

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE PROTOESCÓLICES E AgB DE *Echinococcus granulosus* EM POSSÍVEIS MECANISMOS DE EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.**

**Veridiana Gomes Virginio**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como um dos requisitos básicos para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular**

**Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira**

**Porto Alegre, julho de 2007**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e no Instituto de Higiene da Cátedra de Inmunología da Universidad de la República de Montevideú, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia (CABBIO), pela Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias Del Cono Sur da América Latina (RTPD Network) por parte do Brasil e pelo Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) e pelo Consejo Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por parte do Uruguai.

À minha família, Honorina Gomes Virginio, Osael Virginio Filho e  
Marcelo Gomes Virginio

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela sua orientação segura e capaz, amizade, compreensão e auxílios constantes durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela oportunidade de realização deste trabalho, confiança, incentivo, dedicação e amizade.

A Dra. Ana Hernández, pela amizade, dedicação e auxílio fundamental durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia, em especial para Melissa, Karina, Alice, Patrícia, Tanise, Larissa, Alessandra, Gustavo, Ana Luísa, Fernanda e Caroline.

Aos colegas do Laboratório 210, em especial para Paulo, Desirée, Marcos e Luíza.

Aos colegas do Instituto de Higiene da Cátedra de Inmunología, em especial para Lorena, Verônica, Adriana, Sylvia, Ana Lia, Ana Ferreira, Carmen, Gustavo e Gualberto, pela ótima recepção, convivência e auxílios durante o trabalho.

As professoras Aoi Masuda e Célia Carlini, pela participação em minha comissão de acompanhamento e pelas sugestões de extrema importância.

Aos professores do Departamento e do Centro de Biotecnologia, por todos os ensinamentos.

Aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia, pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários e demais integrantes do Departamento e do Centro de Biotecnologia, em especial a Silvia e ao Luciano, pela amizade e disposição de ajudar.

As agências CNPq, CAPES, CABBIO, RTPD Network por parte do Brasil, e PEDECIBA e CSIC por parte do Uruguai, pelo suporte financeiro.

Aos amigos Cíntia e Martín, pelo apoio, dedicação, confiança, incentivo e amizade sincera constantes.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> .....	13
1.2. Hidatidose .....	17
2. Resposta imune inata do hospedeiro .....	21
2.1. Neutrófilos .....	22
2.1.1. ROS de neutrófilos .....	25
2.1.2. Integrinas de neutrófilos .....	27
2.1.3. IL-8 .....	28
2.2. Resposta adaptativa do hospedeiro .....	28
3. Mecanismos de evasão do parasito .....	30
4. Produtos de secreção e/ou excreção parasitários.....	31
4.1. AgB .....	32
Justificativas .....	35
Objetivos .....	36
CAPÍTULO I .....	37
CAPÍTULO II .....	38
1. Materiais e Métodos .....	39
1.1. Protoescólices .....	39
1.2. Obtenção dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices .....	39

1.3. SDS-PAGE e <i>western blotting</i> .....	40
1.4. Espectrometria de massas.....	41
2. Resultados .....	41
2.1. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS .....	41
2.2. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por <i>western blotting</i> .....	44
2.3. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por espectrometria de massas .....	47
2. DISCUSSÃO GERAL .....	49
PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXOS.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	células apresentadoras de antígenos
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FcR	receptor Fc
GRO- $\alpha$	oncogene- $\alpha$ relacionado ao crescimento
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular do tipo 1
ICAM-2	moléculas de adesão intercelular do tipo 2
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IgG	imunoglobulinas da classe G
IgG4	imunoglobulinas da classe G4
IgE	imunoglobulinas da classe E
IL-4	interleucina do tipo 4
IL-6	interleucina do tipo 6
IL-8	interleucina do tipo 8
IL-10	interleucina do tipo 10
IL-12	interleucina do tipo 12
IL-13	interleucina do tipo 13
IPB-LACEN	Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central pertencente à Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
kDa	quilodalton
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LPS	lipopolissacarídeos
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>natural killer</i>
PAF	fator ativador de plaquetas
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	tampão fosfato salino
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PMA	forbol meristato acetato
PMN	leucócitos polimorfonucleares
ROS	espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SIF-SAA/RS	Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura-Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul
Th1	linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR	receptor <i>Toll-like</i>
TLR2	receptor <i>Toll-like</i> do tipo 2
TLR3	receptor <i>Toll-like</i> do tipo 3
TLR4	receptor <i>Toll-like</i> do tipo 4
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral- $\alpha$

## RESUMO

Os fatores que afetam a susceptibilidade a infecção com *E. granulosus* são pouco conhecidos. Neste trabalho, foi avaliada a interação de protoescólices e um antígeno imunodominante secretado (AgB) de *E. granulosus* com neutrófilos humanos saudáveis. A intensidade de expressão de CD11b e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram avaliadas por citometria de fluxo usando sangue total. Os neutrófilos isolados também foram incubados com protoescólices ou AgB, e a interleucina 8 (IL-8) foi determinada por ELISA de captura. Os protoescólices induziram um aumento significativo na expressão de CD11b em neutrófilos (p=0,026) e na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p=0,026), entretanto a sua viabilidade não foi afetada. Em contraste, nenhum efeito foi observado com o AgB em ambos ensaios. Uma moderada produção de IL-8 foi detectada somente em sobrenadantes de neutrófilos cultivados com protoescólices comparada com a produção basal (p=0,028). O efeito de uma incubação prévia com o AgB foi avaliada em relação a expressão de CD11 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida pelo tratamento dos neutrófilos com forbol meristato acetato (PMA). Nenhuma mudança foi observada na expressão de CD11b, entretanto, a intensidade de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativamente reduzida em comparação ao tratamento apenas com PMA (p=0,038) quando o fator ativador de plaquetas (PAF) foi usado como *priming*. Como os protoescólices ocasionalmente podem ser liberados dos cistos em compartimentos do hospedeiro causando a hidatidose secundária, estes resultados contribuem para elucidação da defesa do hospedeiro e dos mecanismos imunomoduladores do parasito.

A identificação de produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices de *E. granulosus* também foi avaliada neste trabalho. Os produtos de secreção e/ou excreção foram obtidos a partir das primeiras 48 h de cultivo de protoescólices *in vitro*. A caracterização imunológica foi feita por *western blotting* com um *pool* de soros de indivíduos infectados com hidatidose cística. Os produtos de secreção e/ou excreção também foram analisados por espectrometria de massas. As preparações de seis diferentes amostras de protoescólices continham componentes protéicos, os quais foram visualizados por SDS-PAGE com aparentes massas moleculares entre

10 e 200 kDa. Os ensaios de *western blotting* mostraram a presença de diversos antígenos imunogênicos de massas moleculares maiores (acima de 50 kDa), e do AgB. Os resultados de espectrometria de massas foram obtidos com um *pool* de seis amostras de sobrenadantes de cultivo contendo produtos de secreção e/ou excreção, e foram identificadas onze proteínas: malato desidrogenase, ciclofilina, miofilina, P-29, 14-3-3, enolase, duas serinoproteases, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e tiorredoxina peroxidase.

Estes resultados também podem contribuir para elucidação de novos aspectos da complexa interação parasito-hospedeiro, e de mecanismos imunomoduladores, uma vez que as proteínas secretadas podem estar diretamente envolvidas nesses processos.

## ABSTRACT

The factors affecting innate susceptibility to infection with *E. granulosus* are little known. In this work, the interaction of healthy human neutrophils with protoscoleces and a secreted immunodominant antigen (AgB) of *E. granulosus* was assessed. The intensity of CD11b expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production were evaluated by flow cytometry using whole blood. Isolated neutrophils were incubated also with PSC or AgB and interleukin 8 (IL-8) was measured by capture ELISA. The protoscoleces induced a significant increment of CD11b expression in neutrophils (p=0.026) and of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (p=0.026), however their viability was not affected. In contrast, no effect was observed with AgB in both assays. A moderate IL-8 production was detected only in supernatants from neutrophils cultured with protoscoleces compared with basal production (p=0.028). The effect of previous AgB incubation was evaluated in relation with CD11b and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> expression induced by phorbol myristate acetate (PMA) treatment. No changes were observed with CD11 expression, however the magnitude of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was significantly decreased in comparison with PMA alone (p=0.038) when platelet-activating factor was used for priming. As protoscoleces occasionally spilled from cysts into compartments of the host causing secondary cysts, these results contribute to the elucidation of the host defense and parasite immunomodulatory mechanisms involved.

The identification of excretory and/or secretory products from *E. granulosus* protoscoleces also was assessed in this work. Excretory and/or secretory products were obtained from the first 48 h maintenance of protoscoleces *in vitro*. Immunological characterization was performed by western blotting with a pool of sera from individuals infected by cystic hydatidosis. Excretory and/or secretory products also were assessed by mass spectrometry. The preparations of six different samples of protoscoleces contained components proteins which could be distinguished by SDS-PAGE with apparent molecular masses between 10 and 200 kDa. The assays of western blotting showed the presence of the several immunogenic antigens of major molecular masses (above 50 kDa), and of the AgB. The results of the mass spectrometry were obtained with a pool of six culture supernatants sample containing excretory and/or secretory products, and were identified eleven proteins:

malate dehydrogenase, cyclophilin, myophilin, P-29, 14-3-3, enolase, tegumental protein, two serineproteases, phosphoenolpyruvate carboxykinase and thioredoxin peroxidase.

These results can contribute also for elucidate novel aspects of the complex interaction host-parasite and of the immunomodulatory mechanisms, since that secreted proteins can be directly involved in these process.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Echinococcus granulosus*

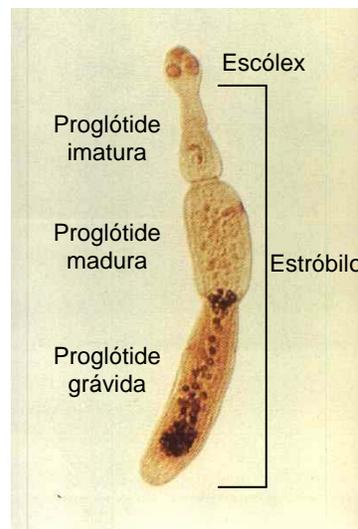
*Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) é um pequeno platelminto parasita, pertencente à classe Cestoda (ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae). O gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) inclui ainda outras seis espécies: *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863), *Echinococcus oligarthrus* (Diesing, 1863), *Echinococcus vogeli* (Rausch & Bernstein, 1972), *Echinococcus equinus*, *Echinococcus ortleppi* (Thompson & McManus, 2002) e *Echinococcus shiquicus*, descrita recentemente (Xiao *et al.*, 2006). *E. granulosus* e *E. multilocularis* são as espécies clinicamente mais importantes, pois são os agentes etiológicos das formas cística e alveolar da hidatidose em humanos (Jenkis *et al.*, 2005). Entretanto, devido a sua distribuição cosmopolita e o seu forte impacto na saúde de animais domésticos e seres humanos, *E. granulosus* é considerada a espécie mais relevante (Carmena *et al.*, 2005b).

O verme adulto de *E. granulosus* é constituído por um escólex anterior e um estróbilo posterior, que possui de dois a cinco segmentos denominados de proglótides (Thompson, 1995). O escólex apresenta um formato globoso, com quatro ventosas musculares, localizadas lateralmente, e um rostelo móvel e extensível na sua porção apical, armado com uma dupla fileira de acúleos ou ganchos envolvidos na fixação do parasito ao hospedeiro. O estróbilo consiste normalmente de três proglótides que diferem no seu estágio de maturação sexual. O primeiro segmento é a proglótide jovem ou imatura, o segundo é a proglótide madura e o último é composto pela proglótide grávida.

Na proglótide imatura, o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos ainda é incompleto. O verme adulto é hermafrodita e, na proglótide madura, ocorre a fecundação, que pode acontecer por autofecundação ou fecundação cruzada. O processo de autofecundação consiste no sistema reprodutivo predominante das populações de *Echinococcus* (Haag *et al.*, 1998), enquanto a ocorrência de fecundação cruzada foi sugerida por estudos genéticos em populações naturais (Haag *et al.*, 1999).

O último segmento do estróbilo é a proglótide grávida, que possui o útero repleto de ovos. Esta proglótide destaca-se do restante do estróbilo e se desintegra no intestino grosso, liberando os ovos, que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo. A liberação da proglótide grávida ocorre após o período de maturidade sexual dos vermes adultos, que acontece em quatro ou cinco semanas após a ingestão do verme pré-adulto pelo hospedeiro definitivo (Zhang & McManus, 2006).

A Figura 1.1. mostra a estrutura corporal do verme adulto.



**Figura 1.1. Forma adulta de *Echinococcus granulosus*.** A forma adulta consiste de um escólex e três proglótides formando o estróbilo. Aumento de 50X. Modificado da página <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (2007).

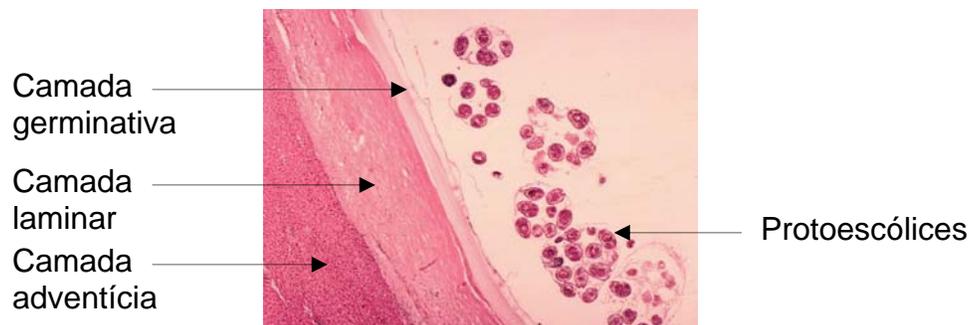
*E. granulosus* necessita de dois hospedeiros mamíferos para completar o seu ciclo vital. A biologia do parasito está revista em Thompson, 1995 e Carmena *et al.*, 2006. O verme adulto vive aderido à mucosa do intestino delgado de seus hospedeiros definitivos, representados pelo cão doméstico e, eventualmente, outros canídeos. Quando infectados esses animais liberam, juntamente às fezes, ovos do parasito, que são a forma infectiva para os hospedeiros intermediários, principalmente ungulados ovinos e bovinos, e, acidentalmente, o homem.

Os ovos do parasito apresentam uma espessa camada, o embrióforo, composta por blocos poligonais de uma proteína do tipo queratina, unidos por uma substância cimentante, que envolvem o embrião ou oncosfera (Holcman & Heath, 1997) e conferem grande resistência aos ovos. Quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos passam por um processo de desintegração passiva do embrióforo, pela ação de enzimas proteolíticas no estômago e/ou no intestino, liberando a oncosfera. A oncosfera penetra na mucosa intestinal com o auxílio de secreções glandulares e migra por via venosa ou linfática até atingir um sítio específico. O tropismo da oncosfera para diferentes órgãos em distintos hospedeiros intermediários e infecções por diferentes espécies de *Echinococcus* pode ser influenciado por sinais do próprio hospedeiro (Brehm *et al.*, 2006). Após um período de incubação indefinido, o qual depende basicamente das condições favoráveis do meio, a oncosfera inicia um complexo processo de diferenciação e se desenvolve até o estágio de metacestódeo (forma larval), também chamado de cisto hidático (Zhang & McManus, 2006).

O cisto é uma estrutura esférica, volumosa, e preenchida por um líquido, denominado de líquido hidático (Holcman & Heath, 1997). O cisto hidático é formado por uma membrana germinativa interna, uma membrana laminar intermediária e uma membrana externa, denominada de adventícia (Figura 1.2).

A camada germinativa reveste internamente o cisto e consiste de uma camada única de células viáveis “pluripotentes”, as quais se proliferam assexualmente e formam estruturas chamadas de cápsulas prolíferas (Kern, 2003). Nas cápsulas prolíferas e também diretamente da camada germinativa, originam-se protoescólices (McManus *et al.*, 2003), que são vermes pré-adultos infectivos para os hospedeiros definitivos (Martínez *et al.*, 2005). Os protoescólices surgem a partir de evaginações na membrana das vesículas prolíferas e pela proliferação de células inicialmente indiferenciadas. Além da proliferação, há também um aumento no tamanho das células envolvidas na diferenciação inicial dos protoescólices (Galindo *et al.*, 2002). Aparecem primeiramente duas constrições que delimitam, no escólex, o rostelo e a região das ventosas. A diferenciação se completa com a formação dos acúleos e a invaginação do escólex para o interior da região somática. Os protoescólices

encontram-se geralmente dispersos no líquido hidático (Kern, 2003), e caso haja uma ruptura do cisto no interior do hospedeiro intermediário, eles podem sofrer um processo de rediferenciação, formando vesículas e novos cistos, chamados de cistos secundários (Zhang *et al.*, 2005). Sendo assim, os protoescólices são responsáveis pela formação de metástases após a liberação do líquido hidático durante a ruptura do cisto, punção ou cirurgia (Walker *et al.*, 2004). Os cistos hidáticos viáveis férteis apresentam protoescólices, enquanto cistos estéreis não contêm essas estruturas (Kern *et al.*, 2003).



**Figura 1.2. Metacestódeo de *Echinococcus granulosus*.** Corte de cisto hidático mostrando os diferentes componentes do estágio larval do parasito. Aumento de 48X. Modificado da página <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (2007).

A camada laminar, acelular, e rica em carboidratos, é a mais externa. Apresenta um aspecto homogêneo e leitoso, sendo formada por um grande número de lâminas concêntricas mecanicamente resistentes. Quando intacta, constitui um filtro perfeito, pois evita o contato direto com as células inflamatórias do hospedeiro e com microrganismos, porém permite o acesso de nutrientes para o parasito (Kern, 2003).

A camada adventícia é produzida pelo hospedeiro, como resposta à presença do cisto hidático. Ela se forma já nos estágios iniciais de diferenciação da oncosfera, a partir de uma inflamação alérgica local, caracterizada pela presença de uma camada de células epitelíóides, pela produção de tecido conjuntivo e pela massiva infiltração de eosinófilos. Se esta reação inicial é suficientemente intensa, pode causar a degeneração e eventual morte do parasito. Caso contrário, a reação

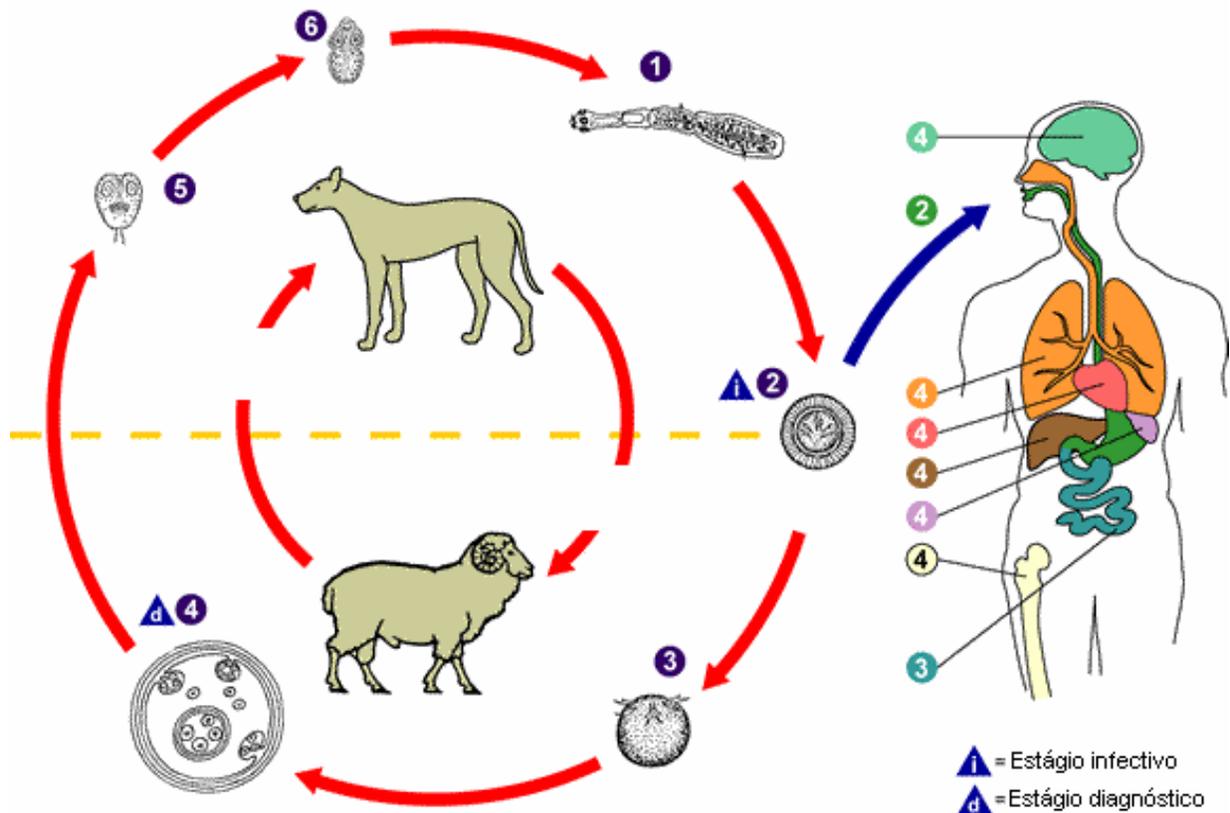
inflamatória aguda desaparece, deixando uma espessa camada de tecido conjuntivo fibroso envolvendo o cisto, que corresponde à camada adventícia.

O líquido hidático, elaborado pela camada germinativa, é incolor, estéril e contém um material parasitário altamente antigênico, responsável por choques anafiláticos em casos de ruptura dos cistos (Kern, 2003). Este líquido é uma complexa mistura de glicoproteínas e lipoproteínas, carboidratos e sais. Além de componentes do parasito, estão também presentes alguns componentes bioquímicos do hospedeiro, principalmente albumina e imunoglobulinas. Devido a sua imunogenicidade, o líquido hidático é capaz de sensibilizar e provocar a formação de anticorpos específicos no organismo parasitado (Camena *et al.*, 2006).

O ciclo vital de *E. granulosus* se completa quando protoescólices viáveis são ingeridos por um hospedeiro definitivo adequado. O ciclo completo está representado na Figura 1.3. Os protoescólices são protegidos da ação de enzimas proteolíticas do hospedeiro por um revestimento mucopolissacarídeo, até que sejam estimulados a evaginar, chegando assim a fase adulta. Desta forma, o ciclo vital doméstico é mantido através da alimentação de cães com as vísceras de ungulados, principalmente ovinos e bovinos, contaminadas com cistos hidáticos férteis (Camena *et al.*, 2006).

## 1.2. Hidatidose

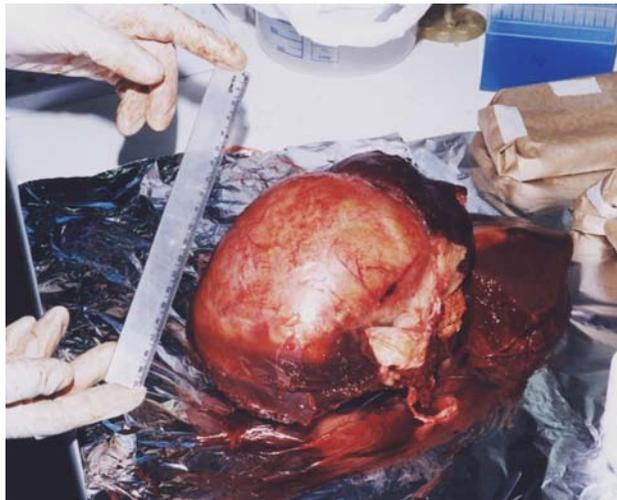
A hidatidose cística é a parasitose causada pelo metacestódeo de *E. granulosus* (Eckert & Deplazes, 2004). A sua importância clínica é praticamente restrita à infecção com a forma larval, uma vez que a presença do verme adulto no hospedeiro definitivo é virtualmente assintomática. Os seres humanos adquirem a infecção pelo contato com mãos, água, alimentos, solo, cães (os ovos ficam em seus pelos, em várias partes do corpo) infectados com os ovos do parasito. Insetos coprofágicos e outros animais podem servir como vetores dos ovos de *E. granulosus* e *E. multilocularis* (McManus *et al.*, 2003).



**Figura 1.3. Ciclo vital do *Echinococcus granulosus*:** (1) O adulto do parasito vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (principalmente o cão doméstico). (2) As proglótides grávidas liberam ovos que são eliminados nas fezes. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário adequado (ovinos, suínos, o homem, etc.), os ovos eclodem no intestino delgado e liberam a (3) oncosfera que penetra na parede do intestino e migra através do sistema circulatório para vários (4) órgãos, especialmente fígado e pulmões. Nesses órgãos, a oncosfera diferencia-se em um cisto hidático, que aumenta gradualmente de tamanho, produzindo (5) protoescólices no seu interior. O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos existentes nos órgãos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, os (6) protoescólices evaginam, fixam-se à mucosa intestinal e se transformam em vermes adultos. Humanos são infectados pela ingestão de ovos, com a resultante liberação de (3) oncosferas no intestino delgado e desenvolvimento de cistos em (4) diversos órgãos.

Modificado da página <http://www.dpd.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (2007).

A maioria dos pacientes (40 a 80%) apresenta apenas um cisto em um único órgão, sendo que o fígado é a principal víscera afetada, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos. Cistos pulmonares atingem 20% dos pacientes, e outras regiões do corpo, tais como o cérebro, músculos, coração, rins e olhos, correspondem aos 10% restantes dos casos (Kern, 2003; Jenkis *et al.*, 2005). Os cistos (Figura 1.4) são pequenos inicialmente, mas ao longo do tempo, podem atingir até 20 cm de diâmetro ou mais (Rogan *et al.*, 2006). São geralmente univesiculares (uniloculares), mas podem apresentar vesículas menores em seu interior, chamadas de cistos filhos ou secundários, termo usado também para novos cistos formados a partir de protoescólices disseminados pelo hospedeiro (Kern, 2003).



**Figura 1.4. Cisto hidático de fígado bovino.** Cortesia de Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Os sintomas da hidatidose são altamente variáveis e dependem de vários fatores (Kern, 2003). Os principais determinantes dos sintomas são basicamente o órgão afetado, o tamanho do cisto e a sua posição no órgão. Outros fatores relevantes são as interações entre o cisto em expansão e órgãos adjacentes, as complicações relacionadas à ruptura dos cistos, tais como a liberação de protoescólices, infecções bacterianas e fúngicas, e, finalmente, a resposta imune do hospedeiro. Em hidatidose hepática, pode ocorrer hepatomegalia, icterícia, dores abdominais e ruptura do cisto dentro do sistema biliar (Cucinotta *et al.*, 2002; Kern,

2003). Em casos pulmonares, os sintomas freqüentes incluem dor torácica, tosse, hemoptise, dispnéia e pleurite (Kern, 2003; Eckert & Deplazes, 2004). As reações de hipersensibilidade em hidatidose variam desde uma simples urticária e tremores de frio ou febre, até espasmos bronquiais e choques anafiláticos potencialmente fatais (Ortona *et al.*, 2003).

A América Latina tem sido reconhecida como uma das áreas de mais alta prevalência de hidatidose, afetando tanto o homem como os animais (Eckert & Deplazes, 2004). Sendo assim, a hidatidose não é somente um problema de saúde pública, mas também tem consideráveis efeitos de perdas econômicas devido a rebanhos comprometidos em alguns países sócio-economicamente mais pobres (Budke *et al.*, 2006). No Estado do Rio Grande do Sul, um levantamento feito do período de 2002 a 2005 registrou 30 casos de pacientes com hidatidose (IPB-LACEN). No entanto, esses registros certamente representam uma subestimativa da situação real, uma vez que os dados são escassos, e os relatos de hospitais são indisponíveis e pouco confiáveis (De La Rue *et al.*, 2006), já que a maioria dos casos não é notificada, principalmente quando não há remoção cirúrgica do cisto hidático.

A economia rural do Rio Grande do Sul é baseada na extensiva criação bovina e ovina, e freqüentemente, os cães são orientados para auxiliar na manutenção do rebanho (De La Rue *et al.*, 2006). Um levantamento feito do período de 2001 a 2006 estimou uma prevalência de hidatidose em 19% dos bovinos, 3% dos ovinos e 20% dos cães de áreas rurais do Estado (SIF-SAA/RS). A espécie predominante na região é *E. granulosus*, conforme demonstrado em um estudo feito por De La Rue *et al.* (2006). Em Santana do Livramento, por exemplo, 83,4% dos abates de animais são domiciliares em áreas rurais, e os cães são alimentados com as vísceras dos animais mortos, sendo que 47,4% dos cães estavam infectados em 2004 (Farias *et al.*, 2004).

O tratamento da doença envolve a remoção cirúrgica de todo o cisto ou de parte dele por punção e aspiração, ou o uso de quimioterápicos como benzimidazoles (albendazole e mebendazole) (McManus *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2006). As medidas preventivas que têm sido usadas para controlar a infecção causada por *E. granulosus* incluem evitar o contato com cães perdidos e ampliar o

tratamento desses animais com praziquantel, a incineração de órgãos infectados e a implementação de melhoras no sistema sanitário e na educação de saúde pública (McManus *et al.*, 2003).

Em hospedeiros humanos, a infecção causada após a ingestão oral de ovos de *E. granulosus* e o posterior desenvolvimento do cisto hidático é conhecida como hidatidose primária, enquanto a formação de novos cistos pela disseminação de protoescólices e/ou cistos menores através da acidental ruptura de cistos primários, é conhecida como hidatidose secundária. A infecção secundária em humanos constitui um importante problema de saúde pública. O desenvolvimento de protoescólices em novos cistos sugere que os vermes pré-adultos estão utilizando mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro (Baz *et al.*, 2006).

## **2. Resposta imune inata do hospedeiro**

A resposta imune inata atua como a primeira linha de defesa contra patógenos, e apesar do caráter não seletivo, é rápida e muito eficiente (Lunardi *et al.*, 2006). As células envolvidas na resposta inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e as células NK (Janeway & Medzhitov, 2002). Estas células diferenciam-se rapidamente em células efectoras de vida curta e se responsabilizam pela eliminação de infecções. Além disso, a ativação de células B e T da resposta adaptativa, as quais expressam receptores de grande diversidade, depende da indução de moléculas co-estimulatórias e secreção de citocinas pelas células da resposta imune inata (Pasare & Medzhitov, 2004).

Os neutrófilos, que são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico (Kuijpers & Roos, 2001), representam um componente central da resposta imune inata e atuam como primeira linha de defesa através de sua migração rápida para os tecidos inflamados, e subsequente desenvolvimento de eficientes mecanismos de defesa que incluem a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de mediadores inflamatórios (Reaves *et al.*, 2005).

Em infecções por helmintos como *Echinococcus*, o primeiro evento no processo imunológico é o contato íntimo entre o parasito e as células ativadas do

sistema imune inato do hospedeiro (Chaible *et al.*, 2005). Entretanto, a associação entre as infecções helmínticas e a função dos neutrófilos tem sido pouco estudada (Falcone *et al.*, 2001).

Em *E. granulosus*, experimentos *in vitro* mostraram que os neutrófilos, em associação com anticorpos, podem causar a morte de oncosferas, sugerindo um possível papel para a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Rogan *et al.*, 1992). A resposta inicial do hospedeiro intermediário ao estabelecimento dos cistos hidáticos é a infiltração de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e fibrócitos (Zhang *et al.*, 2003). Infecções experimentais feitas em camundongos demonstraram um acúmulo de células em torno de protoescólices injetados intraperitonealmente, envolvendo inicialmente macrófagos ativados e subseqüentemente neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Richards *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1986).

Existem evidências que humanos apresentam um nível relativamente alto de resistência inata à infecção com ovos de *E. multilocularis*, como demonstrado pelo lento crescimento do estágio de metacestódeo em órgãos internos, pela reduzida capacidade de formação de protoescólices e pelo tipo de reação histopatológica (Eckert & Deplazes, 2004).

## **2.1. Neutrófilos**

Os neutrófilos são células efectoras fundamentais da resposta imune inata que normalmente circulam em um estado quiescente, mas respondem rapidamente a um estímulo inflamatório, migrando para o tecido atingido (Meshki *et al.*, 2004). Essas células apresentam um tempo de vida curto na circulação, onde permanecem por 6 a 10 h (Kuijpers & Roos, 2001), quando então migram para os tecidos e sofrem apoptose espontânea dentro de 2 a 6 dias (Nilsson-Augustinsson *et al.*, 2004). Os neutrófilos contêm pelo menos quatro tipos de grânulos: os grânulos primários, secundários, terciários e as vesículas secretórias. As diferentes classes de grânulos são formadas seqüencialmente durante os distintos estágios de maturação dos neutrófilos na medula óssea. A classificação é feita de acordo com o conteúdo protéico e a capacidade diferencial de exocitose dos grânulos após a ativação dos

neutrófilos por estímulos inflamatórios. As vesículas secretórias, contendo integrinas tais como CD11b/CD18, são mais rapidamente excitadas (Pham, 2006).

Os neutrófilos ativados utilizam estratégias de defesa contra patógenos através de uma combinação de mecanismos oxidativos e não-oxidativos (Pham, 2006). Os mecanismos de defesa independentes de oxigênio envolvem a fusão de vesículas secretórias com a membrana plasmática dos neutrófilos auxiliando na migração e interação com as células endoteliais do tecido inflamado, e a liberação de enzimas proteolíticas ocasionada pela fusão de grânulos secretórios citoplasmáticos primários e secundários com os lisossomos (Hodgson *et al.*, 2006). A mobilização e a fusão desses grânulos contribui significativamente para a imunidade inata e defesa antimicrobiana através da ligação a membranas celulares bacterianas e posterior alteração da integridade e do potencial de membrana (Thomas *et al.*, 1988) em bactérias gram-negativas, gram-positivas e em alguns vírus envelopados (Mills *et al.*, 1981; Hodgson *et al.*, 2006). As enzimas proteolíticas, tais como a mieloperoxidase, presente em abundância nos grânulos primários, também são liberadas no espaço extracelular, podendo atuar também sobre patógenos não fagocitáveis (Kuijpers & Roos, 2001). A liberação das citocinas IL-8 e GRO- $\alpha$  (oncogene- $\alpha$  relacionado ao crescimento) é outro mecanismo não-oxidativo fundamental exercido pelos neutrófilos pela potente atividade de quimiotaxia desses mediadores na atração de mais neutrófilos para o sítio de inflamação (Van Gisbergen *et al.*, 2005).

Os mecanismos de defesa dos neutrófilos dependentes de oxigênio envolvem a ação da enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase e a produção de ROS, que atuam diretamente na morte de patógenos (Silva *et al.*, 2003; Pham, 2006). A ativação dos mecanismos de defesa dos neutrófilos e de eventos de sinalização intracelular que ocorrem durante a aderência de parasitos não-fagocitáveis e na presença de moléculas solúveis apropriadas pode acontecer através de receptores de superfície celular que reconhecem o ligante diretamente ou opsonizado com anticorpos. Os receptores TLR (receptor *Toll-like*) apresentam um papel fundamental no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e no desencadeamento de eventos de sinalização que ativam a resposta imune inata (Pasare & Medzhitov, 2004). Cada receptor TLR difere em sua

especificidade ao ligante, seu padrão de expressão, e provavelmente no gene-alvo que ele pode induzir (Janeway & Medzhitov, 2002). A família desses receptores inclui dez TLRs humanos, e os neutrófilos parecem apresentar todos estes receptores, exceto o TLR3, pelo menos em nível de mRNA (Hayashi *et al.*, 2003). Já os receptores Fc (FcR) reconhecem especificamente partículas opsonizadas por anticorpos (regiões Fc de imunoglobulinas). A interação entre anticorpos e os FcRs permite o reconhecimento antígeno-específico por células que expressam FcRs em sua superfície (Janeway *et al.*, 2000). Essa interação pode iniciar uma variedade de respostas, que incluem a fagocitose, exocitose, geração de superóxido, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e liberação de citocinas mediadoras para modular a sobrevivência celular (Monteiro & Van de Winkel, 2003). Os neutrófilos apresentam dois tipos de receptores Fc: Fc $\gamma$ RIIa e Fc $\gamma$ RIIIb (Kuijpers & Roos, 2001).

Por outro lado, os neutrófilos funcionam também como células reguladoras da resposta imune, pois podem modular a atividade de citocinas e induzir novos recrutamentos de células inflamatórias, bem como fornecer uma ligação entre a resposta inata e a adaptativa por atrair APCs (células apresentadoras de antígenos) (Pham, 2006). Em humanos, neutrófilos ativados induzem a maturação de células dendríticas, as mais eficientes e importantes APCs (Kanan & Chain, 2006), e acentuam a capacidade destas células desencadearem a proliferação de células T. A interação dos neutrófilos com as células dendríticas parece envolver primeiramente uma zona de contato celular, seguida pela liberação de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pelos neutrófilos. Como os neutrófilos secretam pouco TNF- $\alpha$ , o contato celular poderia direcionar a citocina liberada apenas para as células dendríticas imaturas. Além disso, os neutrófilos podem estimular as células dendríticas a produzirem IL-12, polarizando assim uma resposta protetora para o hospedeiro do tipo T *helper* 1 (Th1) (Van Gisbergen *et al.*, 2005).

Os neutrófilos ativados podem ser analisados através de seus mecanismos oxidativos, que incluem a produção de ROS (Bass *et al.*, 1983), bem como pelos seus mecanismos não-oxidativos, como a regulação positiva de vesículas secretórias

contendo integrinas de adesão, tais como CD11b/CD18, na sua membrana plasmática, (Parkos, 1997), e a produção e secreção de IL-8 (Dreweck *et al.*, 1999).

### 2.1.1. ROS de neutrófilos

A NADPH-oxidase de neutrófilos é uma enzima composta por um complexo de proteínas que catalisa reguladamente a produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) a partir de oxigênio, usando NADPH como doador de elétrons (DeCoursey & Ligeti, 2005; Pham, 2006). Esta reação é conhecida como pulso respiratório. A maior parte do  $O_2^-$  formado durante o pulso respiratório reage com água e dismuta espontaneamente em ROS tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio ( $O_2$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ) (Vowells *et al.*, 1995).  $H_2O_2$ , na presença da enzima mieloperoxidase de neutrófilos (Cavallaro *et al.*, 2003) é convertida em um composto muito tóxico, porém de vida curta, o ácido hipocloroso, que pode atacar diretamente o patógeno, ou reagir com espécies intermediárias de nitrogênio para formar compostos estáveis e altamente reativos como as cloraminas (Hodgson *et al.*, 2006). A holoenzima NADPH oxidase consiste de seis subunidades. Nas células em repouso onde a oxidase permanece inativa, as subunidades p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> e a GTPase Rac2 estão localizadas exclusivamente no citoplasma, enquanto as duas subunidades remanescentes p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup> formam um flavocitocromo heterodimérico ligado à membrana plasmática conhecido como citocromo  $b_{558}$ . A exposição dos neutrófilos a uma variedade de estímulos resulta na translocação e interação das subunidades citosólicas com as subunidades de membrana (Clark, 1999; Fontayne *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004), permitindo o fluxo de elétrons a partir de NADPH para o oxigênio molecular via uma porção FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e dois grupos heme no citocromo ligado a membrana (Vignais, 2002). A reunião de NADPH oxidase pode ocorrer na membrana de organelas intracelulares levando a produção de ROS intracelular ou na membrana plasmática, causando a liberação de radicais no fagossomo ou no espaço extracelular (Bengtsson *et al.*, 2006). A proteína quinase C, associada à reorganização do citoesqueleto de actina dos neutrófilos, tem um importante papel na regulação da organização e do estabelecimento do complexo

NADPH, uma vez que a polimerização e despolimerização de actina, e a translocação da proteína quinase C para a membrana plasmática acentuaram a produção de ROS estimulada por um peptídeo bacteriano em neutrófilos humanos (Bengtsson *et al.*, 2006). A produção de ROS em neutrófilos é um processo que consiste em dois passos: o *priming* e o subsequente estímulo efetor (Remer *et al.*, 2003). O *priming* refere-se a um aumento de 10 a 20 vezes na produção de ROS quando os neutrófilos são expostos a baixos níveis de citocinas (Moore *et al.*, 1998), mediadores lipídicos e fatores de quimiotaxia tais como TNF- $\alpha$ , PAF, e lipopolissacarídeos (LPS) antes da administração de um estímulo capaz de ativar NADPH oxidase efetivamente. Embora altas concentrações desses agentes de *priming* possam levar a produção de  $O_2^-$  (Dusi *et al.*, 1996), as doses típicas utilizadas desses compostos não ativam diretamente a NADPH oxidase de neutrófilos em solução. Sendo assim, os agentes de *priming* ativam várias cascatas de transdução de sinais que amplificam o processo oxidativo, entretanto mantêm a necessidade obrigatória de um estímulo de ativação secundário para iniciar a produção de ROS.

O PMA é o estímulo mais comumente usado para avaliar a produção de ROS em neutrófilos, sendo altamente lipofílico, capaz de atravessar a membrana plasmática, sem passar pelos mecanismos de reconhecimento de receptores, aderência e internalização, característicos da fagocitose (Lunardi *et al.*, 2006). O PMA induz a reunião do complexo NADPH oxidase na superfície da membrana celular, visto que  $O_2^-$  é liberado no espaço extracelular (DeCoursey & Ligeti, 2005). Sua ação parece envolver uma acentuada atividade da proteína quinase C (Walrand *et al.*, 2003).

A medida do pulso respiratório fornece uma indicação do sistema de defesa dos neutrófilos e pode ser usada para investigar a variação imunológica entre indivíduos e estudar a resposta de neutrófilos a diferentes estímulos (Kampen *et al.*, 2004). Uma sonda muito utilizada nos ensaios de produção de ROS é a 2' 7' diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Bass *et al.*, 1983). A princípio, é uma pequena molécula apolar não-fluorescente que difunde para o meio intracelular, onde é clivada por esterases formando a molécula polar deacetilada 2' 7'

diclorofluoresceína (DCFH). Devido a sua polaridade, é então mantida no citoplasma ou em grânulos intracelulares positivos para mieloperoxidase. Após a ativação celular e geração de  $H_2O_2$ , a sonda é convertida à molécula altamente fluorescente 2' 7' diclorofluoresceína (DCF), basicamente pelo potencial oxidativo de  $H_2O_2$ , a qual emite um sinal de fluorescência seguinte a excitação pela luz verde (525 nm) (Robinson *et al.*, 1997). A intensidade de fluorescência é proporcional a atividade do pulso respiratório, mediado por  $H_2O_2$ . Azida de sódio é usada nos ensaios para inibir a atividade de mieloperoxidase e catalases, prevenindo a quebra de  $H_2O_2$  em outras espécies reativas de oxigênio (Vowells *et al.*, 1995).

### **2.1.2. Integrinas de neutrófilos**

Os neutrófilos expressam constitutivamente membros da subfamília da integrina  $\beta_2$  ou CD18. As integrinas são proteínas de superfície celular que estão envolvidas na interação de neutrófilos com moléculas de adesão de superfície presentes em células do tecido inflamado (Davis *et al.*, 2000). Elas são proteínas transmembrânicas constituídas por heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$  ligadas covalentemente, e são agrupadas em famílias de acordo com a sua subunidade  $\beta$ . Os neutrófilos expressam quatro membros da família de integrinas  $\beta_2$ , que são CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1), CD11c/CD18 (gp150,95) e CD11d/CD18, todas apresentando um importante papel na adesão de neutrófilos a células endoteliais (Kuijpers & Roos, 2001). CD11b/CD18, também chamada apenas de CD11b, é constitutivamente expressa em um estado de baixa afinidade na superfície de neutrófilos, que, quando ativados por diferentes estímulos, apresentam uma mudança conformacional no heterodímero da integrina, resultando em uma grande afinidade pelos ligantes endoteliais. A expressão de CD11b é regulada positivamente também através da fusão de grânulos citoplasmáticos de estoque contendo a integrina com a membrana celular (Calafat *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2007). CD11b atua como um receptor ligante a vários fatores, tais como as proteínas iC3b (sistema de complemento) (Guyader *et al.*, 2004), ICAM (moléculas de adesão intercelular)-1 (Li *et al.*, 2000), ICAM-2 (Huang *et al.*, 2006),

fibrinogênio, fator X e heparina (Barnard *et al.*, 2005). Dessa forma, o complexo CD11b/CD18 está envolvido na fagocitose de organismos opsonizados pelo sistema de complemento, na migração endotelial de leucócitos pela interação com ICAM-1 e ICAM-2, na coagulação, e em eventos complexos de sinalização intracelular.

### **2.1.3. IL-8**

A IL-8, uma proteína não glicosilada constituída por 72 aminoácidos (Nicholson *et al.*, 2007), é uma potente citocina com atividade de quimiotaxia de neutrófilos e células T virgens (Janeway *et al.*, 2000). Além disso, acentua a citotoxicidade de neutrófilos dependente de anticorpos (Dreweck *et al.*, 1999). Vários tipos celulares, tais como monócitos, queratinócitos, células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e células T expressam e secretam a proteína. Os neutrófilos ativados também são capazes de secretar grandes quantidades de IL-8, e essa resposta pode ser modulada por citocinas imunorregulatórias tais como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-4 e IL-10. Sendo assim, a capacidade dos leucócitos polimorfonucleares, incluindo os neutrófilos, de produzirem IL-8 e amplificarem a resposta imune por promoverem o recrutamento de outras células efetoras ao sítio de infecção parece ser altamente regulada (Cassatella *et al.*, 1995). Seo *et al.* (2001) demonstraram que a estimulação de neutrófilos com baixas concentrações de IL-8 ativou rapidamente a ligação de CD11b a moléculas de adesão intercelulares ICAM-1, expressadas na superfície de células endoteliais em condições inflamatórias (Reaves *et al.*, 2005). Essa citocina estimula também a produção de ROS em neutrófilos (Janeway *et al.*, 2000).

## **2.2. Resposta adaptativa do hospedeiro**

A variação na ativação das células imunológicas T *helper* (Th1 e Th2) e no perfil de citocinas parece estar associada com a progressão ou regressão de infecções parasitárias. Nestas infecções, a resposta proporcionada por células Th1 favorece o hospedeiro (Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2005), visto que estas células secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e IL-12. Uma das principais

funções efetoras do IFN- $\gamma$  é ativar macrófagos, que por sua vez, entre outros efeitos de ativação, produzem e liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, capazes de eliminar parasitas extracelulares (Baz *et al.*, 2006). A IL-12, produzida primariamente por macrófagos e células dendríticas, é uma citocina chave na geração de células Th1. Essa citocina ativa também a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, o qual poderia atuar como fator co-estimulatório para os macrófagos, na presença de patógenos, produzirem mais IL-12 e estimularem as células Th1 (Liu *et al.*, 2003), conferindo assim, um importante papel regulador para os macrófagos. Finalmente, IFN- $\gamma$  e IL-12 inibem a proliferação de células Th2 (Ortona *et al.*, 2003). Por outro lado, as células Th2 secretam IL-4, IL-10 e IL-13, que são potentes citocinas antiinflamatórias, capazes de inibir a ativação dos macrófagos e funções citotóxicas (Janeway *et al.*, 2000, Vuitton, 2003). Além disso, a IL-10 contribui indiretamente para a indução de citocinas do tipo Th2, pois regula negativamente a secreção de citocinas do tipo Th1 (O' Garra, 1998). A IL-6 também é produzida por células Th2 e está envolvida na maturação de linfócitos B para a produção de anticorpos específicos (Riganò *et al.*, 1997), que muitas vezes, não são produzidos ou detectados em pacientes com hidatidose (Zhang *et al.*, 2003). Sendo assim, a resposta do tipo Th2 parece favorecer os parasitos, principalmente nos estágios iniciais de infecção, por inibir células efetoras fundamentais como os macrófagos.

Em ensaios feitos com esplenócitos de camundongos inoculados com protoescólices vivos (Dematteis *et al.*, 1999), foi obtida uma resposta do tipo Th2, enquanto protoescólices mortos induzirem um perfil de resposta do tipo Th1. Experimentos preliminares mostraram também uma predominância de mRNA de IL-10 em células em contato com protoescólices durante a reação inflamatória inicial (Baz *et al.*, 2006). Os protoescólices podem estar estimulando a secreção de IL-10 por células B, independente de células T, através de seus carboidratos, tais como a fração enriquecida E4+, que é altamente imunogênica em camundongos e humanos (Dematteis *et al.*, 2001; Cardozo *et al.*, 2002). Sendo assim, a indução de uma resposta Th2 não protetora nas fases iniciais da infecção é ativamente direcionada por protoescólices vivos, e provavelmente tem um papel fundamental no estabelecimento da infecção.

Estudos feitos com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de humanos infectados com *E. granulosus* estimuladas com componentes parasitários demonstraram a indução de uma resposta do tipo Th2 (Fauser & Kern, 1997; Cardozo *et al.*, 2002; Ortona *et al.*, 2005). Resultados similares foram obtidos em ensaios com PBMC de pacientes infectados com *E. multilocularis* (Hübner *et al.*, 2006).

### **3. Mecanismos de evasão do parasito**

Os vermes parasitas constituem um grupo muito heterogêneo de organismos, os quais podem apresentar vários mecanismos de modulação da resposta imune do hospedeiro, permitindo a eles um fenômeno comum de vida longa em seus hospedeiros (Harnett & Harnett, 2006). Os helmintos, em particular, podem prevenir ativamente a ação de células efetoras do sistema imune pela liberação de fatores que imunomodulam a função dos leucócitos (Maizels *et al.*, 1993; Bruschi *et al.*, 2000) e da resposta imune em geral (Zhang *et al.*, 2003).

Em *E. granulosus*, as infecções experimentais realizadas pela inoculação de protoescolices em camundongos servem como modelo de estudos para analisar a interação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro. Os primeiros sinais de reação imune podem ser observados por um acúmulo de células imunes em torno dos protoescolices tanto na cavidade peritoneal como no fígado após aproximadamente quinze dias de infecção (Riley *et al.*, 1984; 1985). No entanto, a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro geralmente não é suficiente para eliminar a infecção, sugerindo que cada estágio do parasito apresenta mecanismos de evasão que permitem a sua sobrevivência prolongada em um meio imunológico ativo dentro do hospedeiro (Baz *et al.*, 2006).

A oncosfera é a primeira forma invasiva de *E. granulosus* reconhecida pela resposta imune do hospedeiro intermediário. No entanto, a secreção de glândulas de penetração, presentes na sua região nuclear, provoca a lise de tecidos do hospedeiro adjacentes a ela, permitindo que a oncosfera resista a resposta celular do

hospedeiro por manter uma zona de necrose em células próximas, durante o desenvolvimento da camada laminar (Holcman & Heath, 1997).

A forma larval (cisto hidático) pode sobreviver por longos períodos de tempo no hospedeiro, mas os mecanismos que permitem essa persistência são pobremente conhecidos (Rosenzvit *et al.*, 2006). A princípio, a própria estrutura do metacestódeo viável possibilita a evasão, uma vez que é mascarada pela barreira física da camada laminar, a qual leva a um seqüestro mais efetivo da resposta imune do hospedeiro (Kern *et al.*, 2003, Haag *et al.*, 2006b). Os carboidratos da membrana laminar podem estar envolvidos na modulação da ativação de células T infiltradas, na indução de síntese de IgG somente de baixa avidéz (Gottstein *et al.*, 2006) e na produção de citocinas, principalmente IL-10, polarizando uma resposta Th2 (Vuitton, 2003). Por outro lado, antígenos secretados pelo metacestódeo de *Echinococcus* podem interferir com a imunidade do hospedeiro (função de células apresentadoras de antígenos, produção de citocinas e geração de células de memória) por suprimir células T, a função de macrófagos ou pela produção de anticorpos de baixa avidéz (Kato *et al.*, 2005b), e a variabilidade genética destes antígenos pode favorecer esses processos (Haag *et al.*, 2006b). As proteínas secretadas parecem estar envolvidas mais seguramente em mecanismos de evasão do parasito.

#### **4. Produtos de secreção e/ou excreção parasitários**

As proteínas secretadas apresentam uma seqüência de peptídeo sinal em sua extremidade amino terminal, a qual direciona o transporte para o caminho secretório da superfície celular (Rapoport, 1992). A estrutura comum do peptídeo sinal é conservada entre filós distantes, e consiste de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos (Smyth *et al.*, 2003), distribuídos em uma região N carregada positivamente, seguida de uma região H hidrofóbica e uma região C neutra, porém polar (Rosenzvit *et al.*, 2006). O trânsito de proteínas é um processo complexo regulado por vários passos e com uma grande diversidade de compostos de deslocamento protéico.

As proteínas que são secretadas ou ligadas à membrana celular dos parasitas geralmente estão envolvidas em interações entre o parasito e o hospedeiro

(Fernández *et al.*, 2002; Rosenzvit *et al.*, 2006). Estas moléculas participam em várias funções parasitárias, incluindo a penetração e o estabelecimento nos tecidos do hospedeiro, a modulação da resposta imune e a incorporação de metabólitos do hospedeiro. Em função de sua potencial exposição ao sistema imune do hospedeiro, os componentes secretados são possíveis candidatos para o uso em testes imunodiagnósticos, e como moléculas-alvo no desenvolvimento de drogas e vacinas (Rosenzvit *et al.*, 2006). Nesse contexto, destaca-se o antígeno B (AgB) de *E. granulosus*. O AgB, amplamente estudado, é composto por diferentes isoformas e está presente em altas concentrações no líquido hidático do metacestódeo, sugerindo um importante papel para este antígeno na biologia do parasito, e, particularmente na sua relação com o hospedeiro (Ferreira *et al.*, 2004; Mamuti *et al.*, 2006a).

#### **4.1. AgB**

O AgB foi primeiramente caracterizado como uma lipoproteína termoestável de 120-160 kDa (Oriol *et al.*, 1971; Oriol *et al.*, 1975). Em condições redutoras, dissocia-se em componentes de 8, 16, 24 e 32 kDa, com a sua abundância relativa diminuindo proporcionalmente ao aumento da massa molecular (Lightowers *et al.*, 1989). Os componentes de massa molecular maior correspondem a multímeros de distintas subunidades monoméricas de 8 kDa (AgB/8) relacionadas (González *et al.*, 1996). Monteiro *et al.* (2007) mostraram que subunidades recombinantes de 8 kDa, individualmente analisadas, são capazes de se agregar não-covalentemente em solução formando homo-oligômeros de massa molecular maior, dentro da faixa esperada de 120-160 kDa do AgB nativo purificado.

O AgB está localizado no tegumento dos protoescólices, na membrana germinativa e no líquido hidático (Sanchez *et al.*, 1991). A identificação de um peptídeo sinal a partir da clonagem de genes que codificam as subunidades do AgB e a sua presença abundante no líquido hidático sugerem que é uma proteína secretada após a sua síntese (Frosch *et al.*, 1994).

O AgB é codificado por uma família multigênica (Chemale *et al.*, 2001), e estudos moleculares demonstraram a existência de pelo menos 5 *loci* gênicos para

*AgB8* de *E. granulosus*, denominados de *EgAgB1* (codificando para *AgB8/1*) (Shepherd *et al.*, 1991), *EgAgB2* (codificando para *AgB8/2*) (Fernández *et al.*, 1996), *EgAgB3* (codificando para *AgB8/3*) (Chemale *et al.*, 2001), *EgAgB4* (Arend *et al.*, 2004) e *EgAgB5* (Haag *et al.*, 2004), os quais codificariam novas subunidades de 8 kDa (*AgB8/4* e *AgB8/5*, respectivamente). Entretanto, análises filogenéticas posteriores não puderam discriminar as isoformas *EgAgB3* e *EgAgB5* (Haag *et al.*, 2006a). Recentemente, foi identificado o quinto loci gênico, denominado *EgAgB5* (Mamuti *et al.* 2007). Sendo assim, a família multigênica que expressa o *AgB* inclui cinco grupos maiores de genes bem definidos (*EgAgB1-EgAgB5*) originados de eventos de duplicação que ocorreram nos estágios iniciais de evolução do gênero *Echinococcus* (Haag *et al.*, 2006a). Esses genes são altamente polimórficos, sendo que a variabilidade de seqüências foi descrita até mesmo dentro de um único metacestódeo. As variantes alélicas foram obtidas entre os protoescólices do mesmo metacestódeo e/ou entre células do mesmo protoescólex (Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2004). O número de genes codificando as subunidades do *AgB* permanece desconhecido, mas tudo indica que são vários genes envolvidos na expressão, os quais poderiam constituir uma família gênica de contingência (Haag *et al.*, 2004). Entretanto, a origem desta variabilidade permanece obscura, se é o reflexo de um estado de redundância originado pela duplicação dos genes ao longo do tempo, ou se é gerada por algum mecanismo particular, tais como hipermutação somática, recombinação, ou ambos durante a progressão da doença (Haag *et al.*, 2006b). Por outro lado, os genes que expressam a subunidade de 8 kDa do *AgB* de *E. multilocularis*, os quais apresentam mais de 90% de homologia com os genes de *E. granulosus*, mostraram uma expressão diferencial estágio-específica (Mamuti *et al.*, 2006b), sugerindo que esse perfil de expressão pode ocorrer também em *E. granulosus*, e que a variabilidade genética pode estar diretamente envolvida.

O *AgB* é altamente imunogênico em infecções humanas (Mamuti *et al.*, 2006a), e as subunidades recombinantes *AgB8/1* e *AgB8/2* têm sido propostas para a melhora de ensaios imunodiagnósticos para a detecção da hidatidose cística (Virginio *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2005).

O papel do AgB na biologia do parasito não é completamente elucidado, mas parece estar envolvido na modulação da resposta imune do hospedeiro. A variabilidade dos genes que expressam o AgB foi sugerida como adaptativa para mecanismos de evasão (Haag *et al.*, 2004; Graichen *et al.*, 2007). A possível presença de diferentes subunidades de 8 kDa durante o desenvolvimento do cisto ou em diferentes isolados e cepas de *E. granulosus* poderia ter implicações na resposta imune do hospedeiro, uma vez que a simples troca de uma subunidade para outra poderia ser suficiente, pelo menos parcialmente, para a evasão da resposta imune do hospedeiro (Haag *et al.*, 2004). O AgB pode inibir a atividade de elastase e a quimiotaxia de neutrófilos (Shepherd *et al.*, 1991) interferindo diretamente na resposta imune inata do hospedeiro. Ainda nesse contexto, porém priorizando a resposta imune adaptativa, Riganò *et al.* (2001) mostraram que PBMC de pacientes infectados com hidatidose ativa estimuladas com o AgB produziram IL-4 e IL-13, mas não IL-12. Além disso, produziram pequenas concentrações de IFN- $\gamma$ , promovendo uma resposta imune Th2 não protetora. A indução de apoptose de PBMC em pacientes com hidatidose progressiva também foi descrita (Riganò *et al.*, 2002). O AgB interferiu, ainda, na maturação de células dendríticas, e diminuiu a expressão de IL-12 e TNF- $\alpha$  em células dendríticas maduras, polarizando uma resposta Th2 (Riganò *et al.*, 2007). Chemale *et al.* (2005) sugeriram que o AgB liga-se a compostos hidrofóbicos, mas não consegue desligar-se rapidamente destes compostos em ensaios de competição, sugerindo que este antígeno não está diretamente relacionado ao metabolismo de ácidos graxos. Entretanto, pode estar envolvido em mecanismos de detoxificação, seqüestrando e tamponando compostos hidrofóbicos tóxicos para o parasito, presentes no líquido hidático ou agentes xenobióticos como anti-helmínticos.

## Justificativas

O tempo de vida longo de parasitos helmintos depende de fatores como mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, que parecem ser importantes especialmente nos primeiros eventos da infecção. Os helmintos interferem e modulam a resposta imune do hospedeiro com o intuito de criar um nicho que otimize a sua sobrevivência (Maizels *et al.*, 2004). Em *E. granulosus*, os componentes parasitários estão protegidos dentro do cisto hidático. Entretanto, em situações de rompimento de cistos, vários componentes produzidos tanto pelos protoescólices como pela membrana germinativa, são expostos à resposta imune do hospedeiro.

Os mecanismos de evasão têm sido mais estudados do ponto de vista da resposta imune adaptativa. Portanto, uma interessante abordagem de estudo consiste na análise da presença destes mecanismos durante a resposta imune inata.

Os protoescólices de *E. granulosus* são mortos em infecções secundárias experimentais, e os neutrófilos ativados em resposta ao contato com estes componentes parasitários parecem estar diretamente envolvidos nesse processo. Portanto, para tentar elucidar alguns mecanismos envolvidos neste tipo de resposta imune, a ativação dos neutrófilos pode ser analisada pela expressão da integrina CD11b, pela produção de ROS e IL-8.

Como os protoescólices não são diretamente fagocitados pelos neutrófilos devido ao seu tamanho, produtos secretados e/ou excretados pelos mesmos provavelmente estão envolvidos na interação dos vermes pré-adultos com as células do sistema imune inato do hospedeiro. Nos ensaios de infecções secundárias comentados acima, uma proporção de protoescólices sobrevive à resposta imune inicial, sugerindo a presença de mecanismos de evasão independentes da estrutura física dos cistos. Devido ao seu histórico de possível interferência no sistema imune do hospedeiro, o AgB pode estar envolvido nos mecanismos de evasão da resposta imunológica desenvolvida pelos neutrófilos.

## Objetivos

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo geral a análise dos efeitos de protoescólices e AgB de *E. granulosus* na ativação de neutrófilos humanos e em possíveis mecanismos de evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro, bem como a caracterização dos produtos de secreção e ou/ excreção de protoescólices que possam estar envolvidos nesses processos.

Os objetivos específicos são:

- 1) Analisar os efeitos diretos de protoescólices *in vitro* na ativação de neutrófilos humanos saudáveis,
- 2) Analisar os efeitos diretos e indiretos de AgB *in vitro* na ativação de neutrófilos humanos saudáveis,
- 3) Identificar alguns dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices em cultivo, inclusive o AgB, possivelmente implicados em interações com o sistema imune do hospedeiro intermediário.

## CAPÍTULO I

Effects of protoescolices and AgB from *Echinococcus granulosus* on neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms

Trabalho publicado na revista Parasitology Research 2007, 100(5): 935-942  
(Em anexo)

Esta parte do estudo refere-se aos resultados de ensaios feitos *in vitro* com os protoescolices e o AgB, e os seus efeitos em neutrófilos humanos saudáveis, correspondentes aos objetivos específicos 1 e 2. Os efeitos diretos de protoescolices e do AgB foram estudados através de incubações diretas entre os componentes parasitários e os neutrófilos. Os ensaios de efeitos indiretos do AgB na ativação dos neutrófilos foram feitos através de uma pré-incubação do AgB com neutrófilos posteriormente estimulados com PMA. Para os ensaios diretos e indiretos, a expressão de CD11b e a produção de ROS pelos neutrófilos foram analisadas por citometria de fluxo. A produção de IL-8 foi analisada por ELISA de captura.

## CAPÍTULO II

### Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices de *E. granulosus*

Esta parte do estudo refere-se aos ensaios de cultivo de protoescólices correspondentes ao objetivo específico 3 deste trabalho. O perfil imunogênico dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices obtidos de sobrenadantes de cultivo foram analisados por *western blotting*, utilizando soros de pacientes com hidatidose, enquanto a presença do AgB foi avaliada usando um pool de soros policlonais contra subunidades recombinantes deste antígeno. Os produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices também foram analisados por espectrometria de massas, utilizando um *pool* de amostras de cultivos distintos, devido à baixa concentração de proteínas em cada sobrenadante de cultivo individual.

# 1. Materiais e Métodos

## 1.1. Protoescólices

Os protoescólices foram obtidos conforme descrito em Virginio *et al.* (2007), e cultivados diretamente após a sua obtenção. Após a remoção dos cistos, os protoescólices foram submetidos a ciclos de lavagens através de sucessivas sedimentações em PBS para a retirada de restos de membrana germinativa e líquido hidático. A viabilidade foi determinada por *trypan blue*, e apenas as amostras de protoescólices com viabilidade  $\geq 90\%$  foram utilizadas nos ensaios.

## 1.2. Obtenção dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices

Os protoescólices foram cultivados de acordo com o protocolo sugerido por Carmena *et al.* (2004), com pequenas modificações. Durante a padronização dos ensaios, 100, 200, 400, 800, 1000, 2500, 5000 e 8000 protoescólices por ml de meio foram cultivados em 10 ml de PBS estéril, complementado com 10% de glicose e 100  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Foi estabelecido o cultivo de 8000 protoescólices/ml, pois somente nesta condição a quantidade de produtos de secreção e/ou excreção foi suficiente para a sua visualização em SDS-PAGE corado com prata.

As amostras foram analisadas em diferentes intervalos de cultivo, sendo que não foram feitos intervalos cumulativos. Ao final de cada intervalo, os 10 ml de meio de cultivo eram retirados e substituídos pelo mesmo volume de meio fresco na mesma garrafa de cultivo. A cada extração de sobrenadante de cultivo, uma alíquota de protoescólices era analisada quanto a sua viabilidade. Os intervalos de cultivo analisados foram de 0-13h, 13-18h, 18-24h, 24-40h e 40-48h.

Os sobrenadantes de cultivo foram então concentrados 100X utilizando filtros Amicon Ultra com um poro de 5 kDa de diâmetro (Millipore), e 100  $\mu\text{l}$  de cada sobrenadante foram recuperados após o processo de concentração. Um total de seis culturas de protoescólices foi feito, sendo que cinco procedentes de cistos pulmonares e uma de cisto hepático.

### **1.3. SDS-PAGE e *western blotting***

Alíquotas de 15 µl dos sobrenadantes de cada cultivo concentrados 100X foram analisadas em SDS-PAGE e *western blotting*. As proteínas presentes nas amostras concentradas foram separadas por SDS-PAGE 12% em condições redutoras, conforme Laemmli (1970) e visualizadas em coloração com prata (Shevchenko *et al.*, 1996). Os *western blotting* para detecção do perfil imunogênico dos produtos de secreção e/ou excreção foram realizados utilizando a técnica descrita por Towbin *et al.* (1979), com modificações. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences), que foram bloqueadas com Blotto 5% O/N a 4°C. Como anticorpo primário, utilizou-se um *pool* de seis soros de pacientes infectados com hidatidose cística (com valores altos de absorbância em ensaios de ELISA, Virginio *et al.*, 2003) diluídos 1:500 em blotto 5% (após uma padronização onde foram testadas as seguintes diluições: 1:50, 1:100 e 1:500). O anticorpo primário foi incubado durante 1h30 min a temperatura ambiente e com agitação. Como anticorpo secundário, foi utilizado um conjugado marcado com peroxidase anti-IgG humana (Sigma) diluído 1:1000 em blotto 5%, incubado nas mesmas condições acima, exceto o tempo, que foi de 1 h. Para testar a presença de alguma reatividade cruzada, foi feito um imunodot (pela baixa disponibilidade de material de sobrenadantes de cultivo) com um *pool* de soros negativos (de indivíduos clinicamente saudáveis), nas mesmas condições descritas acima.

Para os ensaios de detecção do AgB nos produtos de secreção dos protoescólices, foi utilizado como anticorpo primário um *pool* de soros policlonais contra cada uma das três subunidades recombinantes do AgB (AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3, gentilmente cedidos por Monteiro) diluído 1:30000 em blotto 5%. Como anticorpo secundário, foi utilizado um conjugado marcado com peroxidase anti-IgG de coelho (Amersham Biosciences) diluído 1: 2000 em blotto 5%. As condições de incubação já foram descritas acima.

A revelação de ambos ensaios foi feita usando um kit de detecção de proteínas (ECL, Amersham Biosciences).

#### **1.4. Espectrometria de massas**

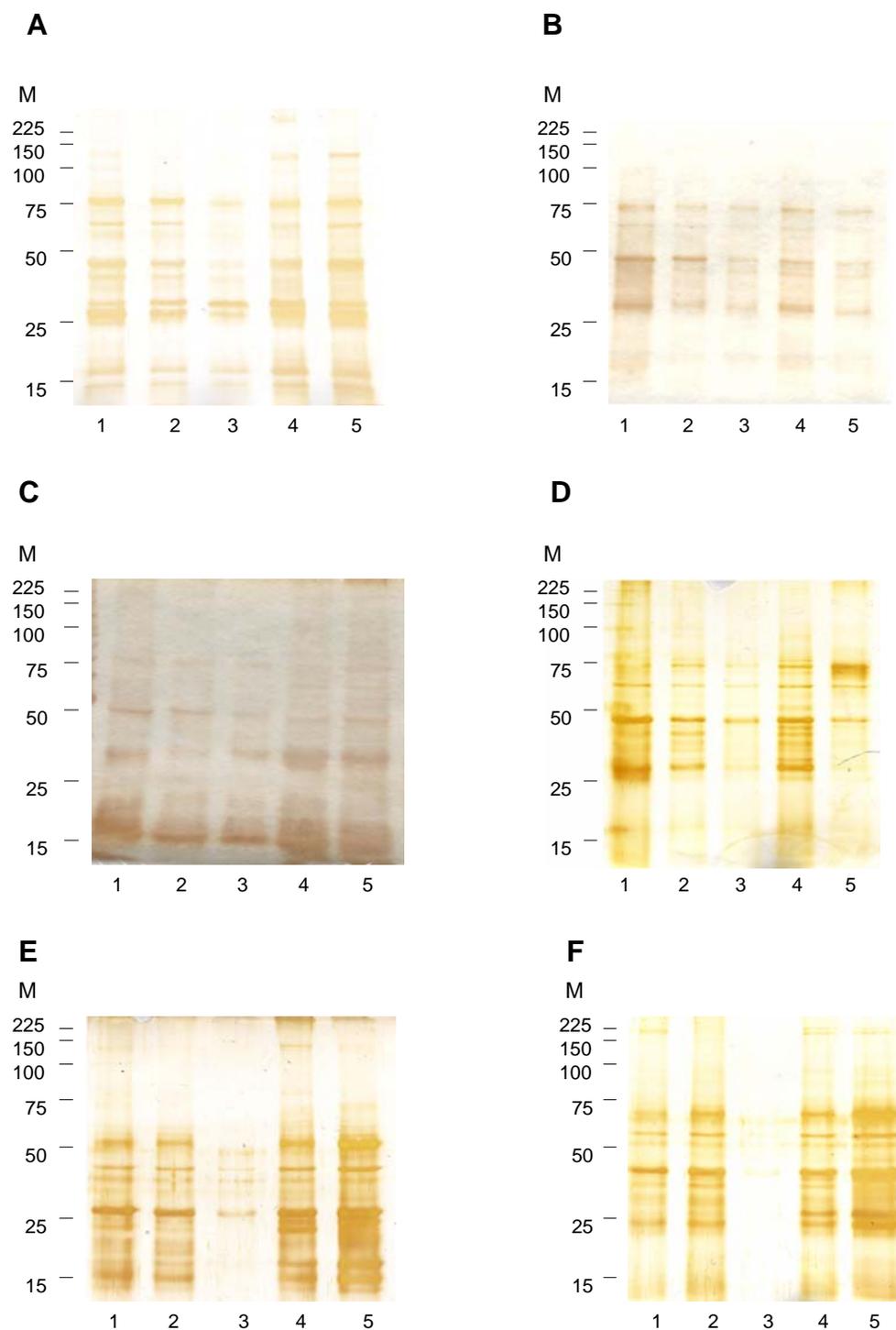
Foi feito um *pool* das seis amostras de sobrenadantes de cultivo chegando a uma concentração de 2 mg de proteína total. As proteínas foram tratadas com uréia, digeridas com tripsina (Promega) e dessalinizadas através de uma coluna de polivinilbenzeno (Waters OASIS®HLB Cartridge).

As amostras foram analisadas por espectrometria de massas em cromatografia líquida (LC-MS/MS: *Liquid chromatography tandem mass spectrometry*) utilizando um espectrômetro de massas API Q-ToF (Micromass) acoplado a um sistema de capilaridade para cromatografia líquida (CapLC, Waters). Os peptídeos foram separados por eluição com um gradiente de água/acetonitrila e ácido fórmico 0,1%. O espectro MS/MS foi processado usando o software Protein Lynx 2.0 (Waters), e o perfil PKL gerado foi utilizado para a pesquisa nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e de *expressed sequence tags* (ESTs) de *E. granulosus* (Fernández *et al.*, 2002) (LophoDB, <http://www.nematodes.org/Lopho/LophDB.php>) utilizando o software Mascot (Matrix Science) (<http://www.matrixscience.com>) (Pinto *et al.*, 2007). A análise por espectrometria de massas foi feita pela estudante de doutorado do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos Karina Mariante Monteiro em colaboração com o grupo do Dr. Fábio Gozzo, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron de Campinas, dentro do projeto MAS-5116, intitulado “Análise Proteômica dos parasitos *Echinococcus granulosus* e *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda)”.

## **2. Resultados**

### **2.1. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS**

Os produtos de secreção e/ou excreção presentes nos sobrenadantes de cultivo representativos de intervalos de tempo dentro das primeiras 48 h de cultivo de protoescólices foram analisados por SDS/PAGE 12%, e visualizados por coloração com prata (Figura 2.1).



**Figura 2.1. SDS-PAGE (12%) dos produtos de secreção e/ou excreção obtidos durante diferentes intervalos de tempo (entre 0 e 48h) de cultivo de protoescólicas. (A)** Sobrenadantes de cultivo obtidos de cisto hepático. (B-F) Sobrenadantes de cultivo obtidos de 5 cistos pulmonares de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. M: Massa molecular expressa em kDa. 1-intervalo de 0-13h; 2-intervalo de 13-18h; 3-intervalo de 18-24h; 4-intervalo de 24-40h; 5-intervalo de 40-48h.

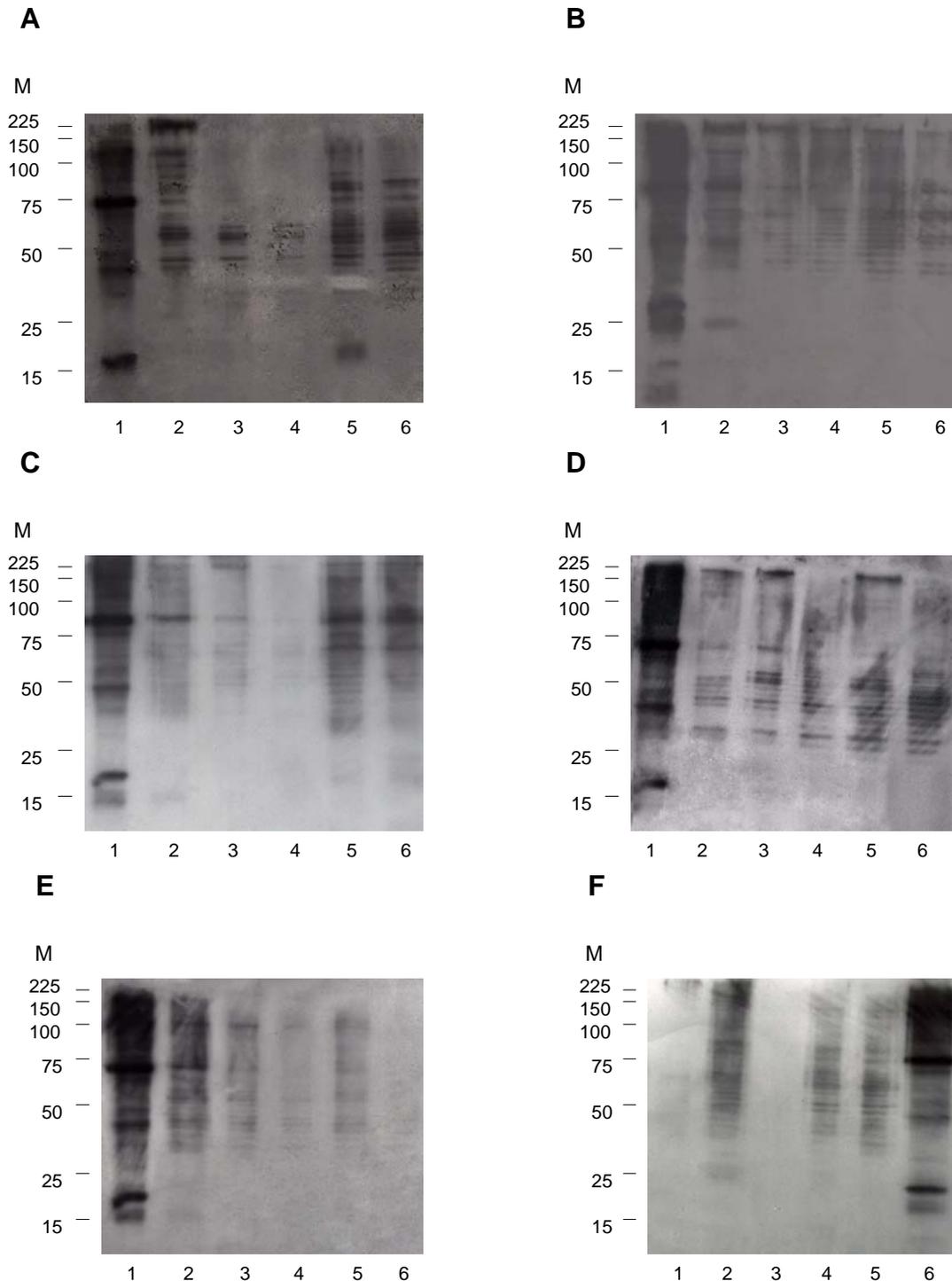
As proteínas obtidas representam, em sua maioria, produtos de secreção e/ou excreção resultantes do metabolismo do parasito, pois a viabilidade dos protoescólices manteve-se em torno de 85% ao longo do período de cultivo. Através da comparação do perfil de proteínas obtido nas amostras oriundas de sobrenadantes de cultivo de protoescólices de diferentes cistos hidáticos, é possível observar uma variabilidade de produtos secretados e/ou excretados entre os diferentes cistos, tanto em termos quantitativos como qualitativos. A amostra de proteínas demonstrada na Figura 2.1-C, aparentemente apresentou uma quantidade geral menor de produtos de secreção em relação às outras amostras. O mesmo ocorreu em intervalos específicos, como o de 40-48h, entre as amostras ilustradas em B e D (Figura 2.1), quando comparadas as amostras representadas por A, E e F (Figura 2.1), as quais apresentaram uma maior quantidade de produtos de secreção nesse período. Uma característica que se manteve em pelo menos 4 amostras de cultivo (Figura 2.1-A, D, E e F), foi uma menor secreção de proteínas no intervalo de 18-24h. Em geral, os produtos de secreção obtidos nos sobrenadantes de cultivo variaram em massa molecular de 10 a 200 kDa, com componentes de aproximadamente 75, 35, 29 e 15 kDa em destaque.

Assim como foi obtida uma considerável diferença qualitativa no perfil de proteínas entre amostras de cistos distintos, o mesmo aconteceu, em alguns casos, entre os intervalos representativos de proteínas secretadas de protoescólices oriundos de um mesmo cisto hidático. A Figura 2.1-C e D demonstra uma considerável diferença qualitativa principalmente em relação aos três primeiros intervalos (0-13h, 13-18h, 18-24h), quando comparados aos intervalos de 24-40h e 40-48h. Por outro lado, também foi observada uma semelhança no perfil de proteínas secretadas entre os diferentes intervalos de cultivo em algumas amostras obtidas do mesmo cisto hidático, como está demonstrado na Figura 2.1-A, B, E e F.

## **2.2. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por *western blotting***

Os produtos de secreção e/ou excreção presentes nos sobrenadantes de cultivo representativos de intervalos de tempo dentro das primeiras 48 h de cultivo de protoescólices foram analisados por *western blotting* utilizando um pool de soros de pacientes com hidatidose cística (Figura 2.2). Foi observada uma variabilidade de proteínas secretadas imunogênicas entre os diferentes cistos hidáticos, e também entre distintos intervalos em um mesmo cisto (exceto na amostra representada pela Figura 2.2-D, que apresentou um padrão de reconhecimento protéico bastante semelhante entre os diferentes intervalos). Em termos gerais, as proteínas imunogênicas presentes nos diferentes sobrenadantes de cultivo oriundos de diferentes cistos, e entre intervalos do mesmo cisto, variaram em massa molecular entre 25 e 200 kDa, aproximadamente. No entanto, nas amostras referentes aos intervalos de 0-13h, representadas na Figura 2.2-C e E, foram obtidas bandas de baixa intensidade de aproximadamente 15 kDa. O mesmo ocorreu na amostra referente ao intervalo de 40-48h, representada na Figura 2.2-A, que apresentou uma banda de aproximadamente 20 kDa.

Os intervalos de cultivo de protoescólices que apresentaram uma maior variabilidade de produtos secretados e/ou excretados nas diferentes amostras foram geralmente os de 0-13h, 24-40h e 40-48h. O intervalo de 18-24h apresentou uma baixa concentração ou até mesmo a ausência (Figura 2.2-F) de produtos de secreção de protoescólices na maioria das amostras cultivadas.



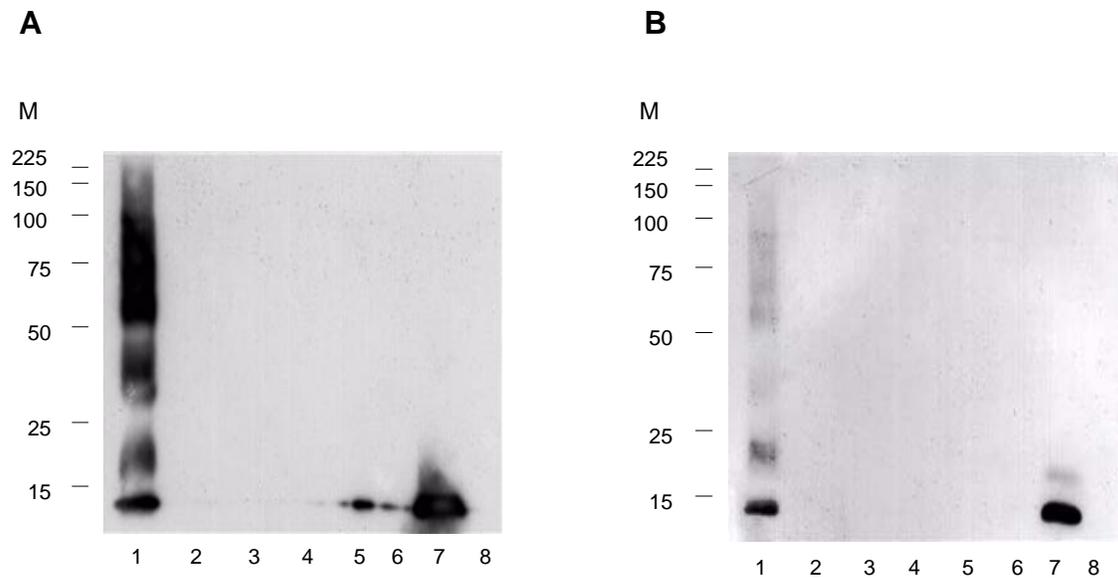
**Figura 2.2. Western blotting dos produtos de secreção e/ou excreção obtidos durante diferentes intervalos de tempo (entre 0 e 48h) de cultivo de protoescólices.** (A) Sobrenadantes de cultivo obtidos de cisto hepático. (B-F) Sobrenadantes de cultivo obtidos de 5 cistos pulmonares de diferentes regiões do Rio Grande do Sul posicionados de acordo com seus respectivos géis SDS-PAGE (Figura 2.1). M: Massa molecular expressa em kDa. 1-líquido hidático (controle positivo); 2-intervalo de 0-13h; 3-intervalo de 13-18h; 4-intervalo de 18-24h; 5-intervalo de 24-40h; 6-intervalo de 40-48h. Figura 2.2-F: 1-intervalo de 0-13; 2-intervalo de 13-18h; 3-intervalo de 18-24h; 4-intervalo de 24-40h; 5-intervalo de 40-48h; 6-líquido hidático.

No imunodot feito com o *pool* de soros negativos, de indivíduos clinicamente saudáveis, nenhuma reatividade com os produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices foi observada (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Imunodot dos produtos de secreção e ou excreção de protoescólices utilizando um pool de soros negativos.** Os dots de cima para baixo correspondem aos produtos de secreção obtidos nos intervalos de tempo de 0-13h, 13-18h, 18-24h, 24-40h e 40-48h. 1-Apenas Blotto 5%; 2-*pool* de soros infectados com hidatidose cística; 3- *pool* de soros de indivíduos clinicamente saudáveis.

Para analisar a presença de AgB nos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices em cultivo, foi feito um *western blotting* utilizando um *pool* de anticorpos policlonais contra subunidades recombinantes do AgB. O AgB foi detectado em uma das seis amostras cultivadas, oriunda de um cisto pulmonar, (Figura 2.4-A), nos intervalos de 18-24h, 24-40h e 40-48h. As outras cinco amostras cultivadas que não apresentaram AgB detectável, foram representadas por apenas um figura (Figura 2.4-B). A sensibilidade de detecção do teste foi de até 680 pg de proteína, determinada em um ensaio de imunodot (dados não mostrados).



**Figura 2.4. Western blotting para análise da presença de AgB nos produtos de secreção e/ou excreção obtidos durante diferentes intervalos de tempo (entre 0 e 48h) de cultivo de protoescólices.** (A) Amostra de sobrenadantes de cultivo com detecção de AgB (B) Amostra de sobrenadantes de cultivo sem detecção de AgB. M: Massa molecular expressa em kDa. 1-AgB nativo (controle positivo); 2-intervalo de 0-13h; 3-intervalo de 13-18h; 4-intervalo de 18-24h; 5-intervalo de 24-40h; 6-intervalo de 40-48h; 7-AgB8/2 recombinante (controle positivo); 8-HSP-70 (controle negativo).

### **2.3. Análise dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices por espectrometria de massas**

Na análise feita por espectrometria de massas, foram identificadas 11 proteínas no *pool* de amostras referentes a 6 cultivos distintos. As proteínas estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Proteínas identificadas por LC-ESI-Q-TOF MS/MS em produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices.**

Proteína	Nº de Acesso*	Escore(S) do Mascot	Peptídeo(s)	Espécie
Malato Desidrogenase	Q04820	102	DQQIILHLLDIPEAK	<i>E. granulosus</i>
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	P29190	39**	QYLLEDIEETTKFLDDVGVDLPK	<i>E. granulosus</i>
Miofilina	S40075	50 44	IMENISAFLEAMK GYGVPVADLFQTVDLFEKK	<i>E. granulosus</i>
P-29	Q9U8G7	63	EFDGLSVQLLDLIR	<i>E. granulosus</i>
Ciclofilina	P14088	74 74	IVFALFDDVPK HWFGEVESGEDVVKDMEAVGSSSGK	<i>E. granulosus</i>
Proteína de Tegumento	AAX20156	67**	NFIIDQVDDTLR	<i>E. granulosus</i>
Enolase	P42894	63 112**	LAMQEFMILPTGAK SGETEDSTIADIVVGLR	<i>Neocallismatix frontalis</i> <i>E. granulosus</i>
Serinoprotease	CAA53145	62	NDIMLLR	<i>Homo sapiens</i>
Serinoprotease	BAD66929	62	NDIMLIR	<i>Bothrops jararaca</i>
Tiorredoxina Peroxidase	Q86M52	36**	GLFIIDDKGVLR	<i>E. granulosus</i>
14-3-3	AAX73175	55	DATLIMQLLR	<i>E. granulosus</i>

O escore do Mascot é  $-10 \times \log(P)$ , onde  $P$  é a probabilidade de a combinação observada ser um evento randômico. Escores individuais acima de 24 indicam identidade ou extensa homologia para  $p \leq 0,05$ .

\*Número de acesso das seqüências homólogas depositadas no banco de dados NCBI

\*\*Escore obtido no Mascot utilizando o banco de ESTs de *E. granulosus*. Os demais escores foram obtidos utilizando o NCBI.

## 2. DISCUSSÃO GERAL

Os mecanismos da resposta imune inata que afetam a suscetibilidade a infecção primária ou secundária com *E. granulosus* são pouco conhecidos (Zhang et al., 2003). A imunomodulação do sistema imune ocorre, basicamente, nos estágios iniciais da infecção (Marriott et al., 2006), portanto, tais mecanismos provavelmente envolvem a modulação de neutrófilos por componentes parasitários, pois são as células imunes mais abundantes encontradas no sangue humano (Hayashi et al., 2003) e mediam a citotoxicidade de alvos grandes, principalmente extracelularmente (Van Spriël et al., 2001). São células efetoras que interagem com os helmintos durante o processo de infecção (Pugine et al., 2005) e também estão envolvidas na regulação da resposta imune adaptativa (Van Gisbergen et al., 2005).

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos de protoescólices e AgB de *E. granulosus* na resposta imune inata do hospedeiro para analisar o seu possível envolvimento em mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou evasão do parasito através do estudo de alguns eventos iniciais de ativação de neutrófilos.

A ativação de neutrófilos foi monitorada por citometria de fluxo (Robinson et al., 1997; Zhang et al., 1995; Guyader et al., 2004) de amostras de sangue total de indivíduos clinicamente saudáveis, e os eventos estudados foram a regulação positiva de CD11b (Davis et al., 2000), a produção de ROS ( $H_2O_2$ ) (Silva et al., 2003), e a detecção de IL-8 por ELISA. A citometria de fluxo apresenta vantagens para a medida da expressão de CD11b e produção de  $H_2O_2$  em relação a técnicas convencionais, uma vez que utiliza pequenas quantidades de sangue, sem precisar isolar a população celular de interesse da amostra de sangue total (Zhang et al., 1995; Guyader et al., 2004). Além disso, é um método mais rápido, sensível e multiparamétrico (Alvarez-Larrán et al., 2005), apresentando resultados objetivos e quantificáveis (Robinson et al., 1997). O estudo de detecção de  $H_2O_2$  apresenta vantagens em relação à detecção de  $O_2^-$ , pois  $H_2O_2$  é mais estável, enquanto  $O_2^-$  tem um tempo de vida curto, especialmente quando presente em altas concentrações, e dismuta espontaneamente, reduzindo assim, o sinal capturado (DeCoursey & Ligeti, 2005).

Os protoescólices são centrais no ciclo biológico do parasito e de particular interesse no desenvolvimento de infecções primárias e secundárias (Galindo *et al.*, 2002). *In vivo*, são normalmente seqüestrados da resposta imune do hospedeiro dentro do cisto hidático (Riganò *et al.*, 2001). Entretanto, os protoescólices são liberados após a acidental ruptura de cistos, o que pode resultar na formação de novos cistos (Thompson, 1995; Dervenis *et al.*, 2005) e no desenvolvimento de hidatidose secundária (Rogan *et al.*, 2006).

O equilíbrio entre a defesa desenvolvida pelos neutrófilos e componentes imunomoduladores expressados e/ou secretados pelo parasito pode direcionar o estabelecimento da infecção. Portanto, foram estudados os efeitos de protoescólices viáveis sobre os neutrófilos a fim de investigar o papel destas células na resposta contra o desenvolvimento da infecção secundária. Os neutrófilos foram ativados pelos protoescólices, pois ocorreu um aumento significativo da expressão de CD11b, da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e de IL-8. Entretanto, não foram observadas mudanças na morfologia ou integridade do tegumento dos vermes expostos às células ativadas. Por outro lado, a interação dos protoescólices com os neutrófilos poderia ocasionar mudanças metabólicas no parasito que afetariam seu subsequente desenvolvimento e viabilidade.

A atividade imunomoduladora de componentes parasitários é geralmente dependente da interação com receptores específicos na superfície das células do sistema imune do hospedeiro (Harnett & Harnett, 2006). Como a ativação dos neutrófilos na presença dos protoescólices foi observada mesmo na ausência de anticorpos, é provável que a interação não tenha ocorrido através de receptores Fc. Os parasitos helmintos são capazes de manipular a resposta imune adaptativa do hospedeiro por modular a resposta inata através de receptores TLR. A interação entre *Taenia crassiceps* e receptores TLR de macrófagos está envolvida na produção de IL-6 por essas células (Dissanayake *et al.*, 2004). Espécies dos gêneros *Taenia* e *Echinococcus* são helmintos filogeneticamente relacionados, que compartilham vários antígenos (Ishida *et al.*, 2003), os quais podem ser reconhecidos por diferentes TLRs.

Recentemente, uma interação entre componentes de *Schistosoma* e receptores TLR de macrófagos também foi relatada (Jenkis *et al.*, 2005), reforçando a hipótese de que a interação observada nesse estudo pode ter ocorrido através de receptores TLR da membrana de neutrófilos. Estudos feitos em neutrófilos humanos ativados por componentes parasitários através dos receptores TLR2 e TLR4 mostraram um aumento na produção de IL-8, regulação positiva na expressão de CD11b e indução de ROS (Sabroe *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2005) que correspondem aos mesmos parâmetros avaliados nesse trabalho.

Em seres humanos, a resposta imune específica contra componentes somáticos e/ou secretados por protoescólices tem sido relatada durante a infecção crônica (Sterla *et al.*, 1999; Cardozo *et al.*, 2002; Virginio *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2005). O AgB representa o maior componente antigênico secretado pela camada germinativa e por protoescólices (Sanchez *et al.*, 1991), está presente em grandes quantidades no líquido hidático (Mamuti *et al.*, 2006a) e pode ultrapassar as membranas do cisto, atingindo o meio interno do hospedeiro (González & Chachau, 2003). Entretanto, o seu papel na biologia do parasito ainda não está bem elucidado. Existem algumas evidências que o AgB está envolvido em mecanismos fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro. É bem possível que o AgB tenha um papel crítico durante o estabelecimento do parasito e os estágios iniciais da infecção, uma vez que só começa a ser reconhecido por anticorpos específicos cinco semanas após a infecção em modelos experimentais de camundongos infectados (Zhang *et al.*, 2003). Além disso, devido a barreira física dos cistos, o AgB pode se acumular no líquido hidático, após ser secretado pelo parasito em um agregado protéico que seja fortemente imunogênico, antes de entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro (Mamuti *et al.*, 2006a). As subunidades de 8 kDa do AgB foram capazes de imunomodular as respostas inata e adaptativa do sistema imune do hospedeiro (Shepherd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001). A interação do AgB com os neutrófilos foi previamente investigada, mas os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram analisados. Sendo assim, os efeitos do AgB nativo na regulação positiva de CD11b, na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e na produção de IL-8 foram avaliados pela primeira vez nesse trabalho.

Em contraste com os protoescólices, o AgB não produziu efeitos detectáveis na ativação de neutrófilos nas condições experimentais utilizadas. Portanto, foi analisada a capacidade do AgB de interferir na ativação de neutrófilos pré-estimulados com PMA, como um modelo *in vitro* para analisar a sua potencial propriedade imunomodulatória. A pré-incubação de neutrófilos com o AgB não alterou a regulação positiva de CD11b induzida por PMA. Entretanto, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativamente reduzida pela presença de 1 µg/ml de AgB. Nos estágios iniciais de desenvolvimento dos cistos hidáticos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos infiltram-se ao redor do cisto (Zhang *et al.*, 2003) e liberam ROS, incluindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as quais podem causar danos para todas as classes de macromoléculas biológicas, levando a oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos, modificações e quebras nas fitas de DNA. A geração de ROS pode ser restrita a fagossomos intracelulares, no entanto, a secreção destes componentes reativos começa antes do fechamento do fagossomo, e os compostos podem escapar para o meio extracelular dos neutrófilos. Portanto, os neutrófilos que se aderem a materiais grandes para serem ingeridos como os protoescólices podem secretar estes produtos em grandes quantidades no meio extracelular (Kuijpers & Roos, 2001). Sendo assim, o parasito precisa se defender de ROS para garantir a sua sobrevivência (Li *et al.*, 2004), e o AgB parece estar envolvido no processo de defesa. O efeito inibitório do AgB foi obtido somente quando PAF foi usado como *priming*. Isso sugere que o efeito inibitório observado não foi atribuído a interação direta entre PMA e AgB, o que está de acordo com a observação de que este efeito não é obtido com a concentração maior de AgB. O fenômeno de *priming* sugere que a ativação é um processo de dois passos. A base molecular para o *priming* de NADPH oxidase é desconhecida (Brown *et al.*, 2004), no entanto se sabe que ele acontece *in vivo* (Nilsson-Augustinsson *et al.*, 2004).

PAF é um estabelecido e importante mediador inflamatório que amplifica a resposta oxidativa de neutrófilos *in vivo* (Archer *et al.*, 1985; Kitchen *et al.*, 1996). Diferente de outros agentes de *priming*, PAF é sintetizado e expressado na superfície de células endoteliais ativadas. A ativação dos neutrófilos por PAF ocorre

provavelmente quando eles estão em íntimo contato com as células endoteliais (McClenahan *et al.*, 2000).

Diferentes agentes de *priming* podem seletivamente potencializar distintos mecanismos efetores durante a ativação de neutrófilos por um estímulo subsequente (Rosenberg & Gallin, 2003). Sendo assim, uma qualitativa diferença entre neutrófilos primados poderia condicionar a interferência do AgB com o caminho intracelular de mecanismo oxidativo envolvido. Além disso, a ativação de células inatas resulta da integração de sinais positivos e negativos com múltiplos receptores/ligantes (Vivier & Malissen, 2005), e a ativação de NADPH oxidase é regulada por diversos caminhos de sinalização inter-relacionados (Bengtsson *et al.*, 2006). Portanto, a resposta dose-dependente observada com o AgB pode estar de acordo com tal padrão complexo de interação na célula. Por outro lado, diversos estudos feitos com diferentes peptídeos mostraram que na resposta adaptativa, estímulos com baixas doses de antígenos preferencialmente induzem uma resposta inibitória Th2, com produção de IL-4 e IL-5 (Rogers & Croft, 1999).

Os mecanismos pelos quais os efeitos de inibição ocorreram não são claros, mas foi sugerido que partículas exógenas podem induzir modificações na membrana, alterando a reunião do complexo NADPH oxidase (Walrand *et al.*, 2003), necessário para a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, a interferência intracelular em outros sistemas enzimáticos também pode estar envolvida no processo de inibição. Entretanto, a elucidação do mecanismo de ação deste antígeno nas células imunes do hospedeiro necessita uma posterior investigação.

Mudanças no perfil de citocinas são eventos cruciais que podem influenciar as interações parasito-hospedeiro (Vuitton 2003). Nesse contexto, o AgB não estimulou a secreção de IL-8 por uma fração enriquecida de neutrófilos. A IL-8 é uma citocina produzida por neutrófilos e outras células inatas, com potente atividade de quimiotaxia de diferentes populações celulares envolvidas em eventos citotóxicos, determinando um papel central para os neutrófilos na regulação e infiltração de leucócitos durante a resposta inflamatória. O tempo de vida curto dos neutrófilos pode ser estendido na presença de IL-8, e esse mecanismo é potencialmente importante para ampliar o tempo de vida dos neutrófilos participantes da resposta

imune no sítio inflamado (Whyte *et al.*, 1999). A IL-8 pode ainda, estimular a liberação de elastase em neutrófilos (Sadowska *et al.*, 2006) e estar envolvida também na modulação da resposta adaptativa (Van Gisbergen *et al.*, 2005).

A variabilidade observada no comportamento geral dos neutrófilos de diferentes indivíduos pode ser devido à presença de subpopulações funcionalmente diferentes entre os PMN circulantes (Bass *et al.*, 1983). Alguns estímulos como a molécula C5a do sistema complemento pode causar uma transiente neutropenia em algumas células, e os neutrófilos recuperados durante este processo apresentaram menor capacidade de migração e uma reduzida capacidade de ligação a imunoglobulinas (Klempner *et al.*, 1980). Sendo assim, ainda que dentro de uma população homogênea de PMN, a aplicação de um estímulo pode alterar a atividade metabólica das células tanto de uma maneira uniforme, causando uma parcial estimulação de todas as células, ou de uma maneira heterogênea, causando uma completa estimulação de somente uma porção das células do sistema (Bass *et al.*, 1983).

O estímulo de neutrófilos e um alto estado de ativação podem levar ao enfraquecimento e à apoptose das células, um efeito difícil de prever e que pode ser variável em cada indivíduo examinado (Eickhoff *et al.*, 2004). Por outro lado, fatores presentes no sangue total de cada indivíduo, como citocinas, células cooperativas, anticorpos e outros componentes plasmáticos podem representar fatores desconhecidos que influenciem nos ensaios. Além disso, o pulso respiratório geralmente acontece no tecido infectado, um meio diferente do sangue, então como qualquer outro ensaio *in vitro*, os dados devem ser analisados e interpretados com cuidado (Kampen *et al.*, 2004).

Assumindo que os resultados obtidos com os protoescólices e o AgB *in vitro* representam parcialmente o que ocorre com os neutrófilos após uma acidental ruptura e liberação do conteúdo de cistos, o AgB poderia ser visto como parte de um mecanismo de evasão importante para a sobrevivência do parasito (protoescólices) em caso de ruptura do cisto. O AgB poderia interferir com a fase efetora da resposta imune, permitindo que protoescólices liberados possam se desenvolver em cistos secundários. Esta interferência, mediada por inibição de

células imunorreguladoras e células efetoras, como os neutrófilos, seria possível devido ao fato que os efeitos estimulatórios de protoescólices poderiam ser resolvidos pelos efeitos não-estimulatórios ou inibitórios do AgB, presente em grandes quantidades no líquido hidático.

Devido ao fato de que o AgB exerce esses efeitos imunomodulares sobre a resposta inata do hospedeiro intermediário, o estudo de outros produtos de secreção de protoescólices que também possam estar envolvidos nesses mecanismos de defesa torna-se extremamente importante.

As proteínas secretadas realmente constituem um grupo fundamental de análise, uma vez que representam os principais produtos imunologicamente ativos, partindo da premissa de que uma proteína precisa ser exportada para exercer o seu efeito no sistema imune do hospedeiro. A análise de proteínas secretadas tem sido feito com sucesso em helmintos, sendo que estudos filogenéticos comparativos entre espécies de nematódeos sugerem que a rápida evolução de novas proteínas secretadas pode refletir uma adaptação evolutiva dos parasitos para evasão da resposta imune do hospedeiro (Maizels *et al.*, 2004). No entanto, poucas pesquisas têm sido direcionadas para a descrição de produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices e de vermes adultos de *E. granulosus* (Camena *et al.*, 2006), provavelmente pela dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de componentes secretados para análises posteriores (Carmena *et al.*, 2005a). Carmena *et al.* (2004) caracterizaram os produtos de secreção de protoescólices analisando o perfil de proteínas apenas por ensaios enzimáticos. Portanto, como o repertório de produtos de secreção do metacestódeo que interfere com o sistema imune do hospedeiro ainda é pouco caracterizado, uma análise mais específica de identificação das proteínas secretadas através de espectrometria de massas torna-se uma alternativa extremamente importante. O estudo de proteínas através de espectrometria de massas oferece ferramentas para investigar proteínas parasitárias e tem o potencial para identificar expressão diferencial em distintos estágios do parasito ou em resposta a drogas (Barrett *et al.*, 2000) e produtos de secreção e/ou excreção (Jefferies *et al.*, 2001). Em *E. granulosus*, esta estratégia viabiliza, por

exemplo, a análise comparativa da expressão de proteínas somáticas e secretadas de protoescólices em cistos de diferentes hospedeiros.

Chemale *et al.* (2003) realizaram um levantamento proteômico preliminar de extratos de protoescólices e de líquido hidático. Entretanto, a análise do conteúdo protéico presente no líquido, que corresponde a produtos de secreção de protoescólices e da membrana germinativa apresentou problemas de resolução, devido à alta concentração de proteínas do soro do hospedeiro no líquido, principalmente albumina e imunoglobulinas. Sendo assim, a análise de produtos secretados através do cultivo de protoescólices permitiu uma avaliação sem a presença desses contaminantes.

Neste trabalho, o cultivo foi feito em diferentes intervalos de tempo, não cumulativos, visando uma análise qualitativa preliminar e prospectiva de produtos de secreção correspondentes a distintos períodos e estados fisiológicos dos protoescólices em cultivo. O meio utilizado para o cultivo foi PBS, que é livre de proteínas ou outros componentes que pudessem interferir com o material resultante do metabolismo do parasito. Além disso, é um meio de fácil preparação e de baixo custo (Carmena *et al.*, 2002). Os produtos de secreção e/ou excreção foram obtidos a partir das primeiras 48 h de cultivo de protoescólices, pois durante este período os parasitos apresentavam uma alta taxa de sobrevivência (em torno de 85%), assegurando uma mínima contaminação com produtos somáticos (Carmena *et al.*, 2002). A variabilidade dos produtos secretados, que pode ocorrer pela presença de diferentes genótipos entre protoescólices de cistos diferentes e até mesmo dentro de um mesmo cisto (Elisondo *et al.*, 2004; Arend *et al.*, 2004), foi independente do órgão de origem dos cistos, contrariando os resultados de Carmena *et al.* (2004), que observaram uma maior variabilidade nos componentes secretados por protoescólices oriundos de cistos hepáticos. No período de 18-24h houve um declínio na secreção em pelo menos quatro cultivos realizados, mas a atividade de protoescólices pode variar de acordo com o seu órgão de origem e também o tempo/intervalo de cultivo (Macintyre & Dixon, 2001). Aparentemente, há uma diminuição do metabolismo dos protoescólices nesse momento, e após ocorre uma retomada da atividade secretora nos intervalos finais.

Os produtos de secreção e/ou excreção imunogênicos obtidos nesse trabalho foram mais representativos em relação a estudos anteriores. Porém os componentes de 20, 50, 65, 75 e 89 kDa identificados apresentaram massa molecular similar aos produtos de secreção obtidos por Auer *et al.* (1988) e Carmena *et al.* (2004). Os produtos secretados não apresentaram reatividade cruzada com soros de indivíduos clinicamente saudáveis, indicando o seu potencial imunodiagnóstico. Entretanto, não foi feita uma comparação com soros de indivíduos com outras parasitoses, devido à baixa quantidade de material.

A secreção *in vitro* do AgB pelos protoescólices foi demonstrada pela primeira vez nesse trabalho. Carmena *et al.* (2004) não detectaram o AgB em seus ensaios e sugeriram que ele poderia ser sintetizado mais tarde por protoescólices e pela membrana germinativa. Entretanto, a técnica de revelação para detecção de proteínas no *western blotting* utilizada nesse trabalho apresenta uma sensibilidade muito maior do que a usada pelos autores citados, permitindo a visualização da banda de 8 kDa correspondente a subunidade do AgB.

Entre as proteínas secretadas identificadas por espectrometria de massas, algumas correspondem a produtos antigênicos. Um passo fundamental no conhecimento de estratégias de evasão do parasito é justamente identificar antígenos que desencadeiam uma forte, mas não restritiva resposta de anticorpos, visto que diferentes classes e subclasses de anticorpos específicos podem apresentar papéis biológicos distintos no estabelecimento da infecção (Ortona *et al.*, 2005). Uma vez identificadas, é possível avaliar experimentalmente a função dessas proteínas, as quais podem levar a elucidação de processos metabólicos específicos e/ou mecanismos de infecção e de evasão. O grupo de antígenos identificado neste trabalho foi composto pelas proteínas malato desidrogenase (Rodrigues *et al.*, 1993), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (Geary *et al.*, 1993), miofilina (Martin *et al.*, 1995) e P-29 (González *et al.* 2000).

A malato desidrogenase mostrou ser altamente imunogênica em humanos infectados com hidatidose (Virginio *et al.*, 2003), tanto em níveis de IgG total como de IgG4, que pode desviar a produção de anticorpos e está correlacionada com a doença ativa (Ortona *et al.*, 2005), pois não é nem citofílica e nem fixadora do

complemento. Por outro lado, por competir diretamente com IgE, pode proteger o hospedeiro de um choque anafilático (Vuitton, 2004).

A PEPCK induziu uma forte resposta imune em humanos (Stadecker *et al.*, 2001), e em camundongos, caracterizada pelo aumento de células T CD4, e da produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (Liu *et al.*, 2006). Esta enzima também é importante na formação de granuloma pela ação de células T CD4 no tecido infectado com parasitas, como foi observado com *Schistosoma mansoni*, (Hernández *et al.*, 1997), embora o perfil de citocinas se encaixe em um balanço de resposta Th1/Th2, conferindo uma resposta parcialmente benéfica para o parasito.

As proteínas P-29 e miofilina apresentaram imunogenicidade em humanos infectados com hidatidose (González *et al.* 2000; Martin *et al.*, 1995), embora se encontrem no tegumento e escoléx de protoescólices, e na camada germinativa, respectivamente.

Dentre as outras proteínas identificadas, as quais também apresentam propriedades antigênicas, algumas já têm um papel descrito em mecanismos de evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro.

A ciclofilina (Colebroock *et al.*, 2002) é uma proteína alérgena e secretada (Ortona *et al.*, 2002; Rosenzvit *et al.*, 2006). As moléculas alérgenas induzem uma resposta Th2 não protetora (Pasare & Medzhitov, 2004).

A proteína de tegumento (EgTeg) (Ortona *et al.*, 2005) de *E. granulosus* inibiu a quimiotaxia de neutrófilos, induziu uma resposta celular dominada pela acentuada produção de IL-4, uma citocina associada a resposta Th2, e escassa produção de INF- $\gamma$ . EgTeg é uma molécula imunomoduladora, pois também não fixa o sistema complemento, induzindo preferencialmente uma resposta Th2, e já foi relatada no líquido hidático (Ortona *et al.*, 2005).

A enolase (Durand *et al.*, 1995), que apresenta a sua seqüência amplamente conservada entre diferentes organismos (Pancholi, 2001), já foi descrita ser secretada em alguns organismos (Veiga-Malta *et al.*, 2004; Sundstrom & Aliaga, 1994; Quiñones *et al.*, 2007). A enolase inibiu a resposta imune de camundongos contra antígenos dependentes de células T e estimulou a produção da citocina antiinflamatória IL-10. Além disso, não estimulou a produção de INF- $\gamma$ , fundamental

na condução da resposta Th1 (Veiga-Malta *et al.*, 2004). A enolase parece estar envolvida também em mecanismos de invasão de parasitos, pois a sua ligação com plasminogênio (proteínase com importante papel nos processos de fibrinólise e degradação de matrizes extracelulares) acentua a atividade desta proteínase (Dzik, 2006).

As serinoproteases de *B. jararaca* (Saguchi *et al.*, 2005) e de *H. sapiens* (Dihanich & Spiess, 1994) pertencem à família de tripsinas. O Ag5 de *E. granulosus* é secretado e representa um dos maiores componentes do líquido hidático, sugerindo a sua importância na biologia do parasito (Lorenzo *et al.*, 2003) principalmente no desenvolvimento do metacésteo. A porção amino terminal do Ag5 apresenta seqüência homóloga a serinoproteases da família de tripsinas (Willis *et al.*, 1997). Este antígeno apresenta duas subunidades ligadas por uma única ponte dissulfeto, que é uma arquitetura altamente conservada em outras serinoproteases desta família (Lorenzo *et al.*, 2003), tais como as proteases de coagulação sanguínea, como a de jararaca, que está envolvida na atividade hidrolítica de fibrinogênio humano (Saguchi *et al.*, 2005). É possível que essas serinoproteases, envolvidas também na degradação da matriz extracelular e na invasão de parasitos (Dzik, 2006), diversifiquem mais rapidamente em relação às outras proteínas, considerando a taxa convencional de evolução, e parecem adquirir novas funções, capacitando uma melhor adaptação ao meio (Saguchi *et al.*, 2005). Nossos resultados sugerem então, a presença de outras serinoproteases nos produtos de secreção de protoescólices, além do Ag5. O Ag5 está presente em diferentes isoformas (Zhang & McManus, 1996), o que sugere que assim como o AgB, o Ag5 pode ser codificado por uma família multigênica, a qual pode ser variavelmente expressa e pode ter algum papel em mecanismos de evasão.

Tort *et al.* (1999) sugeriram que proteases secretadas pelo metacésteo podem ter um papel fundamental no crescimento dos cistos no hospedeiro.

A tiorredoxina peroxidase atua como um antioxidante que remove ROS, especialmente  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Docampo, 1995), derivadas do metabolismo celular. É amplamente distribuída entre os helmintos, onde apresenta um papel fundamental na proteção desses organismos dos efeitos deletérios de ROS produzidas pelos

leucócitos ativados dos hospedeiros (Li *et al.*, 2004). Esses parasitos têm se adaptado ao estresse oxidativo por sintetizar altos níveis de enzimas oxidantes, muitas vezes, na interface parasito-hospedeiro. Já foi demonstrado que protoescólices de *E. granulosus* podem metabolizar peróxido de hidrogênio *in vitro* (Salinas *et al.*, 1998), e que expressam altos níveis de tioredoxina peroxidase, o que provavelmente define um importante papel para essa enzima na biologia do parasito (Li *et al.*, 2004). Sendo assim, seria muito provável que a tioredoxina secretada estaria envolvida na eliminação de ROS produzidas pelo sistema imune do hospedeiro, uma vez que as atividades de catalase e glutathione transferase parecem estar ausentes em protoescólices presentes na forma larval do parasito (Salinas *et al.*, 1998). Em outros parasitos, como *Fasciola gigantica*, os produtos de secreção contêm peroxidoxina, uma enzima que metaboliza peróxido de hidrogênio na ausência da atividade clássica da superóxido dismutase (El-Ghaysh *et al.*, 1999).

E finalmente, a proteína 14-3-3 pertence uma família de moléculas eucarióticas, representadas por diversas isoformas, as quais têm sido encontradas em muitos organismos, incluindo parasitos (Siles-Lucas *et al.*, 1998). A proteína já foi relatada ser secretada pelas glândulas rostelares de vermes adultos de *E. granulosus* (Siles-Lucas *et al.*, 2000), e também por outros parasitos como *Toxoplasma gondii* (Assossou *et al.*, 2004), o que fortemente indica seu papel na interface parasito-hospedeiro. A expressão em altos níveis de 14-3-3 parece estar associada ao crescimento sem restrições do metacestódeo de *E. multilocularis* (Nunes *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* com a proteína 14-3-3 de *E. multilocularis* mostraram uma redução na produção de óxido nítrico bem como no mRNA de óxido nítrico sintetase pelos macrófagos ativados do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2004). Isso mostra que a proteína 14-3-3 pode ajudar o parasito a evadir da resposta imune mediada por óxido nítrico pelas células do hospedeiro.

A presença de proteínas nos produtos de secreção e/ou excreção de protoscólices não descritas anteriormente como secretadas, tais como P-29, miofilina e malato desidrogenase, pode ser o resultado da liberação por morte e degeneração de protoescólices, embora o percentual de viabilidade dos vermes permanecesse relativamente alto (em torno de 85%) mesmo no último intervalo de cultivo. Por outro

lado, estudos de reatividade cruzada por *western blotting* e ELISA de inibição mostraram que os produtos de secreção de protoescólices compartilham mais componentes antigênicos com extratos somáticos dos vermes do que com líquido hidático (Carmena *et al.*, 2005b). Provavelmente estão sendo utilizadas vias alternativas de secreção. Proteínas citosólicas foram identificadas na secreção de cercárias de *S. mansoni*, possivelmente pela ação de glândulas holócrinas, nas quais o conteúdo celular é forçado a sair através de ductos por contração muscular (Curwent *et al.*, 2006). Além disso, o repertório identificado de produtos secretados pode não ser o mesmo que ocorre na situação natural, pois a secreção pode depender de fatores do hospedeiro e da pressão do meio (Carmena *et al.*, 2004).

Os resultados apresentados neste trabalho estendem o conhecimento sobre os efeitos de *E. granulosus* sobre a resposta imune de hospedeiros intermediários humanos. Os protoescólices são componentes do parasito que, apesar de ativarem as células da resposta imune inata, são capazes de secretar proteínas que estão envolvidas em mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, prolongando a sua sobrevivência e permitindo o desenvolvimento de cistos secundários. Como os efeitos de ativação observados pelos protoescólices foram rápidos, proteínas de superfície parecem estar envolvidas nesses processos. Desta forma, as proteínas secretadas e acumuladas no líquido hidático poderiam inibir a resposta imune desenvolvida contra os antígenos de superfície dos protoescólices, em casos de acidental ruptura dos cistos hidáticos. O AgB apresentou uma atividade inibitória, e as outras proteínas identificadas neste trabalho podem também estar envolvidas nesses mecanismos.

## PERSPECTIVAS

Os ensaios de ativação dos neutrófilos de seres humanos clinicamente saudáveis com protoescólices e de inibição destas células com o AgB podem ser testados *in vivo*, utilizando modelos experimentais com camundongos;

Análises de espectrometria de massas de proteínas de superfície de protoescólices podem ser feitas para verificar quais proteínas possíveis poderiam estar envolvidas nos mecanismos de ativação da resposta imune inata do hospedeiro;

Novas culturas de protoescólices podem ser feitas, com a retirada de sobrenadantes de cultivo em tempos constantes, para uma possível análise quantitativa dos produtos de secreção e/ou excreção de protoescólices;

As proteínas identificadas por espectrometria de massas podem ser analisadas quanto ao seu papel em mecanismos de evasão de *E. granulosus* da resposta imune do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Qaoud, K. M. & Abdel-Hafez, S. K. Humoral and cytokine response during protection of mice against secondary hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*, 98: 54-60, 2005.

Alvarez-Larrán, A.; Toll, T.; Rives, S. & Estella, J. Assessment of neutrophil activation in whole blood flow cytometry. *Clin Lab Haem*, 27: 41-46, 2005.

Andrade, M. A.; Siles-Lucas, M.; Espinoza, E.; Arellano, J. L. P.; Gottstein, B. & Muro, A. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide*, 10: 150-155, 2004.

Archer, C. B.; Page, C. P.; Morley, J. & MacDonald, D. M. Accumulation of inflammatory cells in response to intracutaneous platelet activating factor (PAF-acether) in man. *Br J Dermatol*, 112: 285-290, 1985.

Arend, A. C.; Zaha, A.; Ayala, F. J. & Haag, K. L. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol*, 108: 76-80, 2004.

Assossou, O.; Besson, F.; Rouault, J-P.; Persat, F.; Ferrandez, J.; Mayençon, M.; Peyron, F. & Picot, S. Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *FEMS Microbiol Lett*, 234: 19-25, 2004.

Auer, H.; Hermentin, K. & Aspöck, H. Demonstration of a specific *Echinococcus multilocularis* antigen in the supernatant of *in vitro* maintained protoscoleces. *Zbl Bakt Mik Hyg*, 268: 416-423, 1988.

Barnard, M. R.; Linden, M. D.; Frelinger III, A. L.; Li, Y.; Fox, M. L.; Furman, M. I. & Michelson, A. D. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of

monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost*, 3: 2563-2570, 2005.

Barret, J.; Jefferies, J. R. & Brophy, P. M. Parasite proteomics. *Parasitol Today*, 16: 400-403, 2000.

Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seeds, M. C. & Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 130: 1910-1917, 1983.

Baz, A.; Ettlín, G. M & Dematteis, S. Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Immunobiology*, 211: 3-9, 2006.

Bengtsson, T.; Orselius, K. & Wettero, J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biol Int*, 30: 154-163, 2006.

Brehm, K.; Spiliotis, M.; Zavala-Góngora, R.; Konrad, C. & Frosch, M. The molecular mechanisms of larval cestode development: First steps into an unknown world. *Parasitol Int*, 55: 15-21, 2006.

Brown, G. E.; Stewart, M. Q.; Bissonnette, S. A.; Elia, A. E. H.; Wilker, E. & Yaffe, M. B. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 279: 27059-27068, 2004.

Brushi, F.; Carulli, G.; Azzarà, A.; Homan, W.; Minucci, S.; Rizzutti-Gullaci, A.; Sbrana, S. & Angiolini, C. Inhibitory effects of human neutrophil functions by the 45-kD glycoprotein derived from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Int Arch Allergy Immunol*, 122:58-65, 2000.

Budke, C. M. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis*, 12: 296-303, 2006.

Calafat, J.; Kuijpers, T. W.; Janssen, H.; Borregaard, N.; Verhoeven, A. J. & Ross, D. Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood*, 81: 3122-3129, 1993.

Cardozo, C.; Tucci, P. & Hernández, A. Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in patients with cystic hydatid disease. *Parasitol Res*, 88: 984-990, 2002.

Carmena, D.; Benito, A.; Postigo, I.; Arteaga, J.; Martínez, J. & Guisantes, J. A. Short term culture of protoscoleces to obtain excretory-secretory proteins of *Echinococcus granulosus*. *Res Rev Parasitol*, 62:84-88, 2002.

Carmena, D.; Martínez, J.; Benito, A. & Guisantes, J. A. Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology*, 129: 371-378, 2004.

Carmena, D.; Benito, A.; Martínez, J. & Guisantes, J. A. Preliminary study of the presence of antibodies against excretory-secretory antigens from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in dogs with intestinal echinococcosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 311-317, 2005a.

Carmena, D.; Martínez, J.; Benito, A. & Guisantes, J. A. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 861-867, 2005b.

Carmena, D.; Benito, A. & Eraso, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop*, 98: 74-86, 2006.

Cassatella, M. A.; Gasperini, S.; Calzetti, F.; McDonald, P. P.; Trinchieri, G. Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem J*, 310:751-755, 1995.

Cavallaro, A.; Ainis, T.; Bottari, C. & Fimiani, V. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiol Res*, 52: 555-562, 2003.

Chaible, L. M.; Alba-Loureiro, T. C.; Maia, A. A.; Pugine, S. M.; Valle, C. R.; Pithon-Curi, T. C.; Curi, R. & De Melo, M. P. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Vet Parasitol*, 127: 121-129, 2005.

Chemale, G.; Haag, K. L.; Ferreira, H. B. & Zaha, A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol*, 116: 233-237, 2001.

Chemale, G.; Van Rossum, A. J.; Jefferies, J. R.; Barrett, J.; Brophy, P. M.; Ferreira, H. B. & Zaha, A. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics*, 3: 1633-1636, 2003.

Chemale, G.; Ferreira, H. B.; Barrett, J.; Brophy, P. M. & Zaha, A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta*, 1747:189-194, 2005.

Clark, R. A. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis*, 179: 309-317, 1999.

Colebrook, A. L.; Jenkins, D. D. & Lightwlers, M. W. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein. *Parasitology*, 125: 485-493, 2002.

Cucinotta, E.; Palmeri, R.; Lazzara, S.; Melita, G. & Melita, P. Intrabiliary rupture of hepatic hydatid cyst. *Chir Ital*, 54: 249-252, 2002.

Curwent, R. S.; Ashton, P. D.; Sundaralingam, S. & Wilson, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of *Schistosoma* cercariae that facilitate host entry. *Mol Cell Proteomics*, 5: 835-844, 2006.

Davis, H. M.; Carpenter, D. C.; Stahl, J. M.; Zhang, W.; Hynicka, W. P. & Griswold, D. E. Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J Immunol Methods*, 240: 125-32, 2000.

De Course, T. E. & Ligeti, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *CMLS Cell Mol Life Sci*, 62: 2173-2193, 2005.

De La Rue, M. L.; Dinkel, A.; Mackenstedt, U. & Romig, T. New data on *Echinococcus* spp, in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop*, 48: 103-104, 2006.

Dematteis, S.; Baz, A.; Rottenberg, M.; Fernández, C.; Örn, A. & Nieto, A. Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite Immunol*, 21: 19-26, 1999.

Dematteis, S.; Piroto, F.; Marques, J.; Nieto, A.; Örn, A. & Baz, A. Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite Immunol*, 23: 1-9, 2001.

Dihanich, M. & Spiess, M. A novel serine proteinase-like sequence from human brain. *Biochim Biophys Acta* 1218: 225-228, 1994.

Dervenis, C.; Delis, S.; Avgerinos, C.; Madariaga, J. & Milicevic, M. Changing concepts in the management of liver hydatid disease. *J Gastrointest Surg*, 9: 869-877, 2005.

Dissanayake, S.; Amith, R. S. & Shahin, A. *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naive murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). *Mol Immunol*, 41: 391-398, 2004.

Docampo, R. Antioxidant mechanisms. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Marr, J. J. & Muller, M. (Eds). Academic Press, London, pp. 147-160, 1995.

Dreweck, C. M.; Soboslay, P. T.; Schulz-Key, H.; Gottstein, B. & Kern, P. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacystode vesicles. *Parasite Immunol*, 21:433-438, 1999.

Durand, R.; Fischer, M.; Rasclé, C. & Fèvre, M. *Neocallimastix frontalis* enolase gene, enol: first report of an intron in an anaerobic fungus. *Microbiology*, 141: 1301-1308, 1995.

Dusi, S.; Della Bianca, V.; Donini, M.; Nadalini, K. A. & Rossi, F. Mechanisms of stimulation of the respiratory burst by TNF in nonadherent neutrophils: its independence of lipidic transmembrane signaling and dependence on protein tyrosine phosphorylation and cytoskeleton. *J Immunol*, 157: 4615-4623, 1996.

Dzik, J. M. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol*, 53: 33-64, 2006.

Eckert, J. & Deplazes, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, 17: 107-135, 2004.

Eickhoff, S.; Mironowa, L.; Carlson, R.; Leibold, W. & Tipold, A. Measurement of phagocytosis and oxidative burst of canine neutrophils: high variation in healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 101: 109-121, 2004.

El-Ghaysh, A.; Turner, R. J.; Brophy, P. M. & Barret, J. Effect of *Fasciola gigantica* somatic extracts and excretory/secretory products on superoxide production by activated neutrophils. *Vet Parasitol*, 84: 91-100, 1999.

Elissondo, M. C.; Dopchiz, M. C.; Brasesco, M & Denegri, G. *Echinococcus granulosus*: first report of microcysts formation from protoscoleces of cattle origin using the *in vitro* vesicular culture technique. *Parasite*, 11: 415-418, 2004.

Falcone, F. H.; Rossi, A. G.; Sharkey, R, Brown, A. P.; Pritchard, D. I. & Maizels, R. M. *Ascaris suum*-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway. *Infect Immun* 69: 4007-4018, 2001.

Farias, L. N.; Malgor, R.; Cassaravilla, C., Bragança, C. & De La Rue, M. L. Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46: 153-156, 2004.

Fausser, S. & Kern, P. T-Lymphocyte cytokine mRNA expression in cystic echinococcosis. *Acta Trop*, 64: 35-51, 1997.

Fernández, C.; Gregory, W. F.; Loke, P. & Maizels, R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped

and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol*, 122: 171-180, 2002.

Fernández, V.; Ferreira, H. B.; Fernández, C.; Zaha, A. & Nieto, A. Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol*, 77: 247-250, 1996.

Ferreira, H. B.; Chemale, G.; Zaha, A. Structural, functional, and immunological aspects of *Echinococcus granulosus* (Platyhelminthes, Cestoda) antigen B. *Curr Top Biochem Res*, 6: 37-46, 2004.

Fontayne, A.; Dang, P. M.; Gougerot-Pocidallo, M. A. & El-Benna, J. Phosphorylation of p47 phox sites by PCK alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*, 41: 7743-7750, 2002.

Frosch, P.; Hartmann, M.; Muhlschlegel, F. & Frosch, M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol Biochem Parasitol*, 64: 171-175, 1994.

Galindo, M.; González, M. J. & Galanti, N. *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biol Res*, 35: 365-371, 2002.

Geary, T.G.; Winterrowd, C. A.; Alexander-Bowman, S. J.; Favreau, M. A.; Nulf, S. C. & Klein, R. D. *Ascaris suum*: Cloning of a cDNA encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Exp Parasitol*, 77: 155-161, 1993.

González-Sapienza, G.; Nieto, A.; Fernández, C.; Örn, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol*, 18:587-596, 1996.

González-Sapienza, G.; Spinelli, P.; Lorenzo, C.; Hellman, U.; Nieto, A.; Willis, A. & Salinas, G. Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5. *Mol Biochem Parasitol*, 105: 177-184, 2000.

González-Sapienza, G. & Chachau, R. E. Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. *J Biol Chem*, 278: 20179-20184, 2003.

Gottstein, B.; Haag, K. L.; Walker, M.; Matsumoto, J.; Mejri, N. & Hemphill, A. Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitol Int*, 55: 45-49, 2006.

Graichen, D. A. S.; Gottstein, B.; Matsumoto, J.; Müller, M.; Zanotto, P. M.A.; Ayala, F. J. & Haag, K. L. Expression and diversity of *Echinococcus multilocularis* AgB genes in secondarily infected mice: evaluating the influence of T-cell immune selection on antigenic variation. *Gene*, 392: 98-105, 2007.

Guyader, A. L.; Davis-Gorman, G.; Copeland, J. G. & McDonagh, P. F. A flow cytometric method for determining the binding of coagulation factor X to monocytes in whole human blood. *J Immunol Methods*, 292: 207-215, 2004.

Haag, K. L.; Araújo, A. M.; Gottstein, B.; Zaha, A. Selection, recombinant and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93: 695-702, 1998.

Haag, K. L.; Araújo, A. M.; Gottstein, B.; Siles-Lucas, M.; Thompson, R. C.A. & Zaha, A. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taenidae): selfing or outcrossing? *Parasitology*, 118: 63-71, 1999.

Haag, K. L.; Alves-Júnior, L.; Zaha, A.; Ayala, F. J. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene*, 333:157-167, 2004.

Haag, K. L.; Zanotto, P. M. A.; Alves-Júnior, L.; Gasser, R. B.; Zaha, A. & Ayala, F. J. Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect Genet Evol*, 6: 251-261, 2006a.

Haag, K. L.; Gottstein, B.; Müller, N.; Schnorr, A. & Ayala, F. J. Redundancy and recombination in the *Ecchinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? *Parasitology*, 133: 411-419, 2006b.

Harnett, W. & Harnett, M. M. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunol*, 28: 535-543, 2006.

Hayashi, F.; Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102: 2660-2669, 2003.

Hernandez, H. J.; Wang, N.; Tzellas, M. J.; Stadecker, M. J. Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol*, 7: 1170-1176, 1997.

Hodgson, J. C.; Watkins, C. A. & Bayne, C. W. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and the effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocytes *in vitro*. *Vet Immunol Immunopathol*, 112: 12-23, 2006.

Holcman, B. & Heath, D. D. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop*, 64: 5-17, 1997.

Huang, M-T.; Larbi, K. Y.; Scheiermann, C.; Woodfin, A.; Gerwin, N.; Haskard, D. O. & Nourshargh, S. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration *in vivo*: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood*, 107: 4721-4727, 2006.

Hübner, M. P.; Manfrás, B. J.; Margos, M. C.; Eiffler, D.; Hoffman, W. H.; Schulz-Key, H.; Kern, P. & Soboslay, P. T. *Echinococcus multilocularis* metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients. *Clin Exp Immunol*, 145: 243-251, 2006.

Ishida, M. M. I.; Rubinsky-Elefant, G.; Ferreira, A. W.; Hoshino-Shimizu, S. & Vaz, A. J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop*, 89: 73-84, 2003.

IPB-LACEN (FEPPS): Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central pertencente à Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. & Capra, J. D. Defesa do hospedeiro contra a infecção. In: *Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença*. Artmed Editora, Porto Alegre. Cap. 10, p. 363-415, 2000.

Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual Rev Immunol*, 20: 197-216, 2002.

Jenkis, D. J.; Romig, T. & Thompson, R. C. A. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *Int J Parasitol*, 35: 1205-1219, 2005.

Jefferies, J. R.; Campbell, A. M.; Van Rossum, A. J.; Barrett, J. & Brophy, P. M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*, 1: 1128-1132, 2001.

Jenkins, S. J.; Hewitson, J. P.; Ferret-Bernard, S. & Mountford, A. P. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and – independent pathways. *Int Immunol*, 17:1409-1418, 2005.

Kampen, A. H.; Tollersud, T. & Lund, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Methods*, 289: 47-55, 2004.

Kanan, J. H. & Chain, B. M. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology*, 118: 271-278, 2006.

Kato, N.; Nonaka, N.; Oku, Y. & Kamiya, M. Immune responses to oral infection with *Echinococcus multilocularis* protoscoleces in gerbils: modified lymphocyte responses due to the parasite antigen. *Parasitol Res*, 96: 12-17, 2005b.

Klempner, M. S.; Gallin, J. I.; Balow, J. E. & Vankammen, D. P. The effect of hemodialysis and C5a-desarg on neutrophils subpopulations. *Blood*, 55: 777-783, 1980.

Kern, P. *Echinococcus granulosus* infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. *Langenbecks Arch Surg*, 388: 413-420, 2003.

Kitchen, E.; Rossi, A. G.; Condliffe, A. M.; Haslett, C. & Chilvers, E. R. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using Platelet-Activating Factor. *Blood*, 88: 4330-4337, 1996.

Kuijpers, T. W. & Roos, D. Neutrophils. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9, 2001.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

Li, N.; Halldén, G. & Hjerdahl, P. A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering. *Eur J Haematol*, 65: 57-65, 2000.

Li, J.; Zhang, W-B.; Loukas, A.; Lin, R. Y.; Ito, A.; Zhang, L. H.; Jones, M. & Mc Manus, D. P. Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene*, 4: 157-165, 2004.

Lightowlers, M. W.; Liu, D.; Haraloumbous, A. & Rickard, M. D. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol*, 37: 171-182, 1989.

Liu, J.; Cao, S.; Herman, L. M. & Ma, X. Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and Interferon (IFN)- $\gamma$ -primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med*, 8:1265-1276, 2003.

Liu, K.; Bai, X.; Yu, J.; Li, J.; Wei, Q.; Han, G.; Li, G. & Cui, Y. The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Mycobacterium tuberculosis* induces strong cell-mediated immune responses in mice. *Mol Cell Biochem*, 288: 65-71, 2006.

Lorenzo, C.; Salinas, G.; Brugnini, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U & González-Sapienza, G. *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. *Biochem J*, 369: 191-198, 2003.

Lorenzo, C.; Ferreira, H. B.; Monteiro, K. M.; Rosenzvit, M.; Kamenetzky, L.; García, H. H.; Vasquez, Y.; Naquira, C.; Sánchez, E.; Lorca, M.; Contreras, M.; Last, J. A.; González-Sapienza, G. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J Clin Microbiol*, 43:2764-2770, 2005.

Lunardi, F.; Lima, J. H. C. & Assreuy, J. Comparative study of respiratory burst induced by phorbol ester and zymosan in human granulocytes. *Clin Biochem*, 39: 78-85, 2006.

Macintyre, A. R. & Dixon, J. B. *Echinococcus granulosus*: Regulation of leucocyte growth by living protoscoleces from horses, sheep, and cattle. *Exp Parasitol*, 99: 198-205, 2001.

Maizels, R. M.; Bundy, D. A. P.; Selkirk, M. E.; Smith, D. F. & Anderson, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, 365: 797-805, 2003.

Maizels, R. M.; Balic, A.; Gomez-Escobar, N.; Nair, M.; Taylor, M. D. & Allen, J. E. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev*, 201: 89-116, 2004.

Mamuti, W.; Sako, Y.; Nakao, M.; Xiao, N.; Nakaya, K.; Ishikawa, Y.; Yamasaki, H.; Lightowers, M. W. & Ito, A. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int*, 55: 57-62, 2006a.

Mamuti, W.; Sako, Y.; Xiao, N.; Nakaya, K.; Nakao, M.; Yamasaki, H.; Lightowers, M. W.; Craig, P. S. & Ito, A. *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol*, 113: 75-82, 2006b.

Mamuti, W.; Sako, Y.; Bart, J. M.; Nakao, M.; Ma, X.; Wen, H. & Ito, A. Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. *Parasitol Int*, 56: 313-316, 2007.

Marriot, H. M.; Hellewell, P. G.; Cross, S.S.; Ince, P. G.; White, M. K. B.; Dockrell, D. H. Decreased alveolar macrophage apoptosis is associated with increased pulmonary inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 177: 6480-6488, 2006.

Martin, R. M.; Gasser, R. B.; Jones, M. K. & Lightowers, M. W. Identification and characterization of myophilin, a muscle-specific antigen of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol*, 70: 139-148, 1995.

Martínez, C.; Paredes, R.; Stock, R. P.; Saralegui, A.; Andreu, M.; Cabezón, C.; Ehrlich, R. & Galanti, N. Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem*, 94: 327-335, 2005.

McClenahan, D.; Fagliari, J.; Evanson, O. & Weiss, D. Role of inflammatory mediators in priming, activation, and deformability of bovine neutrophils. *Am J Vet Res*, 61: 492-498, 2000.

McManus, D. P.; Zhang, W-B.; Li, J. & Bartley, P. B. Echinococcosis. *Lancet*, 362: 1295-1304, 2003.

Meshki, J.; Tului, F.; Bredeteau, O.; Ding, Z. & Kunapuli, S. P. Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y<sub>2</sub> receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: 264-271, 2004.

Mills, E. L.; Debets-Ossenkopp, Y.; Verbrugh, H. A. & Verhoef, J. Initiation of the respiratory burst of human neutrophils by influenza virus. *Infect Immun*, 32: 1200-1205, 1981.

Monteiro, K. M.; Scapin, S. M.; Navarro, M. V.; Zanchin, N. I.; Cardoso, M. B.; da Silveira, N. P.; Gonçalves, P. F.; Stassen, H. K.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta*, 1774: 278-285, 2007.

Moore, D. A. J.; Henderson, D. & Gazzard, B. G. Neutrophil adhesion molecules in HIV disease. *Clin Exp Immunol*, 114: 73-77, 1998.

Nicholson, G. C.; Tennant, R. C.; Carpenter, D. C.; Sarau, H. M.; Kon, O. M.; Barnes, P. J.; Salmon, M.; Vessey, R. S.; Tal-Singer, R. & Hansel, T. T. A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with

neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist. *Pulm Pharmacol Ther*, 20: 52-59, 2007.

Nilsdotter-Augustinsson, A.; Wilsson, A.; Larsson, J.; Stendahl, O.; Öhman, L. & Lundqvist-Gustafsson, H. *Staphylococcus aureus*, but not *Staphylococcus epidermidis*, modulates the oxidative response and induces apoptosis in human neutrophils. *APMIS*, 112: 109-118, 2004.

Nunes, C. P.; Zaha, A.; Gottstein, B.; Müller, N. & Siles-Lucas, M. 14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Res*, 93: 403-409, 2004.

O' Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8: 275-283, 1998.

Oriol, R.; Willians, J. F.; Pérez-Esandi, M. V. & Oriol, C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg*, 24: 96-1000, 1971.

Oriol, C. & Oriol, R. Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg*, 24: 569-574, 1975.

Ortona, E.; Vaccari, S.; Margutti, P.; Delunardo, F.; Riganò, R.; Profumo, E.; Buttari, B.; Rasool, O.; Teggi, A. & Siracusano, A. Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis. *Clin Exp Immunol*, 128: 124-130, 2002.

Ortona, E.; Riganò, R.; Buttari, B.; Delunardo, F.; Ioppolo, S.; Margutti, P.; Profumo, E.; Teggi, A.; Vaccari, S. & Siracusano, A. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Trop*, 85: 165-171, 2003.

Ortona, E.; Margutti, P.; Delunardo, F.; Nobili, V.; Profumo, E.; Riganò, R.; Buttari, B.; Carulli, G.; Azzara, A.; Teggi, A.; Bruschi, F. & Siracusano, A. Screening of an *Echinococcus granulosus* cDNA library with IgG4 from patients with cystic

echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape. *Clin Exp Immunol*, 142: 528-538, 2005.

Pancholi, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58: 902-920, 2001.

Parkos, C. A. Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *Bioessays*, 19: 865-73, 1997.

Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptative immunity. *Microbes Infect*, 6: 1382-1387, 2004.

Pham, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 6: 541-550, 2006.

Pinto, P. M.; Chemale, G.; Castro, L. A.; Costa, A. P. M.; Kich, J. D.; Vainsten, M. H.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol*, 121: 83-93, 2007.

Pugine, S. M. P.; Faria, M. F.; Maia, A. A. M.; Valle, C. R.; Boschini, C.; Poleti, M. D.; Silva, M. R. M. & De Mello, M. P. Effect of *Cysticercus cellulosae* fractions on the respiratory burst of pig neutrophils. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 47: 91-94, 2005.

Quiñones, W.; Peña, P.; Domingo-Sananes, M.; Cáceres, A.; Michels, P. A. M.; Avilan, L. & Concepción, J. L. *Leishmania mexicana*: Molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol*, 116: 241-251, 2007.

Rapoport, T. A. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258: 931-936, 1992.

Raush, R. L. & Bernstein, J. J. *Echinococcus vogeli* sp. n. (Cestoda: Taenidae) from the bush dog, *Speothos venaticus* (Lund). *Z Prakt Anasth Wiederbeleb Intensivther*, 23: 25-34, 1972.

Reaves, T. A.; Chin, A.C. & Parkos, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 191-198, 2005.

Remer, K. A.; Brcic, M. & Jungi, T. W. Toll-like receptro-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett*, 85: 75-80, 2003.

Richards, K. S.; Arme, C. & Bridges, J. F. *Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts. *Parasitology*, 86: 407-417, 1983.

Riganò, R.; Profumo, E. & Siracusano, A. New perspectives in the immunology of *Echinococcus granulosus* infection. *Parassitologia*, 39: 275-277, 1997.

Riganò, R.; Profumo, E.; Bruschi, F.; Carulli, G.; Azzarà, A.; Iopollo, S.; Buttari, B.; Ortona, E.; Margutti, P.; Teggi, A. & Siracusano, A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun*, 69: 288-296, 2001.

Riganò, R.; Buttari, B.; Profumo, E.; Ortona, E.; Margutti, P.; Teggi, A. & Siracusano, A. Apoptosis modulation in PBMC from patients with cystic echinococcosis. 51 st *Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p. 277, 2002.

Riganò, R.; Buttari, B.; Profumo, E.; Ortona, E.; Delunardo, F.; Margutti, P.; Mattei, V.; Teggi, A.; Sorice, M. & Siracusano, A. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun*, 75: 1667-1678, 2007.

Riley, E. M.; Dixon, J. B.; Kelly, D. F. & Cox, D. A. Immune response to *Echinococcus granulosus*: histological and immunocytochemical observations. *Ann Trop Med Parasitol*, 78: 210-212, 1984.

Riley, E. M.; Dixon, J. B.; Kelly, D. F. & Cox, D. A. The immune response to *Echinococcus granulosus*: sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early murine infection. *J Comp Pathol*, 95: 93-104, 1985.

Riley, E. M.; Dixon, J. B.; Jenkins, P. & Ross, G. *Echinococcus granulosus* infection in mice: host responses during primary and secondary infection. *Parasitology*, 92:391-403, 1986.

Robinson, J. P.; Carter, W. O. & Narayanan, P. Functional assays by flow cytometry. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose, N. R.; Marcario, E.; Folds, J. D.; Lane, H. C. & Nakamura, R. (Eds). Academic Press, New York, pp 245-254, 1997.

Rodrigues, J. J. S.; Ferreira, H. B. & Zaha, A. Molecular cloning and characterization of an *Echinococcus granulosus* cDNA encoding malate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol*, 60: 157-160, 1993.

Rogan, M. T.; Craig, P. S.; Zehyle, E.; Masinde, G.; When, H.; Zhou, P. *In vitro* killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from endemic areas. *Acta Trop* 51:291-296, 1992.

Rogan, M. T.; Hai, W. Y.; Richardson, R.; Zeyhle, E. & Craig, P. S. Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends Parasitol*, 22: 431-438, 2006.

Roger, P. R. & Croft, M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol*, 163: 1205-1213, 1999.

Rosenberg, H. F. & Gallin, J. I. Inflammation. In: *Fundamental Immunology*. Paul, W. E. (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1151-1169, 2003.

Rosenzvit, M. C.; Camicia, F.; Kamenetzky, L.; Muzulin, P. M. & Gutierrez, A. M. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Int*, 55: 63-67, 2006.

Sabroe, I.; Read, R. C.; Whyte, M. K. B.; Dockrell, D. H.; Vogel, S. N. & Dower, S. K. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. *J Immunol*, 171: 1630-1635, 2003.

Sabroe, I.; Dower, S. K. & Whyte, M. K. B. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*, 41: 421-426, 2005.

Sadowska, A. M.; Manuel-y-Keenoy, B.; Vertongen, T.; Schippers, G.; Radomska-Lesniewska, D.; Heytens, E. & De Backer, W. A. Effect of *N*-acetylcysteine on neutrophil activation markers in healthy volunteers: *In vivo* and *in vitro* study. *Pharmacol Res*: 53: 216-225, 2006.

Saguchi, K-I.; Hagiwara-Saguchi, Y.; Murayama, N.; Ohi, H.; Fujita, Y.; Camargo, A. C. M.; Serrano, S. M.T. & Higuchi, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon*, 46: 72-83, 2005.

Salinas, G.; Fernández, V.; Fernández, C. & Selkirk, M. E. *Echinococcus granulosus*: cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp Parasitol*, 90: 298-301, 1998.

Sanchez, F.; March, F.; Mercader, M.; Coll, P.; Muñoz, C. & Prats, G. Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol*, 13: 583-592, 1991.

Seo, S. M.; McIntire, L. V. & Smith, W. Effects of IL-8, Gro- $\alpha$ , and LTB<sub>4</sub> on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: 1568-1578, 2001.

Shepherd, J. C.; Aitken, A. & McManus, D. P. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol*, 44: 81-90, 1991.

Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68: 850-858, 1996.

SIF-SAA/RS: Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura-Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul.

Siles-Lucas, M.; Felleisen, R. S.; Hemphill, A.; Wilson, W. & Gottstein, B. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol*, 91: 281-293, 1998.

Siles-Lucas, M.; Nunes, C. P.; Zaha, A. & Breijo, M. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol*, 22: 521-528, 2000.

Silva, F. R.; Lazzarini, R.; Sá-Rocha, L. C.; Morgulis, M. S. F. A.; Massoco, C. O. & Palermo-Neto, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. *Eur J Pharmacol*, 478: 97-104, 2003.

Smyth, D.; McManus, D. P.; Smout, M. J.; Laha, T.; Zhang, W-B. & Loukas, A. Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method. *Infect Immun*, 71: 2548-2554, 2003.

Stadecker, M. J.; Hernandez, H. J. & Asahi, H. The identification and characterization of new immunogenic egg components: Implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Mem Int Oswaldo Cruz*, 96: 29-33, 2001.

Sterla, S.; Sato, H. & Nieto, A. *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. *Parasite Immunol*, 21: 27-34, 1999.

Sundstrom, P. & Aliaga, G. R. A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme enolase. *J Infect Dis*, 169: 452-456, 2004.

Thomas, E. L.; Lehrer, R. I. & Rest, R. F. Human neutrophil anti-microbial activity. *Rev Infect Dis*, 10 (Suppl 2): S450-S456, 1988.

Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Wallingford, pp 1-50, 1995.

Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18: 452-457, 2002.

Tort, J.; Brindley, P. J.; Knox, D.; Wolfe, K. H. & Dalton, J. P. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Ad Parasitol*, 43: 161-266, 1999.

Towbin, H.; Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA*, 76: 4350-4354, 1979.

Van Gisbergen, K. P. J.M.; Geijtenbeek, T. B. H. & Van Kooyk, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol*, 26: 626-631, 2005.

Van Spruel, A. B.; Leusen, J. H. W.; Van Egmond, M.; Dijkman, H. B. P. M.; Assmann, K. J. M.; Mayadas, T. N. & Van de Winkel, J. G. J. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 97: 2478-2486, 2001.

Veiga-Malta, I.; Duarte, M.; Dinis, M.; Tavares, D.; Videira, A. & Ferreira, P. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein. *Cell Microbiol*, 6: 79-88, 2004.

Vignais, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1428-1459, 2002.

Virginio V. G., Hernández A, Rott M. B., Monteiro K. M., Zandonai A. F., Nieto A, Zaha A & Ferreira H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol*, 132: 309-315, 2003.

Virginio, V. G.; Taroco, L.; Ramos, A. L.; Ferreira, A. M.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. & Hernández, A. Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol Res*, 100: 935-942, 2007.

Vivier, E. & Malissen, B. Innate and Adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*, 6: 17-21, 2005.

Vowells, S. J.; Sekhsaria, S.; Malech, H. L.; Shalit, M. & Fleisher, T. A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods*, 178: 89-97, 1995.

Vuitton, D. A. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or the parasite? *Acta Trop*, 85:119-132, 2003.

Vuitton, D. A. Echinococcosis and allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*, 96: 93-104, 2004.

Walker, M.; Rossignol, J. F.; Torgerson, P. & Hemphill, A. *In vitro* effects of nitazoxinamide on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *J Antimicrob Chemother*, 54: 609-616, 2004.

Walrand, S.; Valeix, S.; Rodriguez, C.; Ligot, P.; Chassagne, J. & Vasson, M-P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*, 331: 103-110, 2003.

Whyte, M.; Renshaws, S.; Lawson, R. & Bingle, C. Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan. *Biochem Soc Trans*, 27: 802-807, 1999.

Willis, A. C.; Diaz, A.; Nieto, A. & Sim, R. B. *Echinococcus granulosus* antigen 5 may be a serine protease. *Parasite Immunol*, 19: 385, 1997.

Xiao, N.; Qiu, J.; Nakao, M.; Li, T.; Yang, W.; Chen, X.; Schantz, P. M.; Craig, P. S. & Ito, A. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*, 55: 233-236, 2006.

Zhang, J.; Kaupke, C. J.; Yousefi, S.; Cesario, T. C. & Vaziri, N. D. Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell*, 84: 147-153, 1995.

Zhang, W-B. & McManus, D. P. Purification and N-terminal amino acid sequencing of *Echinococcus granulosus* antigen 5. *Parasite Immunol*, 18: 597-606, 1996.

Zhang, W-B.; Li, J. & McManus, D. P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev*, 16: 18-36, 2003.

Zhang, W-B.; You, H.; Li, J. Zhang, Z.; Turson, G.; Aili, H.; Wang, J. & McManus, D. P. Immunoglobulin profiles in a murine intermediate host model of resistance for *Echinococcus granulosus* infection. *Parasite Immunol*, 25: 161-168, 2003.

Zhang, W-B.; Jones, M. K.; Li, J. & McManus, D. P. *Echinococcus granulosus*: Pre-culture of protoscoleces *in vitro* significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. *Exp Parasitol*, 110: 88-90, 2005.

Zhang, W-B. & McManus, D. P. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47: 24-41, 2006.

## **ANEXOS**

## Curriculum Vitae - Veridiana Gomes Virginio

### Dados Pessoais

CPF: 693695850-87

Carteira de Identidade: 8050614224 – SSP/RS

Data de nascimento: 16 de junho de 1974

Local de nascimento: Porto Alegre – Rio Grande do Sul

Endereço residencial: Rua Elizário Goulart da Silva, 140 apto 203 – Cristo Redentor. CEP: 91040-430, Porto Alegre – RS

Telefone residencial: 51-33410983

Telefone celular: 51-91448267

Email: veridianagv@yahoo.com.br

### Formação Acadêmica/Titulação

- 2002-2007     Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.  
Título: Análise dos efeitos de protoescólices e AgB de *Echinococcus granulosus* em possíveis mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro.  
Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira.  
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2000-2002     Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.  
Título: Avaliação do potencial imunodiagnóstico de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus* e desenvolvimento de um teste sorológico para a hidatidose humana.  
Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira  
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

- 1994-1998 Ciências Biológicas.  
Ênfase: Licenciatura em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- 1998-2000 Ênfase: Bacharelado em Biologia Molecular, Celular e Funcional.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

### **Estágios realizados na Pós-Graduação**

Instituição: Instituto de Higiene, Facultad de Química e Ciências.

Universidad de la Republica.

Montevideu – Uruguai.

Período: 24 de agosto a 22 de dezembro de 2004.

Carga horária: 50 h/semanais.

Orientação: Dra. Ana Hernández.

Atividades: Avaliação da funcionalidade de neutrófilos humanos em resposta a componentes e antígenos parasitários, e estímulos convencionais utilizando técnicas de cultivo celular e citometria de fluxo.

Instituição: Instituto de Higiene, Facultad de Química e Ciências.

Universidad de la Republica.

Montevideu – Uruguai.

Período: 23 de abril a 9 de maio de 2002.

Carga horária: 50 h/semanais.

Orientação: Dra. Ana Hernández.

Atividades: Purificação da fração de células mononucleares periféricas humanas para cultivo celular e estimulação *in vitro* com antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus* para a determinação de interleucinas por ELISA em sobrenadantes de cultivo.

Instituição: Instituto de Higiene, Facultad de Química e Ciências.

Universidad de la Republica.

Montevideu – Uruguai.

Período: 21 de março a 30 de abril de 2001.

Carga horária: 50 h/semanais.

Orientação: Dra. Ana Hernández.

Atividades: Padronização da técnica de ELISA para a determinação de anticorpos específicos frente a um painel de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus*. Após o estabelecimento das condições adequadas de trabalho, foi avaliado um amplo painel de soros de pacientes com hidatidose confirmada por cirurgia, disponível no Instituto de Higiene.

### **Artigos completos publicados em periódicos**

Virginio, V. G.; Taroco, L.; Ramos, A. L.; Ferreira, A. M.; Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Hernández, A. Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitology Research*, Alemanha, 100:935-942, 2007.

Virginio, V. G.; Hernández, A.; Rott, M. B.; Monteiro, K. M.; Zandonai, A. F.; Nieto, A.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology*, Inglaterra, 132:309-315, 2003.

### **Apresentação de Trabalhos em Congressos e outros Eventos (Total: 19, abaixo as 5 mais relevantes)**

**Virginio, V. G.**; Taroco, L.; Hernández, A.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. Avaliação da estimulação de neutrófilos humanos por protoescolices e AgB de *Echinococcus granulosus*. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. CD-ROM do Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre – RS, 2005. O trabalho recebeu **Menção Honrosa**.

**Virginio, V. G.**; Hernández, A.; Monteiro, K. M.; Zandonai, A. F.; Zaha, A., Ferreira, H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq. Livro de Programas e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq. Caxambu – MG, 2002.

Rott, M. B.; Ferreira, H. B.; Chemale, G.; Herrera, E. C.; **Virginio, V. G.**; Farias, S. E.; Haag, K. L.; Zaha, A. A recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* (Platyhelminthes,

Cestoda) structural and functional characterization and utilization in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq. Livro de Programas e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq. Caxambu – MG, 2001.

**Virginio, V. G.;** Hernández, A.; Zaha, A., Ferreira, H. B. Avaliação do potencial imunodiagnóstico de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus*. XV Congresso Latinoamericano de Parasitologia, XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia e I Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia. Jornal Brasileiro de Patologia, vol. 37 - nº4, São Paulo – SP, 2001.

**Virginio, V. G.;** Zaha, A.; Ferreira, H. B. Otimização da expressão de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus* em *Escherichia coli*. 45º Congresso Nacional de Genética. *Genetics and Molecular Biology* vol. 46º Congresso Nacional de Genética. *Genetics and Molecular Biology* vol. 23 - nº3, Águas de Lindóia – SP, 2000.

### **Cursos ministrados**

Curso Teórico/Prático sobre Expressão de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*. Promovido pela Red de Investigación y Entrenamiento em Enfermedades Parasitarias Del Cono Sur de América Latina (RTPD Network, Suíça).

Local: Centro de Biologia – UFRGS.

Período: 15 a 20 de outubro de 2001.

Total de horas/aula: 24h/a.

Ensino de Biologia Molecular através de um Processo Formativo.

Participação no Tutorial de alunos de graduação do curso de Ciências Biológicas da UFRGS, disciplina BIO12007 – Biologia Molecular Básica.

Local: Centro de Biotecnologia – UFRGS.

Períodos: 2º semestre de 2001 e 1º semestre de 2005.

# Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms

Veridiana Gomes Virginio · Lorena Taroco ·  
Ana Lía Ramos · Ana Maria Ferreira · Arnaldo Zaha ·  
Henrique Bunselmeyer Ferreira · Ana Hernández

Received: 8 May 2006 / Accepted: 19 October 2006 / Published online: 17 November 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** The factors affecting the innate susceptibility to *Echinococcus granulosus* infections are largely unknown. We assessed the interaction of healthy human neutrophils with protoscoleces (PSC) and antigen B (AgB) of *E. granulosus* by analysis of CD11b upregulation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by flow cytometry. PSC induced neutrophil activation, but their viability was not affected. In contrast, no effects were observed with AgB in both assays. Neutrophil-enriched fractions were also incubated with PSC or AgB, and interleukin 8 (IL-8) production was measured by ELISA. Significant increment in IL-8 production was detected only in supernatants from neutrophil-enriched fractions cultured with PSC. The possible effect of a prior incubation with AgB on the phorbol myristate acetate-induced activation was also evaluated. No changes were observed in CD11b expression, but the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was significantly reduced in platelet-activating factor (PAF)-primed neutrophils. These results suggest a possible AgB-mediated mechanism of evasion of the host immune response, which would operate upon events of spillage of the fertile hydatid cyst content.

## Introduction

Cystic hydatid disease (CHD) is a zoonosis caused by the metacestode stage of *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) (Thompson 1995). *E. granulosus* metacestodes develop in the liver and lungs of intermediate hosts (domestic ungulates and primates) as large fluid-filled hydatid cysts, causing unspecific symptoms that depend on the size and localization of the lesions. The innermost layer (germinal layer) of the hydatid cyst wall is responsible for the generation of protoscoleces (PSC), the *E. granulosus* pre-adult form, which can develop into secondary cysts in intermediate hosts. Leakage of cyst content (including viable PSC and hydatid fluid) may occur upon traumatism or during surgery, provoking recurrence of disease in peritoneal cavity or other organs (Smego and Sebanego 2005).

The cyst wall and the PSC secrete several molecules into the hydatid cyst fluid, among which the antigen B (AgB) is quantitatively and immunologically the most relevant (Ferreira et al. 2004; Mamuti et al. 2006). AgB is a 160-kDa thermostable heteropolymeric protein, which is composed by several distinct but related 8 kDa subunits, encoded by a multigenic family (González-Sapienza et al. 1996; Chemale et al. 2001). This antigen binds strongly to lipids and other hydrophobic compounds, suggesting its possible involvement in processes of lipid uptake or detoxification (Chemale et al. 2005). Possible variations in subunit composition among different cysts or during development of individual cysts could also represent a mechanism of evasion from the host immune response (Haag et al. 2004), as well its ability to modulate the host immune system, inhibiting neutrophil chemotaxis (Shepherd et al. 1991) and eliciting a nonprotective Th2 cell response (Riganò et al. 2001).

V. G. Virginio · A. Zaha · H. B. Ferreira  
Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de  
Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brazil

L. Taroco · A. L. Ramos · A. M. Ferreira · A. Hernández (✉)  
Instituto de Higiene, Cátedra de Inmunología, Facultad de  
Química–Facultad de Ciencias, Universidad de la República,  
Avda Alfredo Navarro 3051,  
Montevideo 11600, Uruguay  
e-mail: aherna@fq.edu.uy

Neutrophils are cells that interact with invading parasites and may play a role in host defenses during parasite establishment, but the association between helminth infection and neutrophil function has been little appreciated (Falcone et al. 2001). In human hydatid disease, neutrophil infiltration occurs in cysts (Zhang et al. 2003), and during experimental secondary in mice infection, local inflammation reaction to PSC involves neutrophils and other cells (Riley et al. 1986). In addition, *in vitro* experiments have shown that neutrophils in association with antibodies can bring about the killing of *E. granulosus* oncospheres (Rogan et al. 1992).

There are intracellular signaling events that occur during adherence to nonphagocytatable parasites or in the presence of appropriate soluble molecules to induce neutrophil activation. Both receptors that interact with pathogen-associated molecular patterns or opsonized material can be involved in this process. After opsonin/ligand binding to cell surface receptors, early events occur, such as translocation of the heterodimeric  $\beta_2$  integrin CD11b/CD18 (Mac-1) from secretory vesicles to the neutrophil plasma membrane, and NADPH oxidase assemblage, which results in the generation of superoxide, followed by its dismutation to hydrogen peroxide (Rosales and Brown 1993). Several soluble mediators, such as IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , and IL-10, can also be produced by neutrophils that are involved in effector and regulatory functions (Cassatella et al. 1995; Van Gisbergen et al. 2005).

In this work, we have investigated the *in vitro* effect of *E. granulosus* PSC and AgB on the activation neutrophils from healthy individuals, assessing CD11b upregulation, respiratory burst, and IL-8 production. We have also evaluated the ability of AgB to interfere with the *in vitro* phorbol myristate acetate (PMA)-induced activation of neutrophils to shed some light on the possible parasite evasion mechanisms that involve the modulation of the host's neutrophil activation.

## Materials and methods

### Protoscoleces and antigen B

PSC were obtained by aseptic puncture of fertile bovine hydatid cysts and maintained at 4°C in sterile phosphate-buffered saline (PBS) with 1  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin. PSC viability was determined by eosin exclusion (Robinson and Arme 1985), and only those batches with over 95% viability were used. Opsonized PSC were obtained by incubating them for 30 min at 37°C with a human gamma globulin fraction (5 mg/ml) obtained from pooled de complemented sera from hydatid patients containing high specific IgG1 titles. Adsorbed immunoglobulins were

detected by indirect immunofluorescence using anti-human IgG labeled with fluorescein isothiocyanate. Inert particles of 100  $\mu\text{m}$  in diameter (Sephadex-LH20) (Amersham, Uppsala, Sweden) were used as negative controls in assays with PSC. Bovine IgG (50  $\mu\text{g/ml}$ ) was incorporated in some assays to block Fc $\gamma$ R-mediated activation. The IgG in solution was previously deaggregated by centrifugation. Native AgB, kindly provided by Dr. G. González (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay), was purified as previously described (González-Sapienza et al. 1996).

### Blood samples

Venous peripheral blood from adult healthy volunteers was collected in tubes containing heparin (20 U/ml of blood). Informed consent for blood sampling was previously obtained from all blood donors. All tubes were stored at room temperature for no more than 2 h before use.

### CD11b upregulation assay

The assays were performed, as described by Robinson et al. (1997), with modifications. Whole blood was utilized, and the erythrocytes were lysed with standard  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. Cells were washed, counted, and diluted for a concentration of  $5.0 \times 10^6$  cells/ml in suspension buffer, PBS without  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$ , 1% of bovine serum albumin (BSA-ICN Biomedicals, CA, USA), 0.18% of glucose (Merck, USA), and 0.1% of sodium azide (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA). Polimixin-B (Sigma) (1  $\mu\text{g/ml}$ ) was incorporated in the suspension buffer for assays with PSC. For direct assays, the cell suspension (100  $\mu\text{l/tube}$ ) was incubated with 800 PSC (PSC to cell rate of 1:625), AgB (10 or 1  $\mu\text{g/ml}$ , final concentration), and PMA (10 ng/ml, final concentration), as positive control, for 30 min at 37°C. PSC and inert particles were separated out from the cell suspension using a serigraphy mesh (20  $\mu\text{m}$ ). For indirect assays, preincubation steps with AgB (10 or 1  $\mu\text{g/ml}$ , final concentration) at 37°C for 30 min were carried out before the incubation with PMA, performed as described above. In direct and indirect assays, cells were washed twice in suspension buffer and recovered by centrifugation at  $400 \times g$  for 5 min at 4°C. Some 5  $\mu\text{l}$  of an undiluted anti-human CD11b (mouse IgG1) labeled with phycoerythrin (PE) and the corresponding isotopic control, an unspecific mouse IgG1-PE (both monoclonal antibodies) (Pharmingen, Hamburg, Germany), were used. Cells were incubated with the antibodies for 30 min in the dark and ice bath. After washing as described above, cells were resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of suspension buffer for analysis by flow cytometry.

### Detection of neutrophil respiratory burst (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production)

The assays were performed, as described by Robinson et al. (1997), with modifications. Whole blood was treated as described above. The cells (100 µl/tube) in suspension buffer (as described above, but with 0.1 mM of sodium azide) were incubated for 15 min at 37°C with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma, St. Louis, MO, USA) (20 µM, final concentration) for probe incorporation. For priming, cells were incubated with platelet-activating factor (PAF; Sigma) (10<sup>-7</sup> M) or recombinant human interferon-γ (IFN-γ) (Pharmingen) (1 ng/ml) for 1 h at 37°C. In direct assays, primed cells were incubated with AgB (at final concentration of 10 or 1 µg/ml) for 30 min or 2 h at 37°C. In indirect assays, primed cells were incubated with AgB for 30 min before the incubation with PMA (50 ng/ml, final concentration) for 30 min. Direct assays with PSC were performed as described above but with an incubation step of 2 h at 37°C after priming. PSC and inert particles were then separated out from the cell suspension using a serigraphy mesh (20 µm). Cells were resuspended in 500 µl of suspension buffer for analysis by flow cytometry.

### Flow cytometry analysis

Cell samples were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using Cellquest™ software (BD, version 3.3). Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined by measuring fluorescence emission at 530 nm band-pass filter (FL1 channel), for dichlorofluorescein, and at 585 nm band-pass filter (FL2 channel), for PE emission. A gate was drawn around the neutrophil population in the side vs forward scatter plot, and at least 5,000 gated events were collected for analysis. Relative fluorescence increase was calculated as follows:  $\Delta\text{MFI}(\%) = \{(\text{MFI of sample}) - (\text{MFI of buffer control}) / \text{MFI of buffer control}\} \times 100$ , where MFI=mean fluorescence intensity (Takasaki et al. 1998). A cut-off of 30%  $\Delta\text{MFI}$  for direct assays was arbitrarily selected according previous works (Brushi et al. 1995, 2000).

### Quantitation of IL-8 in culture supernatants

The assays were performed, as described by Dreweck et al. (1999), with minor modifications. Briefly, neutrophil-enriched fractions were isolated by density gradient centrifugation on lymphocyte separation solution (Histopaque 1077, Sigma), followed by lysis of contaminating erythrocytes. The remaining cells were then pelleted, washed twice with sterile suspension buffer, and resuspended to 2×10<sup>6</sup> viable cells per milliliter in culture medium RPMI 1640 supplemented with 1 µg/ml gentamicin, 10% fetal calf serum, and 2 mM L-glutamine (all

reagents from Sigma). Viability tests were performed with trypan blue (Coligan et al. 1993), and only samples with >96% viability were used in the experiments. Enrichment of neutrophils was assessed by flow cytometry analysis of side vs forward scatter distribution. Neutrophil-enriched fractions (500 µl of suspension/well) were cultured with 10 µg/ml LPS (positive control), 1,600 PSC (PSC to cell rates of 1:625), or 20 µg/ml AgB in 24-well microplates (NUNC, Denmark). After incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 20 h, supernatants were collected and cryopreserved at -70°C in sterile conditions until use. IL-8 was assayed using an ELISA kit (OptEIA™ Human IL-8 Set, Pharmingen) as recommended by the manufacturer. The IL-8 concentration was calculated according to standard curves constructed with known amounts of recombinant human IL-8 (Pharmingen), and results were expressed in picogram per milliliter.

### Statistical analysis

Data are presented as means±standard deviation (SD) of three or four independent experiments, and statistical analysis was performed in Excel software (Microsoft, Redmond, WA, USA). Comparison of values obtained with different treatments was carried out using the Student's *t* test for paired samples (Zhang et al. 1995). Values of *p*≤0.05 were considered significant.

## Results

### Effects of PSC and AgB on neutrophil CD11b expression

The possible effects of PSC and AgB on CD11b expression in neutrophils of healthy individuals were analyzed by flow cytometry. The results of three independent experiments are shown in Table 1. PSC opsonized with specific human

**Table 1** Effect of PSC and AgB on neutrophil CD11b expression

	ΔMFI	<i>p</i>
PSC	194±137	0.026 <sup>a</sup>
Opsonized PSC	151±28	0.001 <sup>a</sup>
PSC+bovine IgG	135±90	0.173
Negative control	14±13	–
AgB (10 µg/ml)	18±14	–
AgB (1 µg/ml)	17±26	–
PMA (10 ng/ml)	983±1,291	–

Data are means of ΔMFI±SD of three independent experiments. PSC and inert particles (negative control) were tested at PSC/inert particles to cell rates of 1:625. Student's two-tailed *t* test was used for analysis of the assays with PSC.

<sup>a</sup> Indicates a significant increase (upregulation) of CD11b expression in relation to negative control for *p*≤0.05

antibodies obtained from hydatid patients were used to evaluate a possible involvement of antibodies in neutrophil activation. PSC caused a significant upregulation of CD11b expression both in the presence and in the absence of specific antibodies ( $\Delta\text{MFI } 151\pm 28$ ,  $p=0.001$  and  $194\pm 137$ ,  $p=0.026$ , respectively) in relation to the negative control ( $\Delta\text{MFI } 14\pm 13$ ). No changes in the morphology or viability of the PSC were observed in any of the tested conditions. The treatments with opsonized PSC and soluble bovine IgG did not show significant differences on CD11b expression in relation to that of PSC alone ( $p=0.081$  and  $0.379$ , respectively). Therefore, the observed PSC-induced CD11b upregulation apparently does not depend on antibody interaction.

On the other hand, incubation with AgB (10 and 1  $\mu\text{g/ml}$ ) did not cause any significant alteration (values of  $\Delta\text{MFI}$  below 30%) in CD11b expression ( $\Delta\text{MFI } 18\pm 14$  and  $17\pm 26$ , respectively). Considering the absence of a direct effect of AgB on neutrophil CD11b expression, we have also addressed the possibility of an indirect effect. Cells were first incubated with AgB (10 or 1  $\mu\text{g/ml}$ ) and then stimulated with PMA (10  $\text{ng/ml}$ ). The results of three independent experiments showed that the PMA-stimulated CD11b upregulation ( $\Delta\text{MFI } 477\pm 114$ ) was unaffected by a pretreatment with AgB in both tested concentrations ( $\Delta\text{MFI } 526\pm 99$ ,  $p=0.067$ , for 10  $\mu\text{g/ml}$ ; and  $\Delta\text{MFI } 370\pm 95$ ,  $p=0.21$ , for 1  $\mu\text{g/ml}$ ) in comparison to that of neutrophils not exposed with AgB.

#### Effects of PSC and AgB on neutrophil respiratory burst ( $\text{H}_2\text{O}_2$ production)

To assess the possible effects of PSC and AgB in the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by human neutrophils of healthy individuals, cells primed with IFN- $\gamma$  (1  $\text{ng/ml}$ ) were incubated with PSC or AgB. The results of three independent experiments are shown in Table 2. After 2 h of incubation, PSC significantly increased the neutrophil respiratory burst ( $\Delta\text{MFI}=174\pm 32$ ,  $p=0.026$ ) in comparison to the negative control. The addition of human-specific antibodies induced an increase ( $\Delta\text{MFI}=666\pm 653$ ) of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in relation to those of the negative control and PSC alone, although it was not statistically significant ( $p=0.2$  and  $0.06$ , respectively). The treatment with bovine IgG did not affect the level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in comparison to that of PSC alone ( $p=0.198$ ). No changes in PSC morphology and viability were observed.

In contrast to PSC, AgB did not significantly stimulate the  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in the assays with IFN- $\gamma$ -primed cells (Table 2). Because priming agents may have specific regulatory effects on neutrophil activation processes (Condliffe et al. 1996), we repeated the experiments using PAF ( $10^{-7}$  M) instead of IFN- $\gamma$  for priming. In experiments

**Table 2** Effect of PSC and AgB on  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by IFN- $\gamma$ -primed neutrophils

	$\Delta\text{MFI}$	$p$
PSC	174 $\pm$ 32	0.026 <sup>a</sup>
Opsonized PSC	666 $\pm$ 653	0.2
PSC+bovine IgG	210 $\pm$ 80	0.1
Negative control	53 $\pm$ 2	–
AgB (10 $\mu\text{g/ml}$ )	33 $\pm$ 13	–
AgB (1 $\mu\text{g/ml}$ )	9 $\pm$ 37	–
PMA (50 $\text{ng/ml}$ )	1,548 $\pm$ 1,839	–

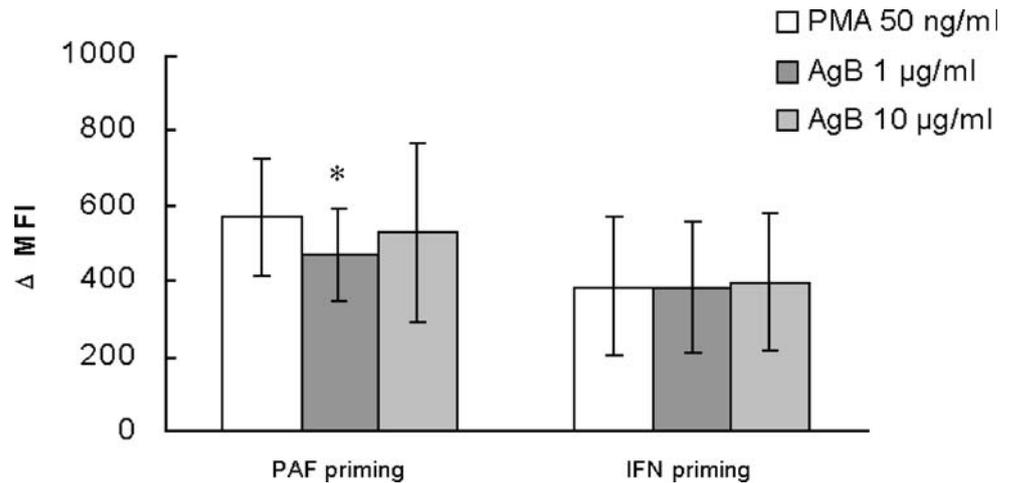
Data are means of  $\Delta\text{MFI}\pm\text{SD}$  of three independent experiments. PSC and inert particles (negative control) were tested at PSC/inert particles to cell rates of 1:625. Student's two-tailed  $t$  test was used for analysis of the assays with PSC.

<sup>a</sup> Indicates a significant increase in the neutrophil respiratory burst in relation to negative control for  $p\leq 0.05$

using PAF, the same stimulatory effect of PSC on the respiratory burst was observed (data not shown). With AgB, on the other hand, the values of  $\Delta\text{MFI}$  were  $29\pm 16$  (AgB 10  $\mu\text{g/ml}$ ),  $26\pm 12$  (AgB 1  $\mu\text{g/ml}$ ), and  $1207\pm 1720$  (PMA 50  $\text{ng/ml}$ ) in four independent assays with PAF-primed cells. Thus, no significant increase in  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was observed. We also tested the effects of the AgB using either PAF or IFN- $\gamma$  for priming but with a shorter incubation time (30 min instead of 2 h). In the assays with PAF, the values of  $\Delta\text{MFI}$  were  $-9\pm 12$  (AgB 10 or 1  $\mu\text{g/ml}$ ) and  $560\pm 85$  (PMA 50  $\text{ng/ml}$ ). Similar results were observed with IFN- $\gamma$  (data not shown). Overall, the results of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  production assays showed that neutrophils were activated by PSC in the absence of specific antibodies, an effect not observed with AgB. The increase in  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in response to opsonized PSC, although not significantly higher than that to PSC alone, does not allow us to rule out a possible contribution of antibodies to the observed PSC effect.

A direct effect of AgB on the activation of respiratory burst in neutrophils of healthy individuals was not evidenced in any of the above tested conditions, but indirect effects could not be ruled out. Therefore, possible indirect effects of the AgB on neutrophil  $\text{H}_2\text{O}_2$  production were investigated in experiments in which the intracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in PMA-stimulated neutrophils (previously primed with PAF or IFN- $\gamma$ ) with or without previous incubation with AgB (10 or 1  $\mu\text{g/ml}$ ) was measured. The results of four independent experiments are shown in Fig. 1. In PAF-primed assays, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  production after preincubation with AgB in a final concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$  was significantly reduced in relation to that of cells treated with PMA alone ( $p=0.038$ ). In these assays, the  $\Delta\text{MFI}$  values obtained with cells that stimulated with PMA without preincubation with AgB were  $570\pm 55$  and  $470\pm 121$  after the treatment with this antigen. However, a

**Fig. 1** Effect of AgB on PMA-stimulated neutrophil  $H_2O_2$  production. Each bar indicates a percent  $\Delta$ MFI (mean $\pm$ SD of four independent experiments). Student's one-tailed *t* test was used for statistical analysis of the observed differences. *Asterisk* indicates a significant ( $p=0.038$ ) decrease in the neutrophil respiratory burst in relation to that in the positive control (PMA alone) for  $p\leq 0.05$



preincubation with AgB in a ten times higher concentration (10  $\mu$ g/ml) resulted in no significant ( $p=0.218$ ) decrease in  $H_2O_2$  production. When IFN- $\gamma$  was used for priming, the PMA-stimulated  $H_2O_2$  production was unaffected by any of the AgB pretreatments (either 10 or 1  $\mu$ g/ml).

We also assessed neutrophil activation after simultaneous incubation of AgB with IFN- $\gamma$  or PAF to evaluate possible interferences in the priming process caused by interactions between AgB and the priming agents. In these assays (four independent experiments for each tested condition), no alterations were observed in relation to the results obtained with priming without the exposure of the cells to the antigen, suggesting no direct interference of AgB with the priming agents. The  $H_2O_2$  production by neutrophils treated with AgB (10 or 1  $\mu$ g/ml) during the priming showed no significant alteration in relation to that of cells treated with PMA alone for any of the tested conditions. Values of  $\Delta$ MFI=2,119 $\pm$ 2,669 (AgB 10  $\mu$ g/ml+PMA,  $p=0.243$ ), 2,782 $\pm$ 3,000 (AgB 1  $\mu$ g/ml+PMA,  $p=0.094$ ), and 2,072 $\pm$ 2,720 (PMA 50 ng/ml) were obtained with PAF. Overall, our results showed that AgB can decrease significantly the  $H_2O_2$  production by PMA-stimulated

neutrophils in a dose-dependent form and that this effect is not due to interaction with priming agents.

#### Production of IL-8 in culture supernatants

The results of ELISA for IL-8 quantitation in supernatants of neutrophil-enriched fraction cultures are summarized in Table 3. A significant increase in IL-8 production was observed when cells were incubated with PSC in comparison to that of the negative control ( $p=0.028$ ). Similar amounts of IL-8 were detected in the supernatants of the negative control and of the cells incubated with AgB at 20  $\mu$ g/ml ( $p=0.952$ ). Our results allow us to conclude that, at least *in vitro*, PSC, but not AgB, can significantly stimulate neutrophil IL-8 production.

#### Discussion

Little is known about the innate mechanisms that affect the susceptibility to primary or secondary infection with *E. granulosus* (Zhang et al. 2003). Such mechanisms are likely to involve neutrophil modulation by parasite components because neutrophils are effector cells that interact with helminths during the infection process (Pugine et al. 2005) and are also involved in the regulation of the immune response (Van Gisbergen et al. 2005).

In this work, we assessed the effects of *E. granulosus* PSC and AgB on the host innate response by studying *in vitro* some early events of neutrophils activation to analyze its possible involvement in the mechanisms of host defense and/or parasite evasion.

*In vivo*, PSC are normally sequestered from the host immune response inside the hydatid cyst structure (Riganò et al. 2001). However, these vegetative forms are sometimes released by the accidental cyst rupture, which may result in PSC development as secondary cysts (Thompson

**Table 3** Effects of PSC and AgB on the *in vitro* production of IL-8 by neutrophils

	IL-8 (pg/ml)	<i>p</i>
PSC	15,701 $\pm$ 32	0.028 <sup>a</sup>
AgB (20 $\mu$ g/ml)	4,574 $\pm$ 2,721	0.952
LPS (10 $\mu$ g/ml)	16,819 $\pm$ 11,761	0.05 <sup>a</sup>
Negative control	4,697 $\pm$ 3,081	–

Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. PSC were tested at PSC to cell rates of 1:625. Student's two-tailed *t* test was used for statistical analysis of the observed differences.

<sup>a</sup>Indicates a significant increase in the production of IL-8 by neutrophils in relation to negative control (culture medium alone) for  $p\leq 0.05$

1995; Dervenis et al. 2005). In CHD, during and after the establishment of the parasite, the balance between host neutrophil defenses and immunomodulatory components putatively expressed and/or secreted by the parasite might direct the infection outcome. Therefore, we studied the effects of viable PSC on neutrophils to investigate the role of these cells in the response against the development of secondary infection. Our results indicate that neutrophils are activated by PSC and that antibodies are not apparently necessary to this activation. Although no changes in PSC morphology or tegument integrity were observed upon exposure to the activated cells under our experimental conditions, it is possible that neutrophil–PSC interaction may determine the metabolic changes in the parasite, which may affect its subsequent development and viability. The physiological relevance of the PSC–neutrophil interaction on the parasite viability remains unclear, but the interaction itself merits further investigation as neutrophils participate in the cross talk with other effector and regulatory cells that may govern the disease outcome. Recently, an interaction between schistosome components and Toll-like receptors has been reported (Jenkins et al. 2005), so that we can speculate that a pattern recognition receptor on neutrophil surface could be also involved in the interaction with PSC and in the observed activation process.

In humans, specific immune response against somatic and/or secreted components of PSC has been reported during chronic disease (Sterla et al. 1999; Cardozo et al. 2002; Virginio et al. 2003; Lorenzo et al. 2005). AgB represents a major antigenic component secreted by germinal membrane and PSC (Sanchez et al. 1991), which is present in large quantities in the hydatid fluid of fertile cysts (Mamuti et al. 2006), but the current knowledge on its biological roles is limited. However, there are some evidences pointing to the involvement of this antigen in mechanisms that would be crucial for parasite survival. For instance, it has been proposed that interactions of AgB 8 kDa subunits with the host immune system would be able to modulate both the innate and the adaptative responses (Shepherd et al. 1991; Riganò et al. 2001). The interaction of AgB with host neutrophils has been previously investigated (Shepherd et al. 1991), but the mechanisms involved have been not so far assessed. As far as we are aware, this work evaluates for the first time the effects of native AgB on neutrophil CD11b upregulation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and IL-8 production.

In contrast to PSC, the AgB did not produce any detectable direct effects upon neutrophil activation in the experimental conditions used. Therefore, we also analyzed the ability of the AgB to interfere with the activation of PMA-stimulated neutrophils as *in vitro* model to evaluate its potential immunomodulatory properties. A preincubation of neutrophils with AgB did not alter the CD11b

upregulation induced by PMA. However, the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significantly reduced by the presence of 1 µg/ml of AgB when PAF was used as a priming agent. Surprisingly, the same effect was not observed when another priming agent (IFN-γ) was used instead of PAF. This suggests that the inhibitory effect is not attributable to a direct interaction between PMA and native AgB, which is also in accordance with the observation that the inhibitory effect is not achieved with a higher concentration of AgB. The phenomenon of priming represents an intriguing aspect of neutrophil activation, which suggests that activation is a two-step process; however, the molecular basis is not completely understood (Brown et al. 2004). *In vivo*, different priming agents would selectively potentiate different effector mechanisms during neutrophil activation by a subsequent stimulus (Rosenberg and Gallin 2003). In this complex scenario, a qualitative difference between primed neutrophils might condition the interference of AgB with the intracellular pathway of oxidative mechanism involved. In addition, it is known that activation of innate cells results from the integration of positive and negative signals through the interaction with multiple receptors/ligands (Vivier and Malissen 2005). The dose-dependent response observed with AgB could be in accordance with such complex pattern of interaction in the cell. The elucidation of the mechanism of action of this antigen on host immune cells will require further investigation.

In agreement with the possible negative immunomodulatory role suggested to AgB, we have not detected secretion of IL-8 by a neutrophil-enriched fraction upon exposure to this antigen. Changes in cytokine profiles are among the most crucial events that can influence the outcome of host–*E. granulosus* interactions (Vuitton 2003). IL-8 is a cytokine produced early by neutrophils and other innate cells, which presents chemotaxis activity powerful for different cellular populations involved in cytotoxic events, determining a central role to the neutrophils in the regulation of the infiltration of leukocytes during the inflammatory response. This interleukin may also be indirectly involved in the modulation of the adaptative response (Van Gisbergen et al. 2005).

The presented data extend the available knowledge about *E. granulosus* effects on immune defenses of human intermediate hosts. Assuming that our *in vitro* results represent, at least in part, what actually happens with neutrophils upon accidental release of cyst content, AgB could be viewed as part of an evasion mechanism important for parasite (PSC) survival in case of cyst rupture. AgB could interfere with the effector phase of the immune response, allowing released PSC to develop into secondary cysts. This interference, mediated by inhibition of immunoregulator and effector cells, such as neutrophils, would

be possible due to the fact that the stimulatory effect of PSC would be overcome by the nonstimulatory or inhibitory effect of AgB present in large amounts in the hydatid cyst fluid. Further investigation will be necessary to identify how such mechanisms would operate *in vivo*.

**Acknowledgments** We thank Dr. Gualberto González-Sapienza for the kind gift of AgB and Dr. Itabajara Vaz for the critical reading of the manuscript. V. G. Virginio is a recipient of a CAPES (Brazil) predoctoral fellowship. This work was supported by CNPq (Brazil), RTPD Network-SIDA (Sweden), and PEDECIBA, CSIC, and TWAS (Uruguay). The experiments included in this work comply with the current laws of Uruguay.

## References

- Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AEH, Wilker E, Yaffe MB (2004) Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279:27059–27068
- Brushi F, Carulli G, Azzarà A, Minnucci S (1995) Inhibition of neutrophils oxidative metabolism by trichinellosis patient sera. Parasite origin or host induction. *Parasite Immunol* 17:253–260
- Brushi F, Carulli G, Azzarà A, Homan W, Minucci S, Rizzutti-Gullaci A, Sbrana S, Angiolini C (2000) Inhibitory effects of human neutrophil functions by the 45-kD glycoprotein derived from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Int Arch Allergy Immunol* 122:58–65
- Cardozo C, Tucci P, Hernández A (2002) Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in patients with cystic hydatid disease. *Parasitol Res* 88:984–990
- Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, McDonald PP, Trinchieri G (1995) Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem J* 310:751–755
- Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116:233–237
- Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A (2005) *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1747:189–194
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (1993) *In vitro* assays for mouse lymphocyte function. In: *Current protocols in immunology*. Wiley, New York, pp 3.0.1–3.19.7
- Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I (1996) Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology* 89:105–111
- Dervenis C, Delis S, Avgerinos C, Madariaga J, Milicevic M (2005) Changing concepts in the management of liver hydatid disease. *J Gastrointest Surg* 9:869–877
- Dreweck CM, Soboslay PT, Schulz-Key H, Gottstein B, Kern P (1999) Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacystode vesicles. *Parasite Immunol* 21:433–438
- Falcone FH, Rossi AG, Sharkey R, Brown AP, Pritchard DI, Maizels RM (2001) *Ascaris suum*-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway. *Infect Immun* 69:4007–4018
- Ferreira HB, Chemale G, Zaha A (2004) Structural, functional, and immunological aspects of *Echinococcus granulosus* (Platyhelminthes, Cestoda) antigen B. *Curr Top Biochem Res* 6:37–46
- González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Örn A, Wernstedt C, Hellman U (1996) Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol* 18:587–596
- Haag KL, Alves-Júnior L, Zaha A, Ayala FJ (2004) Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 333:157–167
- Jenkins SJ, Hewitson JP, Ferret-Bernard S, Mountford AP (2005) Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and-independent pathways. *Int Immunol* 17:1409–1418
- Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenzvit M, Kamenetzky L, García HH, Vasquez Y, Naquira C, Sánchez E, Lorca M, Contreras M, Last JA, González-Sapienza G (2005) Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J Clin Microbiol* 43:2764–2770
- Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowler MW, Ito A (2006) Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int* 55:57–62
- Pugine SMP, Faria MF, Maia AAM, Valle CR, Boschini C, Poleti MD, Silva MRM, De Mello MP (2005) Effect of *Cysticercus cellulosae* fractions on the respiratory burst of pig neutrophils. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47:91–94
- Rosenberg HF, Gallin JI (2003) Inflammation. In: Paul WE (ed) *Fundamental immunology*. Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp 1151–1169
- Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzarà A, Iopollo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Siracusano A (2001) Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 69:288–296
- Riley EM, Dixon JB, Jenkins P, Ross G (1986) *Echinococcus granulosus* infection in mice: host responses during primary and secondary infection. *Parasitology* 92:391–403
- Robinson RD, Arme C (1985) *Echinococcus granulosus*: failure of eosin-exclusion test to demonstrate death of protoscoleces. *Ann Trop Med Parasitol* 79:117–123
- Robinson JP, Carter WO, Narayanan P (1997) Functional assays by flow cytometry. In: Rose NR, Marcario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura R (eds) *Manual of clinical laboratory immunology*. Academic, New York, pp 245–254
- Rogan MT, Craig PS, Zehly E, Masinde G, When H, Zhou P (1992) *In vitro* killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from endemic areas. *Acta Trop* 51:291–296
- Rosales C, Brown EJ (1993) Neutrophil receptors and modulation of the immune response. In: Abramson JS, Wheeler JG (eds) *The neutrophil—the natural immune system*. Oxford University Press, New York, pp 23–62
- Sanchez F, March F, Mercader M, Coll P, Muñoz C, Prats G (1991) Immunohistochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol* 13:583–592
- Shepherd JC, Aitken A, McManus DP (1991) A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol* 44:81–90
- Smego RA Jr, Sebanego P (2005) Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *Int J Infect Dis* 9:69–76
- Sterla S, Sato H, Nieto A (1999) *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. *Parasite Immunol* 21:27–34

- Takasaki J, Kawauchi Y, Masuho Y (1998) Synergistic effect of type II phospholipase A<sub>2</sub> and platelet-activating factor on Mac-1 surface expression and exocytosis of gelatinase granules in human neutrophils: evidence for the 5-lipoxygenase-dependent mechanism. *J Immunol* 160:5066–5072
- Thompson RCA (1995) Biology and systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp 1–50
- Van Gisbergen KPJM, Geijtenbeek TBH, Van Kooyk Y (2005) Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 26:626–631
- Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB (2003) A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132:309–315
- Vivier E, Malissen B (2005) Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* 6:17–21
- Vuitton DA (2003) The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or the parasite? *Acta Trop* 85:119–132
- Zhang J, Kaupke CJ, Yousefi S, Cesario TC, Vaziri ND (1995) Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell* 84:147–153
- Zhang W-B, Li J, McManus DP (2003) Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev* 16:18–36