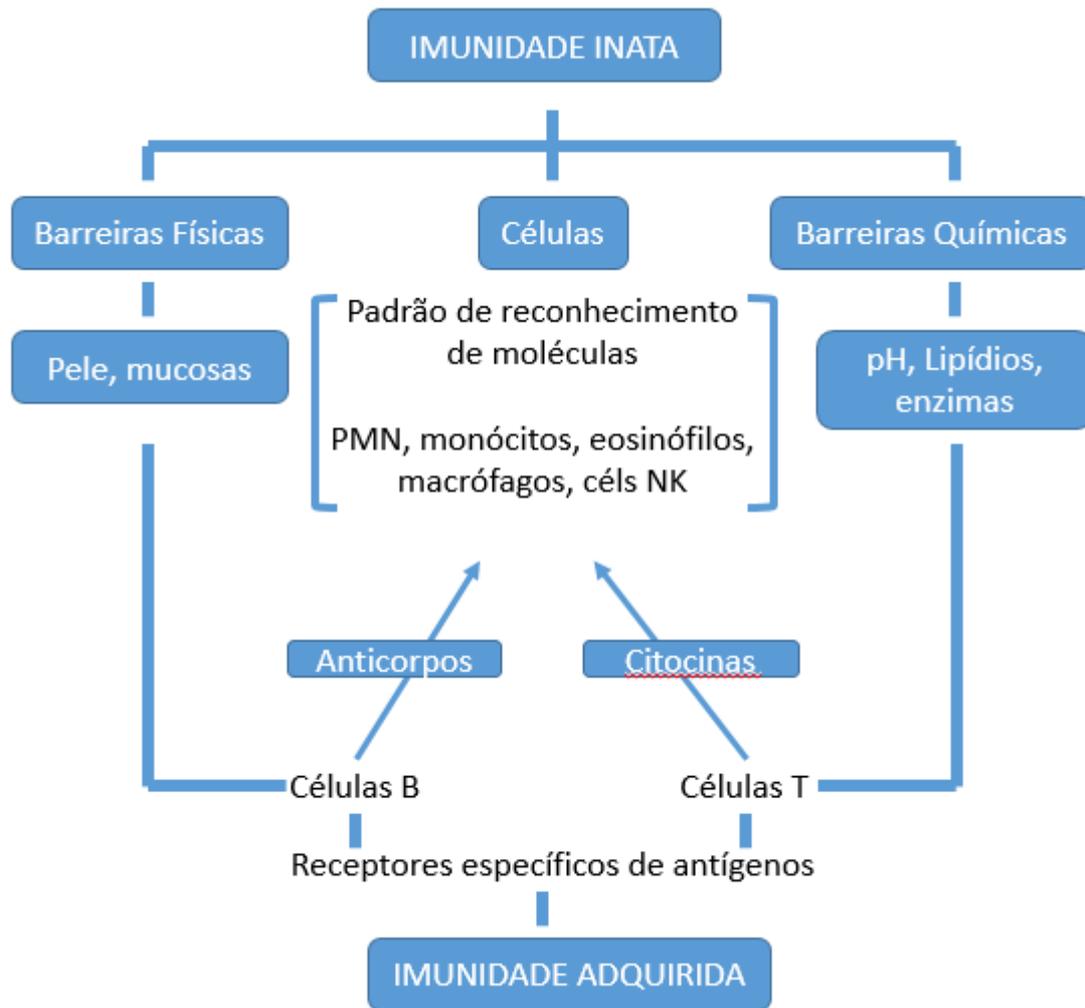
2. Uma célula capaz de processar os antígenos, como uma célula dendrítica, ingere o antígeno.

3. As enzimas da célula processadora de antígenos decompõem o antígeno em fragmentos.

4. Alguns fragmentos do antígeno são recolhidos pelas moléculas dos antígenos de leucócitos humanos (HLA), depois desses fragmentos se reunirem no interior da célula processadora de antígenos. Em seguida, as moléculas de HLA com fragmentos de antígenos são transportadas para a superfície da célula.

5. O receptor das células T pode reconhecer o fragmento do antígeno quando é conectado a este fragmento de antígeno e apresentado por uma molécula de HLA. O receptor das células T adere de imediato à parte da molécula de HLA, que apresenta o fragmento do antígeno, encaixando nela de forma semelhante ao encaixe de uma chave numa fechadura. A célula T é, por conseguinte, ativada e pode começar a combater os invasores que contém aquele antígeno.

Figura 7 - Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e imunidade adquirida.



CAPÍTULO II

1- ENSAIOS SOROLÓGICOS

Os ensaios ou testes sorológicos foram elaborados baseados na proposta da ligação antígeno anticorpo. Os antígenos são estruturas diversificadas compostas por proteínas e são capazes de estimular a produção de anticorpos. Portanto, os anticorpos se ligam aos denominados determinantes antigênicos. Estas ligações entre antígeno e anticorpo permite que haja imunidade cruzada, isto é, quando a reação imune se dirige ao mesmo tempo contra duas moléculas que, embora diferentes, apresentam epítomos iguais ou semelhantes. Os anticorpos são proteínas produzidas por uma célula do sangue chamada de plasmócito quando o sistema imunológico entra em contato com um antígeno, que pode ser um vírus, protozoário, fungo, bactéria, etc., levando a produção de anticorpos específicos contra ele.

Portanto, testes sorológicos são métodos utilizados com o objetivo de detectar anticorpos e ou antígenos para o diagnóstico de doenças. A detecção de anticorpos é realizada para tentar elucidar processos patológicos com sintomas e sinais clínicos confundíveis, contribuir na diferenciação da fase da doença através da pesquisa de diferentes classes de anticorpos, caracterizar a presença de doença congênita, selecionar doadores de sangue, avaliar o prognóstico da doença, avaliar eficácia da terapêutica, avaliar imunidade, etc. A pesquisa de antígenos é utilizado como critério de cura de algumas doenças, na definição da etiologia da doença, na seleção de doadores de sangue, em inquéritos epidemiológicos.

Diante disso, no contexto das análises clínicas os ensaios sorológicos possuem fundamental importância no processo de investigação clínica e como auxiliares no diagnóstico de uma suspeita clínica principal. Toda via, os resultados obtidos podem apresentar alterações de acordo com fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro e com as variações antigênicas

do patógeno. Esses fatores podem levar a resultados falsos positivos pela possibilidade de reações cruzadas contra determinantes antigênicos comuns presentes nos parasitas, contra antígenos ubiqüitários (presentes em vários locais do meio ambiente) ou devido a uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro, ou resultados falsos negativos pela ausência de resposta imunológica contra epítópos dos parasitas.

A investigação clínica através de ensaios sorológicos é constantemente trabalhada pela ciência no intuito de promover resultados assertivos com alta eficiência e baixo custo. As validações dos testes são importantes para estabelecer critérios que possam ser acurados na composição de um teste ideal para a metodologia proposta. A metodologia ideal ou o ensaio sorológico melhor indicado para uma investigação clínica é determinado “TESTE PADRÃO OURO”, ou Standart Gold Test. A escolha do Teste Padrão Ouro avalia diversos fatores como os parâmetros sorológicos, que são rigorosamente analisados para que a definição do processo infeccioso seja a mais próxima do verdadeiro estado clínico do paciente.

Figura 8 - Imagem representativa de tubos de coleta para amostra biológica.



O conhecimento dos parâmetros sorológicos é fundamental na interpretação e valorização de um teste sorológico. Assim, as características e limitações dos testes sorológicos são determinadas pelos seguintes parâmetros:

- **Sensibilidade:** há dois conceitos diferentes de sensibilidade. A sensibilidade técnica que é a menor quantidade que o teste consegue detectar e a sensibilidade clínica que corresponde à porcentagem de pacientes doentes com teste positivo detectados em população sabidamente infectada. É o chamado índice de positividade.
- **Especificidade:** é definida pela porcentagem de indivíduos “sadios” com teste negativo em população sabidamente não infectada. Entende-se como indivíduo sadio é aquele não portador de afecção para a qual o diagnóstico do teste é destinado. A especificidade do teste pode ser influenciada por inúmeros fatores que levam a falsos resultados positivos. O teste de enzimaensaio (ELISA) para detectar a presença de anticorpos contra o vírus HIV, por exemplo, pode apresentar resultados falsos positivos, em alguns casos, pela interferência de alguns fatores, tais como portadores de artrite reumatóide, doenças autoimunes, infecção viral aguda, doença imunológica da tireóide, etc. Indivíduos polinfectedos por parasitas intestinais, muito comum em nosso meio, apresentam um somatório de componentes antigênicos que reagem cruzadamente com inúmeros antígenos-alvo dos kits diagnósticos.
- **Prevalência:** é definida como a porcentagem de indivíduos infectados em uma população.

Quando se conhece a prevalência da doença, a sensibilidade e a especificidade do teste que está sendo utilizado se podem calcular a probabilidade de ocorrência ou não da doença.

Fatores epidemiológicos de validação dos ensaios sorológicos:

- **Valor Preditivo Positivo (VPP):** determina a probabilidade de doença considerando que o resultado do teste é positivo. É obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{VPP} = \text{Positivos Verdadeiros} \div (\text{Positivos Verdadeiros} + \text{Positivos Falsos})$$

- **Valor Preditivo Negativo (VPN):** determina a probabilidade de não ocorrência de doença considerando que o resultado do teste é negativo.

$$\text{VPN} = \text{Negativos Verdadeiros} \div (\text{Negativos Falsos} + \text{Negativos Verdadeiros})$$

- **Limiar de Reatividade:** é a região de corte do teste sorológico, trata-se do ponto onde são identificados os indivíduos doentes dos não doentes. Quando aplicamos uma curva de distribuição de frequência de resultados em uma população vamos observar que haverá uma região onde a curva de indivíduos não doentes imbricará com a curva de indivíduos doentes. Esta região é representada por indivíduos falsos positivos e falsos negativos. Os falsos positivos ocorrem por reações inespecíficas de anticorpos a diferentes estímulos antigênicos, principalmente relacionados com epítomos comuns encontrados em inúmeros microrganismos parasitas da microflora normal ou em indivíduos poliparasitados.

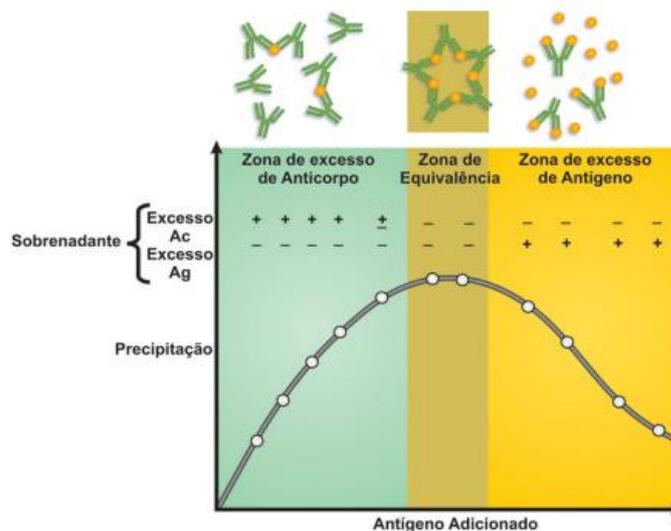
Do exposto, é preciso considerar que diante das limitações determinadas pelos parâmetros sorológicos seus resultados têm valor de probabilidade, que deverá ser associado à probabilidade clínica para a correta interpretação no diagnóstico das diversas doenças infecciosas.

Na prática clínica deveriam ser utilizados testes com limiar de reatividade diferente para a finalidade a que se propõe o teste. Por exemplo, nos bancos de sangue o objetivo principal é não deixar ocorrer falsos resultados negativos para que a doença não seja transmitida em eventuais transfusões, nessa ocasião deveriam ser realizados testes de máxima sensibilidade, ou seja, com limiares de

utilizados por serem métodos simples, rápidos e sensíveis aplicáveis às análises na rotina laboratorial. Os ensaios de precipitação normalmente não requerem equipamentos caros e preservam as características do material biológico.

As reações de precipitação envolvem a combinação de antígeno solúvel com anticorpo solúvel para produzir complexos aglutinados que são visíveis. A reação entre o antígeno e o anticorpo é reversível e obedece a uma constante de associação (K_a). Dentre vários fatores físico-químicos e imunológicos que interferem na reação, as concentrações relativas do antígeno e do anticorpo é um dos mais importantes. Quando as quantidades de antígeno e anticorpo são equivalentes (zona de equivalência) há a formação máxima de precipitado, decrescendo à medida em que um dos dois reagentes está em excesso: pró-zona ou zona de excesso de anticorpo e pós-zona ou zona de excesso de antígeno. Em virtude da reversibilidade da reação, o excesso de um dos reagentes pode induzir à dissociação do precipitado formado, causando erros de interpretação dos resultados. Esta situação é prevista e minimizada durante os processos de padronização dos ensaios.

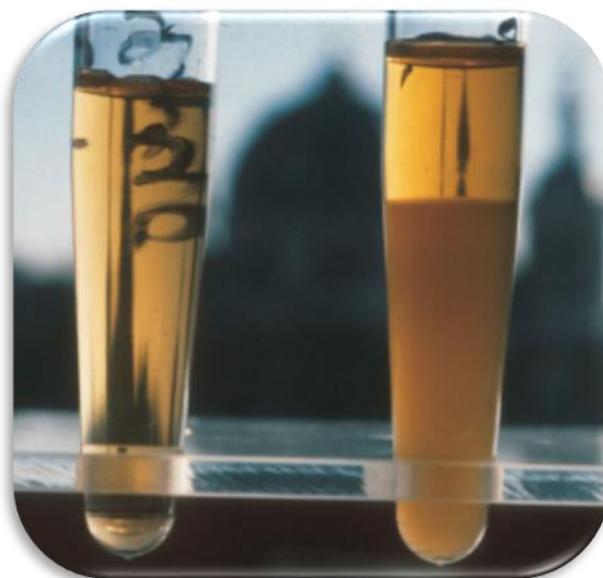
Figura 10- Curva de formação de imunocomplexo em função da quantidade de antígeno adicionada.



(Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/323IMMUN/C2_AGAB.)

A reação de precipitação que geralmente é realizada em método simples de tubo de ensaio demonstra perfeitamente a visualização através da formação do precipitado.

Figura 11-Imagem ilustrativa da prova de precipitação de crioglobulinas na investigação de Hepatite C.



Prova de precipitação revelando a presença de crioglobulinas no soro à direita, em paciente com portador de hepatite C. (fonte: Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf)

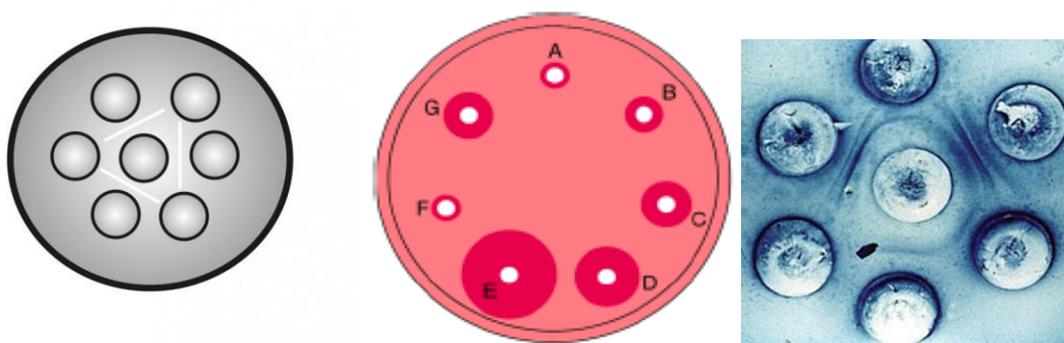
3- IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES

A imunodifusão radial simples, é um método semi-quantitativo baseado na premissa que quando ambos os reagentes (um antígeno desconhecido e moléculas de um anticorpo poliespecífico) são colocados a difundir em um meio suporte, o ponto onde os reagentes se encontram e formam pode ser visualizado como uma linha ou banda de precipitação. Esta reação é estritamente qualitativa ou semi-quantitativa (resultado expresso como a máxima diluição da amostra do paciente que apresente é um método semi-quantitativo baseado na premissa que quando ambos os reagentes (um antígeno desconhecido e moléculas de um

anticorpo poliespecífico) são colocados a difundir em um meio suporte, o ponto onde os reagentes se encontram e formam pode ser visualizado como uma linha ou banda de precipitação.

A amostra teste difunde radialmente no gel, formando um halo de precipitação circular em torno do orifício da amostra. A difusão depende do tamanho do orifício, temperatura, consistência do gel, concentração do anticorpo incluído no gel, tempo de difusão e outros parâmetros. O diâmetro do halo de precipitação formado é proporcional à concentração do analito pesquisado na amostra. Pela comparação do diâmetro do halo da amostra-teste com padrões de concentração conhecida (curva padrão), estabelece-se a concentração do analito na amostra. Em uma descrição prática, a placa de gel é fixada com anticorpos IgG onde é adicionado o Soro humano (amostra a ser analisada), em caso de positividade ocorre fixação. Quanto maior o halo de precipitação, maior a quantidade de IgG detectada. Esta técnica pode ser utilizada principalmente na quantificação de proteínas como imunoglobulinas, fatores do complemento, proteínas de fase aguda, cadeias leves e proteínas de transporte. O teste possui baixa sensibilidade analítica, pois necessita de muito analito.

Figura 12 - Imagens ilustrativas do ensaio de Imunodifusão radial simples.



4- TÉCNICAS ENVOLVENDO SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

Esta técnica consiste na migração de partículas carregadas em um solvente condutor sob a influência de campo elétrico. O movimento das moléculas em um campo elétrico depende principalmente da sua carga, que é por sua vez

determinada pelo pH do suporte. Como as moléculas de proteínas se tornam ionizadas, migram ao eletrodo com carga oposta (para o polo positivo, se a carga de superfície for negativa ou vice-versa). Esse é o princípio da separação eletroforética de misturas complexas, como as proteínas do soro. Deste modo, a eletroforese de proteínas é adotada para separação em métodos como contraimunoeletroforese, imunoeletroforese e imunofixação.

5- CONTRAIMUNOELETROFORESE

A contraimunoeletroforese é a mais antiga das técnicas de separação eletroforética e possui metodologia que difere em parte das técnicas de imunoeletroforese e imunofixação. O método baseia-se em fixar no polo positivo da placa o antígeno e no polo negativo depositar a amostra investigada (líquor), em caso de positividade ocorre a integração antígeno-anticorpo em arraste no centro da placa.

6- IMUNOELETROFORESE

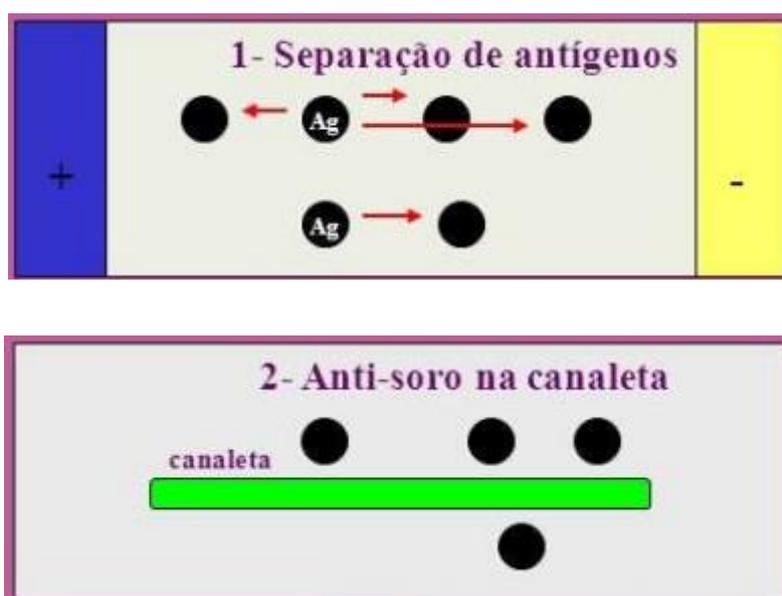
A técnica de eletroforese em gel é a combinação da técnica de eletroforese com a técnica de dupla difusão em gel de ágar. O método caracteriza-se por ser uma técnica que permite a discriminação de substâncias presentes em uma mistura complexa com base nas suas cargas elétricas, pesos moleculares, tamanhos, formas, concentrações e propriedades antigênicas. Portanto, realiza-se uma comparação de misturas complexas de Antígenos que são separados em gel de ágar ou de agarose depositados sobre lâminas, após a aplicação da amostra em uma cavidade no gel e colocação dessa lâmina em uma cuba apropriada submetida a um campo elétrico. As moléculas presentes na mistura migram para os polos positivo ou negativo na dependência de suas cargas elétricas. Uma canaleta é recortada entre os poços e preenchida com um anti-soro contendo Anticorpo com especificidade para um ou mais Antígenos presentes na mistura a ser analisada, e esses Anticorpos se difundem até encontrar as moléculas de Antígenos e reagir com os mesmos. Os imunocomplexos Antígeno-Anticorpo formam linhas ou arcos de precipitação.

A imunoeletroforese pode ser utilizada para detecção de proteína-M (monoclonal), detectar gamopatas monoclonais, mieloma múltiplo e macroglobulinemia. É tecnicamente mais fácil e de menor custo quando comparada à técnica de imunofixação, no entanto não é tão sensível.

7- IMUNOFIXAÇÃO

A imunofixação deve ser realizada quando um pico ou banda é encontrada na eletroforese de proteínas séricas ou quando há suspeita de gamopatia monoclonal. A imunofixação combina a eletroforese e a imunoprecipitação. É um procedimento em dois estágios: primeiro a amostra é aplicada em seis posições diferentes do gel de agarose e as proteínas são separadas por eletroforese de acordo com a carga. Após, soros monoespecíficos para IgG, IgA, IgM, cadeia *kappa* e cadeia *lambda* impregnados numa fita de papel ou acetato de celulose são colocados individualmente sobre cada posição, seguidos da aplicação de solução fixadora de proteínas. Se o antígeno complementar estiver presente em proporções adequadas na amostra, os complexos formados precipitam e são fixados no gel, o que permite sua identificação com o auxílio de um corante

Figura 13 - Esquema representativo do método de contraimunoeletroforese.





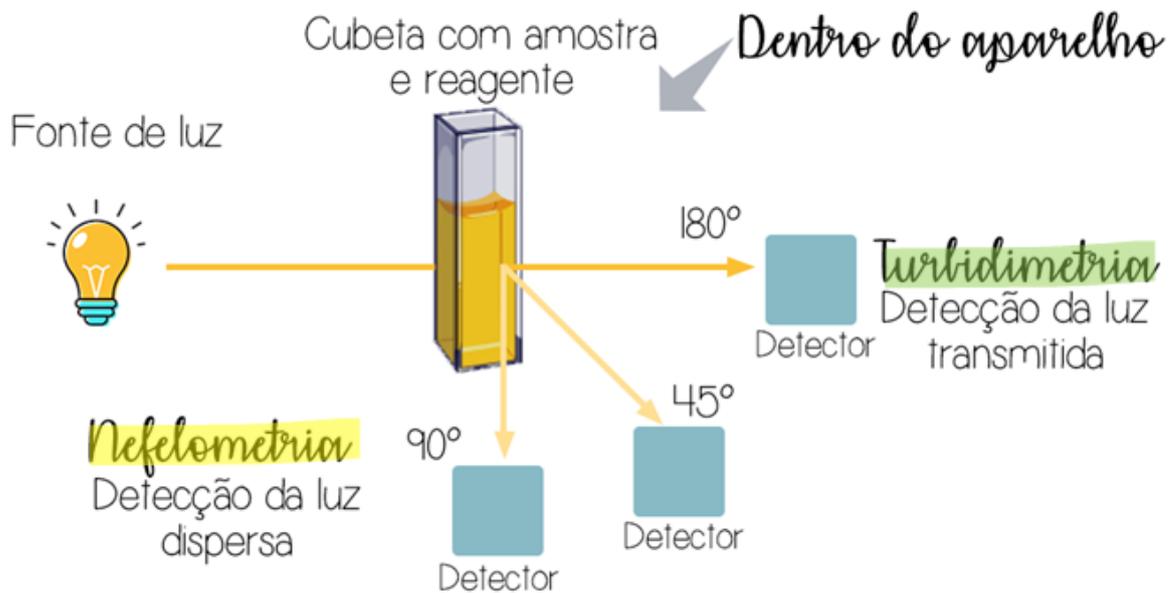
8- TURBIDIMETRIA

Este teste está sujeito às mesmas condições dos sistemas nefelométricos. O sinal de detecção é a absorvância e não a intensidade de luz dispersa. Não necessita de aparelhagem especial. As reações podem ser medidas em espectrofotômetros simples utilizados em bioquímica. Pode ser utilizada para medidas quantitativas de drogas ou biomarcadores no soro, plasma ou urina.

9- NEFELOMETRIA

Uma característica importante das soluções coloidais é a sua pronunciada dispersão da luz. Quando um feixe de luz incidente atravessa um meio contendo partículas, estas interferem com a passagem da luz, fazendo com que seja dispersa em todas as direções. Este fenômeno, conhecido como efeito Tyndall, não altera o comprimento de onda da luz incidente e é independente do tipo de partícula. Os ensaios nefelométricos se baseiam no princípio de que um imunocomplexo em solução dispersa luz em vários ângulos em relação à luz incidente. Um nefelômetro utiliza uma fonte de luz de alta intensidade que incide em uma cubeta contendo os imunorreagentes. A quantidade e a natureza da dispersão dependem da forma e do tamanho das partículas, da concentração, do comprimento de onda e do índice de refração do meio.

Figura 14 - Imagem representativa dos métodos de Nefelometria e Turbidimetria.



10- REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO

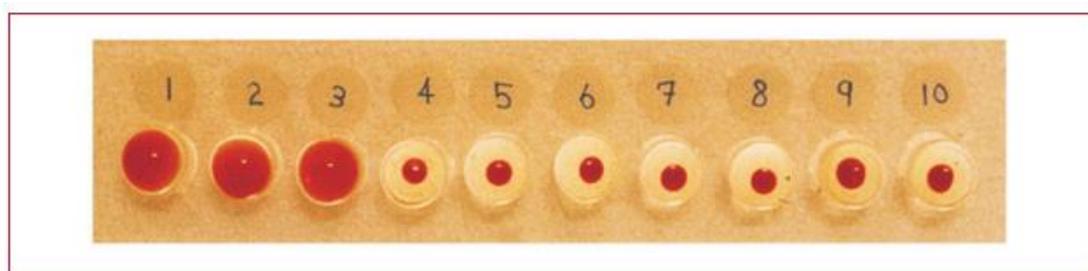
A ligação cruzada com produção de agregados ocorre quando um anticorpo reage com um antígeno multivalente presente em uma partícula (insolúvel). A partícula insolúvel pode ser um antígeno insolúvel nativo, antígenos expressos em células (por exemplo, antígenos eritrocitários) ou partículas cobertas com antígenos (por exemplo, partículas de látex). As reações de aglutinação têm boa sensibilidade e podem ser analisadas por inspeção visual, no entanto são mais sujeitas a resultados falso-positivos devido à aglutinação inespecífica.

11- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO DIRETA

A reação de aglutinação direta é mediada pelo uso de partículas antigênicas em sua forma íntegra ou fragmentada: hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpo. São realizadas diluições em série do anticorpo frente a uma quantidade constante do antígeno.

Após um período de incubação a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como a máxima diluição em que ocorre a aglutinação. Exemplos de reações de aglutinação direta: tipagem de grupos sanguíneos (antígenos específicos), reação de Paul-Bunnell-Davidson (antígenos heterófilos), teste de Widal para salmoneloses, teste de aglutinação para toxoplasmose e tripanossomíase.

Figura 15 - Imagem ilustrativa do método de Hemaglutinação.

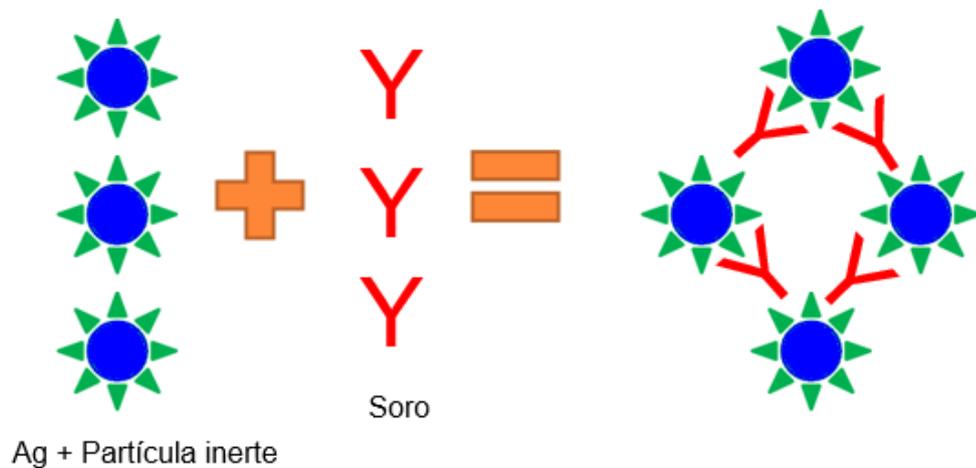


– Reação de hemaglutinação. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/3231MMUN/C2_AGAB.)

12- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA OU INDIRETA

As reações de aglutinação passiva ou indireta, as hemácias e as partículas inertes (bentonita, látex, sepharose, leveduras, gelatina) podem ser sensibilizadas por adsorção passiva. Isto pode ser feito através de contato direto com antígenos solúveis, por adsorção via agentes químicos solúveis, por adsorção com agentes químicos, (p. ex. ácido tânico ou cloreto de cromo) e por conjugação através de ligações químicas covalentes. A aglutinação passiva resume-se na fixação de antígenos em partículas inertes no objetivo de pesquisar no soro dos pacientes anticorpos. Os resultados positivos serão observados através de aglutinação presente.

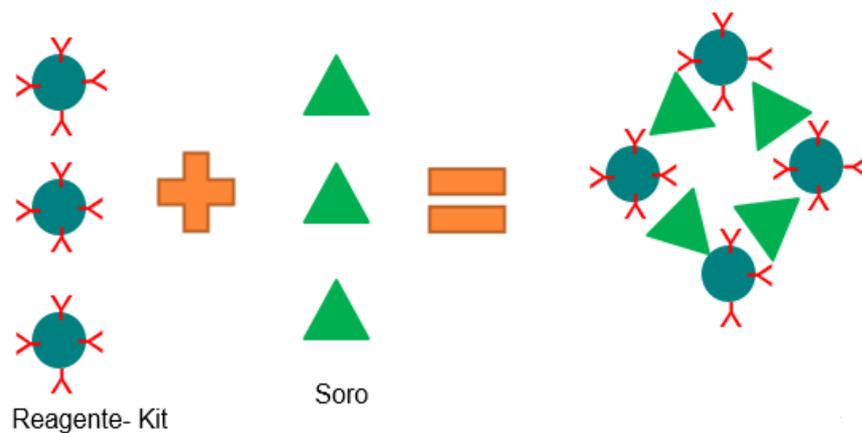
Figura 16 - Imagem representativa do método de Aglutinação passiva indireta.



13- REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA REVERSA

A reação de aglutinação passiva reversa é caracterizada pela fixação de anticorpos às partículas inertes semelhantes às utilizadas na Reação passiva citada anteriormente. Esse método prioriza investigar no soro do paciente possíveis antígenos, a positividade da reação ocorre através da aglutinação detectada.

Figura 17 - Imagem representativa do método de Aglutinação passiva reversa.

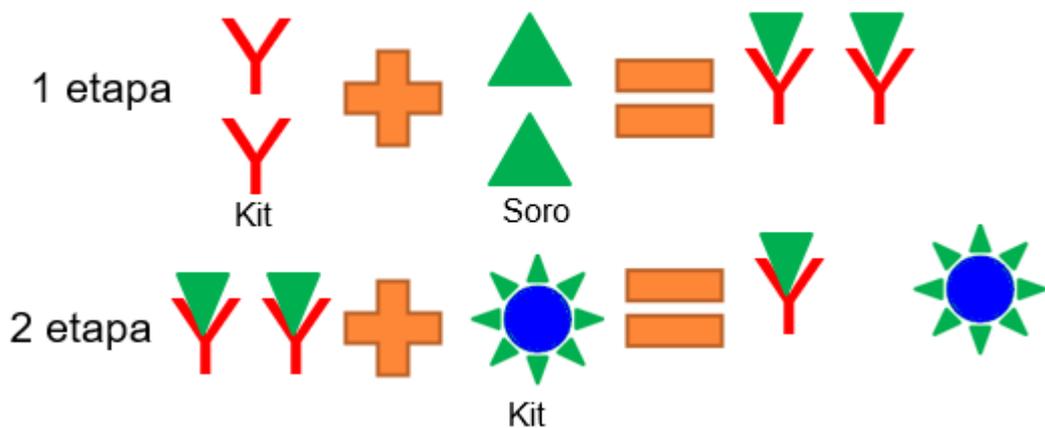


14- REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA AGLUTINAÇÃO

As reações de inibição da aglutinação são baseadas na competição entre antígenos particulados e solúveis por um número limitado de sítios combinatórios em moléculas de anticorpos. A inibição da aglutinação é um

indicador de reação positiva. Um exemplo de técnica de inibição da aglutinação é a testagem para a presença do hormônio da gonadotrofina coriônica (hCG) como teste de gravidez. Os anticorpos presentes nos Kits são utilizados em uma primeira etapa para exposição ao soro do paciente na busca da presença de antígenos. Havendo positividade os anticorpos do kit ira aglutinar aos antígenos presentes. Inicia a segunda etapa, onde a solução previamente aglutinada será exposta a outro kit com partículas inertes fixadas com antígenos (o Kit possui antígenos previamente quantificados). Portanto, caso não aconteça a aglutinação, é deduzido que os antígenos pesquisados inicialmente já estavam aglutinados, indicando positividade.

Figura 18 -Imagem representativa do método de Inibição da Aglutinação.



15- TESTE DE COOMBS DIRETO

A realização do teste de Coombs Direto utiliza no reagente a antiglobulina (Coombs direto) para determinar se o anticorpo de ligação de eritrócitos (IgG) ou complemento (C3) está presente nas membranas dos eritrócitos. Os eritrócitos do paciente são incubados com anticorpos anti-IgG humana e C3. Portanto, caso exista a presença dos anticorpos IgG ou o C3 ligados às membranas dos eritrócitos, ocorrerá aglutinação, caracterizando o resultado como positivo. Um resultado positivo sugere a presença de anticorpos (auto-imune) nos eritrócitos.

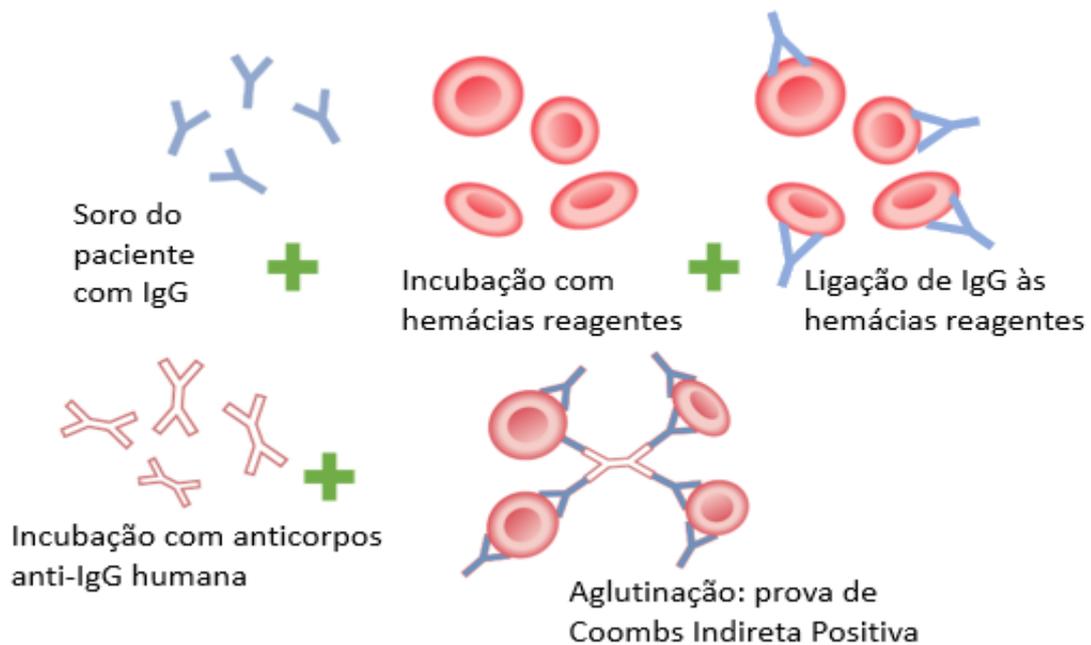
Figura 19 -Imagem esquemática do método de Coombs Direto.



16- TESTE DE COOMBS INDIRETO

O teste de Coombs Indireto é realizado utilizando a antiglobulina (Coombs indireto) para detectar anticorpos IgG antieritrócitos no plasma de um paciente. O plasma do paciente é adicionado a um reagente para eritrócitos; a seguir o soro de Coombs (anticorpos contra IgG humana ou anti-IgG humana) é acrescentado. Se ocorrer aglutinação, anticorpos IgG (anticorpos ou aloanticorpos) contra eritrócitos estão presentes. Este teste é também utilizado para determinar a especificidade de um aloanticorpo.

Figura 20 - Imagem esquemática do método de Coombs Indireto.



17- REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (RID)

As reações de imunofluorescência são caracterizadas pela utilização anticorpos marcados com substância fluorescentes para a detecção de antígenos específicos. A imunofluorescência direta baseia-se na exposição imediata da reação fluorescente em caso de positividade. A reação tem por princípio ser qualitativa devido ao fato de ser utilizada para detectar antígenos em tecidos biológicos (material de biópsias, vírus, bactérias, células etc.), é raramente quantitativa. Essa técnica é muito utilizada para a pesquisa de vírus respiratórios (influenza, parainfluenza, vírus sincicial respiratório e adenovírus)

18- REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RII)

A reação de imunofluorescência indireta diferem a metodologia da RID pois o objeto de pesquisa são os anticorpos presentes na amostra do paciente. Os anticorpos reagem com antígenos específicos fixados em uma lâmina de microscopia. Após a fixação a lâmina é submetida a um processo de lavagem e um anticorpo anti-humano (conjugado) marcado com substância fluorescente é adicionado. A lâmina é exposta a mais uma etapa de lavagem no intuito de

remover o conjugado caso não haja positividade. Portanto, a reação é considerada como positiva quando observada a fluorescência no microscópio o que sugere a presença do anticorpo em estudo na amostra do paciente. Os conjugados utilizados são isotipo-específico, portanto, são eficientes para a distinção entre os anticorpos IgG, IgA e IgM. A imunofluorescência indireta é considerada padrão ouro para o diagnóstico de muitas doenças como infecções pelo *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Chlamydiae*, entre outros.

Figura 21- Imagem esquemática das Reações de Imunofluorescência Direta e Indireta.

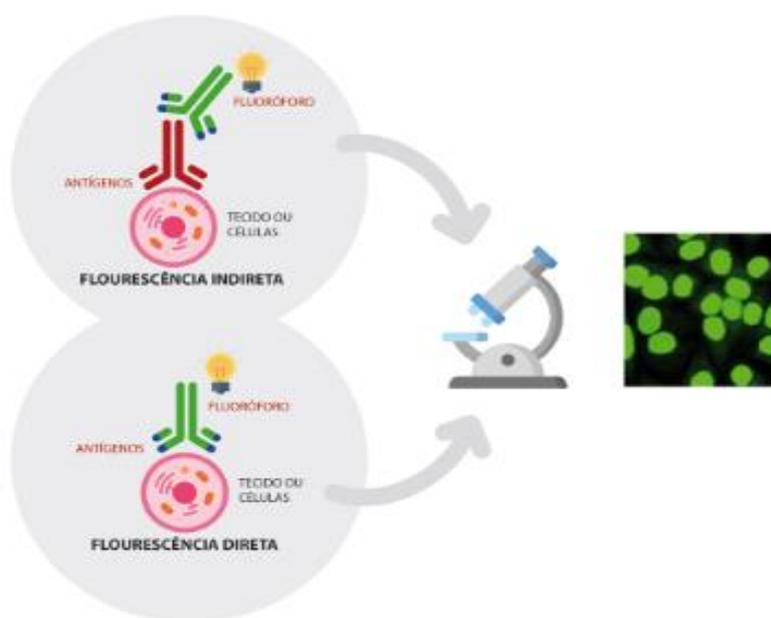
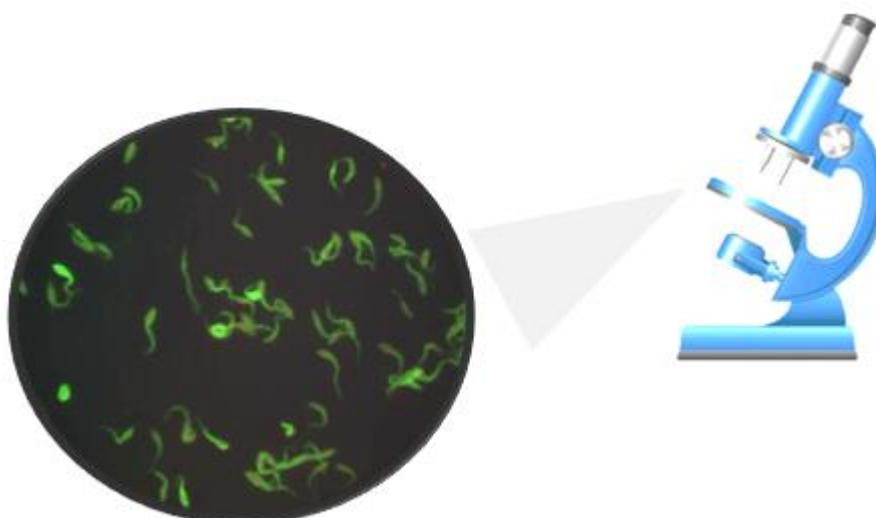


Figura 22 - Imagem ilustrativa da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI – IgG) positiva, com antígeno de *Trypanosoma cruzi*



19- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

O teste denominado **ELISA** trata-se de uma abreviatura do termo em inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ou para o português: **Ensaio Imunoenzimático**. Este método revolucionou os métodos de diagnóstico imunológico pois apresenta grande precisão em quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, sendo também considerado um teste de grande sensibilidade e especificidade.

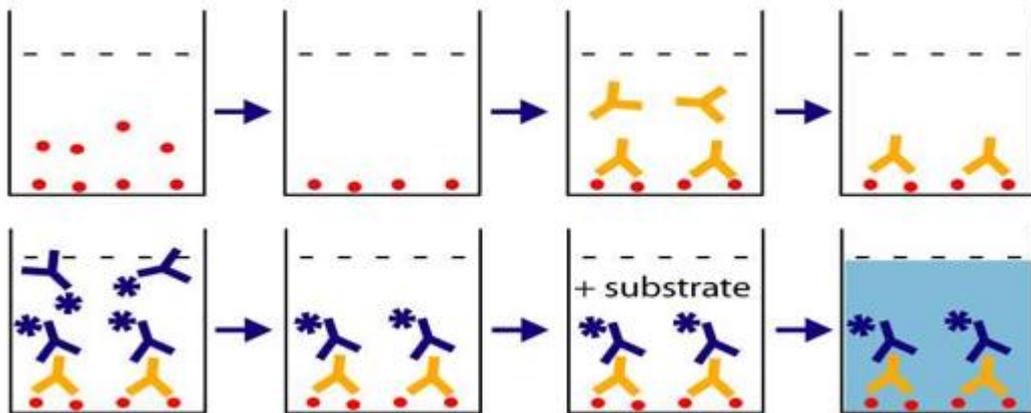
O teste de ELISA destaca 4 tipos principais: ELISA direto, ELISA indireto, ELISA sanduíche e ELISA de competição. O ELISA direto é caracterizado pela pesquisa do antígeno ligado à placa, e a adição de um anticorpo primário conjugado a um cromógeno. Toda via, o ensaio de ELISA indireto também objetiva a pesquisa de antígenos, entretanto, o método ocorre em duas etapas: 1- é adicionado um anticorpo primário específico para o antígeno fixado; 2-Posteriormente adiciona-se um anticorpo secundário anti-anticorpo humano com a adição do cromógeno. Existe um método menos utilizado que é o ELISA de competição. Esse método pode detectar um antígeno com baixo peso molecular ou com poucos epítomos de ligação. Utiliza um antígeno marcado para competir com o antígeno alvo, então, o antígeno marcado se liga menos quanto tem menos antígenos alvos na amostra. Dentre os testes supracitados outro método que se destaca é o ELISA sanduíche. Esse tipo é realizado em alguns passos – primeiramente, anticorpos de captura são ligados ao fundo da placa, para evitar que nenhum outro anticorpo interfira na reação com os antígenos alvo que possivelmente estarão presentes na amostra.

ELISA INDIRETO- Método

- A placa possui antígeno aderido.
- Preenche os espaços vazios com proteína inerte.
- Caso haja anticorpos se ligará ao antígeno

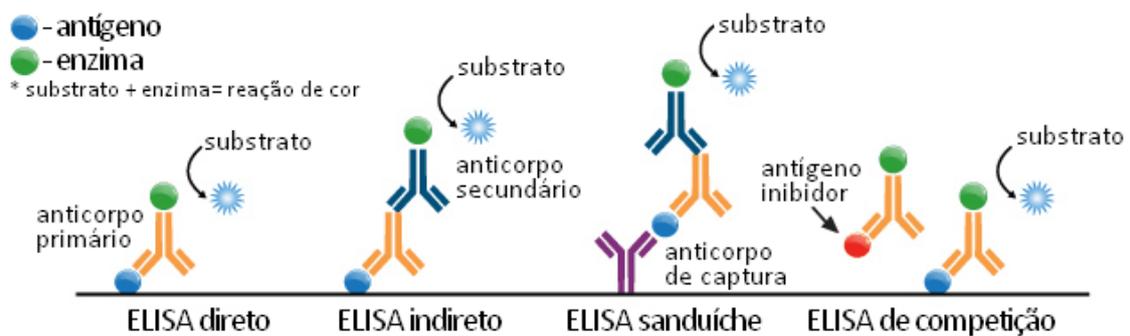
- Lava-se a placa com PBS e Tween.
- Adiciona-se anticorpo anti-anticorpo humano + peroxidase.
- Incuba-se por 45 min a 37 graus e lava-se a placa.
- Adiciona-se o **substrato e Stopper**
- Lê-se absorbância. Amarelo positivo

Figura 23 - Imagem esquemática do método de ELISA INDIRETO



Posteriormente, adiciona-se outro anticorpo específico para o antígeno. Toda via, na etapa final é adicionado um terceiro anticorpo ligado à enzima (cromógeno). Essa enzima irá reagir com o substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação (cor mais fraca ou mais forte) é proporcional à quantidade de antígeno presente.

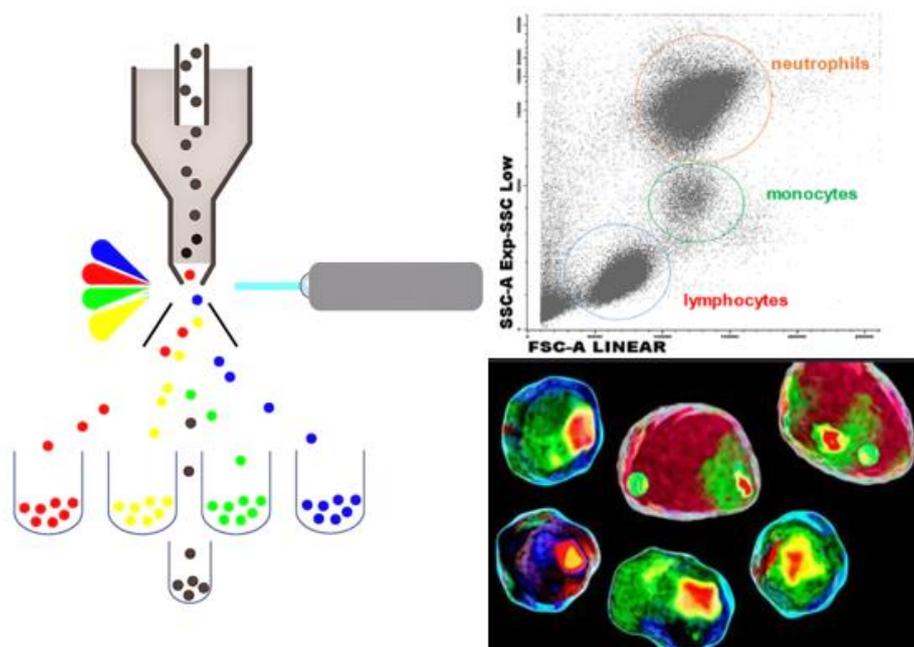
Figura 24 - Imagem esquemática dos diferentes tipos de método ELISA



20- CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica com grande capacidade de medir multiparâmetros (2 a 30 ou mais) em uma amostra e sua capacidade de coletar informações de milhões de células em questão de segundos. A técnica utiliza imunofluorescência na identificação de determinadas partículas em suspensão, portanto, permite aferir com grande precisão células vivas, fenotipagem e demais análises celulares. Portanto, o aparelho faz a distinção de células (partículas) por fluorescência, a suspensão de células marcadas é colocada em um separador de células que afere a intensidade da fluorescência de cada célula. A separação de células ocorre devido à leitura da fluorescência específica. Através da citometria é possível determinar configurações fenotípicas e funcionais de subpopulações celulares, o isolamento de diferentes populações celulares com distintos antígenos de superfície corados por diferentes anticorpos fluorescentes. A técnica permite uma análise diagnóstica e prognóstica na avaliação de doenças malignas e benignas, transplante de órgãos e tecidos, imunodeficiências primárias e adquiridas.

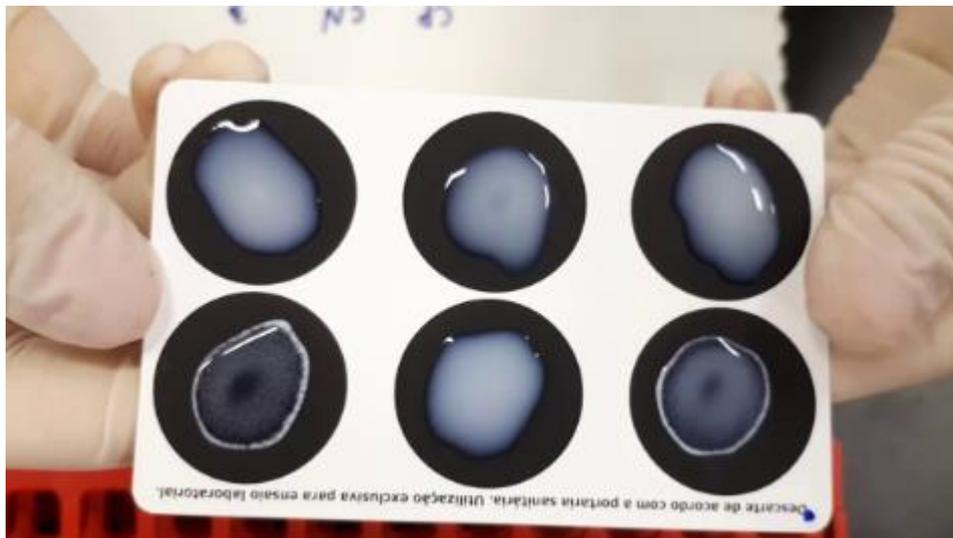
Figura 25 - Imagem esquemática do ensaio de Citometria de Fluxo para identificação células leucitárias.



21-FATOR REUMATÓIDE (FR)

O fator reumatóide é um fenômeno que interfere diretamente na precisão dos resultados sorológicos. O grupo de pacientes portadores de doenças auto-imune dentre as principais: artrite reumatóide (presente em 80%) e síndrome de Sjögren (presente em quase 100%) representam a maioria dos casos de fator reumatóide. O processo de FR é caracterizado pela formação de anticorpos IgM (anti-anticorpo-humano) que irão promover ligações com o anticorpo IgG (reação auto-imune) formando imunocomplexos que destroem tecidos saudáveis, como articulações e cartilagens.

Figura 26 -Placa de identificação do ensaio de Fator reumatóide.



22-WESTERN-BLOT

O *western blot* e ou *imunoblot* é um método em biologia molecular amplamente utilizada para detectar proteínas específicas em uma amostra. Essa técnica combina a separação de proteínas por eletroforese em gel sua transferência para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF. Uma vez na membrana são usados como sonda anticorpos específicos para a proteína alvo. A passagem de electroforese em gel é incluída nas análises de *western blot* para resolver o problema da reatividade cruzada dos anticorpos. Como resultado, os pesquisadores podem examinar a quantidade de proteína em uma dada

amostra e comparar os níveis entre diversos grupos. O *western blot* é uma técnica versátil e sensível que permite detectar e quantificar proteínas específicas em uma amostra no objetivo de diagnóstico e pesquisa.

23-PCR- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR, na sigla em inglês) é uma técnica de biologia molecular usada para amplificar regiões específicas de DNA em laboratório. O método PCR é amplamente utilizado em várias áreas, como diagnóstico de doenças genéticas, medicina forense, pesquisa científica e biotecnologia. Uma das variações mais utilizadas da técnica é o RT-PCR (PCR-Real Time-tempo real) que foi muito destacado no protocolo de diagnóstico da Covid-19. O método apresenta grande importância no diagnóstico de doenças infecciosas devido à especificidade e precisão dos resultados.

O processo de PCR consiste em várias etapas principais:

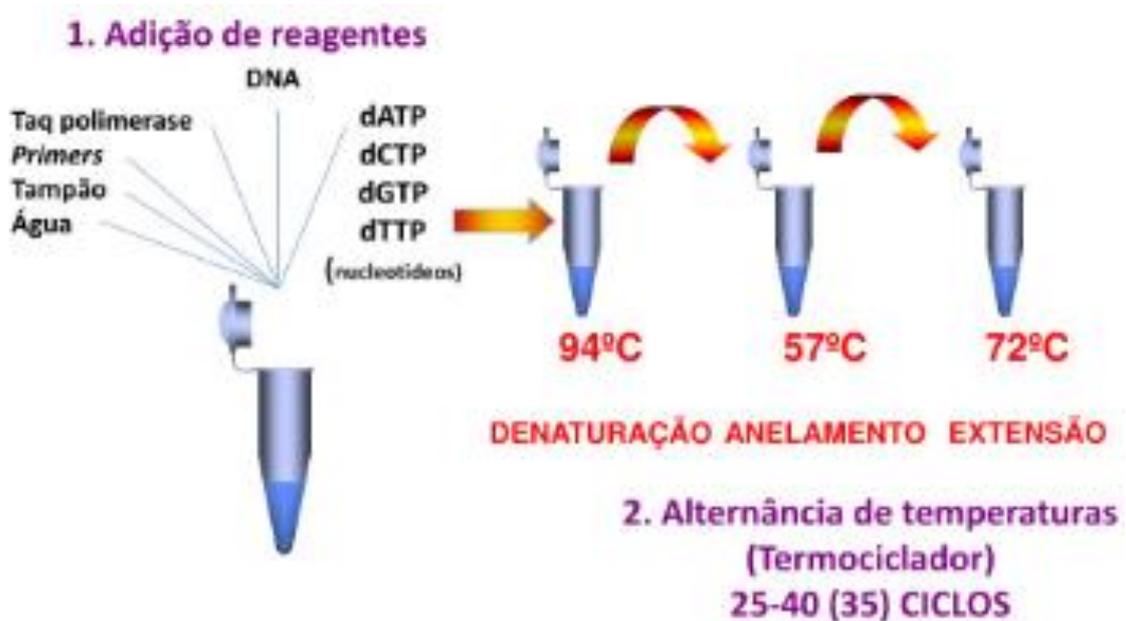
1. **Desnaturação:** A primeira etapa envolve aquecer a amostra contendo o DNA alvo, para separar as duas fitas de DNA originais. Isso é feito a uma temperatura elevada (geralmente cerca de 95°C), que quebra as ligações de hidrogênio entre as fitas.
2. **Anelamento:** Após a desnaturação, a temperatura é reduzida para permitir que os primers, os oligonucleotídeos complementares às sequências de DNA desejadas, se liguem às fitas de DNA alvo específicas. Os primers atuam como iniciadores para a replicação do DNA.
3. **Extensão/elongação:** Uma enzima chamada DNA polimerase é adicionada à mistura, juntamente com os nucleotídeos de construção do DNA (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). A DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA complementares às cadeias alvo usando os primers como modelo. Essa etapa ocorre em uma temperatura ideal para a atividade da enzima (geralmente em torno de 72°C).

4. Ciclagem: As etapas de desnaturação, anelamento e extensão são repetidas várias vezes em ciclos, geralmente de 20 a 40 vezes. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA alvo presente na amostra inicial, resultando em uma amplificação exponencial.

No final do processo de PCR, a quantidade acumulada de DNA amplificado pode ser usada para várias finalidades, como análise genética, sequenciamento de DNA, detecção de mutações, confirmação de presença de organismos patogênicos, entre outros.

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica, capaz de detectar pequenas quantidades de DNA-alvo em uma mistura complexa. É uma ferramenta essencial na área da biologia molecular, permitindo que ocorra uma amplificação de seqüências de DNA específicas para posterior análise e pesquisa.

Figura 27 - Imagem esquemática das etapas do método de PCR.



CAPITULO III

1- IMUNOPATOLOGIA

O desenvolvimento de doenças está diretamente relacionado com a vulnerabilidade de mecanismos efetores do sistema imunológico. Considerando o sistema imune como o complexo de defesa do organismo, entende-se que a desarmonia dos processos homeostáticos ou o simples desenvolvimento de patologias estão associados à ineficiência da resposta imunológica.

Embora o organismo de qualquer ser manifeste em sua existência diversas doenças, existem mecanismos e estruturas específicas para evitar que isso aconteça. Além disso, as condições genóticas e fenotípicas entre outros fatores podem determinar o perfil de vulnerabilidade e resistência dos indivíduos.

Os principais mecanismos imunopatológicos são:

1. Hipersensibilidade: é uma reação imunológica exagerada e inadequada a um antígeno específico. Pode ser classificada em quatro tipos (I, II, III e IV) de acordo com os mecanismos envolvidos. A hipersensibilidade tipo I é caracterizada pela liberação excessiva de histamina e outros mediadores da inflamação, resultando em sintomas como urticária, broncoespasmo e anafilaxia. A hipersensibilidade tipo II envolve a destruição de células pelo sistema imunológico, causando doenças como anemia hemolítica autoimune e doença hemolítica do recém-nascido. A hipersensibilidade tipo III ocorre quando os complexos antígeno-anticorpo se depositam nos tecidos, desencadeando uma resposta inflamatória. Exemplos incluem a glomerulonefrite e a vasculite. A hipersensibilidade tipo IV, também conhecida como reação de hipersensibilidade tardia, envolve a ativação de linfócitos T e a liberação de citocinas, resultando em uma resposta inflamatória retardada. É observada em doenças como a dermatite de contato e a tuberculose.

2. Autoimunidade: é o processo em que o sistema imunológico ataca erroneamente os tecidos do próprio organismo. Acredita-se que a autoimunidade ocorra devido a uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Exemplos de doenças autoimunes incluem lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla e diabetes tipo 1.

3. Imunodeficiência: é caracterizada pela incapacidade do sistema imunológico de funcionar adequadamente, tornando o indivíduo mais suscetível a infecções. Pode ser adquirida, como no caso da infecção pelo HIV, ou hereditária, como a síndrome de imunodeficiência combinada grave (SCID) ou a síndrome de DiGeorge.

4. Tolerância imunológica: é o mecanismo que previne o sistema imunológico de atacar células e tecidos próprios. A tolerância central ocorre durante o desenvolvimento dos linfócitos no timo (para células T) e na medula óssea (para células B), eliminando os linfócitos que reconhecem antígenos próprios. A tolerância periférica ocorre nos tecidos periféricos, onde as células imunes suprimem a resposta imunológica a antígenos próprios, impedindo assim a autoimunidade.

Dentre as principais estruturas que compõem a atuação imunológica destaca-se a participação dos linfócitos. Os linfócitos desempenham um papel fundamental na resposta imunológica do corpo. Existem dois tipos principais de linfócitos: linfócitos B e linfócitos T.

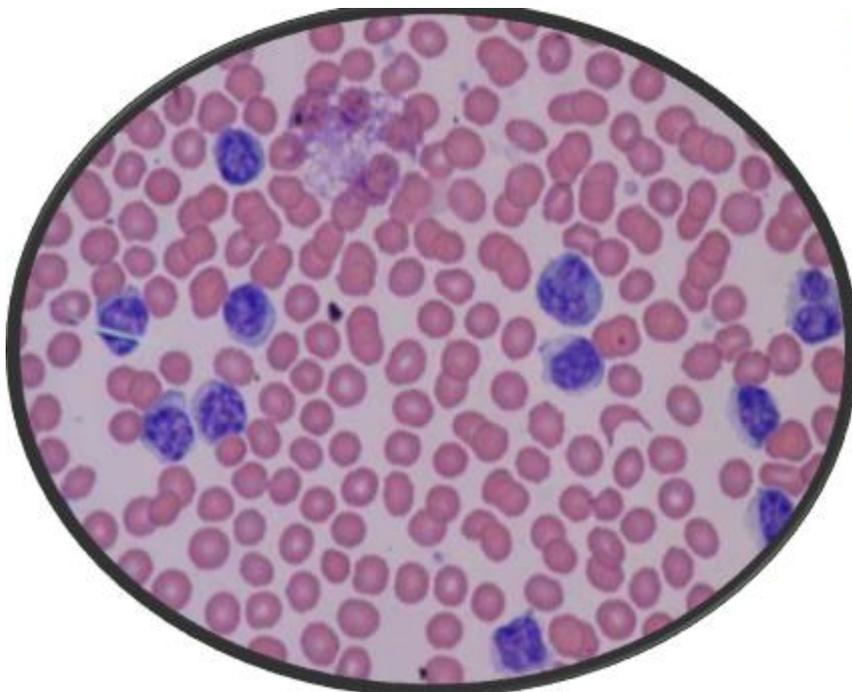
Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, que são proteínas específicas que se ligam a antígenos (substâncias estranhas ao corpo) e ajudam a eliminá-los do organismo. Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B podem neutralizar os antígenos diretamente ou marcar as células infectadas ou invadidas por antígenos para serem destruídas por outras células do sistema imunológico.

Já os linfócitos T são responsáveis por coordenar e direcionar a resposta imune. Eles são capazes de reconhecer células infectadas por vírus, células tumorais ou células que foram invadidas por bactérias intracelulares. Os linfócitos T podem matar diretamente essas células infectadas ou liberar mensageiros químicos chamados citocinas, que ativam outras células do sistema imunológico para eliminar a infecção.

Além disso, os linfócitos T também desempenham um papel importante na regulação da resposta imune, controlando e suprimindo a atividade de outras células imunes para evitar respostas autoimunes (quando o sistema imunológico ataca tecidos saudáveis do próprio organismo).

Em resumo, os linfócitos desempenham um papel central na resposta imunológica, seja pela produção de anticorpos para eliminar antígenos ou pela coordenação e direção da resposta imune através da atividade dos linfócitos T.

Figura 28 - Imagem fotográfica de lâmina citológica com glóbulos vermelhos e células leucocitárias.



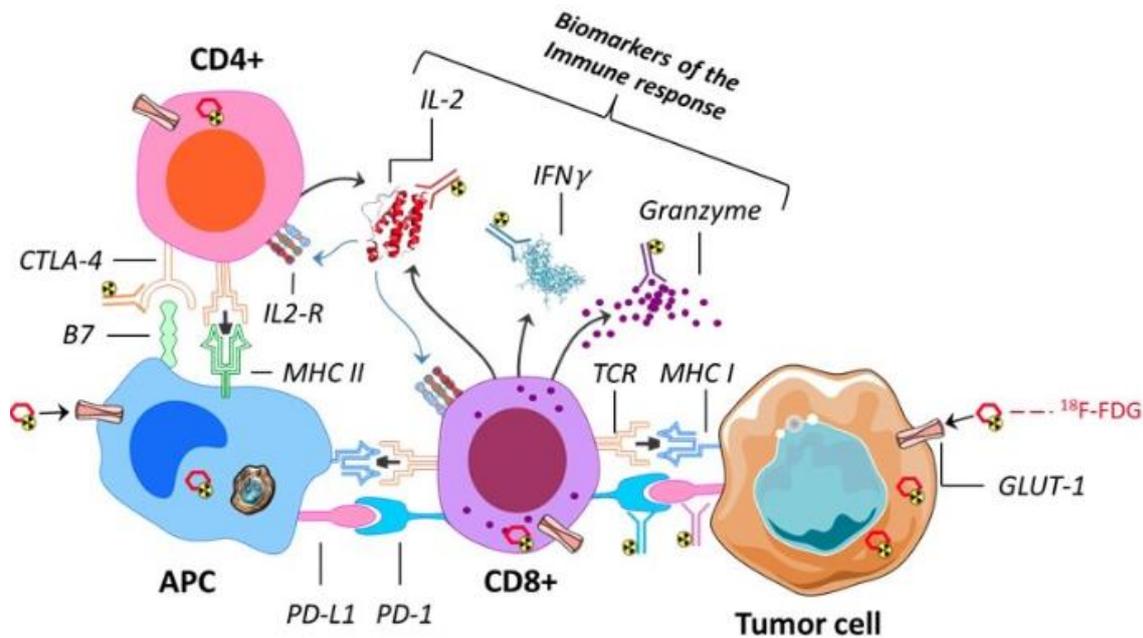
2- FUNÇÕES DOS LINFÓCITOS CD4 e CD8

Os linfócitos CD4 e CD8 são subtipos linfócitos T, que são células sistema imunológico responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos, como vírus, bactérias e fungos. Os linfócitos CD4, também conhecidos como células T auxiliares, desempenham um papel central na resposta imunológica. Eles são ativados quando entram em contato com um antígeno específico apresentado por uma célula apresentadora de antígeno, como um macrófago. Os linfócitos CD4 ativados secretam citocinas, moléculas que sinalizam e coordenam a resposta imune. Essas citocinas estimulam a proliferação de outros linfócitos T e de células B, que produzem anticorpos. Além disso, os linfócitos CD4 também ajudam a regular a resposta imune, promovendo a ativação de células do sistema imune quando necessário e inibindo a resposta quando não é mais necessária.

Os linfócitos CD8, também são conhecidos como células T citotóxicas e possuem a responsabilidade de eliminar células infectadas por patógenos. Eles reconhecem antígenos apresentados na superfície de células infectadas, ligam-se a essas células e liberam grânulos que contêm proteínas tóxicas, como perforinas e granzimas. Essas proteínas induzem a apoptose (morte celular programada) nas células infectadas, impedindo a replicação do patógeno e evitando a disseminação da infecção.

Assim, enquanto os linfócitos CD4 coordenam a resposta imune e auxiliam na produção de anticorpos, os linfócitos CD8 têm a função de eliminar diretamente as células infectadas. Juntos, esses dois subtipos de linfócitos T desempenham papéis cruciais na defesa do organismo contra infecções.

Figura 29 - Imagem representativa da interação entre linfócitos CD4 e CD8 com uma célula apresentadora de antígenos APCs e célula tumoral.



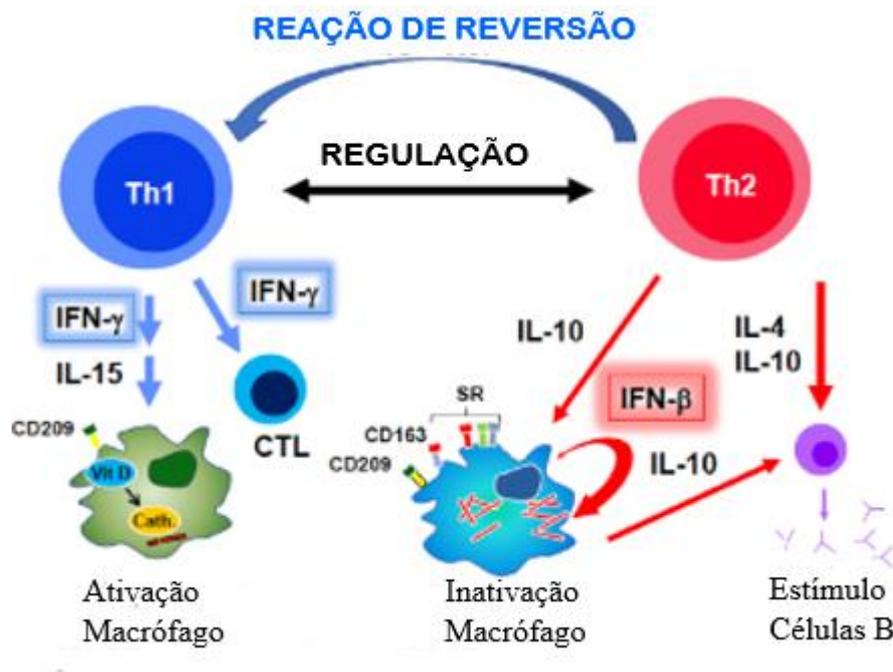
3- PERFIL DE RESPOSTAS TH1 E TH2

As respostas th1 e th2 são dois tipos diferentes de respostas imunológicas que ocorrem no organismo em resposta a diferentes estímulos. A resposta th1 envolve a ativação dos linfócitos T helper do tipo 1 (Th1) e é caracterizada pela produção de citocinas como interferon-gama (IFN-gama) e interleucina-2 (IL-2). Essa resposta é ativada principalmente por infecções intracelulares, como as causadas por vírus, bactérias intracelulares e protozoários. As células Th1 ajudam a ativar os linfócitos T citotóxicos e promovem a resposta imunológica celular, que envolve a destruição direta das células infectadas.

Em contraste, a resposta th2 envolve a ativação dos linfócitos T helper do tipo 2 (Th2) e é caracterizada pela produção de citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13). Essa resposta é ativada principalmente por infecções parasitárias e alergias. As células Th2 ajudam a ativar os linfócitos B e promovem a resposta imunológica humoral, que envolve a produção de anticorpos para combater os patógenos.

As respostas th1 e th2 são mediadas por diferentes tipos de citocinas e desempenham papéis distintos na defesa imunológica. Enquanto a resposta th1 é mais eficaz contra infecções intracelulares, a resposta th2 é mais eficaz contra infecções parasitárias e alergias. No entanto, um desequilíbrio entre as respostas th1 e th2 pode levar a várias doenças autoimunes e imunodeficiências.

Figura 30 - Imagem representativa dos mecanismos imunológicos de regulação dentre as respostas Th1 e Th2.



4- PRINCIPAIS CITOCINAS E SUAS FUNÇÕES

As citocinas são proteínas produzidas pelas células do sistema imunológico e desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune. Algumas das principais citocinas e suas funções são:

1. Interleucina-1 (IL-1): Promove a inflamação, estimula a produção de outras citocinas e inicia a resposta imune.
2. Interleucina-2 (IL-2): Estimula a proliferação de células T e aumenta a atividade das células T citotóxicas.

3. Interleucina-4 (IL-4): Atua na ativação de células B e na produção de anticorpos.
4. Interleucina-6 (IL-6): Induz a produção de proteínas de fase aguda, regula a resposta inflamatória e promove a diferenciação de células B.
5. Interleucina-10 (IL-10): Tem um efeito imunossupressor, reduzindo a resposta inflamatória.
6. Interferon-gama (IFN-gama): Estimula a atividade de células T citotóxicas e células natural killer (NK) e desempenha um papel importante na resposta antiviral.
7. Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa): Desempenha um papel importante na resposta inflamatória e possui atividade antitumoral.
8. Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): Estimula a produção e maturação de granulócitos, como neutrófilos, basófilos e eosinófilos.
9. Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF): Estimula a produção e maturação de macrófagos.
10. Fator estimulador de colônias de células-tronco (SCF): Estimula a formação e maturação das células progenitoras hematopoéticas.

Essas são apenas algumas das principais citocinas, e existem muitas outras que desempenham papéis importantes na resposta imune. É importante ressaltar que as funções das citocinas são complexas e interconectadas e podem variar dependendo do contexto celular e da resposta imune específica.

5- A RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO FATOR DE PROTEÇÃO

A inflamação é uma resposta complexa e essencial do sistema imunológico para proteger o organismo contra agentes invasores. Quando o corpo é exposto a uma lesão, infecção ou estresse, o sistema imunológico é

ativado e libera substâncias químicas, como citocinas e histaminas, que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos na área afetada. Isso resulta em um aumento do fluxo sanguíneo local e na migração de células imunológicas, como os leucócitos, para o local da inflamação. Essas células têm a função de identificar e destruir agentes invasores, como bactérias, vírus, fungos e células cancerígenas.

Além disso, a inflamação também promove a reparação e a regeneração do tecido danificado. Aumenta a produção de células de defesa, facilita a remoção de detritos e toxinas, estimula a produção de colágeno e de novos vasos sanguíneos, e protege a área afetada contra uma possível disseminação da infecção.

Embora a inflamação seja um mecanismo de defesa fundamental, ela também pode ter efeitos negativos se não for devidamente controlada. Uma inflamação crônica ou excessiva pode causar danos aos tecidos saudáveis e levar a doenças autoimunes, como artrite reumatoide, asma, doença inflamatória intestinal e doenças cardiovasculares.

6- O PAPEL REGULATÓRIO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico é regulado por vários mecanismos que garantem sua eficácia e evitam respostas imunes excessivas ou inapropriadas. Esses mecanismos de regulação incluem diversos processos, dentre eles a Tolerância imunológica. Tolerância imunológica: é a capacidade do sistema imunológico de não atacar os próprios tecidos do organismo. Isso ocorre porque durante o desenvolvimento dos linfócitos, as células que reconhecem antígenos próprios (auto-antígenos) são eliminadas ou tornadas inativas. A tolerância também pode ser induzida por células supressoras que inibem a resposta imunológica contra células próprias. Outro fator importante é o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama e a interleucina-1 estimulam a resposta imune, enquanto as citocinas anti-inflamatórias, como o interleucina-10 e o fator transformador de crescimento

beta, desligam ou inibem a resposta imune. O equilíbrio entre essas citocinas é essencial para evitar a inflamação excessiva ou crônica.

A Coestimulação e supressão imunológica são processos que durante a ativação de linfócitos, são necessários sinais adicionais chamados de coestimulação, fornecidos por moléculas presentes nas células apresentadoras de antígenos. Sem o sinal de coestimulação adequado, o sistema imunológico pode se tornar tolerante ou em estado de anergia, ou seja, incapaz de responder efetivamente a um estímulo. Além disso, células supressoras podem inibir a resposta imune, evitando danos aos tecidos próprios.

Outro fator importante é a remoção de células autoimunes, existem mecanismos de remoção de células autoreativas, ou seja, células do sistema imunológico que reconhecem antígenos próprios. Isso ocorre através da apoptose (morte celular programada) dessas células ou pela atuação de células supressoras que neutralizam seu efeito. Toda via é importante considerar a regulação pelo sistema complemento: o sistema complemento é uma parte do sistema imunológico que aumenta a resposta imune contra microrganismos invasores. No entanto, a ativação desregulada do sistema complemento pode levar a danos aos tecidos próprios. Existem mecanismos reguladores que controlam a ativação do complemento para evitar danos desnecessários.

Esses são apenas alguns dos mecanismos de regulação do sistema imunológico. É um sistema altamente complexo e delicado, e a falha em qualquer um desses mecanismos pode levar a doenças autoimunes, alergias ou imunodeficiências.

7- REGULAÇÃO E CÉLULAS T REGULATÓRIAS (TREG)

As células T regulatórias (Tregs) são um subtipo especializado de células T que desempenham um papel fundamental na regulação e supressão do sistema imunológico. Seu principal objetivo é prevenir e controlar respostas imunes excessivas, evitando que o sistema imunológico ataque as próprias células do

corpo (autoimunidade) ou responda excessivamente a agentes externos, como alérgenos.

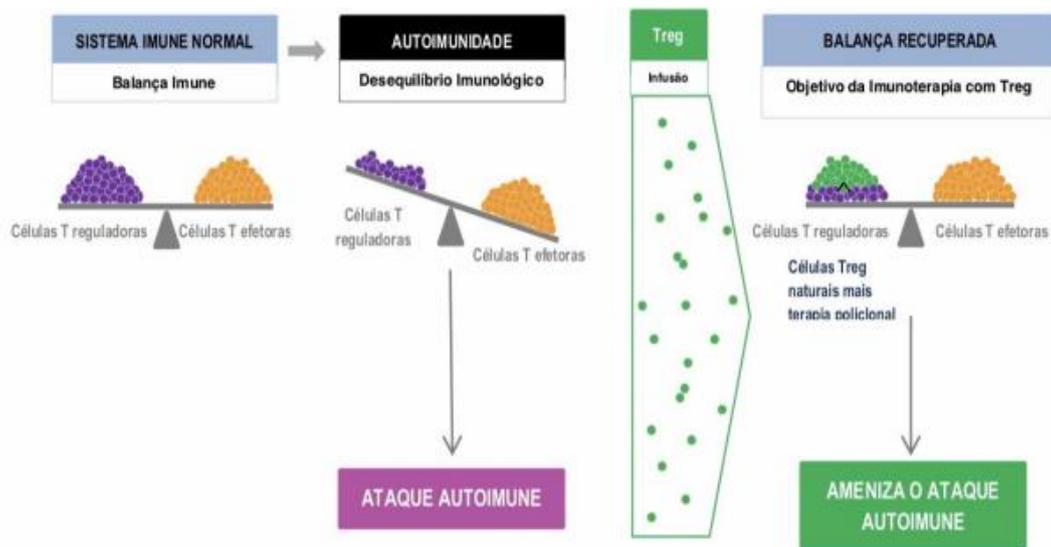
As células Tregs são capazes de reconhecer e suprimir as respostas imunes indesejadas através de vários mecanismos. Elas liberam substâncias reguladoras, como citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, interleucina-10 e TGF-beta), que inibem a ativação de outras células do sistema imunológico. Além disso, as células Tregs podem interagir diretamente com outras células imunes, como células T efetoras e células dendríticas, inibindo sua função e atividade.

As células Tregs também desempenham um papel importante na tolerância imunológica, que é a capacidade do sistema imunológico de reconhecer e tolerar substâncias não prejudiciais, como proteínas alimentares e flora intestinal, evitando respostas autoimunes ou alérgicas. Elas atuam suprimindo a ativação de linfócitos T e B responsáveis por respostas imunes indesejadas contra essas substâncias. Além disso, as células Tregs têm a capacidade de modular a resposta imune durante a gravidez, evitando rejeição fetal induzida pelo sistema imunológico da mãe.

No contexto de doenças autoimunes, as células Tregs podem estar presentes e ser funcionais, mas sua supressão é insuficiente para controlar a resposta imune patológica. Isso pode levar a uma quebra na autotolerância e ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

Em resumo, as células T regulatórias desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase imunológica, prevenindo respostas imunes indesejadas e ajudando na prevenção de doenças autoimunes e alérgicas. Elas são essenciais para modular a resposta imune e garantir uma resposta adequada do sistema imunológico a diferentes estímulos.

Figura 31 - Participação das células Treg no controle da resposta imunológica.



CAPITULO IV

IMUNOPARASITOLOGIA

1- MECANISMOS IMUNOLÓGICOS EM INVASÕES PARASITÁRIAS

O sistema imunológico possui diversos mecanismos para combater parasitos que invadem o organismo. Aqui estão alguns dos principais mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune contra parasitos dentre as principais: 1) Resposta imune inata; 2) Resposta imune adaptativa; 3) Produção de anticorpos; 4) Resposta imune mediada por células; 5) Resposta inflamatória.

1. Resposta imune inata: A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de parasitos. Essa resposta é mediada por células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, que detectam a presença de parasitos por meio de proteínas receptoras e iniciam uma resposta inflamatória. Essas células podem fagocitar os parasitos e liberar substâncias tóxicas para eliminá-los.

2. Resposta imune adaptativa: A resposta imune adaptativa é ativada quando a resposta imune inata não é suficiente para eliminar os parasitos. Nesse caso, células especializadas, chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e macrófagos, capturam fragmentos dos parasitos e os apresentam às células T auxiliares. As células T auxiliares, por sua vez, estimulam a produção de anticorpos pelas células B e ativam as células T citotóxicas para matar os parasitos.

3. Produção de anticorpos: Os parasitos podem ser alvos da resposta imune humoral, em que células B produzem anticorpos. Os anticorpos podem se ligar aos parasitos e neutralizá-los, impedindo sua entrada nas células hospedeiras e marcando-os para a destruição por células fagocíticas.

4. Resposta imune mediada por células: A resposta imune mediada por células, principalmente pelas células T, desempenha um papel importante no combate a parasitos intracelulares. As células T citotóxicas podem reconhecer e destruir células infectadas pelos parasitos, enquanto as células T auxiliares auxiliam na ativação das células B e na resposta imune adaptativa.

5. Resposta inflamatória: A resposta inflamatória desempenha um papel crucial na eliminação de parasitos. Células inflamatórias, como eosinófilos e basófilos, são recrutadas para o local de infecção por meio de sinais químicos liberados pelas células infectadas. Essas células liberam mediadores inflamatórios que causam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de mais células do sistema imunológico para combater os parasitos.

É importante ressaltar que a resposta imune contra parasitos pode variar dependendo do tipo de parasito e do local da infecção. Além disso, diferentes células, como mastócitos e eosinófilos, podem ser ativadas em resposta a diferentes parasitos. Os parasitos possuem várias estratégias para burlar o sistema imunológico do hospedeiro. Alguns dos mecanismos de evasão imunológica utilizados pelos parasitos incluem:

A mudança de antígenos de superfície é uma alternativa muito presente no processo de invasão parasitária. Muitos parasitos são capazes de alterar a expressão de antígenos de superfície, dificultando o reconhecimento por parte do sistema imunológico. Isso permite que eles evitem a ação de anticorpos específicos. Outro fator importante é promover a supressão da resposta imunológica. Os parasitos podem secretar substâncias que suprimem a resposta imune do hospedeiro. Essas substâncias podem inibir a atividade de células imunológicas, como linfócitos e macrófagos, ou evitar a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Alguns parasitos são capazes de invadir e viver dentro de células imunológicas, como macrófagos ou células dendríticas. Isso lhes permite evitar a ação do sistema imunológico. Algumas alternativas como o mimetismo molecular também pode contribuir de forma favorável para o parasito. Os parasitos podem produzir moléculas que se assemelham às moléculas do hospedeiro. Isso pode levar à inibição do sistema imunológico, pois o sistema imune pode não reconhecer essas moléculas como estranhas.

Esses são apenas alguns exemplos dos mecanismos que os parasitos podem usar para burlar o sistema imunológico. No entanto, é importante ressaltar que o sistema imunológico também possui mecanismos de defesa para lidar com parasitos, e a interação entre o parasito e o hospedeiro é complexa e diversa.

2- ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INTERAÇÃO PARASITO HOSPEDEIRO

As infecções proporcionadas por parasitos aos seres humanos possuem registros milenares. Os fatores imunológicos de cada indivíduo estão relacionados com fatores ambientais, locais endêmicos e epidemias, além da variabilidade biológica de cada um. Entretanto, os parasitos em uma constante de evolução adaptativa aprimoram seus fatores de virulência no intuito de burlar os mecanismos de defesa dos hospedeiros. Existem diversos mecanismos de

interação entre parasitos e hospedeiros no processo de estabelecimento das infecções. Alguns dos mais importantes são:

1. Aderência: O parasito adere às células do hospedeiro, geralmente por meio de estruturas especializadas na sua superfície, como ganchos, ventosas ou outras estruturas de fixação. Isso permite que o parasito se instale e se mantenha no hospedeiro.

2. Invasão: Após a adesão, o parasito invade as células ou tecidos do hospedeiro. Essa invasão pode ocorrer por diferentes vias, como penetração ativa, através de complexos de proteínas secretadas pelo parasito, ou por endocitose, na qual o hospedeiro envolve o parasito em uma vesícula e o internaliza na célula.

3. Burlar o sistema imune: O sistema imunológico do hospedeiro é uma das principais defesas contra infecções parasitárias. Por isso, os parasitos desenvolvem estratégias para evitar ou suprimir a resposta imune do hospedeiro. Isso pode ser feito por meio da produção de moléculas que inibem a resposta imune, pela modificação de antígenos na sua superfície para escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico, ou até mesmo pela invasão de células do sistema imune e sua manipulação.

4. Nutrição e reprodução: O parasito depende do hospedeiro para obter nutrientes e se reproduzir. Para isso, ele pode se alimentar do hospedeiro, utilizando os seus nutrientes ou células, ou até mesmo se reproduzir dentro do hospedeiro, produzindo larvas ou ovos que serão eliminados para infectar outros indivíduos.

5. Manipulação do hospedeiro: Alguns parasitos têm a capacidade de manipular o comportamento ou a fisiologia do hospedeiro para favorecer sua própria sobrevivência e reprodução. Isso pode incluir desde a alteração do sistema nervoso do hospedeiro para induzir comportamentos específicos, como no caso de toxoplasmose em roedores, até a indução de alterações hormonais para favorecer a reprodução do parasito.

Esses são apenas alguns exemplos dos mecanismos de interação entre parasitos e hospedeiros no processo de estabelecimento das infecções. Cada parasito possui adaptações específicas para se manter no hospedeiro e garantir sua própria sobrevivência e reprodução.

3- MODELO IMUNOLÓGICO DOS PARASITOS: LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença causada pelo parasita do gênero *Leishmania*, transmitido por picadas de mosquitos infectados. Quando o parasita entra no organismo, ele é reconhecido pelas células do sistema imunológico, que desencadeiam uma resposta imunológica para combatê-lo. A resposta imune na leishmaniose pode variar entre os indivíduos e é influenciada por fatores genéticos e ambientais. Existem dois principais mecanismos de resposta imune envolvidos na leishmaniose: a resposta Th1 e a resposta Th2.

A resposta Th1 é caracterizada pela produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). Essas citocinas estimulam a ativação de células do sistema imunológico, como os macrófagos, para destruir o parasita. Os macrófagos ativados aumentam a produção de óxido nítrico (NO), que tem efeito tóxico sobre o parasita. Além disso, as células T citotóxicas também são ativadas na resposta Th1 e participam na destruição direta das células infectadas pelas *Leishmania*.

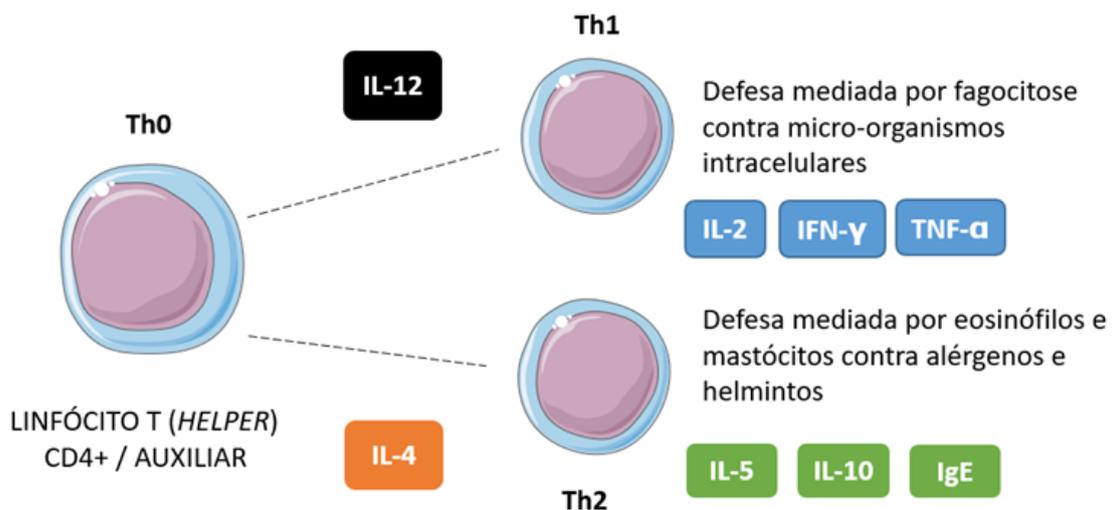
Por outro lado, a resposta Th2 é caracterizada pela produção de citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10). Essas citocinas promovem uma resposta imune mais humoral, estimulando a produção de anticorpos contra as *Leishmania*. No entanto, essa resposta é menos eficiente na eliminação do parasita e pode até mesmo contribuir para o desenvolvimento de uma forma mais severa da doença.

A resposta Th1 é considerada protetora na leishmaniose, pois promove a destruição direta do parasita e a ativação de células do sistema imunológico. A resposta Th2, apesar de sua capacidade de produzir anticorpos, pode ser associada a um maior risco de progressão da doença.

No entanto, é importante destacar que a resposta imune na leishmaniose é bastante complexa e outras células e citocinas também desempenham um papel importante. Além disso, existem diferentes espécies de *Leishmania*, cada uma com suas características imunológicas específicas. Portanto, a resposta Th1 e Th2 pode variar dependendo do tipo de infecção por *Leishmania* e das características do hospedeiro.

Os mecanismos imunológicos descritos anteriormente foram propostos a partir de diversos estudos experimentais. As contribuições científicas realizadas por diversos autores foram fundamentais na elucidação da relação parasito hospedeiro no estabelecimento da infecção por *Leishmania*.

Figura 32 - Modelo esquemático na atuação da resposta Th1 e Th2.



4- PROSPECTOS EXPERIMENTAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS INFECÇÕES POR LEISHMANIOSE

O perfil da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro poder ser crucial para o desenvolvimento da leishmaniose. Assim, vários estudos (Pearson et al, 1983; Howard et al, 1980; Liew et al, 1982) foram realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos de regulação das respostas Th1/Th2 na infecção por *Leishmania*. Um fator importante é que a modulação da resposta Th1 e Th2 na leishmaniose em camundongos têm influência fundamental na característica da resposta mediada pelas células T CD4+, podendo separar-se em subgrupos com base no perfil de citocinas. Experimentos realizados com *L. major* utilizando camundongos (BALB/c) susceptíveis à infecção, demonstraram que IL-4 possui um papel importante no desenvolvimento da resposta imune contra um antígeno específico da *Leishmania* denominado LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C Kinase) (Launois et al., 1997), regulando negativamente a expressão da subunidade $\beta 2$ do receptor de IL-12 nas células Th1 que possui potencial protetor. Assim, a célula não reconhece IL-12 e a produção de IFN- γ e a produção de NO (óxido nítrico) pelos macrófagos é inibida, impedindo a destruição dos parasitos pelos mesmos. A IL-4 também, promove a diferenciação das células Th2 induzindo uma maior secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, entre outras citocinas, bem como a produção de anticorpos específicos contra o parasito (Locksley et al, 1991; Scott et al, 1991; Heinzl et al, 1989; Heinzl et al, 1991; Rogers et al, 2002). Estudos realizados tanto em *L. major* (Kopf et al, 1996) e principalmente em *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993; Soong et al, 1997; Jones et al, 2000; Jones et al, 2002), indicaram que utilizando o mesmo hospedeiro e diferente cepas ou espécies do parasito, a resposta protetora era sempre dependente da produção de IFN- γ , mas a susceptibilidade à infecção nem sempre dependia da produção de IL-4. Estudos em modelos experimentais refletem o que já se havia observado há muito tempo na doença em seres humanos, ou seja, que o parasito tem uma participação importante no estabelecimento da infecção e na determinação de sua forma clínica. Entretanto, independentemente da necessidade ou não do

desenvolvimento de uma resposta Th2 para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*, um ponto em que vários dos estudos acima citados concordam é que os momentos iniciais da infecção são cruciais no estabelecimento da resposta imune e costumam determinar sua capacidade de controlar ou não a infecção por estes parasitos (Jones et al, 2002; Vester et al, 1999). A variabilidade de manifestações clínicas das leishmanioses é causada por estes fatores e pode ser observado em experimentos com camundongos inoculados com *L. major* ou *L. braziliensis* que desenvolvem lesões cutâneas simples e evoluem espontaneamente para cura (Childs et al, 1984; Sacks & Noben-Trauth, 2002). Entretanto, quando camundongos são inoculados com *L. amazonensis*, embora não desenvolvam a forma difusa da infecção, não conseguem controlá-la e desenvolvem uma lesão persistente que se torna crônica (Kima et al., 2000). Estudos sobre a imunopatogênese das leishmanioses cutâneas, demonstraram que a resistência de camundongos aos parasitos do gênero *L. major* está relacionada com a indução e desenvolvimento preferencial das respostas tipo Th-1 (Locksley et al., 1987). Estas respostas incluem a produção de IL-2 que ativa a proliferação de linfócitos, a produção de IFN- γ e TNF- α que são mediadores da proteção pela ativação de macrófagos para atividade microbicida através da produção de óxido nítrico (NO) (Wei et al., 1995). Outros fatores podem contribuir para a regulação da resposta imune, células da resposta imune inata, como granulócitos e células “natural killer” (NK), bem como os queratinócitos e células dendríticas que secretam citocinas e quimiocinas responsáveis pela diferenciação das células T CD4+, determinando assim, a prevalência do perfil Th1 protetor ou Th2 susceptível à infecção. As células T regulatórias (Treg) também exercem um papel importante na resposta imune do hospedeiro aos parasitos, as Treg inibem ativamente a resposta imune, desempenhando um papel preventivo na autoimunidade, bem como na regulação geral da resposta imune aos tumores e às doenças infecciosas em geral (Maloy & 22 Powrie, 2001; Sakaguchi, 2004). Segundo (Jiaxiang et al, 2005) as células T CD4+ e CD25+ representam um subconjunto de células Treg que representam 5 a 10% da população geral de células T CD4+, esta população de linfócitos possui ação moduladora no sistema

para a sobrevivência das formas amastigotas no interior dos macrófagos, através da ligação com receptores de Complemento (Brinttingham & Mosser, 1996; Handman & Bullen; 2002). A proteína LACK se encontra próxima ao cinetoplasto do citoplasma celular e possui grande homologia entre as diferentes espécies do parasito. A presença de um epitopo imunodominante em sua conformação ativa linfócitos CD4+ com receptor de células T (TCR) V β 4, V α 8 produtores de IL-4, que aumentam após a infecção por *L. major* em camundongos BALB/c, contribuindo para a susceptibilidade do hospedeiro à infecção, regulando negativamente a expressão da subunidade β 2 do receptor de IL-12 nas células Th1 que possui potencial protetor. A participação das moléculas citadas anteriormente no mecanismo de infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, pode ser de grande importância para elucidar os processos que envolvem a ação do parasito, e a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro nas fases iniciais da infecção.

6- O PAPEL DAS ECTO-NUCLEOTIDASES NA INFECÇÃO POR PARASITOS

As E-NTPDases são ecto-nucleotidases com atividade apirase e a presença de íons bivalentes geralmente Ca²⁺ ou Mg²⁺ no meio extracelular, contribui para sua capacidade de hidrolisar ATP e ADP, resultando na produção de AMP (Plesner, 1995; Zimmermann, 2000). As funções fisiológicas destas enzimas ainda não foram totalmente elucidadas, mas há hipóteses que sugerem a participação delas em vários processos como: proteção contra efeitos citolíticos promovidos pelo ATP extracelular, terminação da sinalização purinérgica, envolvimento na transdução de sinal e envolvimento na adesão celular. Estudos sobre o papel destas enzimas em parasites foram descritas em espécies como *Toxoplasma gondii* (Asai et al, 1995), *Tritrichomonas foetus* (Jesus et al, 2002), *Trypanosoma cruzi* (Bissagio et al, 2003; Fietto et al, 2004) *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al, 1997), os resultados obtidos com espécies da família *Tripanosomatidae*, especificadamente as espécies *T. gondii* e *L. amazonensis* demonstraram a participação destas enzimas na captação de adenina para as vias

de salvação de purinas, necessário para a sobrevivência do parasito. As 5'-nucleotidasas são enzimas encontradas na forma solúvel ou presente nas membranas de parasitos, bactérias, células vegetais e animais (Zimmermann, 1992). Estas enzimas agem sobre mononucleotídeos purínicos e pirimídicos, apresentam atividade sobre 5'-dinucleotídeos, 5'-trinucleotídeos e sobre nucleotídeos complexos como UDP-glicose ou Flavina Adenina dinucleotídeo (FAD) e ainda, são capazes de hidrolisar AMP resultando na formação de adenosina.

O ATP extracelular é uma molécula que exerce um papel importante na resposta imune de mamíferos (Launois et al, 1997). Após o processo de injúria são liberadas altas concentrações de ATP extracelular, age como “sinal de perigo” induzindo uma resposta /inflamatória caracterizada pela liberação de citocinas, tais como IFN- γ , IL-12 e TNF (Ia sala et al, 2003; Langston et al, 2003). Os efeitos podem variar de acordo com a concentração, o tempo de ação e o tipo de célula envolvida (Di Virgilio F., 2007). O controle dessas ações é realizado pelas enzimas com atividade da família apirase e 5'-nucleotidase, que agem sobre o ATP e seus produtos de degradação, reduzindo a sua concentração no meio extracelular resultando na conversão em adenosina. A adenosina através da ativação de receptores purinérgicos da família P1 induz uma resposta anti-inflamatória, contrária a resposta promovida pelo ATP.

REFERENCIAS

ABBRANCHIO, M.P., Boeynaems, J.M. Barnard, E.A. Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A. and Burnstock, G. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 52-55.

ABBRANCHIO, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A. Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A. and Weisman, G.A. 2006. International Union of Pharmacology LVII: update on P2Y G protein coupled nucleotide receptors : from molecular mechanisms pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281-341.

AFONSO, L.C.C. and Scott, P. 1993. Imune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61:2952-2959.

ALEXANDER, J. and K. Vickerman. 1975. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana* macrophages. *J. Protozool.* 22-502.

ALMEIDA-AMARAL, E.E., R. Belmont-Firpo, M.A. Vannier-Santos, and Meyer-Fernandes, J.R. 2006. *Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-phosphatase activity. *Exp. Parasitol.* 114(4):334-40. ASAI, T. Miura, S. Sibley, L.D. 1995. Okabayashi, H. Takeuchi, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hidrolase isozymes from the parasite protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 270: 1191-7.

BACELLAR O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, Johnson WD, Carvalho EM. 1996. Interleukin-12 restores interferon-gamma

production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173: 1515- 1518. BACELLAR O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 12: 1228-1231.

BAKALARA, N., Seyfang, A., Davis, C., and Baltz, T.1995. Characterization of a Life-Cycle-Stage Regulated Membrane Protein Tyrosine Phosphatase in *Trypanosoma brucei*. *Eur.J.Biochem.*234, 871–877. BARGANHOL, E., S.K.A.Tamajasuku, A. Bernardi, M.R. Wink, and Battastini A.M.O, 2007.Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Bioch. Biophys. Acta.*1770: 1352-1359.

BARRAL, A., M.Barral-Netto, E.C.Young, C.E.Brownell, D.R.Twardzik, and S.G.Reed. 1993. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania brasiliensis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90(8):3442-3446.

BERREDO-PINHO, M., C.E.Peres-Sampaio, P.P.Chrispim, R.Belmont-Firpo, A.P.Lemos, A.Martiny, M.A.Vannier-Santos, and J.R.Meyer-Fernandes. 2001. A Mg-dependent ecto-atpases in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch.Biochem.Biophys.* 391:16-24

BERTHOLET, S., A.Debrabant, F.Afrin, E.Caler, S.Mendez, K.S.Tabbara, Y.Belkaide, and D.L.Sacks. 2005. Antigen requirements for Efficient Priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*- Dendritic Cells. *Infect.Immun.* 73(8):4714-4722.

BETTINI, S., Gradoni, L., 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect. Sci. Appl.* 7, 241–245. BISSAGIO, D.F., Peres-Sampaio, Meyer-Fernades, J.R., and Souto-Padron, T. 2003. Ecto-ATPase activity on the surface of the *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol.Res.* 91, 273-282.

BOGDAN C, Rollinghoff M, and Diefenbach A: The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000, 173:17-26. BORGES, F.P., B.Gottardi, C.Stuepp, A.B. Larré, T. Tasca, G.A.De Carli, and Bonan C.D. 2007. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5.) activity in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*. *Veter. Parasitol.* 143:106-111.

BRINTTINGHAM, A, and Mosser, D.M. 2006. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today.* 12. 444-447 BRYANT. S. M., L. A. Guthrie, M. J. Pabst. and R. B. Johnston, Jr.1986. Macrophage membrane proteins: possible role in the regulation of priming for enhanced respiratory burst activity. *Cell. Immunol.* 45-53.

BURNSTOCK G. 2007. Purine and Pyrimidine receptors. *Cell.Mol.Life.Sci.*64, 1471-1483. CABRAL, M., O'grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76, 173–180.

CARVALHO E.M, Bacellar O.A, Reed S, Barral A, Rocha H. 1988. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Brazilian Journal of Medical Biological Research.* 21: 85-92.

CHANG, K. P. 1981. *Leishmania donouan*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*4-67.

CHANG, K.-P., D. Fong, and R. S. Bray. 1985. *Biology of Leishmania and leishmaniasis*, Chang and R. S. Bray (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier, London. p. 1-30. In K.-P.

CHANG. K. P., and D. M. Dwyer. 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in the phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* 193:678.

CHILDS, G.E., L.K.Lightner, L.Mackinney, M.G.Groves, E.E.Prices, and L.D.Hendricks. 1984. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania amazonensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 78:25-34.

COHN, C.S, Gottlieb M. 1997.The acquisition of purines by Trypanosomatids. *Parasitol Today*;13:231 –5. COIMBRA, E.S., S.C.Gonçalves-da-Costa., S.Corte-Real, F.G.De Freitas, A.C.Durão, C.S Souza, M.I.Silva-Santos, e E.G Vasconcelos. 2002. Characterization and cytochemical localization of an diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitol.* 124:137-143.

COOL, D.E., Blum, J.J., 1993. Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry* (127/128),143–149.

DI VIRGILIO, F.2007. Purinergic signalling in the immune system . A brief update. *Purinergic signalling.* 3,1-3

DING, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J.Immunol.* 141:2407–2412.

DING A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. 1990.Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1-beta 2 and-beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *Journal of Immunology* 145: 940-944. DE ALMEIDA M.C,

Cardoso S.A, Barral-Netto M. 2003. Leishmania (Leishmania) chagasi infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. International Journal of Parasitology 33: 153-162.

DUARTE, M.I.S. & Cobertt, C.E.P. 1994. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil; leishmaniose visceral. In: Brasileiro Filho G, Pitella Jeh, Pereira Fel, Bambirra Ea & Barbosa Aja. Bogliolo Patologia 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. Cap. 33, 1151- 1152.

DUTRA, P.M.L., Rodrigues, C.O., Jesus, J.B., Lopes, A.H.C.S., Souto-Padrón, T., Meyer-Fernandes, J.R., 1998. A novel Ecto-phosphatase activity of Herpetomonas muscarum muscarum inhibited by platelet activation factor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 253, 164–169.

EVANS, T.G., L. Thai, D.L. Granger, and J.B. Hibbs, Jr. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. J. Immunol. 151:907-912. FERRARI, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Idzko, M., Panther, E. and Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. J. Immunol. 35, 527-537.

FERRARO, R.B., Souza, J.L., Cunha, R.D.C., and Meyer-Fernandes, J.R., 2004. Characterization of an ecto-phosphatase activity in malpighian tubules of hematophagous bug Rhodnius prolixus. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 57, 40–49.

FRETES, R.E., Paglini, P., Fernandez A.R., Enders, J. and De Fabro, S.P. 1999. Trypanosoma cruzi: increased 5'-nucleotidase activity associated with dysfunction of adrenergic receptors in acutely infected albino Swiss mice. J. Parasitol. 85, 970-972.

FURUYA, T., Zhong, L., Meyer-Fernandes, J.R., Hong-Gang, L., Moreno, S.N.J., and Docampo, R., 1998. Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 92, 339–348.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE.2000. Guia de Doenças da Fundação Nacional de Saúde. URL: [http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/leishmaniose visceral](http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/leishmaniose%20visceral).

GHALIB H.W, Piuvezam M.R, Skeiky Y.A, Siddig M, HashimF.A, el-Hassan A.M, Russo DM, Reed SG. 1993.Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Clinical Investigation*. 92: 324-329.

GREEN, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Whishnok, and S. R. Tannenbaum. 1984. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*.126: 131–136.

GREEN, S.J., M.S. Meltzer, J.B. Hibbs, Jr., and C.A. Nacy. 1990.Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol* 144:278.

GRIMALDI, G.Jr., and Tesh, B.R. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Am.Society for Microbiology*. 6:230-250

GHOSH, M., and Mukherjee, T. 2000. Stage-specific development of a novel adenosine transporter in *Leishmania donovani* amastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol*. 108:93-99.

GLEW, R.H., A.K. Saha, S. Das, and A.T. Remaley.1988. Biochemistry of the Leishmania species.Microbiol Rev.52(4): 412–432.

GODING,J.W. and M.C.Howard. 1998. Ecto-enzymes of lymphoid cells. Immunol.Rev. 161:5-10.

GOTTLIEB, M. and D.M. Dwyer.1982. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of Leishmania donovani promastigotes. Mol Cell Biol.2(1): 76–81

GOTTLIEB, M. and Dwyer. D.M. 1983. Evidence for distinct 5'-and-3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of Leishmania donovani promastigotes. Mol.Biochem.Parasitol. 7, 303-317. 71

HASKO, G., Kuhel, D.G., Chen, J.F., Schwarzchild, M.A., Deitch, E.A., Mabley, J.G., Marton, A. and Szabo, C.2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-alpha production via adenosine A2A receptor-dependent and independent mechanisms. FASEB.J.14, 2065- 2074.

HANDMAN, E. and Bullen, 2002. Interaction of Leishmania with the host macrophages. Trends Parasitol. 18, 332-334.

HEINZEL, F. P.; Sadick, M. D.; Mutha, S. S.; and Locksley, R. M. 1991. Production of interferon-gamma, interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of American, v.88, p.7011-7015.

HEINZEL, E P., Sadick ,M. D. Holaday, B. J. Coffman, R. L. and Locksley, R. M. 1989. Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. J. Exp. Med.169.59.

HOWARD, J.G., Hale, C. and Chan Liew, W.L. 1980. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J. Immunol.* 128: 1917.

HUMPHREYS, B. D., & Dubyak, G. R. 1998. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 64(2), 265–273.

JACOBSON, K.A. and Gao, Z.G. 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 247-264.

JANUSZ, M. J. K. F. Austen, and J. K. Czap. 1987. Lysosomal enzyme release from human monocytes by particulate activators is mediated by α -glucan inhibitable receptors. *J. Immunol.* 138:3897.

JESUS, J.B., Podlyska, T.M., Lopes, A.H.C.S., Vannier-Santos, M.A., and Meyer-Fernandes, J.R., 2002. Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* 88, 991–997.

JIAXIANG, J. J. Masterson, J. Sun, and L. Soong. 2005. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. *The J. of Immunology*. 174: 7147-7153.

JONES, D.E., L.U. Buxbaum, and P. Scott. 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 165:364-372.

JONES, D.E., M.R. Ackermann, U. Wille, C.A. Hunter, and P. Scott. 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 Interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.* 70:2151-2158.

KARUPIAH, G., Fredricson T.N., Holmes K.L., Khairallah, L.H., and Buller, R.M. 1993. Importance of interferons in recovery from mousepox. *J.Virol.* 67(7): 4214-4226. 72

KRECKLER, L.M., Wan, T.C., Ge, Z.D. and Auchampach, J.A. 2005. Adenosine inhibits tumor necrosis factor –alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor.*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 317; 172-180.

KIMA, P.E., S.L.Constant, L.Hannum, M.Colmenares, K.S.Lee, A.M.Haberman, M.J.Shlomchick, and D.Macmahon-Pratt. 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastogotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J.Exp.Med.* 191:1063-1068.

KLEMPNER, M. S., M. Cedron, and D. J. Wyler. 1983. Attachment of plasma vesicles of human macrophages to *Leishmania tropica* promastigotes.*J. Infect. Dis.* 148~337.

KOPF, M., F.Brombacher, G.Köhler, G.Keinzle, K.-H.Widman, K.Lefrang, C.Humborg, B.Lederman, and W.Solbach. 1996. IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major* . *J.Exp.Med.* 184:1127-1136.

LA SALA,A., D.Ferrari, F.Di Virgilio, M.Idzko, J.Norgauer, and G.Girolomoni. 2003. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* 73:339-343.

LAISON R. and Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R eds. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic Press, 1987:1– 1111.

LANGSTON, H.P., K. Yong, A.T. Gewirtz, K.E. Dombrowski, and J. A. Kapp. 2003. Secretion of IL-12 and IFN- γ , But IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP. *The Journal of Immunology*. 170: 2962-2970.

LAPPAS, C.M., Rieger, J.M. and Linden, J. 2005. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4⁺ T cells. *J. Immunol*. 174, 1073-1080.

LAUNOIS, P.; Maillard, I.; Pingel, S.; Swihart, K. G.; Xenarios I.; and Acha-Orbea H. 1997. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4⁺ T cells instruct Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, v.6, p.541-549,.

LEMOS, A.P., Souza, A.L.F., Pinheiro, A.A.S., Berrêdo-Pinho, M., and Meyer-Fernandes, J.R., 2002. Ecto-phosphatase activity on the cell surface of *Crithidia deanei*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c, 500–505.

LÉVESQUE SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, and Sévigny J. 2007. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol*. 152(1):141-50.

LIEW, F.Y., S. Millott, C. Parkinson, R.M.J. Palmer, and S. Moncada. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol*. 144:4794-7. 73

LIEW, F.Y., Y. Li, and S. Millott. 1990. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ , in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol*. 145:4306.

LO, S.K., Bovis, L., Matura, R. Zhu, B., Lum, H., Turco, S.J. and Ho, J.L. 1998. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol*. 160.1857-1865

LOCKSLEY, R.M.; Heinzl, F.P.; Sadick, M.D.; Holaday, B.J.; and Gardner K.D. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annual Inst. Pasteur Immunology*, v.138, p.744-749, 1987.

LOOKER, D.L. Berens, R.L. and Marr, J.J. 1983. Purine metabolism in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 9:15–28.

MALOY, K.J. and F.Powrie.2001. Regulatory T Cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2, 816-819.

MAOILI, T.U., E.Takane, R.M.Arantes, J.L.Fietto, and L.C. Afonso. 2004. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol.Res.* 94:207-212. MARR, J.J.Berens, R.L., and Nelson, D.J.1978. Purine metabolism and *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim.Biophys.Acta.*544, 360-371.

MARCUS AJ, Broekman M.J., Drosopoulos J.H, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, and Levi R 2003. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 305:9–16.

MARQUES-DA-SILVA, E.A. Oliveira, J.C. Figueiredo, A.B. Júnior, D.S.L. Carneiro, C.M. Fietto, J.L.R. and Afonso L.C.C. 2008. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and infection.* 850-857

MEYER-FERNANDES, J.R. 2002. Ecto-ATPases in protozoa parasites looking for a function. *Parasitol.Int.* 51:299-303.

MEYER-FERNANDES, J.R, Dutra, P.M., Rogrigues, C.O., Saada-Nehme, J. and Lopes, H.A. 1997. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania Tropic*. *Arch.Biochem.Biophys.*341, 41-50.

MIZUMOTO N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H,Enjyoji K, Takashima A 2002.CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 8:358–365

MAHAUT-SMITH, M.P., Ennion, S.J. Rolf, M.G. and Evans, R.J.2000. ADP is not an agonist at P2X(1) receptors evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets . *Br. Pharmacol.*. 131, 108-114. 74

MURRAY, H.W., J.D.Berman, C.R.Davies, and N.G.Saravia. 2005. Advances and leishmaniases. *Lancet.* 366:1561-1577.

MURRAY HW, and Nathan CF. 1999.Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental. Medicine* 189: 741-746,

NAKAAR, V. Beckers, C.J.M. Polotsky, V. and Joiner, K.A.1998. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleotide triphosphate hydrolase. *Mol Biochem Parasitol.*97:209-20.

NEWMAN, C. 2003. Serum-free cell culture—the ethical, scientific and economic choice. *Biomed. Scientist.*941–942.

NORTH, R.A. and Suprenant, A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40, 563-580.

PANTHER E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la Sala A, Girolomoni G, and Norgauer J.2003. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood*. 15;101(10):3985-90.

PEARSON, R.D., Wheeler, D.A., Harrison, L.H. and Kay, H.D. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* 5: 907

PINELLI E, Ellick-Kendrick R, and Wagenaar J.1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62:229–35.

PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. 1995.*Int Rev Cytol*;158:141 –214.

POSNER, B.I., Faure, R., Burgess, J.W., Bevan, A.P., Lachance, D., Zhnag-Sun, G., Fantus, I.G., Ng, J.B., Hall, D.A., Lum, B.S., Shaver, A., 1994. Peroxovanadium compounds a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 4596–4604.

RASKOVALOVA, T., Huang, X., Sitkovsky, M., Zacharia, L.C., Jackson, E.K. and Gorelik, E.2005. Gs protein acoupled receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J.Immunol.* 175, 4383-4391.

REITHINGER, R. and Dujardin, J.C. 2007. Molecular Diagnosis of leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J.Clin.Microbiol.*45:21-25.

RIBEIRO, J.M., Katz, O., Pannel, L.K., Waitumbi, J. and Warburg A. 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J.Exp.Biol.* 202, 1551-1559.

ROGERS, K.A.; Dekrey, G.K.; Mbow, M.L.; Gillespie, R.D.; Brodskyn, C.I.; and Titus, R.G. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*, v.209, p.1-7. 75

ROGERS, K.A. and Titus, R.G. 2003. Immunomodulatory effects of *Maxadilan* and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 25, 127-134

SACKS, D. and Kamhawi, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, v.55, p.453-483.

SACKS, D. and Noben-Trauth, N. 2002. The immunology and susceptibility and resistance *Leishmania major* in mice. *Nat.Rev.Immunol.* 2:845-858.

SACKS, D. and Perkins, P.V. 1984. Identification of Infective Stage *Leishmania* Promastigotes. *Science*. 233: 1417-1419

SAKAGUCHI, S. 2004. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531.

SCHNURR, M., Toy, T., Stoitzner, P., Cameron, P., Shin, A., Beecroft, T. 2003. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood.* 98: 153-159

SCHNURR, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S., and Eigler, A. 2000. Extracellular ATP and TNF- α synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 147, 3149-3155.

SCOTT, P. 1991. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology*, v.147, p.3149-3155.

SILVA, R. and D.L. Sacks, 1987. Metacyclogenesis Is a Major Determinant of Leishmania Promastigote Virulence e Attenuation. *Infection and Immunity.* 126: 2802-2806

SKELTON, L., Cooper, M., Murphy, M., & Platt, A. 2003. Human immature monocyte-derived dendritic cells express the G protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001, P2Y14) and increase intracellular calcium in response to its agonist, uridine diphosphoglucose. *J. Immunol* 171(4), 1941–1949.

SOMERS, G. R., Hammet, F. M., Trute, L., Southey, M. C., & Venter, D. J. 1998. Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease. *Lab Invest.* 78(11), 1375–1383.

SOONG, L., C.H. Chang, J. Sun, B.J. Longley, Jr., N.H. Ruddle, R.A. Flavell, and D. McMahon-Pratt. 1997. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 158:5374-5383.

SPÄTH, G.F. and Beverkley, S.M.. 2001. A lipophosphoglycan- independent method for isolation of infective leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.* 99:97-103. 76

STUEHR, D., and M.A. Marletta. 1985. Mammalian nitrite biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7738.

SURPRENANT, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., and Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor P2X7. *Science.* 272, 735-738.

TASCA, T., Bonan, C.D., Carli, C.A., Battastini, A.M. and Sarkis, J.J. 2003. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp. Parasitol.* 105, 71-78

TAUSSKY, H.H. and Schorr, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202.675-685.

THOMPSON, L.F., Eltzchig, H.K., Ibla, J.C. Van de Wiele. C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C., and Colgan, S.P. 2004. Crucial role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 200, 1395-1405.

TRINCHIERI G, and Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. 1996. *Journal of Leukocyte Biology* 59: 505-511.

VALDINEREZ, M., C. Lonardoni, M. Russo, and S. Jancar. 2000. Essential Role of Platelet - Activating Factor in Control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. *Infect. Immun.* 68:6355-6361.

VESTER, B., K. Muller, W. Solbach, and T. Laskay. 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *leishmania major*. *Infect. Immun.* 67:3155-3159.

WALTERS, L. L. 1993. Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Euk. Microbiol.* 40:196-206

WALTERS, L. L., G. B. Modi, R. B. Tesh, and T. Burrage. 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana Mexicana* and *Lutzomyia abonenci* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:294-314

WEI, X.; Charles, I.G.; Smitch, A.; Ure, J.; Feng, G.; Huang, F.; Xu, D.; Muller, W.; Moncada, S.; Liew, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, v.375, p.408-411, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.
<http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm>.

WILKIN, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.M., and Robaye, B. 2001. The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 7172-7177. 77

WYLER, D.J. 1982. In Vitro Parasite Monocyte Interactions in Human Leishmaniasis. Evidence for an active role of the parasite in attachment. *J. Clin.* 70, 82-88.

ZIMMERMANN, H. 1992. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285 (Pt2), 345-365.

ZIMMERMANN, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 392, 299-X
FEFB309/2013/06/Microbiologia_Basica.pdf