

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase  
aguda da esquistossomose mansônica humana

por

AMANDA CARDOSO DE OLIVEIRA SILVEIRA

BELO HORIZONTE

FEV/2011

**DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR**

**A.C.O. SILVEIRA**

**2011**

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase  
aguda da esquistossomose mansônica humana

por

AMANDA CARDOSO DE OLIVEIRA SILVEIRA

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho

Co-orientação: Dr<sup>a</sup>. Denise da Silveira Lemos  
Guinchetti

BELO HORIZONTE

FEV/2011

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S587a Silveira, Amanda Cardoso de Oliveira.  
2011

Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase aguda da esquistossomose mansônica humana / Amanda Cardoso de Oliveira Silveira. – Belo Horizonte, 2011.

xxiv, 141 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 141 - 165

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Biomarcadores farmacológicos/análise I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira de (Orientação). III. Guinchetti, Denise da Silveira Lemos (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase  
aguda da esquistossomose mansônica humana

por

AMANDA CARDOSO DE OLIVEIRA SILVEIRA

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Andréa Teixeira de Carvalho (**Presidente**)

**Prof. Dr.** Stefan Michael Geiger

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**Suplente:** Dr<sup>a</sup>. Cristina Toscano Fonseca

**Dissertação defendida e aprovada em:** 25/02/2011.

## **COLABORADORES**

### **Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte**

Dr. Giovanni Gazzinelli – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

Dr. Cristiano Lara Massara – Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica

Dr. Martin Johannes Enk – Laboratórios de Esquistossomose e Helminologia e Malacologia Médica

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Laboratório de Esquistossomose

Dr. Olindo Assis Martins Filho – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

### **Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte-MG**

Dr. José Augusto Nogueira Machado

Dra. Maria Carolina Barbosa Álvares

### **Universidade Federal de Minas Gerais-ICB/Departamento de Bioquímica e Imunologia**

Dr. Alfredo Miranda de Góes

## **SUPORTE FINANCEIRO:**

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CPqRR/FIOCRUZ: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

**“Porque nenhum de nós vive para si mesmo, nem morre para si mesmo. Se vivemos, é para o Senhor, e, se morremos, é também para o Senhor. Portanto, se vivemos ou morremos, somos do Senhor” (Rm 14.7-8)**

**Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos que sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha vida. Agradeço a vocês por acreditarem em mim, pelo exemplo de vida e por todo amor e dedicação que me impulsionam a cada dia.**

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho, agradeço por ter me recebido como sua aluna e pela oportunidade de realizar este trabalho. Muito obrigada pelo apoio, direcionamento e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dr<sup>a</sup>. Denise da Silveira Lemos Guinchetti, agradeço por ter aceitado me co-orientar e contribuído grandemente nos momentos em que mais precisei. Obrigada por ter me incentivado desde o início e por todos os esforços realizados.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, agradeço pela oportunidade de poder trabalhar em seu laboratório e conviver com um profissional competente e dedicado.

Ao Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo, agradeço pela disponibilidade em ensinar e auxiliar sempre que preciso.

Aos colaboradores, Dr. Giovanni Gazzinelli, Dr. Cristiano Lara Massara, Dr. Martin Johannes Enk, Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Dr. José Augusto Nogueira Machado, Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Barbosa Álvares, Dr. Alfredo Miranda de Góes que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar desse estudo.

Aos órgãos financiadores, fundamentais para a realização desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao seu Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por me proporcionarem um excelente ambiente de trabalho e crescimento científico.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao corpo técnico do LBDM, Fabiana Rocha, Fabiana Paixão, Roquelia Ferreira, Maisa de Oliveira e da Plataforma de Citometria, Ana Beatriz e Marcos Damasio pela disponibilidade e dedicação na realização dos experimentos.

Aos amigos especiais que fiz no LBDM, pelos dias alegres e também pelos difíceis, que vivemos juntos na nossa sala dos estudantes, agradeço à Jerusa Arantes, Livia Passos, Camila Magalhães, Laís Maroni, Aretha Silva, Ana Carolina Campi, Luíza Pacheco, Rafaella Gaiotti, Maurício Azevedo e Renato Abdala pela amizade e carinho.

Agradeço em especial ao Matheus Fernandes Costa e Silva, dar continuidade ao seu trabalho foi um privilégio para mim, que só se tornou possível com a sua colaboração constante. Muito obrigada.

Agradeço ainda aos amigos dos outros laboratórios e aos colegas da pós-graduação, conviver com cada um de vocês foi fundamental todo esse tempo.

Aos meus queridos amigos e aos irmãos da IPF, presentes de Deus na minha vida, meu agradecimento especial e reconhecimento por tudo que vocês representam para mim.

A todos os meus familiares, por sempre torcerem e orarem por mim.

Ao Sérgio, pelo apoio e por fazer parte desse momento tão importante na minha vida.

Aos meus pais Vânia e José, e aos meus irmãos Luiz e Débora, agradeço pelo amor, companheirismo, dedicação e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por serem tão especiais. Tenham certeza que vocês foram fundamentais para a conclusão dessa etapa. Vocês são parte essencial da minha vida.

Agradeço principalmente Aquele, sem o qual, nada do que está feito se fez, ao meu fiel Deus, primordial nessa etapa tão significativa e transformadora da minha vida.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| Lista de Figuras .....  | XIII      |
| Lista de Tabelas .....  | XVII      |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos .....  | XVIII     |
| Resumo .....  | XXIII     |
| Abstract .....  | XXIV      |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>  | <b>29</b> |
| 2.1 <i>Objetivo geral</i> .....   | 30        |
| 2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....  | 30        |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1 <i>Aspectos epidemiológicos e ciclo biológico da esquistossomose mansônica</i> .....  | 32        |
| 3.2 <i>Formas clínicas da esquistossomose mansônica</i> .....   | 33        |
| 3.3 <i>Diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansônica</i> .....   | 35        |
| 3.4 <i>Resposta imune na fase aguda da esquistossomose mansônica</i> .....  | 37        |
| 3.5 <i>Tratamento para a esquistossomose mansônica</i> .....  | 44        |
| <b>4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1 <i>Descrição da área estudada</i> .....   | 48        |
| 4.2 <i>Caracterização da população avaliada</i> .....   | 51        |
| 4.2.1 <i>Critérios de inclusão</i> .....  | 52        |
| 4.2.2 <i>Critérios de exclusão</i> .....  | 52        |
| 4.3 <i>Exame parasitológico de fezes</i> .....  | 55        |
| 4.4 <i>Avaliação de parâmetros clínicos</i> .....   | 55        |
| 4.5 <i>Avaliação de parâmetros hematológicos</i> .....  | 55        |
| 4.6 <i>Exame ultra-sonográfico</i> .....  | 56        |
| 4.7 <i>Obtenção de granulócitos do sangue periférico e plasma</i> .....   | 58        |
| 4.8 <i>Obtenção dos sobrenadantes de cultura</i> .....  | 59        |
| 4.9 <i>Obtenção de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou vermes adultos (SWAP) do S. mansoni</i> .....                              | 59        |
| 4.10 <i>Determinação dos níveis de IgE total no plasma</i> .....  | 59        |
| 4.11 <i>Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de cultura</i> .....                           | 60        |
| 4.12 <i>Caracterização das citocinas e quimiocinas presentes no plasma e nos sobrenadantes das culturas de granulócitos</i> ..... | 61        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.13 Aquisição e análise dos dados de avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas .....   | 62        |
| 4.14 Imunofenotipagem ex vivo de leucócitos do sangue periférico .....  | 64        |
| 4.15 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de eosinófilos e neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo .....  | 68        |
| 4.16 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo .....   | 70        |
| 4.17 Aquisição e análise ex vivo de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>HIGH</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo .....  | 72        |
| 4.18 Análise estatística dos dados .....  | 74        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>   | <b>75</b> |
| 5.1.1 Dados epidemiológicos e intensidade de infecção dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel com praziquantel .....  | 76        |
| 5.1.2 Avaliação do perfil hematológico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel....   | 78        |
| 5.1.3 Caracterização ultra-sonográfica de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel .....   | 82        |
| 5.1.4 Determinação dos níveis de IgE total no plasma de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel.....  | 85        |
| 5.1.5 Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de cultura de GRANULÓCITOS, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel..... | 87        |
| 5.1.6 Avaliação das citocinas e quimiocinas no plasma e em sobrenadantes de cultura de GRANULÓCITOS, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, em indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel .....        | 90        |

|   |     |
|---|-----|
| 5.1.7 <i>Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular em EOSINÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel</i> .....   | 98  |
| 5.1.8 <i>Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em EOSINÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....  | 101 |
| 5.1.9 <i>Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por NEUTRÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....   | 104 |
| 5.1.10 <i>Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em NEUTRÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....   | 106 |
| 5.1.11 <i>Análise ex vivo do número de LINFÓCITOS T (CD3<sup>+</sup>) e suas subpopulações, linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>), do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> ..... | 109 |
| 5.1.12 <i>Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por LINFÓCITOS TCD4<sup>+</sup>, do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....   | 111 |
| 5.1.13 <i>Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por LINFÓCITOS TCD8<sup>+</sup>, do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....   | 114 |
| 5.1.14 <i>Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em LINFÓCITOS T do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel</i> .....  | 116 |
| 6 DISCUSSÃO .....   | 119 |
| 7 CONCLUSÃO.....  | 139 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 141 |

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Casa de campo localizada na Zona rural de Igarapé, Município pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte - MG. Vista geral da casa de campo, na qual é possível observar a piscina de água natural abastecida pelo córrego Igarapé.....49
- Figura 2:** Casa de campo localizada na Zona Rural de Igarapé, Município pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte - MG. Represa vizinha à casa, na qual toda a água utilizada pelos turistas era desprezada.....50
- Figura 3:** Representação esquemática da análise de citocinas e quimiocinas, através do ensaio com microesferas por citometria de fluxo.....63
- Figura 4:** Análise de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni por citometria de fluxo.....69
- Figura 5:** Análise de neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni por citometria de fluxo.....69
- Figura 6:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo.....71
- Figura 7:** Análise de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HIGH do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo.....73
- Figura 8:** Análise do perfil hematológico, série vermelha e plaquetas, de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....80
- Figura 9:** Análise do perfil hematológico, série branca, de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....81

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 10:</b> Concentração plasmática de IgE total de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....  | 86 |
| <b>Figura 11:</b> Níveis plasmáticos em densidade óptica (D.O.) de Óxido Nítrico (NO), de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....  | 88 |
| <b>Figura 12:</b> Níveis de Óxido Nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel nas culturas controle (CTL), antígenos solúveis do ovo (SEA) e antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP). .... | 89 |
| <b>Figura 13:</b> Análise da produção de citocinas/quimiocinas CXCL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ e IL-10 do plasma de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose .....  | 94 |
| <b>Figura 14:</b> Análise da produção de citocinas/quimiocinas G-CSF, GM-CSF, CCL24 e IL-4 do plasma de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose .....   | 95 |
| <b>Figura 15:</b> Níveis de citocinas/quimiocinas CXCL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose.....   | 96 |
| <b>Figura 16:</b> Níveis de citocinas/quimiocinas G-CSF, GM-CSF, CCL24, IL-3 e IL-4 nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose.....   | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 17:</b> Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), CD80 (B) e CD86 (C), moléculas de ativação CD23 (D), CD25 (E), HLA-DR (F) e CD69 (G), receptor de IgG (FcγR1) CD64 (H) e moléculas de adesão CD62L (I), CD11a (J), CD13 (K), CD18 (L), CD44 (M) e CD54 (N) por eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel..... | 100 |
| <b>Figura 18:</b> Número de receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) por eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel .....   | 102 |
| <b>Figura 19:</b> Principais alterações imunofenotípicas em eosinófilos induzidas pela infecção aguda pelo <i>S. mansoni</i> e pelo seu tratamento específico .....  | 103 |
| <b>Figura 20:</b> Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), CD80 (B) e CD86 (C), moléculas de ativação CD23 (D), CD25 (E), HLA-DR (F) e CD69 (G), receptor de IgG (FcγR1) CD64 (H) e moléculas de adesão CD62L (I), CD11a (J), CD 44 (K) por neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel .....                              | 105 |
| <b>Figura 21:</b> Número de receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) por neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel. ....   | 107 |
| <b>Figura 22:</b> Principais alterações imunofenotípicas em neutrófilos induzidas pela Infecção aguda pelo <i>S. mansoni</i> e pelo seu tratamento específico.....   | 108 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 23:</b> Número de linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) (A), linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) (B) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8 <sup>+</sup> ) (C) do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....                                       | 110 |
| <b>Figura 24:</b> Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), moléculas de ativação CD25 (B), HLA-DR (C) e CD69 (D), moléculas de adesão CD62L (E) e CD18 (F) e CD25 <sup>HIGH</sup> (G) em linfócitos TCD4 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel..... | 112 |
| <b>Figura 25:</b> Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ) induzidas pela infecção aguda pelo <i>S. mansoni</i> e pelo seu tratamento específico.....  | 113 |
| <b>Figura 26:</b> Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), moléculas de ativação CD25 (B), HLA-DR (C) e CD69 (D) e moléculas de adesão CD62L (E) e CD18 (F) por linfócitos TCD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....                     | 115 |
| <b>Figura 27:</b> Número de receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos após (AGD-PT II ■ = 11) terapêutica específica com praziquantel.....  | 117 |
| <b>Figura 28:</b> Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8 <sup>+</sup> ) induzidas pela infecção aguda pelo <i>S. mansoni</i> e pelo seu tratamento específico.....   | 118 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Caracterização da população avaliada .....  | 54 |
| <b>Tabela 2</b> – Critérios e parâmetros avaliados nos exames ultra-sonográficos .....  | 57 |
| <b>Tabela 3</b> – Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de leucócitos circulantes.....  | 65 |
| <b>Tabela 4</b> – Dados demográficos e intensidade de infecção dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel.....   | 77 |
| <b>Tabela 5</b> – Medidas das variáveis ultra-sonográficas do fígado de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel .....               | 83 |
| <b>Tabela 6</b> - Medidas das variáveis ultra-sonográficas do baço e dos linfonodos de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel..... | 84 |

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

**ACT-BT** – *Group of patients with the acute phase of schistosomiasis mansoni, before specific therapeutic with praziquantel* - Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel

**ACT-AT I** – *Group of patients with the acute phase of schistosomiasis mansoni, one year after specific therapeutic with praziquantel* - Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

**ACT-AT II** – *Group of patients with the acute phase of schistosomiasis mansoni, two years after specific therapeutic with praziquantel* - Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

**ADCC** – *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

**AGD-AT** – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel

**AGD-PT I** – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

**AGD-PT II** – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

**APC** – *Antigen-presenting cell* - Célula apresentadora de antígeno

**BAP** – Medida do baço em mm, ântero-posterior

**BLON** – Medida do baço em mm, eixo longitudinal

**BSA** – *Bovine Serum Albumin* – Albumina bovina sérica

**CBA** – *Cytometric Bead Array* – Ensaio com bead por citometria

**CC** – Receptor de quimiocina

**CCL24** – Quimiocina eotaxina, recrutamento de eosinófilos

**CCR2** – Receptor de quimiocinas para migração de linfócitos T, monócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas

**CCR3** – Receptor de quimiocinas para migração de eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T

**CCR5** – Receptor de quimiocinas para migração de linfócitos Th1, NK, células dendríticas, monócitos

**CERC** – Cercárias

**CD** – *Cluster of differentiation* – Grupo de diferenciação

**CD3** – Marcador de superfície para linfócitos T

**CD4** – Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos

**CD8** – Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos

**CD11a** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos

**CD11b** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos

**CD13** – Molécula expressa em granulócitos

**CD14** – Marcador para população de monócitos

**CD16** – Molécula de identificação de células NK, receptor de baixa afinidade para IgG

**CD18** – Molécula de adesão celular expressa em leucócitos

**CD19** – Marcador para população de linfócitos B

**CD23** – Marcador de ativação em leucócitos

**CD25** – Marcador de ativação em leucócitos

**CD28** – Molécula co-estimuladora de proliferação

**CD44** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos

**CD54** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos

**CD62L** – Molécula de adesão celular expressa em leucócitos

**CD64** – Receptor de IgG

**CD69** – Molécula de ativação de leucócitos

**CD80** – Molécula de co-regulação de ativação celular

**CD86** – Molécula de co-regulação de ativação celular

**cDNA** – DNA complementar

**CONEP** – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

**CPqRR** – Centro de Pesquisas René Rachou

**CT** – Grupo controle

**CTL** – Cultura controle

**CXC** – Receptor de quimiocina

**CX** – Receptor de quimiocina

**CX3** – Receptor de quimiocina

**CXCL-8** – Quimiocina de migração de neutrófilos

**CXCR3** – Receptor de quimiocina para migração de fibroblastos e linfócitos T Tipo 1 ativados

**CYCHR** – *Cychrome* – Fluorocromo Cicromo

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**D.O.** – Densidade Óptica

**EOS** – Eosinófilos

**ECP** – Peroxidase Catiônica Eosinofílica

**EDTA** – Etilenodiaminotetracético

**ELISA** – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Teste imunoenzimático

**EPO** – Peroxidase eosinofílica

**E.U.A.** – Estados Unidos da América

**FACScan** – *Fluorescence Activated Cell Sorter*

**FACSCalibur** – *Fluorescence Activated Cell Sorter*

**FCγRI** – Receptor para Fc de IgG

**FITC** – Isotiocianato de fluorescência

**FL** – Fluorescência

**FLS** – Facs Lysing Solution

**FSC** – Forward Scatter

**FUNASA** – Fundação Nacional de Saúde

**G-CSF** – Fator estimulador de colônia de granulócitos

**GM-CSF** – Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

**HLA-DR** – Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas

**HSC** - Células hepáticas estreladas

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**ICAM-1** – Molécula de adesão celular 1

**IFN-γ** – Interferon gama

**Ig** – Imunoglobulina

**IL** – Interleucina

**iNOS** - NO sintetase induzível

**KLH** - Keyhole Limpet Hemocyanin

**LDAP** – Medida do lobo direito do fígado em mm, ântero-posterior

**LDLON** – Medida do lobo direito do fígado em mm, secção longitudinal

**LEAP** – Medida do lobo esquerdo do fígado em mm, ântero-posterior

**LELON** – Medida do lobo esquerdo do fígado em mm, secção longitudinal

**LHMM** – Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica

**LINF** – Linfócitos

**MAPK** – Proteínas quinases ativadoras de mitógeno

**MBP** – Proteína básica principal

**MEM** – Minimal Essential Médium

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**MONO** – Monócitos

**NEUT** – Neutrófilos

**NO** – Óxido Nitríco

**NK** – Natural Killer

**OPG** – Ovos por grama de fezes

**PBMC** – Células mononucleares do sangue periférico

**PBS** – Tampão Fosfato Salínico

**PE** – Ficoeritrina

**Percp** – Proteína Clorofila Piridinina

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PIII** – Antígeno purificado da fração solúvel de verme adulto

**rpm** – rotação por minuto

**RP** – Proteína Recombinante

**RPMI 1640** – Meio de cultivo celular

**SEA** – Antígenos solúveis do ovo

**SOM** – Esquistossômulos

**SSC** – Side Scatter

**SWAP** – Antígenos solúveis de vermes adultos

**TC** – Tricolor

**TEG** – Tegumento de vermes adultos

**TGF-β** – Fator de transformação do crescimento beta

**TMB** – Tetrametilbenzidina

**TNF-α** – Fator de necrose tumoral alfa

**T<sub>REG</sub>** – Células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>)

**UFMG** – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

**VCAM-1** – Molécula de adesão celular vascular-1

**VP** – Veia porta

**XC** – Receptor de quimiocina

**WHO** – World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

## Resumo

Nesse estudo foram avaliadas as principais alterações clínico-laboratoriais, ultra-sonográficas e imunofenotípicas induzidas em pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose mansoni (AGD-AT) e o impacto que a terapêutica específica com praziquantel teria em um ano (AGD-PT I) e dois anos (AGD-PT II) após o tratamento. Amostras de fezes e sangue periférico dos pacientes foram coletadas para realização do exame parasitológico e hemograma, respectivamente. Posteriormente, os pacientes foram submetidos ao exame ultra-sonográfico para avaliar comprometimento hepático e/ou esplênico. Em seguida, foi realizada a determinação dos níveis plasmáticos de IgE total, óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas. Além disso, foram realizadas avaliações do perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes e dosagem de NO, citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de cultura de granulócitos do sangue periférico. Os resultados mostraram reduções da concentração de hemoglobina, percentual do hematócrito, número de plaquetas e global de leucócitos no grupo AGD-PT II, com algumas alterações ultra-sonográficas (hepatomegalia e esplenomegalia) persistentes. Em relação às avaliações plasmáticas no grupo AGD-PT II, foi observado redução dos níveis de IgE total quando comparados aos grupos CT, AGD-AT e AGD-PT I, NO em comparação com o grupo AGD-AT, CXCL-8 em comparação com o grupo AGD-AT, GM-CSF em comparação com o grupo AGD-PT I e CCL24 em comparação com o grupo CT. Nos dados referentes à avaliação dos sobrenadantes de cultura de granulócitos do grupo AGD-PT II, frente ao estímulo com SWAP, foi observado redução dos níveis de óxido nítrico quando comparado ao grupo AGD-AT e CXCL-8 em relação ao grupo AGD-PT I. Na avaliação do perfil imunofenotípico do grupo AGD-PT II, os resultados mostraram reduções progressivas nos números absolutos das moléculas CD28, CD80, CD86, CD23, CD25, HLA-DR, CD69, CD64, CD18, CD44, CD54, CCR2 e CCR3 em eosinófilos, CD80, CD86, CD11 e CCR2 em neutrófilos e número absoluto de linfócitos TCD3<sup>+</sup> e suas subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como os marcadores CD28 e CD18 em comparação ao grupo AGD-PT I. Com base nos achados desse estudo sugere-se que dois anos após terapêutica específica com praziquantel, a grande maioria das alterações observadas nos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes e persistentes um ano após o tratamento, tenham sido normalizadas, sugerindo que o tratamento pode promover, a longo prazo, a reversibilidade das alterações imunofenotípicas das principais populações celulares envolvidas no contexto da infecção esquistossomótica aguda.

## Abstract

In this study was evaluated the main clinical/laboratory, ultrasonographic and immunophenotypic features in patients with the acute phase of schistosomiasis mansoni (ACT-BT) and the impact of the specific therapeutic with praziquantel about these parameters one year (ACT-AT I) and two years (ACT-AT II) after specific therapeutic. Peripheral blood and feces of patients were collected to perform blood and parasitological examinations, respectively. Subsequently, the patients were evaluated by ultrasound to assess hepatic/splenic commitment. Afterwards, we evaluated the plasmatic levels of total IgE, nitric oxide (NO), cytokines and chemokines. Moreover, we evaluated *ex vivo* immunophenotypic features from circulating leucocytes, and the levels of NO, cytokines and chemokines in supernatant of culture from circulating granulocytes. The results showed a reduction in the concentration of hemoglobin, percentage of hematocrit, number of platelets and total leucocytes as well as ultrasonographic alterations (hepatomegaly and splenomegaly) in the ACT-AT II group. The plasmatic analysis from ACT-AT II revealed a decreased levels of total IgE as compared to CT, ACT-BT and ACT-AT I groups, NO as compared to ACT-BT group, CXCL-8 as compared to ACT-BT group, GM-CSF as compared to ACT-AT I group and CCL24 as compared to CT group. Regarding the analysis in the supernatant culture of granulocytes from ACT-AT II, in the presence of SWAP, there was a reduction in NO levels as compared to ACT-BT as well as in CXCL-8 as compared to ACT-AT I. The immunophenotypic profile from ACT-AT II group showed progressive decrease in the absolute number of CD28, CD80, CD86, CD23, CD25, HLA-DR, CD69, CD64, CD18, CD44, CD54, CCR2 and CCR3 in eosinophils, CD80, CD86, CD11 and CCR2 in neutrophils and CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD28 and CD18 markers in T lymphocytes as compared to ACT-AT I. In summary, the findings of this study suggest that after two years post-treatment specific with Praziquantel, the majority of alterations observed in acute patients of schistosomiasis, before and those persistents after one year post-treatment, returned to the normal levels, suggesting that chemotherapy can promote, a long time, the reversibility of the immunological alterations in the main cell populations involved in the context of acute schistosomiasis infection.



Atualmente, a esquistossomose é considerada um problema de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, situados em áreas tropicais e subtropicais, com destaque para regiões da África Subsaariana (Katz & Peixoto 2000, Steinmann et al. 2006, WHO 2010). É considerada endêmica em 76 países, com mais de 700 milhões de indivíduos pertencentes ao grupo de risco à infecção e cerca de 200 milhões infectados. No entanto, alguns trabalhos mostram que a transmissão da esquistossomose tem diminuído significativamente em muitas regiões por meio da implementação de programas de controle da doença (Engels et al. 2002, Steinmann et al. 2006, Wilson et al. 2007, WHO 2010). No Brasil, ainda é considerada uma das mais importantes doenças endêmicas, afetando principalmente populações de baixa renda, com aproximadamente 36 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e 1,5 milhão infectadas, o que torna o Brasil o país mais afetado pela esquistossomose nas Américas (Coura & Amaral 2004, Steinmann et al. 2006, Lambertucci 2010).

No homem, hospedeiro definitivo, a infecção pode induzir quatro diferentes formas clínicas, uma forma aguda e três formas crônicas (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica) (Bina 1981). Embora as formas crônicas sejam mais prevalentes e associadas à morbidade em áreas endêmicas, a forma aguda é potencialmente mais grave e acomete, normalmente, indivíduos não residentes em áreas endêmicas (Hiatt et al. 1979, Wynn et al. 2004, Gryseels et al. 2006, Manzella et al. 2008).

A fase aguda da esquistossomose, também denominada Febre de Katayama é uma das manifestações clínicas da infecção pelo *Schistosoma*, sendo considerada uma síndrome toxêmica grave (Ross et al. 2007, Jaureguiberry et al. 2010). Clinicamente, essa fase da doença é dividida em pré-postural e pós-postural. A fase aguda pré-postural tem início com a penetração das cercárias através da pele do hospedeiro definitivo, podendo desencadear um quadro de dermatite cercariana (Boros 1989, Lambertucci 2010). Essa fase apresenta sintomatologia inespecífica combinada com uma série de eventos imunológicos como reação de hipersensibilidade mediada por IgE, resposta imune anti-esquistossômulo e produção de anticorpos IgM, IgG e IgA (Alves-Brito et al. 1992, Rabello et al. 1995, Lambertucci 2010). Muitos trabalhos mostram ainda que durante essa fase observa-se um perfil misto de citocinas, com predomínio de uma resposta do Tipo 1, caracterizada por altos níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Rezende et al. 1997, Correa-Oliveira et al. 1998, Chiamonte et al. 1999).

A fase aguda pós-postural tem início com a postura dos ovos no sistema porta hepático, sendo caracterizada por uma sintomatologia inespecífica (febre, náuseas, cefaleia,

anorexia, calafrios, tosse, sudorese e diarreia) acompanhada de leucocitose, eosinofilia, hepatoesplenomegalia e uma resposta imune celular exacerbada aos antígenos do *Schistosoma*, especialmente antígenos provenientes dos ovos (Gazzinelli et al. 1985, Silveira-Lemos 2004, Enk et al. 2010). Estudos em humanos e modelos experimentais têm demonstrando que a reação de hipersensibilidade do tipo granulomatosa estaria associada a um perfil de resposta imune misto, com presença de citocinas tanto do Tipo 1 como do Tipo 2 (Pearce et al. 1992, Chiaramonte et al. 1999, Caldas et al. 2008, Allam 2009, Othman et al. 2009).

A abordagem diagnóstica da fase aguda baseia-se em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Makarova et al. 2003). Contudo, o diagnóstico torna-se frequentemente um desafio, pois além da inespecificidade dos sintomas, a presença de ovos nas fezes pode não ser facilmente detectável pelo exame parasitológico (Enk et al. 2008, Pereira et al. 2010). No entanto, avanços metodológicos são propostos com o intuito de caracterizar melhor a fase aguda da infecção pelo *S. mansoni*. Dentre esses avanços, pode-se destacar a avaliação abdominal ultra-sonográfica, considerada método de eleição na investigação de qualquer suspeita de doença hepática (Cerri & Oliveira 2002, Silva et al. 2006). Entretanto, estudos ultra-sonográficos que avaliem danos hepáticos durante a fase aguda da infecção são ainda escassos (Magalhães 2002, Lambertucci 2010).

Em relação ao tratamento específico dos portadores da fase aguda da esquistossomose humana, a droga de primeira escolha é o praziquantel, considerado atualmente a droga mais efetiva contra todas as espécies de *Schistosoma* (Richter 2003, Gryseels et al. 2006). Entretanto, o praziquantel apresenta baixa eficácia contra vermes imaturos, tanto em humanos quanto em modelos murinos (Lambertucci et al. 2000). A taxa de cura na fase aguda varia de 40-50%, podendo o praziquantel ser administrado isoladamente ou em conjunto com corticosteróides, no intuito de suprimir a reação de hipersensibilidade (Lambertucci 1993, Horak & Kolarova 2005, Jaureguiberry et al. 2007).

Embora existam vários estudos na literatura descrevendo avaliações clínicas, laboratoriais e terapêuticas em pacientes portadores das formas clínicas crônicas da esquistossomose, ainda são escassos os estudos que avaliam esses parâmetros durante a fase aguda da infecção humana.

Considerando ainda as alterações imunológicas observadas durante a fase aguda da esquistossomose, destacam-se os mecanismos de hipersensibilidade mediada por IgE, leucocitose, eosinofilia, resposta imune celular e humoral como sendo os eventos

imunológicos mais importantes no combate a infecção (Gazzinelli et al. 1985, Rabello et al. 1995, Silveira-Lemos 2004, Lambertucci 2010).

Diante dos mecanismos imunológicos expostos, fica evidente que a infecção pelo *S. mansoni* desencadeia uma resposta imunológica ampla e que a intensidade dessa resposta está relacionada à gravidade da doença. Cabe ressaltar que a resposta imunológica relacionada à infecção abrange múltiplas vias que envolvem a ativação e o recrutamento de diferentes populações celulares, assim como a produção de diversas citocinas e outros fatores solúveis ativadores e reguladores da resposta imune.

Dessa forma, considerando a complexidade dos eventos imunológicos relacionados à fase aguda da infecção pelo *S. mansoni* e as limitações na identificação de pacientes portadores desta fase da infecção, esse estudo torna-se relevante por dar continuidade na busca por uma melhor compreensão da resposta imune durante a fase aguda da doença, além de constituir uma oportunidade interessante de se avaliar parâmetros clínico-laboratoriais que auxiliem na monitoração terapêutica de pacientes portadores da fase aguda da infecção.

Vale ressaltar ainda que esse trabalho foi idealizado no intuito de se testar a hipótese de que dois anos após terapêutica específica com praziquantel, alterações imunológicas e ultra-sonográficas observadas em pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes e persistentes um ano após o tratamento, se normalizem.



## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar aspectos laboratoriais, ultra-sonográficos e imunológicos associados à terapêutica específica da fase aguda da esquistossomose mansônica humana.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar parâmetros laboratoriais (exame parasitológico de fezes, eritrograma, leucograma e plaquetas) e exame ultra-sonográfico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, antes e após terapêutica específica com praziquantel;

Caracterizar alterações morfológicas no fígado e baço de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, antes e após terapêutica específica com praziquantel;

Avaliar os níveis plasmáticos de IgE total, óxido nítrico, citocinas e quimiocinas de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, antes e após terapêutica específica com praziquantel;

Avaliar os níveis de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas de granulócitos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, antes e após terapêutica específica com praziquantel, após cultivo *in vitro* na presença de antígenos solúveis de ovos e vermes adultos do *S. mansoni* (SEA e SWAP, respectivamente);

Caracterizar *ex vivo* o perfil fenotípico (marcadores de ativação, co-estimulação e adesão celular) de leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose após terapêutica específica com praziquantel.



### 3.1 Aspectos epidemiológicos e ciclo biológico da esquistossomose mansônica

A esquistossomose é uma infecção helmíntica causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, que se apresenta de forma heterogênea em humanos e em modelos experimentais (Smith et al. 2009). Atualmente, é considerada um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia e América do Sul, com destaque para as regiões da África Subsaariana (Katz & Peixoto 2000, Steinmann et al. 2006, WHO 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO 2010), existem aproximadamente 700 milhões de indivíduos expostos aos riscos de infecção e cerca de 200 milhões de infectados, entretanto, a transmissão tem diminuído significativamente em muitas regiões por meio da implementação de programas de controle da doença (Engels et al. 2002, Steinmann et al. 2006, Wilson et al. 2007, WHO 2010).

No Brasil, a esquistossomose ainda é considerada uma das mais importantes doenças endêmicas, afetando principalmente populações de baixa renda, com aproximadamente 36 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e 1,5 milhão de pessoas infectadas (Coura & Amaral 2004, Steinmann et al. 2006). A área endêmica para a esquistossomose abrange cerca de dezenove estados, ocorrendo desde os estados do Maranhão até Minas Gerais, com certa penetração no Espírito Santo. Apresenta ainda, focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Tocantins (Coura & Amaral 2004). No estado de Minas Gerais, a doença é prevalente em 519 dos 853 municípios, abrangendo uma área de 300.000 Km<sup>2</sup> (Katz 1998). Entretanto, estudos recentes têm observado uma diminuição na morbidade e prevalência da doença, devido principalmente a quimioterapia em grande escala combinada com a expansão territorial (Katz & Peixoto 2000, Coura & Amaral 2004, Amaral et al. 2006).

Dentre as espécies do gênero *Schistosoma*, duas são consideradas predominantemente parasitos humanos de relevância médica, o *Schistosoma mansoni* e o *Schistosoma hematobium*, sendo que a primeira espécie é responsável pela infecção esquistossomótica no Brasil (Katz & Peixoto 2000).

O controle total desta enfermidade, entretanto, ainda é um grande desafio para os órgãos de saúde pública. Principalmente devido às seguintes razões: (a) ampla disseminação do hospedeiro intermediário; (b) implementação de condições sanitárias e programas de educação sanitária; (c) ineficácia do tratamento na redução da prevalência (reinfecções); (d) inexistência de uma vacina eficaz para prevenir a esquistossomose (Coura & Amaral 2004, Berriman et al. 2009).

A propagação e manutenção do ciclo da doença dependem de inúmeros fatores, como a existência de clima apropriado, condições sócio-econômicas precárias, indivíduos infectados eliminando ovos, existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas susceptíveis com águas contendo cercárias. Considerando essas condições, a infecção pelo *S. mansoni* ocorre quando o hospedeiro definitivo entra em contato com águas infestadas por cercárias (estágios larvais do parasito), liberadas pelo hospedeiro intermediário, habitualmente caramujos do gênero *Biomphalaria*. No hospedeiro definitivo, as cercárias transformam-se em esquistossômulos (parasitos jovens), que migram em direção aos vasos sanguíneos e, através da circulação, são carreados para o sistema porta hepático, via pulmão (Gordon & Griffiths 1951). No sistema porta, os vermes jovens diferenciam-se em machos e fêmeas e acasalam-se nas veias mesentéricas inferiores, iniciando a postura dos ovos (cerca de 300 ovos/fêmea/dia) (Alisson et al. 1974). Parte dos ovos alcança a luz intestinal, sendo eliminados para o meio externo juntamente com as fezes, a outra parte é drenada para o fígado e/ou outros órgãos, instalando-se nos ramos intra-hepáticos mais finos da veia porta ou permanecem na parede do intestino, onde se tornam alvos da resposta imune celular do hospedeiro, que desenvolve uma reação granulomatosa típica em torno dos mesmos (Bogliolo 1959, Warren et al. 1967). Em contato com a água, os ovos eclodem liberando o miracídio (larva ciliada) que infecta o caramujo. No caramujo, o miracídio passa por um processo de reprodução assexuada que leva à formação das cercárias, fechando assim o ciclo biológico do parasito (Leiper 1915).

### **3.2 Formas clínicas da esquistossomose mansônica**

Segundo Bina (1981) a infecção esquistossomótica pode induzir quatro diferentes formas clínicas no hospedeiro definitivo, sendo uma forma aguda e três formas crônicas (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica). As apresentações clínicas são associadas com a localização do parasito, a intensidade do parasitismo e a resposta imune do hospedeiro contra a infecção.

A maioria dos indivíduos residentes em área endêmica para a esquistossomose são portadores da infecção crônica, que ocorre por volta do sexto mês após a exposição, podendo evoluir para as diferentes formas clínicas da doença. A forma clínica intestinal é a mais frequente, caracterizada por episódios ocasionais de diarreia mucossanguinolenta com dor ou desconforto abdominal; a forma clínica hepatointestinal, além dos sintomas intestinais, também apresenta hepatomegalia; já a forma clínica hepatoesplênica, pode manifestar-se sob duas diferentes formas, a forma compensada, onde é observado um quadro de hepatoesplenomegalia com menor grau de hipertensão portal, ou a forma descompensada, que

apresenta circulação colateral, varizes esofagianas com anemia acentuada, desnutrição e hiperesplenismo (Pessoa 1967, Bina & Prata 2003).

A forma clínica aguda acomete, normalmente, indivíduos não residentes em áreas endêmicas, que entram em contato com águas contaminadas por larvas do parasito pela primeira vez (Wynn et al. 2004, Jaureguiberry et al. 2005, Gryseels et al. 2006, Manzella et al. 2008). Entretanto, a fase aguda também pode ser observada em populações endêmicas, afetando principalmente crianças que são expostas ao parasito pela primeira vez (Caldas et al. 2008). Todas as espécies conhecidas de *Schistosoma* podem levar ao desenvolvimento da fase aguda da doença em humanos infectados (Jaureguiberry et al. 2010).

A fase aguda tem sido descrita como uma síndrome toxêmica, que ocorre devido ao desenvolvimento de reações toxêmicas em resposta à migração e maturação dos esquistossomulos (Corachan 2002). A maioria dos sintomas exibidos durante essa fase está associada à espécie infectante de *Schistosoma*, a carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imune eficiente (Coelho et al. 2009, Jaureguiberry et al. 2009), sendo os sinais e sintomas mais prevalentes, febre, mal-estar, diarreia, vômitos, anorexia, cefaleia, dor abdominal, perda de peso, tosse seca e hepatoesplenomegalia, acompanhados por eosinofilia acentuada e leucocitose (Wynn et al. 2004, Gryseels et al. 2006, Manzella et al. 2008). De acordo com alguns autores, esses sinais e sintomas são causados, provavelmente, por imunocomplexos circulantes e pela elevação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (De Jesus et al. 2002, Wynn et al. 2004).

A fase aguda é clinicamente dividida em pré-postural e pós-postural. A fase pré-postural inicia-se com a penetração das cercárias através da pele do hospedeiro definitivo, podendo surgir semanas após a penetração e desencadear um quadro de dermatite cercariana, caracterizado por prurido, erupção urticariforme, eritema/edema, pequenas pápulas e dor, podendo desaparecer espontaneamente (Torres 1976, Boros 1989, Bouree & Caumes 2004, Gryseels et al. 2006). Este tipo de manifestação clínica é geralmente mais intenso em casos de reinfecções, onde há participação de mastócitos, moléculas do sistema do complemento, eosinófilos e imunoglobulina IgE (Torres 1976). Essa fase pode durar de dez a trinta dias após a exposição, apresentando uma sintomatologia variada. A fase pós-postural inicia-se após o período de instalação e maturação do *S. mansoni* no sistema porta hepático, quando se dá a postura dos ovos, podendo ocorrer entre o quinquagésimo e centésimo vigésimo dia após a infecção. Esta fase é também caracterizada por uma sintomatologia variada e inespecífica (Veronesi & Focaccia 2004).

De acordo com alguns estudos, a incidência da fase aguda da esquistossomose é subestimada, pouco compreendida e sua importância relacionada, principalmente, a indivíduos de áreas urbanas e turistas que visitam regiões tropicais endêmicas como África, Brasil e Laos (Lunde & Ottsen 1980, Evengard et al. 1990, Rabello 1995, Enk et al. 2010, Jaureguiberry et al. 2010). Segundo Chen et al. (2009), a incidência da doença está altamente relacionada com um perfil de indivíduos específico, caracterizado por serem do sexo masculino, que realizam viagens por períodos breves e normalmente associadas a atividades de trabalho ou recreação. No Brasil, o crescimento do turismo rural tem contribuído consideravelmente para o surgimento de novos surtos da fase aguda da esquistossomose. Muitos relatos já foram descritos na literatura (Barbosa et al. 2000, 2001, De Jesus et al. 2002, Tomé et al. 2003, Enk et al. 2003, 2004, 2010, Massara et al. 2008), sendo em sua maioria associados a áreas rurais, sem infra-estrutura adequada de saneamento.

### **3.3 Diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansônica**

A abordagem diagnóstica da fase aguda da esquistossomose baseia-se em aspectos clínicos (sinais e sintomas), epidemiológicos (histórico de contato com águas contaminadas) e laboratoriais (presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes, eosinofilia e detecção de anticorpos específicos) (Makarova et al. 2003). Entretanto, o diagnóstico torna-se, frequentemente, um desafio, pois além da sintomatologia variada e inespecífica, a presença de ovos nas fezes, pode não ser facilmente detectável pelo exame parasitológico, já que a maioria das infecções atuais apresenta carga parasitária baixa, afetando assim, tanto os pacientes, que não recebem o tratamento adequado, podendo desenvolver formas mais graves da doença, quanto contribuindo para a manutenção do ciclo biológico da esquistossomose (Enk et al. 2008, 2010, Lambertucci 2010).

Em função da escassez de abordagens diagnósticas eficientes durante a fase aguda da esquistossomose, a avaliação abdominal ultra-sonográfica tem se destacado por sua precisão, não invasividade, baixo custo e eficácia (Lambertucci et al. 1994, Cerri & Oliveira 2002, Silva et al. 2006). A ultra-sonografia foi introduzida no âmbito da esquistossomose na década de setenta, como sendo um método de diagnóstico por imagens, baseado em propriedades específicas dos tecidos à passagem de feixes de sons de alta frequência (Hatz 2001, Richter 2003). É uma avaliação que proporciona um diagnóstico indireto, com avaliação tecidual mediante reflexões das ondas sonoras nos órgãos internos (Magalhães 2002). A velocidade de propagação das ondas sonoras se altera de acordo com os tecidos avaliados, que apresentam graus variados de absorção, refração e transmissão, ajudando em suas caracterizações (Hatz

2001, Richter 2003). A importância da ultra-sonografia está relacionada principalmente com a possibilidade de se mensurar a elasticidade e propriedades dinâmicas de órgãos como fígado e baço, assim como, os vasos relacionados, veias porta, esplênica, mesentérica superior e as colaterais (Machado 2002, Harvey 2002).

Estudos ultra-sonográficos têm sido conduzidos como ferramenta complementar à avaliação clínica dos pacientes portadores da esquistossomose. O aumento inespecífico do fígado e baço, bem como linfadenomegalia peripancreática e periportal durante a fase aguda são características marcantes (Lambertucci et al. 1994, Rabello et al. 1994), entretanto, estudos ultra-sonográficos que avaliem os possíveis danos hepáticos provocados pelo *S. mansoni* durante essa fase da infecção são ainda escassos (Lambertucci 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO 1991), a padronização do uso da ultra-sonografia na avaliação de alterações patológicas provocadas pela infecção por *S. mansoni* deve ser realizada com base nas medidas dos diâmetros longitudinais dos lobos direito e esquerdo do fígado, do diâmetro longitudinal do baço, do diâmetro interno da veia porta na metade do trajeto entre o hilo hepático e sua bifurcação e da parede anterior da vesícula biliar e os três ramos portais (incluindo as paredes) entre o primeiro e o terceiro ponto de bifurcação. Para as infecções crônicas da esquistossomose, a média das três últimas medidas segue a classificação para fibrose periportal seguinte: Grau I - média de espessura de 3 a 5 mm; Grau II - média de espessura de 5 a 7 mm; Grau III - média de espessura acima de 7 mm.

Outra abordagem complementar proposta para identificar a fase aguda da esquistossomose é a detecção de anticorpos IgG e IgM específicos para hemocianina do molusco *Megathura cremulata*, mais conhecido como Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) e presentes em portadores da fase aguda (Alves-Brito et al. 1992, Rabello et al. 1994). Entretanto, Verweij et al. (1995), já relataram a presença de anticorpos anti-KLH em pacientes infectados por outros helmintos. Uma nova abordagem proposta por Makarova et al. (2003), foi a proteína recombinante RP26 (26kDA) do *S. mansoni* capaz de diferenciar a fase aguda da crônica por ensaios de ELISA. Como já mencionado, a eosinofilia, presença de eosinófilos no sangue periférico em quantidades superiores a 600 células/mm<sup>3</sup> (Checkley et al. 2010) é também um dos critérios utilizados como diagnóstico na identificação de pacientes na fase aguda. Todavia, a eosinofilia é também característica em doenças alérgicas, reações medicamentosas, doenças do tecido conjuntivo e neoplasias, não sendo um elemento determinante do aspecto clínico quando visto isoladamente (Rocha et al. 1993, Checkley & Sanderson 2009).

### 3.4 Resposta imune na fase aguda da esquistossomose mansônica

Como já destacado anteriormente, uma série de eventos imunológicos complexos podem ocorrer durante a fase aguda da esquistossomose, tanto durante a fase pré-postural, com a presença de reação de hipersensibilidade mediada por IgE, resposta imune celular anti-esquistossômulo, resposta imune pulmonar, produção de anticorpos IgM e/ou IgG anti-esquistossômulo e produção de IgA anti-antígenos do parasito (Diaz-Rivera et al. 1956, Alves-Brito et al. 1992, Rabello et al. 1995, Lambertucci 2010), quanto durante a fase pós-postural, com a presença de reações de hipersensibilidade do tipo granulomatosa, leucocitose, eosinofilia e resposta imune celular e humoral (Pearce et al. 1991, Lukacs & Boros 1993, Caldas et al. 2008, Allam 2009, Silveira-Lemos 2004).

As formas mais graves da fase aguda da esquistossomose são caracterizadas por reações granulomatosas inflamatórias ao redor dos ovos nos tecidos do hospedeiro, com um ambiente composto por citocinas pró-inflamatórias, enquanto as formas menos graves da doença correspondem a uma inflamação hepática reduzida e um ambiente composto por citocinas anti-inflamatórias (Smith et al. 2009).

As reações granulomatosas na fase aguda da infecção têm início quando as células apresentadoras de antígenos (APC) (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) capturam, processam e apresentam os antígenos solúveis dos ovos de *S. mansoni* (SEA), via Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHCII) aos linfócitos TCD4<sup>+</sup> que liberam inicialmente citocinas inflamatórias (Mathew & Boros 1986, Stadecker et al. 2004). A ativação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> é eficiente quando há interação entre as moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), presentes nas APC, com a molécula CD28, presente nos linfócitos (Lenschow et al. 1996, Stavitsky 2004). Uma via alternativa que também pode ocorrer é quando as citocinas IL-4 e IL-13 estimulam os macrófagos ativados a produzirem arginase I, que por sua vez, promove a secreção de TGF- $\beta$ , mas, suprime a produção de IL-6, IL-12 e IL-23, reduzindo assim, a resposta do Tipo 1 e promovendo a fibrose e a produção de citocinas do Tipo 2 (Herbert et al. 2010, Pesce et al. 2009).

Estudos em modelos experimentais já demonstraram que a infecção esquistossomótica, assim como outras infecções helmínticas, está associada a uma intensa resposta do Tipo 2. No entanto, nos estágios iniciais da doença, a reação imunológica envolve a produção de citocinas do Tipo 1, como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , que dão lugar a uma resposta do Tipo 2 após a postura dos ovos, caracterizada pela expressão de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, suprimindo a resposta do Tipo 1 e induzindo a formação dos granulomas ao redor dos ovos. A

incapacidade de desenvolver uma resposta do Tipo 2 eficaz pode ser fatal (Chiaramonte et al. 1999).

O estágio inicial de formação do granuloma envolve a participação de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular-1 (ICAM-1), induzida por citocinas como IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que promovem a ativação de macrófagos e linfócitos T, contribuindo para a formação do granuloma (Bevilacqua 1993, Ritter & Mckerrow 1996, Stadecker et al. 2004). Em modelo murino da fase aguda da esquistossomose, Speziali et al. (2010) avaliando o fígado de camundongos CD57BL/6 observaram um aumento na formação de granulomas, com presença de fibrose e produção de células inflamatórias, associadas à produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.

Com o decorrer da fase aguda da infecção, o granuloma tende a diminuir de tamanho, resultando na redução da inflamação, essa fase é denominada de modulação, onde a reação granulomatosa é regulada por um complexo balanço de citocinas, no qual a ausência de IFN- $\gamma$  contribui para modulação do granuloma (Montesano et al. 1997, Pancre et al. 1999, Caldas et al. 2008). Mecanismos moduladores alternativos têm sido descritos: segundo Anthony et al. 2010, os ovos de *S. mansoni* exercem ainda uma influência significativa nas células hepáticas estreladas (HSC), causando a inibição da fibrogênese e um fenótipo quiescente nessas células, que são fundamentais na indução da fibrose durante a infecção esquistossomótica. Além desses, existem mecanismos já conhecidos que envolvem a participação de células T, células T reguladoras (Treg), monócitos e/ou macrófagos, fatores solúveis, anticorpos e imunocomplexos (Goes et al. 1989, Pancre et al. 1999, Hesse et al. 2001, Taylor et al. 2006, Herbert et al. 2010).

A resposta imune celular exacerbada também é uma das características marcantes durante a fase aguda da infecção esquistossomótica, onde se observa o envolvimento diferencial de populações celulares como eosinófilos e neutrófilos (Lambertucci 2010, Jaureguiberry et al. 2010).

Os eosinófilos são leucócitos pleiotrópicos, envolvidos na iniciação e propagação das respostas inflamatórias, incluindo infecções helmínticas, bacterianas, virais, neoplasias e alergias (Rothenberg 1998, Hogan et al. 2008). Vários estudos já demonstraram a associação entre infecção helmíntica e eosinofilia (Barbosa et al. 2001, De Jesus et al. 2002, Silveira-Lemos 2004, Anthony et al. 2007, Jaureguiberry et al. 2007, Silveira-Lemos 2008, Teixeira-Carvalho et al. 2008, Checkley & Sanderson 2009). Entretanto, os mecanismos e as funções dos eosinófilos não são totalmente compreendidos. Algumas linhas de pesquisa apontam para funções exercidas por essas células como, modulação da imunidade adaptativa (MacKenzie et

al. 2001, Rothenberg & Hogan 2006) e participação na resposta imune de mucosas (Mishra et al. 1999, Rothenberg 2004). Além disso, os eosinófilos estão associados com a resposta desenvolvida durante a imunidade inata, por serem fonte de citocinas como IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 (Rothenberg & Hogan 2006).

Na esquistossomose, o evento de eosinofilia é atribuído ao aumento da produção da IL-5 e outras citocinas como IL-1, IL-3, GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos) e G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos) (Clutterbuck et al. 1989, Weller 1992, Reiman et al. 2006). Tem sido proposto que durante a infecção esquistossomótica não haja somente um aumento do número de eosinófilos, mas também um aumento da atividade dessas células, o que explicaria um papel protetor dessa população celular em infecções helmínticas (Silveira-Lemos et al. 2008). Entretanto, duas linhagens murinas deficientes na produção de eosinófilos recentemente estudadas, não demonstraram alterações significativas na carga parasitária, na formação do granuloma ou regressão da fibrose quando os animais foram infectados pelo *S. mansoni* (Swartz et al. 2006). Todavia, deve-se considerar que os eosinófilos podem apresentar diferentes estágios de ativação, além de exercer atividades anti- e pró-inflamatórias ou imunorreguladoras, através da produção de diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Munitz & Levi-Schaffer 2004, Bandeira-Melo & Weller 2005, Hogan et al. 2008).

Os neutrófilos por sua vez, são leucócitos tipicamente associados com a imunidade antimicrobiana, entretanto, estudos recentes têm demonstrado a participação dessas células em infecções helmínticas (Morimoto et al. 2004, Anthony et al. 2006, 2007). Os neutrófilos são ativados e recrutados para os sítios de infecção durante a invasão dos parasitos nos tecidos. Os estímulos quimiotáticos para os neutrófilos podem derivar de linfócitos T sensibilizados e produtos de ativação do sistema complemento (Anthony et al. 2006).

A função dos neutrófilos é essencialmente dependente de um processo imune, tanto celular quanto humoral, não atuando como uma entidade celular independente e sim, em coordenação com outras populações celulares, incluindo eosinófilos e macrófagos, podendo assim, combater a infecção de forma eficiente (Atta et al. 1981, Anthony et al. 2007).

Durante a infecção pelo *S. mansoni*, Taylor et al. (2006) observaram pouco efeito da depleção de neutrófilos na severidade da esquistossomose. Geralmente, entretanto, os neutrófilos são reconhecidos como componentes importantes da resposta do Tipo 2 durante as infecções helmínticas (Anthony et al. 2007).

Os mecanismos utilizados pelos neutrófilos para destruírem as larvas de *S. mansoni* são fortemente associados aos mecanismos exibidos pelos eosinófilos, como a secreção de

várias proteínas citotóxicas (MBP - Proteína básica principal; EPO - Peroxidase eosinofílica; ECP - Proteína catiônica eosinofílica), mediadores lipídicos (Prostaglandinas; Tromboxanos; Fator Agregador de Plaquetas) e radicais derivados do oxigênio ( $H_2O_2$ , NO,  $OH^-$ ), que também possuem atividade tóxica (Cara et al. 2000).

Tanto os eosinófilos quanto os neutrófilos podem produzir um derivado do oxigênio denominado óxido nítrico (NO), que é capaz de controlar uma grande variedade de processos biológicos, como a homeostase da pressão sanguínea, agregação plaquetária e transmissão de sinais pelo sistema nervoso, tendo papel inclusive no processo de ativação dos macrófagos e células de defesa (Durner et al. 1999). O NO é produzido pela enzima NO sintetase (iNOS) e foi identificado como um fator citotóxico importante e versátil envolvido na regulação do sistema imune e na defesa contra parasitos (Khatsenko et al. 1993, Oliveira et al. 1998). Com base em modelos murinos de infecção esquistossomótica já foi observado que existe um aumento da expressão de iNOS na pele de camundongos vacinados com cercárias de *S. mansoni* (Ramaswamy et al. 1997). Entretanto, seu papel nos processos inflamatórios permanece incerto, uma vez que propriedades anti- e pró-inflamatórias tem sido atribuídas ao NO, variando de acordo com sua concentração ou depuração tecidual (Flora & Zilberstein 2000).

Além de funcionar como uma molécula sinalizadora o NO tem atividade antimicrobiana e citotóxica em processos envolvendo aumento dos níveis de circulação de toxinas bacterianas ou citocinas (Nathan & Hibbs 1991). Segundo Liew (1995) o NO pode se tornar um mediador importante no equilíbrio das citocinas do Tipo 1 e do Tipo 2 na esquistossomose. As células do Tipo 1 produzem  $IFN-\gamma$ , que induz NO, enquanto células do Tipo 2 produzem IL-10 e IL-4 que podem inibir a transcrição de iNOS. O NO também pode ser produzido por células do Tipo 1 e sua proliferação pode ser inibida por suas elevadas concentrações, assim, além de ser um mediador da interação das respostas do Tipo 1 e 2 o NO pode ser uma importante molécula reguladora (Pearce et al. 1995). Oliveira et al. (1998, 1999) correlacionaram a presença de NO com a reação granulomatosa *in vivo* e *in vitro* estimulada com SEA e SWAP e observaram uma diminuição da proliferação celular, sugerindo um possível papel regulador do NO na formação do granuloma. O NO parece ter um papel central na regulação da reação granulomatosa na esquistossomose humana (Oliveira, 2000).

A exposição de células de pacientes portadores da esquistossomose aos diferentes antígenos de *S. mansoni* também vem sendo amplamente estudada. Desde a década de 80, vêm sendo realizados ensaios de reatividade celular aos antígenos solúveis de diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni*, entre estes os de vermes adultos totais (SWAP), tegumento

de vermes adultos (TEG), cercárias (CERC), esquistossômulos (SOM) e ovos (SEA) (Gazzinelli et al. 1983). Desde então, foi demonstrado que a reatividade celular aos antígenos do parasito é muito mais acentuada na fase aguda do que na fase crônica da doença (Gazzinelli et al. 1985). Na fase crônica em geral, observa-se uma intensa resposta proliferativa direcionada ao SWAP e uma fraca resposta ao SEA (Boros et al. 1975, Bahia-Oliveira et al. 1992, Talaat et al. 2007). Entretanto, Teixeira-Carvalho et al. (2008) observaram padrões de citocinas diferenciados em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas crônicas da esquistossomose frente ao estímulo com SEA, demonstrando níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-10 em pacientes portadores da forma clínica intestinal e predomínio de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica da doença.

Malaquias et al. (1997) mostraram que o tratamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de infecção esquistossomótica aguda com anticorpo anti-IL-4 reduziu significativamente a proliferação celular, diante do estímulo SEA, porém, isso não ocorreu quando o estímulo utilizado foi o SWAP. Contigli et al. (1999) avaliaram clones e linhagens de células T isolados de portadores das formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose e de indivíduos saudáveis. Os resultados encontrados revelaram um padrão diferenciado de citocinas nesses indivíduos. Os portadores da esquistossomose apresentaram um perfil de citocinas do Tipo 2 e Tipo 2/Tipo 0, produzindo IL-4 e IL-5 durante a fase aguda e IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  durante a fase crônica, enquanto os indivíduos saudáveis apresentaram um perfil do Tipo 1/Tipo 0, produzindo IFN- $\gamma$  ou IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ .

Montenegro et al. (1999) e De Jesus et al. (2002) demonstraram que PBMC de pacientes com esquistossomose aguda responderam ao SEA e ao SWAP, produzindo grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , em comparação aos pacientes com esquistossomose crônica. Já para a citocina IL-10, esses grupos apresentaram níveis similares. Esses autores detectaram ainda uma resposta de IL-5 antígeno-específica, sugerindo que o padrão de expressão de citocinas seja caracterizado por um perfil misto (Tipo 1 e 2). Por outro lado, De Jesus et al. (2002) detectaram baixos níveis de IL-5 após o estímulo por SEA.

A IL-5 está relacionada ao recrutamento de eosinófilos, proliferação e diferenciação de células B (Sher et al. 1990, Weinstock 1992), enquanto IL-13 e IL-4 inibem a produção de citocinas inflamatórias (Minty et al. 1993, De Waal Malefyt et al. 1993) e promovem a expressão de MHCII e CD23 por monócitos/macrófagos e linfócitos B (De Waal Malefyt et al. 1993). Além disso, essas citocinas induzem, *in vitro*, a troca de classe para IgE e promovem a síntese de IgG e IgM (Minty et al. 1993, McKenzie et al. 1993, Defrance et al.

1994, Cocks et al. 1993, Chiaramonte et al. 1999). Falhas no desenvolvimento de uma resposta Tipo 2 efetiva pode resultar em uma reação granulomatosa exacerbada, provocada, principalmente, por células dos Tipos 1 e 17 (Anthony et al. 2007).

As células da resposta Tipo 17 representam um subtipo celular TCD4<sup>+</sup>, caracterizado por células produtoras de IL-17, considerada como mediadora de processos inflamatórios crônicos (Cua et al. 2003, Anthony et al. 2007). Rutitzky et al. (2005) demonstraram que camundongos isogênicos da raça CBA, que desenvolvem patologia exacerbada naturalmente, apresentam altos níveis de IL-17 e que essa patologia pode ser reduzida através de anticorpos anti-IL-17.

Outro subtipo de células T são as células T reguladoras (T<sub>REG</sub>). Estudos mostram que infecções por nematódeos podem induzir expansão natural dessa população celular (Summers et al. 2003, Saunders et al. 2007), sugerindo um papel modulador das células T<sub>REG</sub> em processos inflamatórios (Belkaid & Rouse 2005, Anthony et al. 2007). Alguns estudos têm sugerido que as células T<sub>REG</sub>, mediadas por IL-10, desempenhem função na supressão da resposta do Tipo 1 contra SEA (Hesse et al. 2004, Freeman et al. 2005). Entretanto, achados mais recentes indicam que estas células poderiam exercer seu papel através de um mecanismo, ainda desconhecido, porém, independente de IL-10 (Mckee & Pearce 2004, Baumgart et al. 2006, Taylor et al. 2006).

A resposta imunológica e a inflamação granulomatosa relacionadas à infecção pelo *S. mansoni* abrangem múltiplas vias que envolvem a ativação e o recrutamento de diferentes populações celulares, bem como a produção de diversas citocinas e fatores solúveis. Nesse contexto, as quimiocinas e seus receptores tornam-se elementos chaves no processo de recrutamento de leucócitos.

As quimiocinas são pequenas proteínas com quatro cisteínas conservadas que formam duas pontes dissulfeto. Estão agrupadas em duas diferentes famílias de acordo com a posição das duas primeiras cisteínas, que estão adjacentes (CC), ou separadas por um aminoácido (CXC) (Baggiolini 1998). A maioria das quimiocinas é produzida em condições patológicas pelas células teciduais e pelo infiltrado leucocitário (Moser & Willmann 2004). As quimiocinas produzidas durante os processos inflamatórios são determinantes da extensão, do tipo e da duração do processo migratório de células para o tecido, sendo a regulação celular da expressão dos receptores dessas moléculas um fator importante no processo de migração (Sallusto et al. 2000).

Os receptores de quimiocinas por sua vez, compreendem uma família de sete domínios transmembrânicos unidos a uma proteína G e possuem atividade em leucócitos, onde teriam

importância no desenvolvimento, diferenciação, distribuição anatômica, tráfego e função efetora das células (Ono et al. 2003), sendo portanto, fundamentais na ativação e regulação da resposta imune inata e adaptativa.

A posição relativa de um resíduo de cisteína na molécula define quatro motivos estruturais para os receptores de quimiocinas (CC, CXC, CX3C e XC). Cerca de dezoito receptores foram descritos, receptores para as quimiocinas CC (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, e CCR10), receptores para CXC (CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 e CXCR6), receptor para a quimiocina CX3C (CX3CR1) e receptor para a quimiocina XC (XCR1) (Rottman 1999, Horuk 2001, Ono et al. 2003).

A avaliação da função de quimiocinas e seus receptores contribuem para um melhor entendimento de aspectos imunológicos em doenças infecciosas, inflamatórias e virais (Murphy et al. 2000). Esses dados, além de permitirem estudos acerca dos processos imunológicos, também proporcionam conhecimentos básicos para a manipulação da resposta imune, assim como, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Mackay 2001).

Até o momento, poucos estudos abordaram o papel das quimiocinas e seus receptores na esquistossomose humana. Segundo Falcão et al. (2002), pacientes portadores das formas clínicas crônicas da doença demonstram altos níveis de MIP-1 $\alpha$ , RANTES e CCL24 em comparação aos indivíduos não infectados. Silveira-Lemos (2004) observou em pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose um aumento no percentual médio de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando os receptores CCR2 e CCR5, sugerindo que essa fase seja influenciada tanto por fatores da resposta imune do Tipo 1 quanto do Tipo 2. Teixeira-Carvalho et al. (2008) observaram a expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CXCR4 em linfócitos TCD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma clínica intestinal, demonstrando que esses fatores poderiam estar associados aos eventos benéficos da imunomodulação da forma crônica intestinal na esquistossomose humana. No entanto, Silveira-Lemos et al. (2010) avaliaram o recrutamento de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, através da avaliação das quimiocinas CXCL8, CCL2, CCL3 e CCL24 e dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 e CXCR4, e observaram níveis elevados de todas as quimiocinas avaliadas e níveis reduzidos de CXCR1 e CXCR2. A avaliação da associação entre as quimiocinas e seus receptores revelou que os pacientes com infecção aguda que exibiram níveis reduzidos de CCL24 foram os mesmos que apresentaram elevados níveis de CCL3, CCR5 e CXCR3, sugerindo que a CCL24 possa influenciar a cinética das quimiocinas e seus receptores no recrutamento de eosinófilos.

Estudos *in vitro* envolvendo a quimiocina CCL24 demonstram que esta é uma molécula ativadora e quimioatraente de eosinófilos (Jose et al. 1994, Kita & Gleich 1996).

Do ponto de vista da resposta imune humoral, vários trabalhos mostram que as classes e subclasses de anticorpos *anti-Schistosoma* variam de acordo com parâmetros inerentes ao hospedeiro. Sabemos que o isotipo IgG4 é ineficiente na ativação do complemento (Iskander et al. 1981). Além disso, compete com IgE específica na ligação a antígenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, bloqueando a sua desgranulação (Stanworth & Smith 1973). Caldas et al. (2000) encontraram aumento nos níveis de IgE contra SWAP e redução de IgG4 contra SEA em soro de indivíduos resistentes à reinfeção após o tratamento específico, sugerindo que a resistência à reinfeção dependa do balanço entre os níveis de IgE e IgG4.

Durante a infecção aguda pelo *S. mansoni* os leucócitos circulantes exibem um perfil imunofenotípico diferenciado, com uma diminuição do percentual médio de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. Por outro lado, ocorre um aumento do percentual médio de linfócitos TCD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, B-1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) e um aumento da expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 por linfócitos TCD4<sup>+</sup> (Martins-Filho et al. 1999, Silveira-Lemos 2004). De acordo com esses resultados, os autores sugeriram que possa estar havendo uma ativação diferencial de subpopulações de células T durante a fase aguda da esquistossomose humana.

Diante dos mecanismos imunológicos expostos fica evidente que a infecção causada pelo *S. mansoni* desencadeia respostas imunológicas complexas, principalmente em relação à fase aguda, à intensidade e gravidade da doença.

### **3.5 Tratamento para a esquistossomose mansônica**

Atualmente, a estratégia de controle mais eficaz para o combate à esquistossomose mansônica é a quimioterapia específica em massa, sendo o praziquantel o composto ativo mais eficiente contra todas as espécies de *Schistosoma* (Salvioli et al. 1997, Jaureguiberry et al. 2007, Lambertucci 2010). O praziquantel começa a atuar cerca de uma hora após sua administração, provocando paralisia das contrações musculares do parasito, dano tegumentar e aumento na exposição de antígenos na superfície do parasito. Seus efeitos colaterais podem variar de acordo com os indivíduos, mas normalmente, são leves, incluindo náuseas, vômitos, mal-estar e dor abdominal (Stelma et al. 1995, Gryseels et al. 2006). Além disso, é uma droga que apresenta poucos efeitos sobre ovos e vermes imaturos do *Schistosoma*, sendo que ovos retidos nos tecidos podem ser excretados após o tratamento (Renganathan & Cioli 1998).

Atualmente, o Ministério da Saúde utiliza o praziquantel produzido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz), que é apresentado em comprimidos de 600 mg, administrados por via oral. O Ministério recomenda uma dose única de 50 mg/kg de peso corporal para adolescentes acima de 15 anos e adultos e 60 mg/kg para crianças de até 15 anos (Brasil 2010). Após o tratamento, são relatadas taxas de cura de até 60% durante a fase aguda e 90% durante a fase crônica, com redução da contagem de ovos acima de 90% entre os não curados (Utzinger et al. 2000, Gryseels et al. 2006, Katz 2008). Nas populações expostas às reinfecções, com número de ovos elevado, a taxa de cura pode ser reduzida, podendo a dose do medicamento ser aumentada e fracionada (Davis 1993).

A fase aguda da esquistossomose pode ser inicialmente tratada com corticosteróides para suprimir a reação de hipersensibilidade e, posteriormente, com praziquantel para eliminar os vermes (Lambertucci 1993, Horak & Kolarova 2005). No caso de varizes esofágicas hemorrágicas, os beta-bloqueadores, escleroterapia endoscópica, esplenectomia ou desvio portocaval poderão ser indicados (Lambertucci 1993, Olds & Dasarathy 2000). Outra droga que pode ser utilizada no combate à infecção esquistossomótica é a oxamniquine, entretanto, essa droga atua somente sobre formas jovens do *S. mansoni* (Olds & Dasarathy 2000, Fenwick et al. 2003), possuindo uma eficácia semelhante ao praziquantel, contudo, seus efeitos colaterais são mais pronunciados e já existem trabalhos na literatura demonstrando resistência a esse medicamento (Lambertucci et al. 2000, Saconato & Atallah 2000). Outra alternativa de tratamento são os derivados da artemisinina, compostos ativos contra parasitos da malária e vermes imaturos do *S. mansoni* (Xiao et al. 2002). Entretanto, o uso desses compostos, em áreas endêmicas para a malária, não é recomendado devido ao risco dos parasitos da malária tornarem-se resistentes a essa droga (Gryseels et al. 2006).

A ausência ou melhora discreta do quadro clínico da esquistossomose após o tratamento específico tem sido relatada na literatura (Lambertucci et al. 1982, Gryseels et al. 1994, Homeida et al. 1996, Boisier et al. 1998, Frenzel et al. 1999, Martins-Leite et al. 2008, Jaureguiberry et al. 2007, Pinto-Silva et al. 2010). No geral, a prevalência e a intensidade da infecção reduzem-se acentuadamente após o tratamento. Toure et al. (2008) avaliaram o impacto de dois anos de tratamento com praziquantel sobre a infecção esquistossomótica em Burkina Faso, África, e observaram uma redução significativa da prevalência e intensidade da infecção por *S. haematobium*, demonstrando a eficácia do tratamento para o controle da doença. Segundo Frenzel et al. (1999), pacientes portadores de esquistossomose crônica demonstraram redução da fibrose hepática, após dois anos e sete meses de tratamento com praziquantel.

Em relação à resposta imunológica pós-tratamento específico alguns trabalhos têm demonstrado respostas heterogêneas, que variam de acordo com os antígenos utilizados e o período de avaliação (Fitzsimmons et al. 2004, Joseph et al. 2004). No geral, a maioria dos estudos imunológicos pós-tratamento foram realizados em pacientes portadores das formas clínicas crônicas da esquistossomose. Martins-Leite et al. (2008), utilizando pacientes portadores da fase crônica da doença, demonstraram que os níveis de IFN- $\gamma$ , induzidos por SEA, diminuíram, significativamente, nas formas mais graves da doença, não se alterando nas demais formas clínicas. Esse mesmo estudo mostrou que os níveis de IL-4, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  não se alteraram significativamente em resposta ao SEA. Entretanto, o estudo realizado por De Souza et al. (2007) avaliando o efeito do tratamento com oxamniquine em pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, demonstraram que os níveis de IFN- $\gamma$  aumentam, significativamente, em resposta aos antígenos SEA e SWAP e os níveis de IL-4 não se alteram. Além disso, foram observadas alterações como leucocitose, eosinofilia e altos níveis de IgE total antes do tratamento, com posterior redução desses parâmetros pós-tratamento. Esses autores sugerem ainda, que o tratamento da forma clínica aguda promoveria um direcionamento para uma resposta imune do Tipo 1, entretanto, a função exata dos fatores envolvidos na resposta do Tipo 1 ainda requer elucidação.

Costa-Silva (2009) durante a avaliação do perfil imunofenotípico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, na primeira parte desse estudo, antes e um ano após o tratamento, observou um aumento de linfócitos TCD3<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e um aumento da ativação e adesão celulares determinado pela elevação da expressão das moléculas CD28, CD80, CD86, CD25, HLA-DR, CD69, CD18, CD44 e CD54 em leucócitos do sangue periférico de pacientes avaliados antes do tratamento. Com relação aos receptores de quimiocinas foi observado aumento da expressão de CCR5 e CXCR3. Contudo, embora, a maioria dos aspectos imunofenotípicos avaliados antes do tratamento tenham retornado à normalidade um ano após quimioterapia, algumas alterações imunológicas ainda permaneceram (aumento do número absoluto de CD28, CD80, CD86, CD18, CCR2, CXCR3 em eosinófilos, diminuição de CD62L em neutrófilos, aumento de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e de CD18 em linfócitos TCD4<sup>+</sup>). A permanência dessas alterações, mesmo um ano após o tratamento, sugere um impacto a longo prazo da terapêutica específica pós-fase aguda da infecção esquistossomótica sobre o estado geral dos pacientes. Em função da permanência dessas alterações é que se realizou esse estudo de avaliação laboratorial, imunológica e ultrassonográfica dois anos após terapêutica específica com praziquantel.

#### **4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Descrição da área estudada**

Os indivíduos avaliados nesse estudo entraram em contato com as formas infectantes do *S. mansoni* presentes em coleções hídricas contaminadas, em uma casa de campo localizada na Zona Rural de Igarapé, Município pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte – Minas Gerais (MG), durante o feriado de carnaval do ano de 2006. O local é frequentemente alugado durante finais de semanas e feriados prolongados, possuindo uma casa ampla, com uma piscina e uma ducha abastecidas por água natural proveniente do córrego Igarapé. Foi realizada uma inspeção na casa de campo, no ano de 2006, pelos pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Dr. Cristiano Lara Massara e Dr. Martin Johannes Enk, na qual observou-se ausência de saneamento básico, sendo que toda a água utilizada na residência era desprezada em uma represa vizinha. Foi realizada ainda, pesquisa malacológica nas coleções hídricas e foram detectados moluscos *Biomphalaria glabrata* eliminando cercárias de *S. mansoni* (Costa-Silva 2009).



**Figura 1:** Casa de campo localizada na Zona Rural de Igarapé, Município pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte - MG. Vista geral da casa de campo, na qual é possível observar a piscina de água natural abastecida pelo córrego Igarapé.



**Figura 2:** Casa de campo localizada na Zona Rural de Igarapé, Município pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte - MG. Represa vizinha à casa, na qual toda a água utilizada pelos turistas era desprezada.

## 4.2 Caracterização da população avaliada

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de fezes e sangue periférico de indivíduos normais e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni, que foram subdivididos em cinco grupos de estudo. Os *Grupos 1 e 2* foram denominados grupos controles do estudo, sendo formados por indivíduos saudáveis (homens e mulheres), doadores de sangue da Fundação Hemominas de Belo Horizonte - MG (n=9), com idade variando entre 18 a 45 anos para parâmetros os hematológicos e imunofenotípicos e indivíduos saudáveis (n=12), não infectados pelo *S. mansoni* para parâmetros ultrasonográficos, respectivamente. Vale ressaltar que esses indivíduos foram selecionados após teste sorológico negativo para doença de Chagas, leishmaniose, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite e apresentavam exame parasitológico de fezes negativo para o *S. mansoni* e outros helmintos anteriormente à sua avaliação. Além disso, esses indivíduos não apresentavam ter contato com área endêmica. Os grupos 3, 4 e 5 foram formados por pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni sendo: *Grupo 3*, composto por 16 pacientes (homens – n = 07 e mulheres – n = 09) portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, avaliados antes do tratamento específico (AGD-AT), com idade variando entre 05 a 35 anos e contagem de ovos por grama de fezes (opg) variando de 04 a 768; *Grupo 4*, composto por pacientes (homens e mulheres) portadores da forma clínica aguda da esquistossomose (n=13), avaliados um ano após terapêutica específica com praziquantel (AGD-PT I); *Grupo 5*, composto por pacientes (homens e mulheres) portadores da forma clínica aguda da esquistossomose (n=11), avaliados dois anos após terapêutica específica com praziquantel (AGD-PT II) (**Tabela 1**).

O diagnóstico da forma clínica aguda da esquistossomose foi baseado em dados epidemiológicos (contato recente com água contaminada com as formas infectantes do *S. mansoni*), clínicos (enterocolite aguda, náuseas, vômitos, dor abdominal, febre, dor de cabeça, perda de peso, tosse, dermatite cercariana, hepatomegalia e esplenomegalia) e laboratoriais (eosinofilia e ovos viáveis de *S. mansoni* nas fezes) (Barata et al. 1999).

Todos os pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni*, independente da sua participação nesse estudo, foram submetidos ao tratamento com praziquantel na dose padrão brasileira, 50 mg/Kg de peso para adultos e 60 mg/Kg de peso para crianças (Disch et al. 2002, Costa-Silva 2009, Enk et al. 2010). Posteriormente ao tratamento, alguns pacientes relataram o aparecimento de determinadas reações adversas relacionadas ao medicamento, tais como náuseas, vômitos, tonteira, dor abdominal e sonolência. Além disso, um paciente

relatou que apresentou paralisia momentânea de membros inferiores após administração do praziquantel.

É importante mencionar que todas as avaliações propostas para o estudo, incluindo exame parasitológico de fezes, avaliação de parâmetros hematológicos, exame ultrassonográfico e avaliações imunológicas foram realizadas antes, um ano e dois anos após a terapêutica específica com praziquantel.

A inclusão dos pacientes neste trabalho seguiu critérios de inclusão e exclusão, que estão descritos a seguir:

#### ***4.2.1 Critérios de inclusão***

Após avaliação clínica e parasitológica, os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- Idade compreendida entre 05 a 65 anos;
- Indivíduos que relataram ausência de tratamento com drogas anti-helmínticas nos últimos 24 meses;
- Conclusão dos exames propostos;
- Assinatura de consentimento livre e esclarecido pelo voluntário ou responsável.

#### ***4.2.2 Critérios de exclusão***

Foram excluídos deste estudo pacientes que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima ou que apresentaram:

- Impossibilidade para a realização dos exames propostos;
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol) (Skinner et al. 1984);
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos;
- Anemia significativa, definida como hemoglobina menor que 10 g/dL (Stoltzfus & Dreyfuss 1998).

Todos os indivíduos que aceitaram participar voluntariamente deste estudo puderam retirar-se quando desejado, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico e tratamento terapêutico (**Tabela 1**).

Além disso, este trabalho cumpriu com as disposições da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, sendo aprovado pelos Comitês de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

É importante ressaltar ainda que, a primeira parte desse estudo, a avaliação um ano após o tratamento específico constituiu tema da dissertação de mestrado do estudante Matheus Fernandes Costa e Silva, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Durante este estudo, verificou-se que as alterações ultra-sonográficas esplênicas e hepáticas permaneciam um ano após tratamento específico e estavam associadas com alterações imunofenotípicas. Dessa forma, esse projeto foi ampliado e a segunda parte do estudo de avaliação dos parâmetros propostos dois anos após terapêutica específica constituiu tema dessa dissertação de mestrado.

**Tabela 1:** Caracterização da população avaliada

| GRUPOS  | SIGLAS    | VARIAÇÃO IDADE (ANOS) | VARIAÇÃO (OPG) | FEM. | MASC. | TOTAL |
|---|-----------|-----------------------|----------------|------|-------|-------|
| Grupo controle doadores de sangue                             | CT        | 18-45                 | 0-0            | 05   | 04    | 09    |
| Grupo controle parâmetros ultrasonográficos                   | CT*       | 10-38                 | 0-0            | 07   | 05    | 12    |
| Portadores da forma clínica aguda – Antes do tratamento       | AGD-AT    | 05-35                 | 04-768         | 09   | 07    | 16    |
| Portadores da forma clínica aguda – Um ano após tratamento    | AGD-PT I  | 05-31                 | 0-0            | 07   | 06    | 13    |
| Portadores da forma clínica aguda – Dois anos após tratamento | AGD-PT II | 08-31                 | 0-0            | 05   | 06    | 11    |

CT/CT\* – Grupo controle

AGD-AT – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT I – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT II – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

OPG – Ovos por grama de fezes

### ***4.3 Exame parasitológico de fezes***

Os exames parasitológicos foram realizados pelos Drs. Cristiano Lara Massara e Martin Johannes Enk do Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica do CPqRR. A presença e o número de ovos do *S. mansoni*/grama de fezes foram determinados por meio do exame de seis lâminas de uma amostra de fezes de cada paciente, utilizando-se o método parasitológico de Kato-Katz (Katz et al. 1972). A contagem do número total de ovos por grama de fezes de cada indivíduo foi apresentada pelo resultado da média aritmética da leitura das seis determinações e definida como ovos por grama de fezes (opg). O método Kato-Katz é o método de escolha para determinação da intensidade de infecção e tem sido amplamente utilizado em estudos epidemiológicos (Enk et al. 2008).

### ***4.4 Avaliação de parâmetros clínicos***

Os participantes do estudo foram submetidos a anamnese detalhada, realizada pelo Dr. Martin Johannes Enk, médico que possui ampla experiência na avaliação clínica de pacientes portadores de esquistossomose mansônica. Uma ficha de registro com os seguintes dados de identificação foi preenchida: número do protocolo, nome, sexo, idade, naturalidade e escolaridade. Durante a anamnese as informações consideradas foram: sintomas gerais (adinamia, hiporexia, emagrecimento, febre, dor de cabeça); sintomas digestivos (dor abdominal, náuseas, vômitos, hematêmese, diarreia, hematoquesia); sintomas de outros aparelhos e sistemas; história pregressa: contato com águas naturais (localidade, frequência e regularidade); manifestações cutâneas após contato com águas; tratamentos anteriores para esquistossomose mansoni (medicamentos utilizados); cirurgias; outras doenças; hábitos ou passado mórbido; história familiar e social. Todos os parâmetros avaliados nesse trabalho foram disponibilizados para leitura científica por meio de publicação recente de Enk et al. (2010).

### ***4.5 Avaliação de parâmetros hematológicos***

O perfil hematológico da população avaliada foi determinado por meio do hemograma, realizado por um laboratório terceirizado (Laboratório Paula Castro - Medicina Laboratorial/Belo Horizonte/MG), através de um contrato firmado entre o laboratório e o CPqRR. As determinações foram realizadas por sistema automatizado de contagem por citometria de fluxo, utilizando-se sangue periférico, coletado em tubos de 5 mL, contendo

como anticoagulante o EDTA (Etilenodiaminotetracético). Os parâmetros avaliados foram contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina e número de plaquetas, global de leucócitos e diferencial de células com determinação do percentual e do número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

#### **4.6 Exame ultra-sonográfico**

Os pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose e indivíduos não infectados pelo *S. mansoni* foram submetidos ao exame de ultra-sonografia abdominal, utilizando-se o aparelho modelo Nemio SSA/550<sup>a</sup> (Toshiba) transdutor convexo de 3.75 MHz para indivíduos maiores que dez anos de idade e 5.0 MHz para indivíduos menores que dez anos de idade. Todos os participantes desse estudo foram examinados pela Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Barbosa Álvares, médica da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte - MG, que possui ampla experiência na avaliação ultra-sonográfica de pacientes portadores da infecção pelo *S. mansoni*. O exame foi realizado com os indivíduos em decúbito dorsal e jejum mínimo de seis horas (**Tabela 2**).

Nesse estudo, adotou-se a classificação da OMS (1991) para avaliar a morbidade provocada pela infecção pelo *S. mansoni* em relação ao aumento da ecogenicidade periportal, descrita abaixo:

**Grau 0:** espessamento da parede dos ramos periportais < 3 mm (ausência de fibrose);

**Grau I:** espessamento da parede dos ramos periportais entre 3 a 5 mm (fibrose incipiente);

**Grau II:** espessamento da parede dos ramos periportais entre 5 a 7 mm (fibrose moderada);

**Grau III:** espessamento da parede dos ramos periportais superior a 7 mm (fibrose grave).

**Tabela 2:** Critérios e parâmetros avaliados nos exames ultra-sonográficos

| CRITÉRIOS AVALIADOS                                       | PARÂMETROS                           |
|---|--------------------------------------|
| Textura do parênquima hepático                            | Homogêneo ou Heterogêneo             |
| Superfície do fígado                                      | Regular ou Irregular                 |
| Medida do lobo esquerdo do fígado                         | mm (LELON e LEAP)                    |
| Medida do lobo direito do fígado                          | mm (LDLON e LDAP)                    |
| Ecogenicidade   | mm (VP), portal central e periférico |
| Lesões hepáticas focais                                   | Presença ou Ausência                 |
| Calibre da veia porta (diâmetro)                          | mm (lúmen, hilo e bifurcação)        |
| Circulação colateral                                      | Presença ou Ausência                 |
| Medida do baço  | mm (BLON e BAP)                      |
| Textura do parênquima do baço                             | Homogêneo ou Heterogêneo             |
| Superfície do baço  | Regular ou Irregular                 |
| Calibre da veia esplênica                                 | mm (hilo)                            |
| Medida da veia mesentérica superior                       | mm                                   |
| Medida do pâncreas  | mm                                   |
| Textura do parênquima do pâncreas                         | Homogêneo ou Heterogêneo             |
| Superfície do pâncreas                                    | Regular ou Irregular                 |
| Calibre do ducto pancreático principal                    | mm                                   |
| Vias biliares   | -                                    |
| Medida da vesícula biliar                                 | mm                                   |
| Superfície da vesícula biliar                             | Regular ou Irregular                 |
| Medida da espessura da parede anterior da vesícula biliar | mm                                   |
| Medida de linfonodos periportais-PP                       | mm                                   |

(Secção longitudinal-LELON, na linha médio-esternal e ântero-posterior-LEAP, secção longitudinal-LDLON, na linha hemiclavicular e ântero-posterior-LDAP; veia porta-VP).

#### ***4.7 Obtenção de granulócitos do sangue periférico e plasma***

Para separação dos granulócitos amostras de sangue periférico foram coletadas a vácuo em tubos de 10 mL contendo heparina sódica (Vacutainer – BD, E.U.A.) e o sangue foi lentamente adicionado sobre uma camada de solução de histopaque 1077 (SIGMA, E.U.A.), na proporção de 2:1, em tubos cônicos de poliestireno com capacidade para 50 mL (Falcon – BD, E.U.A.). Os tubos foram centrifugados a 400 g por 40 minutos a 18° C (Centrifuga Beckman Modelo J-6B, E.U.A.). Em seguida, o plasma, o anel de células mononucleares e o histopaque foram removidos. O plasma foi retirado cuidadosamente e armazenado a -70° C (Ultra Low Freezer - Partlow 1160). O anel de granulócitos, que se dispõe como um manto acima da suspensão de hemácias, foi retirado cuidadosamente para que a contaminação com hemácias fosse a menor possível. Posteriormente, os granulócitos foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL de polipropileno (Falcon – BD, E.U.A.) e as hemácias presentes removidas através da lise com 45 mL de solução de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl 155 Mm, KHCO<sub>3</sub> 10Mm e EDTA 0.1 mM) (SIGMA, E.U.A.), pH 7,2. Em seguida os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados a 400 g por 10 minutos a 18° C (Centrifuga Beckman Modelo J-6B, E.U.A.). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 20 mL de meio de cultura MEM (Minimal Essential Médium) (reagente GIBCO, E.U.A.), sendo logo em seguida, submetidas novamente à centrifugação a 400 g por 10 minutos a 4° C. A partir dessa etapa, os tubos contendo os granulócitos foram mantidos em banho de gelo para manutenção da estabilidade e viabilidade das células. Os procedimentos de lavagem/centrifugação foram repetidos por mais duas vezes e, em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (reagente GIBCO, E.U.A.). Uma alíquota foi separada e diluída em 190 µL de Solução de Turk (diluição 1:20) para contagem de células em câmara de Neubauer (Hausser Scientific, E.U.A.) e ajustadas para a concentração desejada, que era de 1x10<sup>7</sup> células/mL em RPMI 1640 (reagente GIBCO, E.U.A.). Os granulócitos foram cultivados em tubos de polipropileno de 5 mL, contendo 600 µL de RPMI durante 18 horas, na presença de SEA e SWAP na concentração de 25 µg/mL em incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. As culturas controles foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a presença de estimulação antígeno-específica.

#### **4.8 Obtenção dos sobrenadantes de cultura**

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 400 g por 10 minutos a 18° C e os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados em microtubos de 500 µL. Os sobrenadantes foram imediatamente estocados a -70° C (Ultra Low Freezer - Partlow 1160) para posterior utilização nos ensaios de dosagem de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico.

#### **4.9 Obtenção de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou vermes adultos (SWAP) do *S. mansoni***

Os antígenos solúveis de ovos (SEA) e vermes adultos do *S. mansoni* (SWAP) foram obtidos segundo método descrito por Gazzinelli e colaboradores (1983). Os ovos do parasito e os vermes adultos foram coletados, após seis semanas de infecção, de camundongos albinos suíços infectados com cercárias da cepa LE do *S. mansoni*. Os ovos ou vermes adultos do parasito foram triturados e ressuspensos em salina 1,7%, utilizando-se homogeneizador com pistão de teflon (Wirtis, DTL) (30 segundos de homogeneização com intervalos de 60 segundos). O homogenato resultante foi centrifugado a 50.000 g durante uma hora a 4° C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS 0,015 M, pH 7,4 (SIGMA, E.U.A.), durante 48 horas a 4° C e esterilizado utilizando filtro de 0,22 µm (Filter millex – HA – Milipore Products Divison, E.U.A.). O conteúdo protéico presente no material filtrado foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976), modificado pelo Kit Microprote (DOLES, Brasil). A solução antigênica foi alíquotada e conservada a -70° C (Ultra Low Freezer - Partlow 1160), para uso posterior nos ensaios de estimulação antigênica.

#### **4.10 Determinação dos níveis de IgE total no plasma**

Os níveis plasmáticos de IgE total, foram quantificados utilizando-se o Kit Imunoenzimático para determinação quantitativa de IgE total (IgE Total SYM, Symbiosis Diagnóstica, Brasil) e o ensaio realizado segundo as recomendações do fabricante. Alíquotas de 25 µL dos plasmas testados e dos seis padrões (reagentes do Kit de IgE total SYM) nas concentrações de 0; 5; 25; 50; 150 e 400 UI/mL foram dispensadas, em duplicatas, em seus respectivos poços da placa de fundo chato, previamente sensibilizadas com estreptavidina. Em seguida, foram adicionados 100 µL de anticorpo monoclonal anti-IgE humano conjugado com biotina (reagente do Kit de IgE total SYM) aos poços onde as amostras e os padrões foram dispensados anteriormente. As placas foram vedadas e incubadas por 30 minutos a

temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com 300 µL/poço com solução de lavagem (reagente do Kit de IgE total SYM) e, posteriormente, foram adicionados 100 µL de um segundo anticorpo monoclonal anti-IgE humano conjugado com peroxidase (reagente do Kit de IgE total SYM). Novamente, as placas foram incubadas 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e após a incubação, lavadas cinco vezes com 300 µL/poço com solução de lavagem (reagente do Kit de IgE total SYM). Em seguida, foram adicionados, a todos os poços, 100 µL da solução de cromógeno-substrato (tetrametilbenzidina-TMB) (reagente do Kit de IgE total SYM) e a placa novamente foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a reação foi interrompida adicionando-se, a todos os poços da placa, 100 µL de ácido sulfúrico 1 N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (reagente do Kit de IgE total SYM). A densidade óptica das amostras e padrões foi medida em leitor automático (Molecular Devices-Precision Reader, E.U.A.), utilizando-se filtro de 450 nm. As concentrações de IgE das amostras foram determinadas segundo um modelo de ajustamento por meio de curva de 6 parâmetros, definida, a partir das concentrações conhecidas dos padrões.

#### ***4.11 Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de cultura***

Os níveis de óxido nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de culturas foram quantificados utilizando-se o Kit QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay (DINO-250) para determinação quantitativa de Óxido Nítrico (NO) (Quantitative Colorimetric Determination of Nitric Oxide at 540 nm, BioAssay Systems, E.U.A.) sendo o ensaio realizado segundo as recomendações do fabricante. Anteriormente, todas as amostras foram desproteïnadas adicionando-se 80 µL de Sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>) 75 mM e 120 µL de Hidróxido de Sódio (NaOH) 55 mM e centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4°C até que não ocorresse mais formação de precipitado. Em seguida, foram acrescentados 70 µL de Tampão Glicina (reagentes do Kit QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay). Para realização do ensaio, alíquotas de 100 µL dos plasmas e sobrenadantes testados e dos oito padrões (reagentes do Kit QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay) nas concentrações de 0; 5; 10; 15; 20; 30; 40 e 50 µL/mL foram dispensados, em duplicatas, em seus respectivos tubos de 1,5 mL. Em seguida, grânulos de cádmio foram lavados com água destilada e ativados com 200 µL do Tampão de Ativação (reagente do Kit QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay) diluído 1x. Posteriormente foram adicionados 3 grânulos de cádmio por amostra, incubados durante 15 minutos.

As amostras foram transferidas, em duplicatas, para seus respectivos poços em placas de fundo chato e adicionados 50 µL dos reagentes A e B.

A densidade óptica das amostras e padrões foi medida em leitor automático (Molecular Devices-Precision Reader, E.U.A.), utilizando-se filtro de 540 nm.

#### ***4.12 Caracterização das citocinas e quimiocinas presentes no plasma e nos sobrenadantes das culturas de granulócitos***

Foram dosadas as citocinas IL-1β, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, GM-CSF e G-CSF e as quimiocinas CXCL-8 e CCL24, no plasma e nos sobrenadantes das culturas de granulócitos na ausência e presença dos antígenos SEA e SWAP.

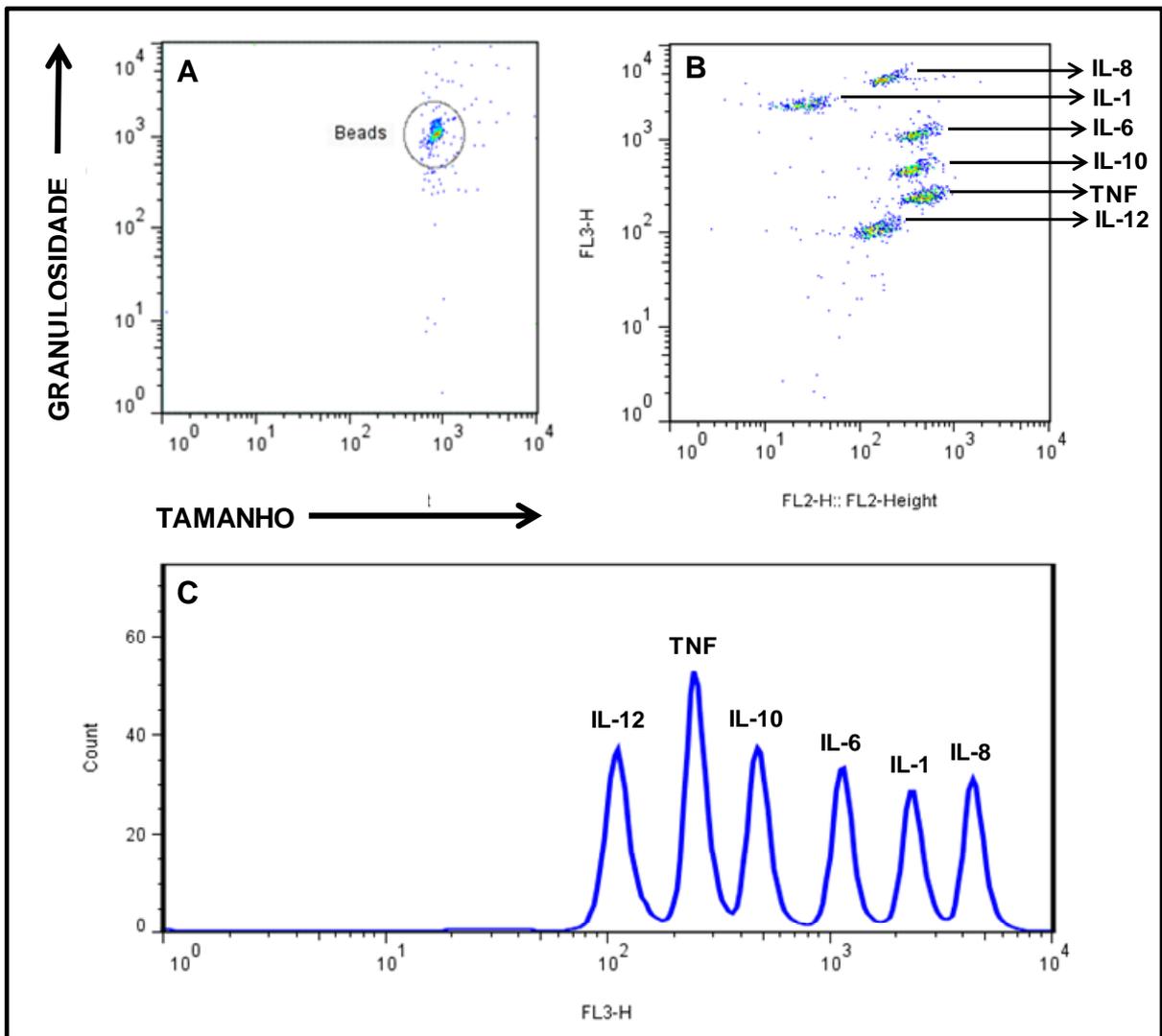
Os níveis dos analitos avaliados foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) (BD, Pharmingen, E.U.A.) que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para os analitos de interesse, que são detectados nos canais FL3/FL4. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de até vinte analitos em um mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada do protocolo original proposto pelo fabricante, com algumas modificações: alíquotas de 25 µL de plasma ou sobrenadante de culturas foram utilizadas sem diluição prévia. Alíquotas de 25 µL dos padrões de citocinas e quimiocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente G (solução diluente tamponada), "Padrão sem diluição" – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL e 25 µL de diluente G apenas (controle negativo). As amostras e os padrões foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. A cada tubo foi adicionado 15 µL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e quimiocinas, IL-12p70, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-1β, CXCL-8 (Human Inflammation Kit, BD, Pharmingen, E.U.A.) e GM-CSF, CCL24, G-CSF, IL-4, IL-3 (Human Allergy Mediators Kit II, BD, Pharmingen, E.U.A.) mais 18 µL do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas e quimiocinas, conjugados com ficoeritrina - PE (reagente B) e incubados por 3 horas, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL da solução F (Tampão fosfato salínico) e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos a 18° C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A.).

#### ***4.13 Aquisição e análise dos dados de avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas***

A aquisição dos dados obtidos foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (BD, E.U.A.). Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foi obtido com base na seleção da população de microesferas em gráficos de densidade de tamanho versus granulidade. Selecionada a população de interesse, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de densidade FL3 x FL2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada analito presente na amostra (**Figura 3**).

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa dos analitos uma curva padrão foi construída, baseada nos dados dos padrões de citocinas em concentrações de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4º parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.



**Figura 3:** Representação esquemática da análise de citocinas e quimiocinas, através do ensaio com microesferas por citometria de fluxo.

(A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de densidade de tamanho versus granulidade.

(B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas e quimiocinas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de densidade FL2 versus FL3.

(C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL3) onde avalia-se a intensidade de fluorescência 3 (FL3) versus número de eventos, capaz de discriminar as diferentes microesferas

#### ***4.14 Imunofenotipagem ex vivo de leucócitos do sangue periférico***

Os ensaios *ex vivo* de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico foram realizados utilizando-se amostras de 50 µL de sangue periférico coletado a vácuo em tubos de 5 mL, contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer - Becton Dickinson - BD, E.U.A.), que foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon - BD, E.U.A.), contendo 2 µL do anticorpo monoclonal marcado com o fluorocromo específico (Isotiocianato de fluoresceína - FITC; Ficoeritrina - PE; Cychrome - CYCHR; Tricolor - TC) para o receptor celular de interesse ou anticorpos monoclonais anti-receptores de quimiocinas (**Tabela 3**). As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o período de incubação, as amostras de sangue periférico foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS - BD, E.U.A) diluída dez vezes em água destilada. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de PBS 0,015M, pH 7,4 (SIGMA, E.U.A.) e as amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 18°C (Centrífuga Beckman, Modelo J-6B, E.U.A.). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 2 mL de PBS 0,015M, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram fixadas com 200 µL de solução fixadora (10 g/L de paraformaldeído; 1% de cacodilato de sódio; 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - SIGMA, E.U.A.). Após um período de 15 minutos a 4° C, os fenótipos celulares presentes em cada tubo foram determinados com o auxílio do citômetro de fluxo (FACScalibur - BD, E.U.A.).

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de leucócitos circulantes

| MARCADOR   | FLUOCR.* | CLONE    | CONC.** | FUNÇÕES   |
|------------|----------|----------|---------|---|
| Anti-IgG1  | FITC     | 679.1Mc7 | 0,5 µg  | Controle isotípico.   |
| Anti-IgG2a | PE       | UCTH-1   | 0,5 µg  | Controle isotípico.   |
| Anti-CD3   | FITC     | UCTH-1   | 0,5 µg  | Associado ao receptor de células T (TCR). Exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR. Expresso em timócitos e linfócitos T. |
| Anti-CD4   | FITC     | SK3      | 0,5 µg  | Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II.  |
| Anti-CD4   | CYCHR    | SK3      | 0,5 µg  | Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.   |
| Anti-CD8   | TC       | 3B5      | 0,5 µg  | Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos.  |
| Anti-CD11a | PE       | WT.1     | 0,5 µg  | Molécula de adesão celular expressa em eosinófilos e basófilos; liga-se a ICAM-1, ICAM, ICAM-2, ICAM-3.   |
| Anti-CD13  | PE       | WM15     | 0,5 µg  | Expresso em granulócitos. É uma aminopeptidase ligada à molécula de MHC de classe II.   |
| Anti-CD14  | FITC     | M0P9     | 0,5 µg  | Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) expresso em células mielomonocíticas.                                |
| Anti-CD18  | PE       | L130     | 0,5 µg  | Molécula de adesão celular expressa em leucócitos.  |
| Anti-CD23  | PE       | M-L233   | 0,5 µg  | Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII).  |

|             |      |           |        |  |
|-------------|------|-----------|--------|--|
| Anti-CD25   | PE   | 3G10      | 0,5 µg | Ativação de leucócitos, identificação de células T reguladoras.  |
| Anti-CD28   | PE   | FAB342P   | 0,5 µg | Molécula co-estimuladora de proliferação, produção de citocinas por linfócitos T e produção de anticorpos dependente de linfócitos T.  |
| Anti-CD44   | PE   | 515       | 0,5 µg | Molécula envolvida na adesão de leucócitos   |
| Anti-CD54   | PE   | LB2       | 0,5 µg | Molécula de adesão de leucócitos. Liga-se à CD11a/CD18.  |
| Anti-CD62L  | PE   | SK11      | 0,5 µg | Molécula de adesão celular expressa em leucócitos.   |
| Anti-CD64   | FITC | 10.1      | 0,5 µg | Receptor de IgG (FcγRI)  |
| Anti-CD69   | FITC | BAF2359   | 0,5 µg | Molécula de ativação de leucócitos.  |
| Anti-CD80   | PE   | BAF140    | 0,5 µg | Co-regulação de ativação de linfócitos T.  |
| Anti-CD86   | PE   | BAF141    | 0,5 µg | Co-regulação de ativação de linfócitos T.  |
| Anti-HLA-DR | PE   | TÜ36      | 0,5 µg | Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.  |
| Anti-CCR2   | FITC | 48607.211 | 0,5 µg | Migração de linfócitos T, monócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas. Liga-se a CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL12 (MCP-5), CCL13 (MCP-4), CCL16 (HCC-4). |
| Anti-CCR3   | FITC | 61828.111 | 0,5 µg | Migração de eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T. Liga-se a CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (EOTAXINA).   |

|            |      |           |        |  |
|------------|------|-----------|--------|--|
| Anti-CCR5  | FITC | 45502.111 | 0,5 µg | Migração de linfócitos T Tipo 1, NK, células dendríticas, monócitos. Liga-se a CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CCL11 (EOTAXINA), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1). |
| Anti-CXCR3 | FITC | 49801.111 | 0,5 µg | Migração de fibroblastos e linfócitos T Tipo 1 ativados. Liga-se a CXCL4 (PF4), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC).   |

---

### Anticorpos marcas Becton Dickinson e Invitrogen

---

**Fonte:** CD Reference Chart. 8th HLDA International Workshop, 2004. Mason et al. 2003, D'ambrosio et al. 2003, Ono et al. 2003.

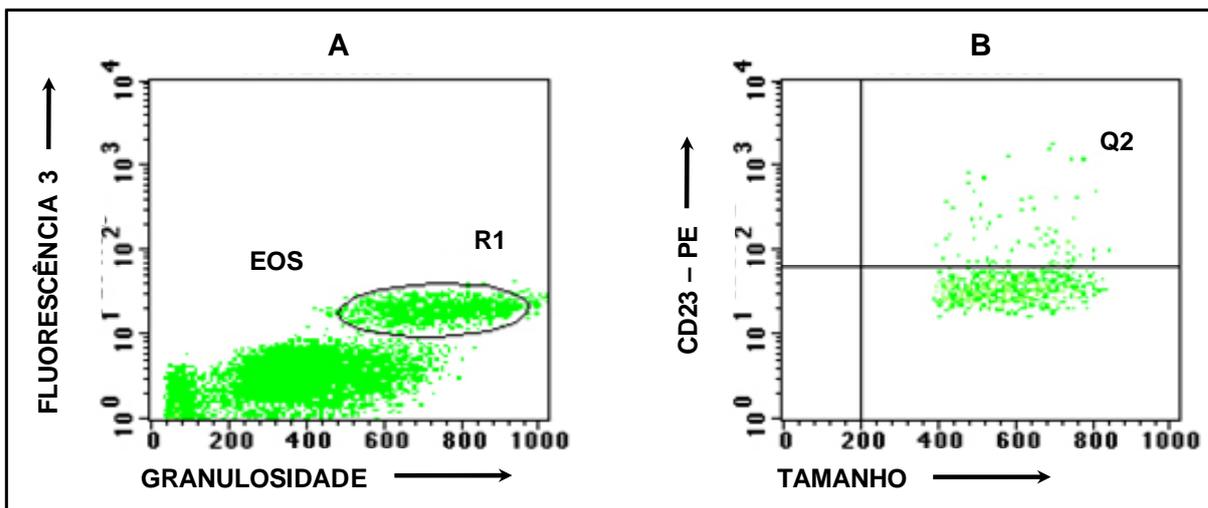
\* FLUOCR.: Fluocromo

\*\* CONC.: Concentração

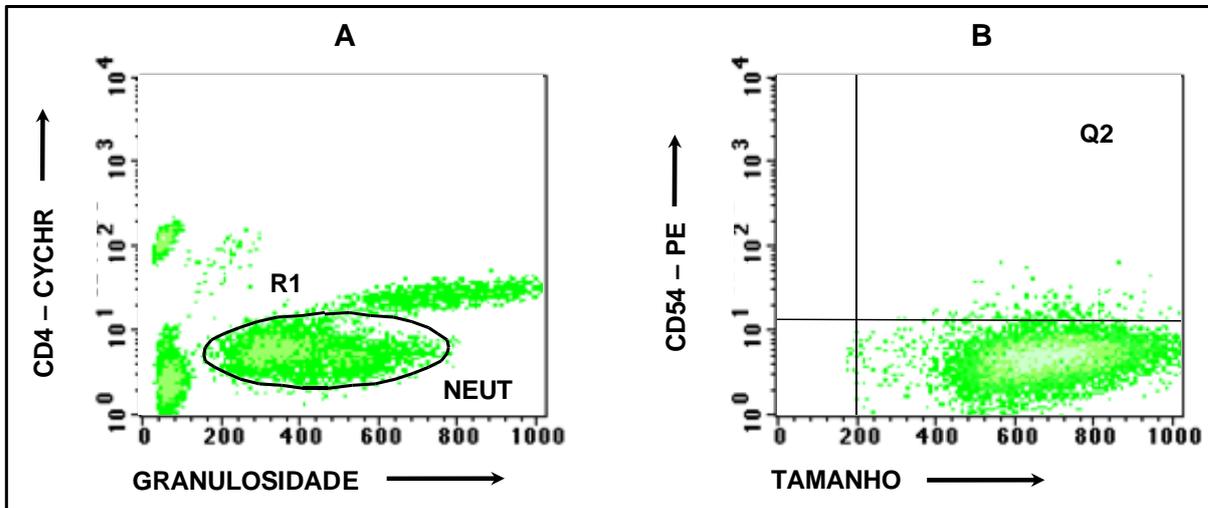
#### ***4.15 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de eosinófilos e neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo***

As amostras celulares obtidas para o estudo foram avaliadas e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur, BD (E.U.A.). Para as análises dos resultados foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest (BD, E.U.A.). Foram coletados vinte mil eventos para a análise *ex vivo* das amostras.

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de marcadores de superfície e receptores de quimiocinas foram realizadas através de um sistema de computador acoplado ao citômetro. As **Figuras 4 e 5** representam, de forma esquemática, o método utilizado para a análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figuras 4A e 5A**) consistiu na identificação das populações de eosinófilos (EOS) e neutrófilos (NEUT), respectivamente. A população de eosinófilos foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através da construção de gráficos de densidade de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) versus uma fluorescência não relacionada (para observação da autofluorescência característica de eosinófilos). Já a população de neutrófilos foi selecionada por meio de gráfico de densidade de granulosidade celular versus CD4/FL3 (células com granulosidade intermediária CD4 - CYCHR). A **Figura 4B** ilustra, no quadrante 2 (Q2), a detecção do marcador de superfície CD23 na população de eosinófilos, em gráfico de tamanho (Forward Scatter - FSC) versus fluorescência 2 (CD23 - PE). A **Figura 5B** ilustra, no quadrante 2 (Q2), a detecção do marcador de superfície CD54 na população de neutrófilos, em gráfico de tamanho versus fluorescência 2 (CD54 - PE).



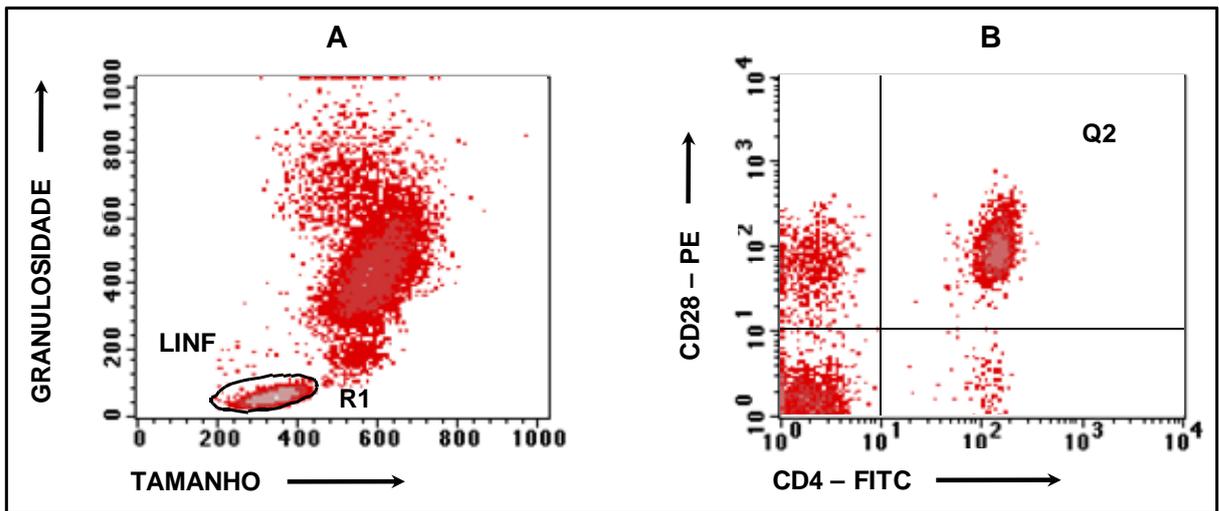
**Figura 4:** Análise de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de eosinófilos (EOS), selecionada no “gate” R1 em gráfico de granulosidade em função da fluorescência 3. (B) representa o perfil de análise da população de eosinófilos positivos para o marcador de superfície CD23 no quadrante (Q2) em gráfico de densidade de tamanho versus fluorescência 2 (CD23 - PE).



**Figura 5:** Análise de neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de neutrófilos (NEUT), selecionada no “gate” R1 em gráfico de granulosidade em função da fluorescência 3 (CD4 - CYCHR). (B) representa o perfil de análise da população de neutrófilos positivos para o marcador de superfície CD54 no quadrante 2 (Q2) em gráfico de densidade de tamanho versus fluorescência 2 (CD54 - PE).

#### ***4.16 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo***

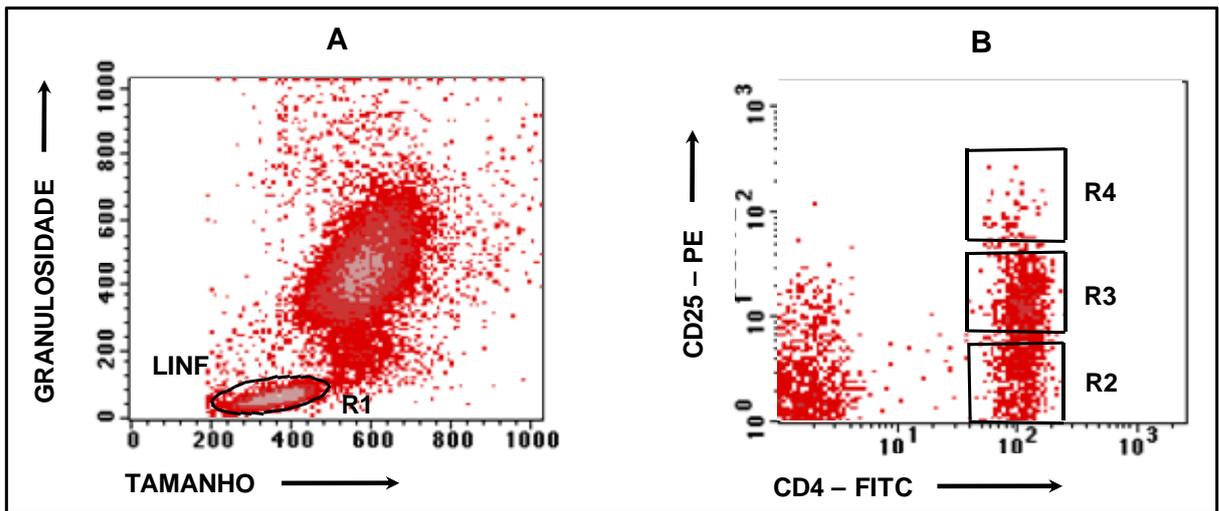
A identificação da população de linfócitos e a determinação do valor percentual de marcadores de superfície e receptores de quimiocinas foram realizadas através de um sistema de computador acoplado ao citômetro. A **Figura 6** representa, de forma esquemática, o método utilizado para a análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figuras 6A**) consistiu na identificação da população de linfócitos. A população de linfócitos foi selecionada por uma janela - “gate” (R1), através da construção de gráficos de densidade de tamanho celular versus granulosidade celular. A **Figura 6B** ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção do marcador de superfície CD28 na população de linfócitos CD4<sup>+</sup>, em gráfico de fluorescência 1 (CD4 - FITC) versus fluorescência 2 (CD28 - PE).



**Figura 6:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo. **(A)** representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho versus granulosidade. **(B)** representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> positivos para o marcador de superfície CD28 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD4 - FITC) versus fluorescência 2 (CD28 - PE).

#### ***4.17 Aquisição e análise ex vivo de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>HIGH</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo***

A análise de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>HIGH</sup> foi realizada segundo proposto por Baecher-Allan et al. (2001). De acordo com esses autores, linfócitos T expressando os marcadores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>HIGH</sup> apresentam características reguladoras em humanos. A **Figura 7** representa, de forma esquemática, o método utilizado para a análise dos resultados. Primeiramente, selecionou-se a população de linfócitos por uma janela – “gate” (R1), através da construção de gráficos de densidade de tamanho celular versus granulosidade celular (**Figura 7A**). Em seguida, foram construídos gráficos de CD4-FITC versus CD25-PE, permitindo a identificação de três subpopulações: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (R2), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>LOW</sup> (R3) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>HIGH</sup> (R4). A fração celular selecionada em R4 representa o valor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com provável papel regulador (Baecher-Allan et al. 2001) na população de linfócitos totais (**Figura 7B**).



**Figura 7:** Análise de células  $CD4^+CD25^{HIGH}$  do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansônica por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho versus granulidade. (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos  $CD4^+$  positivos para o marcador de superfície  $CD25^{HIGH}$  no “gate” R4 em gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD4 - FITC) versus fluorescência 2 (CD25 - PE).

#### ***4.18 Análise estatística dos dados***

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 5.00 (La Jolla, CA) para comparação entre os grupos. Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste de Mann Whitney e para análise comparativa entre três grupos foi empregado o teste de Análise de Variâncias (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns, ambos para dados não paramétricos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de  $p < 0,05$ .



### **5.1.1 Dados epidemiológicos e intensidade de infecção dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel**

No presente estudo dezesseis pacientes com média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $19,8 \pm 9,2$  anos e mediana de 19,0 foram avaliados e caracterizados como portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes de serem tratados (AGD-AT). Após a quimioterapia específica com praziquantel esse grupo de pacientes foi acompanhado durante um (AGD-PT I) e dois anos (AGD-PT II). Os grupos AGD-PT I e AGD-PT II foram compostos por números inferiores de pacientes em relação ao grupo AGD-AT, em função da impossibilidade de acompanhamento clínico-laboratorial de alguns pacientes e de gravidez em uma das pacientes do grupo AGD-PT II (**Tabela 4**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), entre mulheres e homens, do grupo AGD-AT em relação à idade ( $19,3 \pm 10,1$  e  $20,3 \pm 8,7$  anos, respectivamente,  $p = 0,8453$ ) e intensidade de infecção ( $143,6 \pm 245,2$  e  $72,0 \pm 73,3$ /opg, respectivamente,  $p = 0,7498$ ). Nos grupos agudos avaliados um ano (AGD-PT I) e dois anos (AGD-PT II) após o tratamento, também não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre mulheres e homens em relação à idade (AGD-PT I =  $19,4 \pm 9,4$  e  $17,8 \pm 6,3$  anos, respectivamente,  $p = 0,7188$  e AGD-PT II =  $23,0 \pm 7,8$  e  $17,8 \pm 6,3$  anos, respectivamente,  $p = 0,2700$ ) (**Tabela 4**).

A intensidade de infecção no grupo AGD-AT apresentou variação de 04-768/opg (média  $\pm$  DP:  $112,3 \pm 188,6$ /opg com mediana de 56,0). Um ano e dois anos após terapêutica com praziquantel (grupos AGD-PT I e AGD-PT II), nenhum dos pacientes apresentou ovos de *S. mansoni* nas fezes (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Dados demográficos e intensidade de infecção dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel

| PARÂMETROS                                  | PACIENTES<br>AGD-AT* | PACIENTES<br>AGD-PT I | PACIENTES<br>AGD-PT II |
|---|----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>Nº de indivíduos</b>                     | 16 (100%)            | 13 (81,25%)           | 11 (68,75%)            |
| <b>Idade (anos)</b>                         |                      |                       |                        |
| Varição                                     | 05 – 35              | 05 – 31               | 08 – 31                |
| Média ± DP                                  | 19,8 ± 9,2           | 18,7 ± 7,8            | 20,2 ± 7,2             |
| Mediana                                     | 19,0                 | 16,0                  | 22,0                   |
| <b>Gênero</b>                               |                      |                       |                        |
| Feminino                                    | 09 (56,3%)           | 07 (53,8%)            | 05 (45,5%)             |
| Masculino                                   | 07 (43,7%)           | 06 (46,2%)            | 06 (54,5%)             |
| <b>Exame<br/>Parasitológico<sup>#</sup></b> |                      |                       |                        |
| Negativo                                    | 00                   | 13                    | 11                     |
| Positivo                                    | 16                   | 00                    | 00                     |
| <b>Contagem de<br/>ovos (opg)</b>           |                      |                       |                        |
| Varição                                     | 04 – 768             | ----                  | ----                   |
| Média ± DP                                  | 112,3 ± 188,6        | ----                  | ----                   |
| Mediana                                     | 56,0                 | ----                  | ----                   |

\* Segundo os critérios de inclusão e exclusão estipulados para o estudo.

# O exame parasitológico foi realizado antes do tratamento específico com praziquantel, 12 e 24 meses após tratamento.

AGD-AT – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel  
AGD-PT I – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT II – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

### ***5.1.2 Avaliação do perfil hematológico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel***

O hemograma foi realizado em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo CT) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (grupo AGD-AT), um ano (grupo AGD-PT I) e dois anos (grupo AGD-PT II) após terapêutica específica com praziquantel. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente (**Figuras 8 e 9**).

A análise da série vermelha do hemograma mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da concentração de hemoglobina (**Figura 8A**) dos grupos AGD-AT ( $13,7 \pm 1,6$  g/dL), AGD-PT I ( $14,4 \pm 1,4$  g/dL) e AGD-PT II ( $13,6 \pm 1,6$  g/dL) em relação ao grupo CT ( $15,8 \pm 1,5$  g/dL). No grupo AGD-PT I foi observado um aumento significativo do número de hemácias ( $4,9 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^5/\text{mm}^3$  – **Figura 8B**) em relação ao grupo AGD-AT, não se alterando significativamente no grupo AGD-PT II ( $4,6 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^5/\text{mm}^3$ ).

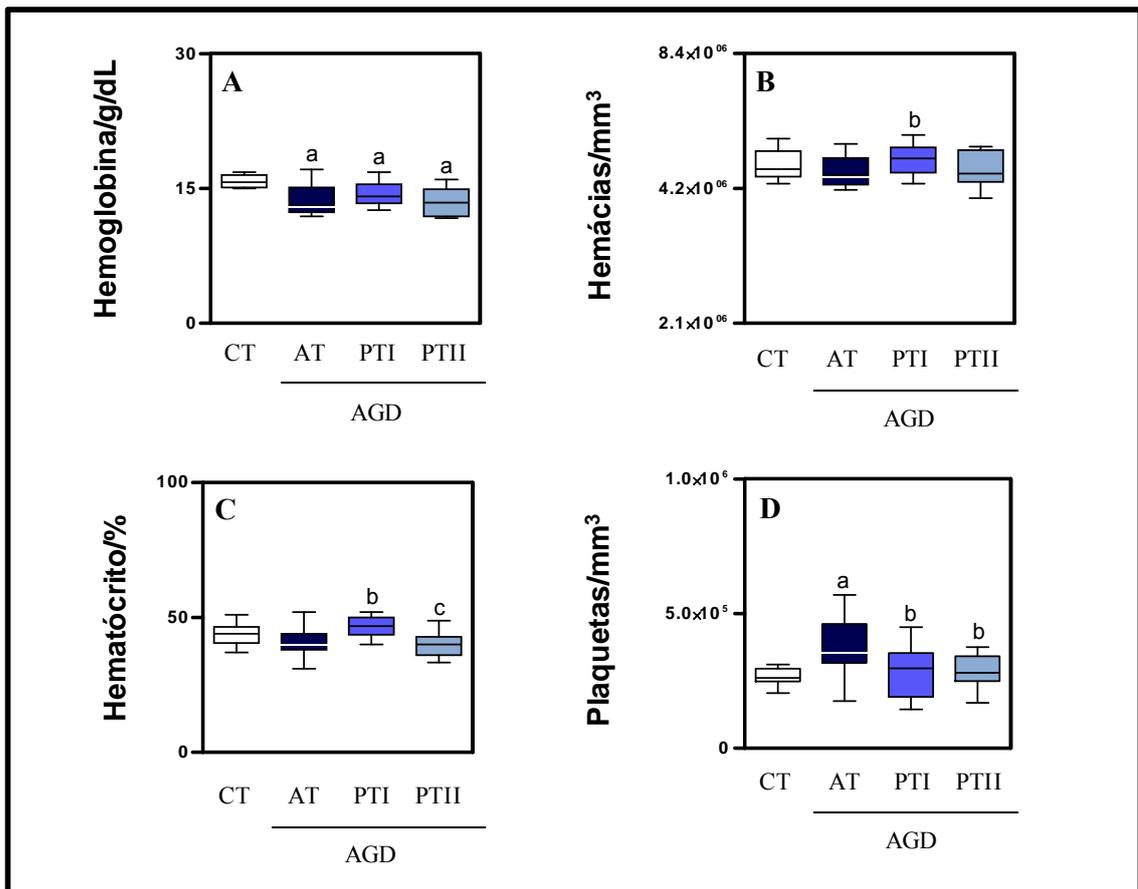
Na análise do hematócrito do grupo AGD-PT I foi observado um aumento estatisticamente significativo do seu percentual ( $46,7 \pm 3,9\%$  – **Figura 8C**) em relação ao grupo AGD-AT. Entretanto, no grupo AGD-PT II foi observada uma diminuição estatisticamente significativa do percentual do hematócrito ( $41,1 \pm 4,6\%$  – **Figura 8C**) em relação ao grupo AGD-PT I. Além disso, o número de plaquetas (**Figura 8D**) mostrou-se estatisticamente aumentado no grupo AGD-AT ( $3,9 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5/\text{mm}^3$ ) em relação a todos os demais grupos avaliados (CT -  $2,7 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4/\text{mm}^3$ , AGD-PT I -  $2,8 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^4/\text{mm}^3$  e AGD-PT II -  $3,4 \times 10^5 \pm 6,5 \times 10^4/\text{mm}^3$ ).

A análise da série branca do hemograma mostrou aumento estatisticamente significativo da global de leucócitos (**Figura 9A**) do grupo AGD-AT ( $12325 \pm 5301/\text{mm}^3$ ) em relação ao grupo CT ( $7156 \pm 2051/\text{mm}^3$ ). Esse resultado foi representado pelo aumento do número absoluto de eosinófilos ( $2178 \pm 2923/\text{mm}^3$  – **Figura 9C**) e linfócitos ( $4219 \pm 971/\text{mm}^3$  – **Figura 9D**) do grupo AGD-AT em relação ao grupo CT (eosinófilos:  $160 \pm 84/\text{mm}^3$  e linfócitos:  $2534 \pm 488/\text{mm}^3$ , **Figuras 9C e 9D**, respectivamente). Os resultados do grupo AGD-PT I mostraram diminuição estatisticamente significativa da global de leucócitos ( $7854 \pm 1375/\text{mm}^3$  – **Figura 9A**) em relação ao grupo AGD-AT. Esse resultado foi representado por uma diminuição significativa do número absoluto de neutrófilos ( $3686 \pm 1690/\text{mm}^3$  – **Figura 9B**), eosinófilos ( $665 \pm 489/\text{mm}^3$  – **Figura 9C**) e linfócitos ( $3110 \pm 1062/\text{mm}^3$  – **Figura 9D**) do grupo AGD-PT I em relação ao grupo AGD-AT. No entanto, o

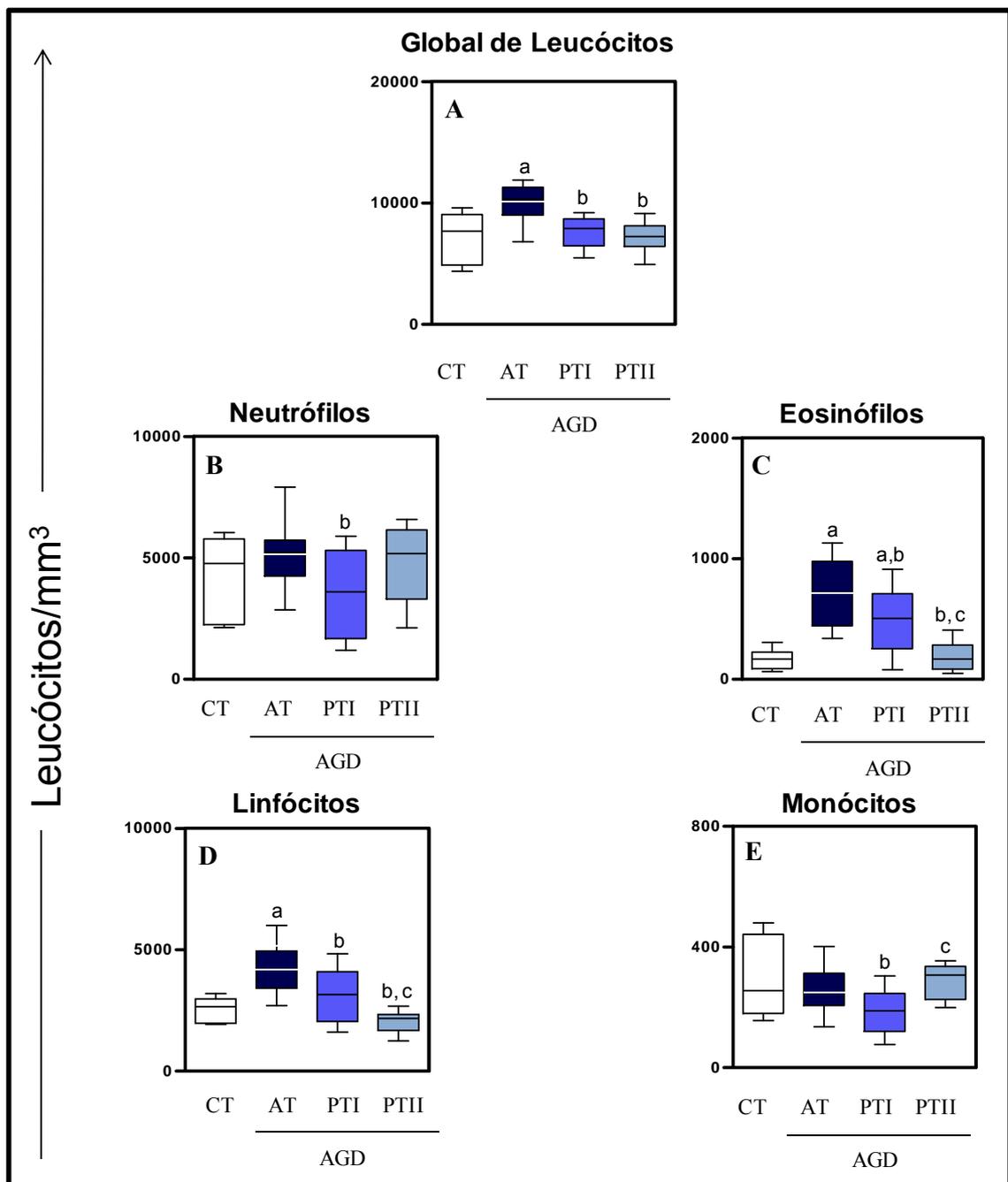
número absoluto de eosinófilos ( $665 \pm 489/\text{mm}^3$ ) do grupo AGD-PT I foi estatisticamente maior em relação ao grupo CT ( $160 \pm 84/\text{mm}^3$ ). No grupo AGD-PT II foi observada uma diminuição do número absoluto de eosinófilos ( $359 \pm 398/\text{mm}^3$  – **Figura 9C**) e linfócitos ( $2040 \pm 453/\text{mm}^3$  – **Figura 9D**) quando comparado ao grupo AGD-PT I.

Considerando a população de monócitos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT ( $292 \pm 128/\text{mm}^3$  – **Figura 9E**) e o grupo AGD-AT ( $284 \pm 114/\text{mm}^3$  – **Figura 9E**), entretanto, ocorreu uma diminuição significativa em relação ao grupo AGD-PT I ( $192 \pm 74/\text{mm}^3$  – **Figura 9E**), alterada significativamente no grupo AGD-PT II ( $287 \pm 53/\text{mm}^3$  – **Figura 9E**).

De maneira geral, com base em valores de referência para análises hematológicas utilizados atualmente na rotina laboratorial, deve-se ressaltar que com exceção de uma eosinofilia acentuada no grupo AGD-AT, todas as outras alterações observadas se enquadram nos valores de referência para indivíduos adultos, não demonstrando alterações realmente significativas do ponto de vista biológico. Destaca-se ainda, que grande parte dos parâmetros hematológicos avaliados no presente estudo, dois anos após quimioterapia específica com praziquantel, retornou a níveis semelhantes aos referenciados no grupo controle.



**Figura 8:** Análise do perfil hematológico, série vermelha e plaquetas, de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. **(A)** Concentração de Hemoglobina em g/dL, **(B)** Representa o número de Hemácias x 10<sup>6</sup> por mm<sup>3</sup>, **(C)** Percentual do Hematócrito e **(D)** Número de Plaquetas por mm<sup>3</sup>. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.



**Figura 9:** Análise do perfil hematológico, série branca, de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. (A) Representa a Global de Leucócitos, (B) Subpopulação de Neutrófilos, (C) Subpopulação de Eosinófilos, (D) Subpopulação de Linfócitos e (E) Subpopulação de Monócitos. Os resultados estão expressos como valor absoluto de leucócitos/mm<sup>3</sup> em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.

### ***5.1.3 Caracterização ultra-sonográfica de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel***

Alterações morfológicas de fígado, baço e presença de linfonodos periportais foram investigadas através de avaliações ultra-sonográficas de indivíduos saudáveis, não infectados pelo *S. mansoni* (grupo CT) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (grupo AGD-AT), um ano (AGD-PT I) e dois anos (AGD-PT II) após a terapêutica específica com praziquantel (**Tabelas 5 e 6**).

A análise da avaliação ultra-sonográfica demonstrou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) das medidas ântero-posterior do lobo esquerdo do fígado (LEAP) e da medida longitudinal do lobo direito do fígado (LDLON) dos grupos AGD-AT (LEAP:  $54,8 \pm 11,1$ /mm; LDLON:  $150,3 \pm 15,8$ /mm), AGD-PT I (LEAP:  $58,0 \pm 10,5$ /mm; LDLON:  $142,6 \pm 12,7$ /mm) e AGD-PT II (LEAP:  $60,3 \pm 11,8$ /mm; LDLON:  $135,4 \pm 12,4$ /mm) em relação ao grupo CT (LEAP:  $46,7 \pm 10,0$ /mm; LDLON:  $102,2 \pm 16,0$ /mm). Além disso, a medida longitudinal do lobo direito do fígado (LDLON) em AGD-PT II foi estatisticamente ( $p < 0,05$ ) menor do que em AGD-PT I (**Tabela 5**). Foi observado ainda, um espessamento periportal (parede portal hilar - espessura VP) estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo AGD-AT ( $3,2 \pm 1,0$  /mm) e AGD-PT I ( $3,0 \pm 1,8$ /mm) em relação ao grupo CT ( $1,5 \pm 0,3$ /mm) (**Tabela 5**).

Também foi observado aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) das medidas longitudinal (BLON) e ântero-posterior (BAP) do baço dos grupos AGD-AT (BLON:  $108,3 \pm 15,6$ /mm; BAP:  $42,8 \pm 9,7$ /mm), AGD-PT I (BLON:  $101,4 \pm 9,7$ /mm; BAP:  $42,5 \pm 9,7$ /mm) e AGD-PT II (BLON:  $108,1 \pm 18,0$ /mm; BAP:  $43,8 \pm 8,3$ /mm) em relação ao grupo CT (BLON:  $91,2 \pm 12,7$ /mm; BAP:  $35,1 \pm 6,3$ /mm) (**Tabela 6**). Foram observados linfonodos periportais somente no grupo AGD-AT ( $1,8 \pm 1,0$ /mm) (**Tabela 6**). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as demais medidas avaliadas.

Contudo, embora, algumas alterações ultra-sonográficas tenham retornado à normalidade dois anos após quimioterapia específica com praziquantel, algumas alterações ultra-sonográficas no fígado e no baço ainda permanecem, sugerindo um processo longo e gradual de recuperação desses órgãos após a terapêutica específica da infecção aguda esquistossomótica.

**Tabela 5.** Medidas das variáveis ultra-sonográficas do fígado de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel

| MEDIDAS                 | INDIVÍDUOS<br>CT<br>(n = 12) | PACIENTES<br>AGD – AT<br>(n = 08) | PACIENTES<br>AGD – PT I<br>(n = 07) | PACIENTES<br>AGD – PT II<br>(n = 09) |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Fígado LELON</b>     |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 102,2 ± 16,0                 | 113,7 ± 19,2                      | 109,7 ± 10,3                        | 112,7 ± 15,3                         |
| Mediana <sup>#</sup>    | 102,9 (77,1-111,5)           | 110,8 (90,4-130,3)                | 114,0 (92,0-119,0)                  | 116,0 (96,0-133,0)                   |
| <b>Fígado LEAP</b>      |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 46,7 ± 10,0                  | 54,8 ± 11,1*                      | 58,0 ± 10,5*                        | 60,3 ± 11,8*                         |
| Mediana <sup>#</sup>    | 44,0 (36,4-66,1)             | 50,6 (40,7-70,4)                  | 55,5 (46,0-71,0)                    | 64,0 (41,0-78,0)                     |
| <b>Fígado LDLON</b>     |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 102,2 ± 16,0                 | 150,3 ± 15,8*                     | 142,6 ± 12,7*                       | 135,4 ± 12,4**                       |
| Mediana <sup>#</sup>    | 102,9 (77,1-112,1)           | 150,0 (120,5-180,2)               | 145,5 (123,0-159,0)                 | 137,0 (114,0-153,0)                  |
| <b>Fígado LDAP</b>      |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 68,6 ± 11,9                  | 65,0 ± 10,3                       | 70,6 ± 8,6                          | 67,1 ± 12,7                          |
| Mediana <sup>#</sup>    | 66,8 (60,7-72,6)             | 70,3 (50,2-80,9)                  | 74,5 (58,0-80,0)                    | 63,0 (59,0-97,0)                     |
| <b>Calibre VP</b>       |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 9,7 ± 0,9                    | 10,1 ± 1,8                        | 10,3 ± 1,7                          | 10,4 ± 1,7                           |
| Mediana <sup>#</sup>    | 9,5 (8,7-11,4)               | 9,9 (8,0-12,8)                    | 10,2 (7,5-12,1)                     | 11,2 (7,2-12,2)                      |
| <b>Espessura VP</b>     |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 1,5 ± 0,3                    | 3,2 ± 1,0*                        | 3,0 ± 1,8*                          | 2,0 ± 0,7*                           |
| Mediana <sup>#</sup>    | 1,5 (1,0-2,2)                | 3,0 (2,0-5,0)                     | 3,0 (1,0-6,0)                       | 2,0 (0,9-3,0)                        |
| <b>Veia mesentérica</b> |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP              | 6,7 ± 1,1                    | 7,0 ± 1,3                         | 7,3 ± 1,0                           | 7,4 ± 1,4                            |
| Mediana <sup>#</sup>    | 6,7 (4,7-9,0)                | 6,8 (5,7-9,1)                     | 7,1 (6,0-8,7)                       | 7,0 (5,2-9,2)                        |

Os valores estão representados pela média ± desvio padrão (mm).

\* diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos não infectados.

\*\* diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos não infectados e pacientes agudos antes da terapêutica específica com praziquantel.

<sup>#</sup> representa a mediana e a variação dos valores (Min-Max).

CT – Grupo controle

AGD-AT – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT I – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT II – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

LELON: medida longitudinal do lobo esquerdo; LEAP: medida ântero-posterior do lobo esquerdo; LDLON: medida longitudinal do lobo direito;

LDAP: medida ântero-posterior do lobo direito; VE: veia esplênica; VP: veia porta.

**Tabela 6.** Medidas das variáveis ultra-sonográficas do baço e dos linfonodos de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes, um ano e dois anos após terapêutica específica com praziquantel

| MEDIDAS              | INDIVÍDUOS<br>CT<br>(n = 12) | PACIENTES<br>AGD – AT<br>(n = 08) | PACIENTES<br>AGD – PT I<br>(n = 07) | PACIENTES<br>AGD – PT II<br>(n = 09) |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Baço BLON</b>     |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP           | 91,2 ± 12,7                  | 108,3 ± 15,6*                     | 101,4 ± 9,7*                        | 108,1 ± 18,0*                        |
| Mediana <sup>#</sup> | 90,4 (76,4-125,6)            | 110,2 (90,4-140,9)                | 100 (87,0-118,0)                    | 104,0 (89,0-148,0)                   |
| <b>Baço BAP</b>      |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP           | 35,1 ± 6,3                   | 42,8 ± 9,7*                       | 42,5 ± 9,7*                         | 43,8 ± 8,3*                          |
| Mediana <sup>#</sup> | 33,9 (26,3-39,0)             | 40,5 (30,6-60,7)                  | 42,0 (24,0-58,0)                    | 42,0 (34,0-63,0)                     |
| <b>Linfonodo PP</b>  |                              |                                   |                                     |                                      |
| Média ± DP           | N.V.                         | 1,8 ± 1,0                         | N.V.                                | N.V.                                 |
| Mediana <sup>#</sup> |                              | 2,1 (0,0-2,9)                     |                                     |                                      |

Os valores estão representados pela média ± desvio padrão (mm).

\* diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos indivíduos não infectados.

<sup>#</sup> representa a mediana e a variação dos valores (Min-Max).

CT – Grupo controle

AGD-AT – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, antes da terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT I – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, um ano após terapêutica específica com praziquantel

AGD-PT II – Grupo de pacientes apresentando a forma clínica aguda da esquistossomose, dois anos após terapêutica específica com praziquantel

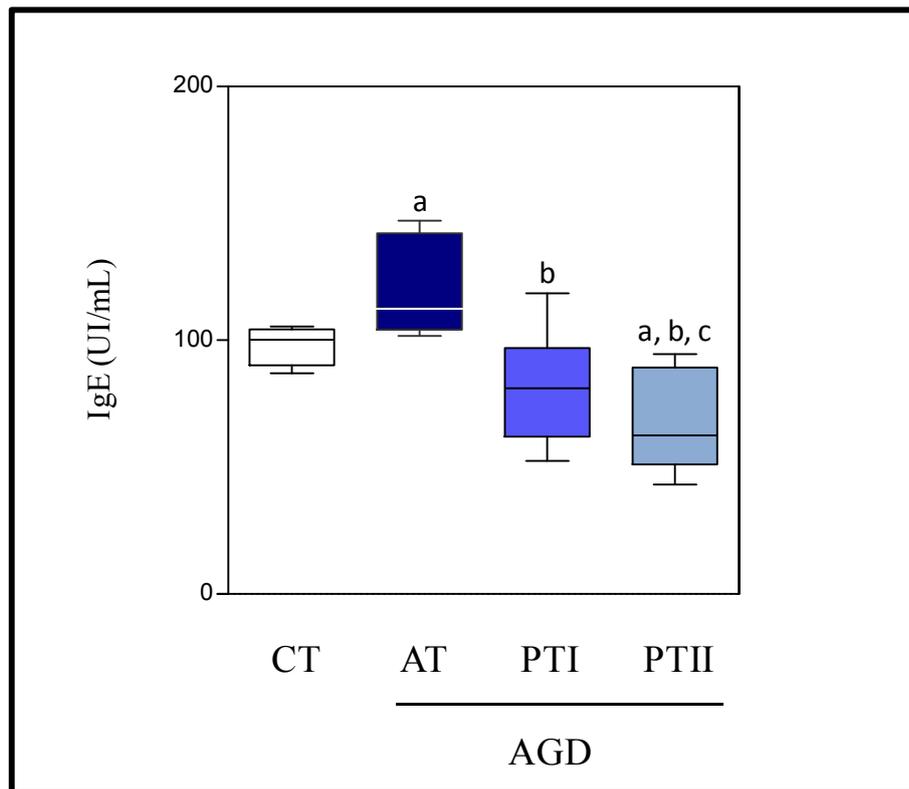
N.V. – não visualizados (em indivíduos saudáveis, os linfonodos periporiais normalmente não são visualizados pela ultrassonografia).

LON: longitudinal; AP: ântero-posterior; PP: periportal.

#### ***5.1.4 Determinação dos níveis de IgE total no plasma de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel***

Com o intuito de se investigar alterações nos níveis de IgE total induzidas pela infecção e pelo tratamento com praziquantel, sua concentração foi determinada no plasma de indivíduos saudáveis (grupo CT) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (grupo AGD-AT), um ano (grupo AGD-PT I) e dois anos (grupo AGD-PT II) após terapêutica específica. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente (**Figura 10**).

A avaliação da concentração plasmática de IgE total (UI/mL) demonstrou aumento significativo no grupo AGD-AT ( $121,1 \pm 20,0$  UI/mL) em relação ao grupo CT ( $98,2 \pm 7,9$  UI/mL). No grupo AGD-PT I houve uma diminuição significativa da concentração de IgE ( $82,7 \pm 20,0$  UI/mL) em relação ao grupo AGD-AT, apresentando valores similares aos do grupo CT. Já no caso do grupo AGD-PT II ( $67,6 \pm 18,8$  UI/mL) foi observada uma diminuição significativa dos níveis de IgE em relação aos valores encontrados para todos os demais grupos avaliados (**Figura 10**).



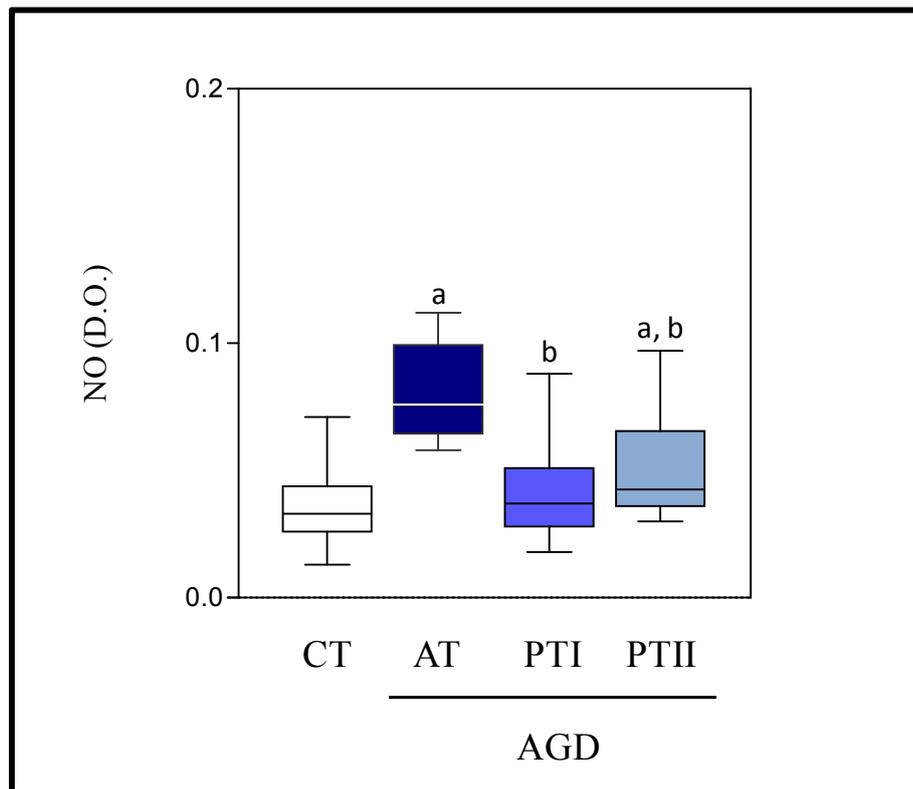
**Figura 10:** Concentração plasmática de IgE total de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração plasmática de IgE em UI/mL. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.

**5.1.5 Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de cultura de GRANULÓCITOS, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel**

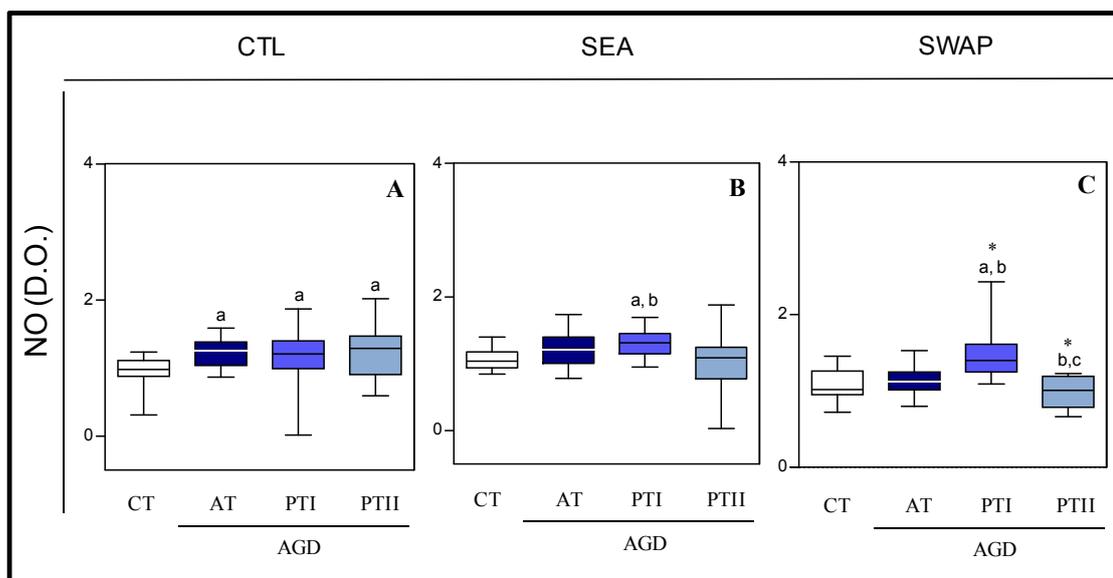
A avaliação da produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) no plasma e em sobrenadantes de cultura de granulócitos, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, nos indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel foi realizada indiretamente em função da produção de Nitrato, com base na análise dos valores de densidade óptica (D.O.) obtidos, utilizando filtro de 540 nm. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente e as diferenças dentro do mesmo grupo em função dos estímulos está representada por \* (CT) e \*\* (SEA) (**Figuras 11 e 12**).

A avaliação dos níveis plasmáticos de NO demonstrou aumento estatisticamente significativo no grupo AGD-AT ( $0,08 \pm 0,02$  D.O.) em relação ao grupo CT ( $0,04 \pm 0,02$  D.O.). No grupo AGD-PT I foi observada uma diminuição significativa dos níveis de NO ( $0,04 \pm 0,02$  D.O.) em relação ao grupo AGD-AT. No grupo AGD-PT II também foi observada uma diminuição dos níveis de NO ( $0,05 \pm 0,02$  D.O.) em relação ao grupo AGD-AT (**Figura 11**).

Nos sobrenadantes provenientes da cultura controle (CTL - **Figura 12A**) a análise de NO demonstrou um aumento estatisticamente significativo nos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II quando comparados ao grupo CT. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 12B**) a produção de NO foi superior no grupo AGD-PT I quando comparado aos grupos CT e AGD-AT. Já nos sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 12C**) foi observado um aumento dos níveis de NO no grupo AGD-PT I em relação a todos os grupos avaliados. Além disso, foi observada uma diminuição de NO no grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-AT. A produção de NO dentro dos grupos AGD-PT I e AGD-PT II foi estatisticamente maior quando estimulado com SWAP em comparação às culturas controles (**Figuras 12A, 12B e 12C**).



**Figura 11:** Níveis plasmáticos em densidade óptica (D.O.) de Óxido Nítrico (NO), pela medida indireta de nitrato, de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração plasmática de NO em densidade óptica (D.O.). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.



**Figura 12:** Níveis de Óxido Nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel nas culturas controle (CTL), antígenos solúveis do ovo (SEA) e antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP). Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração plasmática de NO em densidade óptica (D.O.). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente e as diferenças dentro do mesmo grupo estão representadas por \* (CT) e \*\* (SEA).

**5.1.6 Avaliação das citocinas e quimiocinas no plasma e em sobrenadantes de cultura de GRANULÓCITOS, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, em indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel**

A produção *in vitro* das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-3, L-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e G-CSF e das quimiocinas CXCL-8 e CCL24) no plasma e em sobrenadantes de cultura de granulócitos, na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica com SEA e SWAP, de indivíduos não infectados e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose antes e após terapêutica específica com praziquantel, foi avaliada por meio do sistema CBA, conforme descrito nos Materiais e Métodos, sendo seus resultados expressos em pg/mL. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente e as diferenças dentro do mesmo grupo em função dos estímulos está representada por \* (CTL) e \*\* (SEA) (**Figuras 13, 14, 15 e 16**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-3, L-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e G-CSF entre os grupos avaliados (**Figuras 13 e 14**).

Os níveis plasmáticos de CXCL-8 (**Figura 13A**) aumentaram significativamente no grupo AGD-AT em relação ao grupo CT e diminuíram quando comparado ao grupo AGD-PT II. Já os níveis de GM-CSF (**Figura 14B**) foram similares nos grupos AGD-AT e AGD-PT I, em relação ao grupo CT, diminuindo significativamente no grupo AGD-PT II, em relação ao grupo AGD-PT I. Além disso, houve um aumento significativo dos níveis de CCL24 (**Figura 14C**) do grupo AGD-PT I em relação ao grupo AGD-AT. No grupo AGD-PT II, por sua vez, houve uma diminuição significativa em relação ao grupo CT.

De maneira geral, podemos observar que houve uma diminuição da citocina GM-CSF e da quimiocina CXCL-8 dois anos após quimioterapia e um aumento da quimiocina CCL24 um ano após quimioterapia, não se alterando dois anos após quimioterapia específica com praziquantel.

Nos sobrenadantes provenientes da cultura controle (CTL - **Figura 15A**) a análise de CXCL-8 demonstrou um aumento significativo nos grupos AGD-AT e AGD-PT II em relação ao grupo CT. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 15B**) os resultados demonstraram aumento significativo de CXCL-8 no grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-AT. Já nos sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15C**) houve um aumento significativo de CXCL-8 no grupo AGD-AT em relação ao grupo CT. Além disso,

observou-se aumento dessa quimiocina no grupo AGD-PT I quando comparado ao grupo AGD-AT. Considerando o grupo AGD-PT II foi observada uma diminuição de CXCL-8 em relação ao grupo AGD-PT I. No grupo CT foi observada uma maior produção de CXCL-8 quando estimulado com SEA e SWAP, comparado a cultura CTL. Já no grupo AGD-PT I a produção de CXCL-8 foi maior na cultura estimulada com SWAP, quando comparado as culturas CTL e a SEA (**Figuras 15A, 15B e 15C**).

Na análise da citocina IL-1 $\beta$  da cultura controle (CTL - **Figura 15D**) houve um aumento significativo no grupo AGD-AT em relação ao grupo CT, além disso, foi observado um aumento significativo dessa citocina no grupo AGD-PT II quando comparado com os grupos CT e AGD-PT I. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 15E**), a produção de IL-1 $\beta$  mostrou-se aumentada no grupo AGD-AT e AGD-PT II quando comparado ao grupo CT. Considerando os sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15F**) observou-se aumento significativo dessa citocina em todos os tempos avaliados em comparação ao grupo CT. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentro de um mesmo grupo em função dos diferentes estímulos (**Figuras 15D, 15E e 15F**).

Os resultados da síntese de IL-6 nos sobrenadantes da cultura controle (CTL - **Figura 15G**) e da cultura estimulada com SEA (**Figura 15H**) mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-PT I. Considerando os sobrenadantes provenientes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15I**) não foi observada nenhuma alteração significativa. No entanto, nesta mesma cultura foi observado que a produção de IL-6 no grupo AGD-AT foi superior em relação à cultura CTL (**Figuras 15G, 15H e 15I**).

Nos sobrenadantes da cultura controle (CTL - **Figura 15J**) a análise da citocina IL-12p70 demonstrou um aumento significativo nos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II quando comparado ao grupo CT. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 15K**) a produção de IL-12p70 mostrou um aumento significativo nos grupos AGD-PT I e AGD-PT II, quando comparados ao grupo CT. Já nos sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15L**) a produção de IL-12p70 aumentou significativamente nos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II em relação ao grupo CT. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentro de um mesmo grupo em função dos diferentes estímulos (**Figuras 15J, 15K e 15L**).

Nos sobrenadantes da cultura controle (CTL - **Figura 15M**) a análise da citocina TNF- $\alpha$  demonstrou um aumento significativo no grupo AGD-PT II em relação aos grupos CT e AGD-AT. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 15N**) a produção de

TNF- $\alpha$  também mostrou um aumento estatisticamente significativo nos grupos AGD-PT I e AGD-PT II em relação ao grupo CT. Já nos sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15O**) foi observado um aumento estatisticamente significativo nos grupos AGD-AT e AGD-PT I em relação ao grupo CT. A produção de TNF- $\alpha$  dentro do grupo AGD-AT foi estatisticamente superior quando estimulado com SWAP em comparação as culturas CTL e estimulada com SEA (**Figuras 15M, 15N e 15O**).

Nos sobrenadantes da cultura controle (CTL - **Figura 15P**) a análise da citocina IL-10 não demonstrou nenhuma alteração entre os grupos avaliados. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 15Q**) foi observado que a produção de IL-10 aumentou nos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II em relação ao grupo CT. Já nos sobrenadantes provenientes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 15R**) foi observado um aumento significativo dessa citocina nos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II quando comparado ao grupo CT. Além disso, foi observada uma diminuição significativa de IL-10 no grupo AGD-PT I em relação ao grupo AGD-AT. A produção de IL-10 dentro do grupo AGD-AT foi estatisticamente superior quando estimulada com SWAP em comparação as culturas CTL e SEA (**Figuras 15P, 15Q e 15R**).

Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SWAP (**Figura 16C**) foi observada uma diminuição estatisticamente significativa de G-CSF nos grupos AGD-AT e AGD-PT I em relação ao grupo CT.

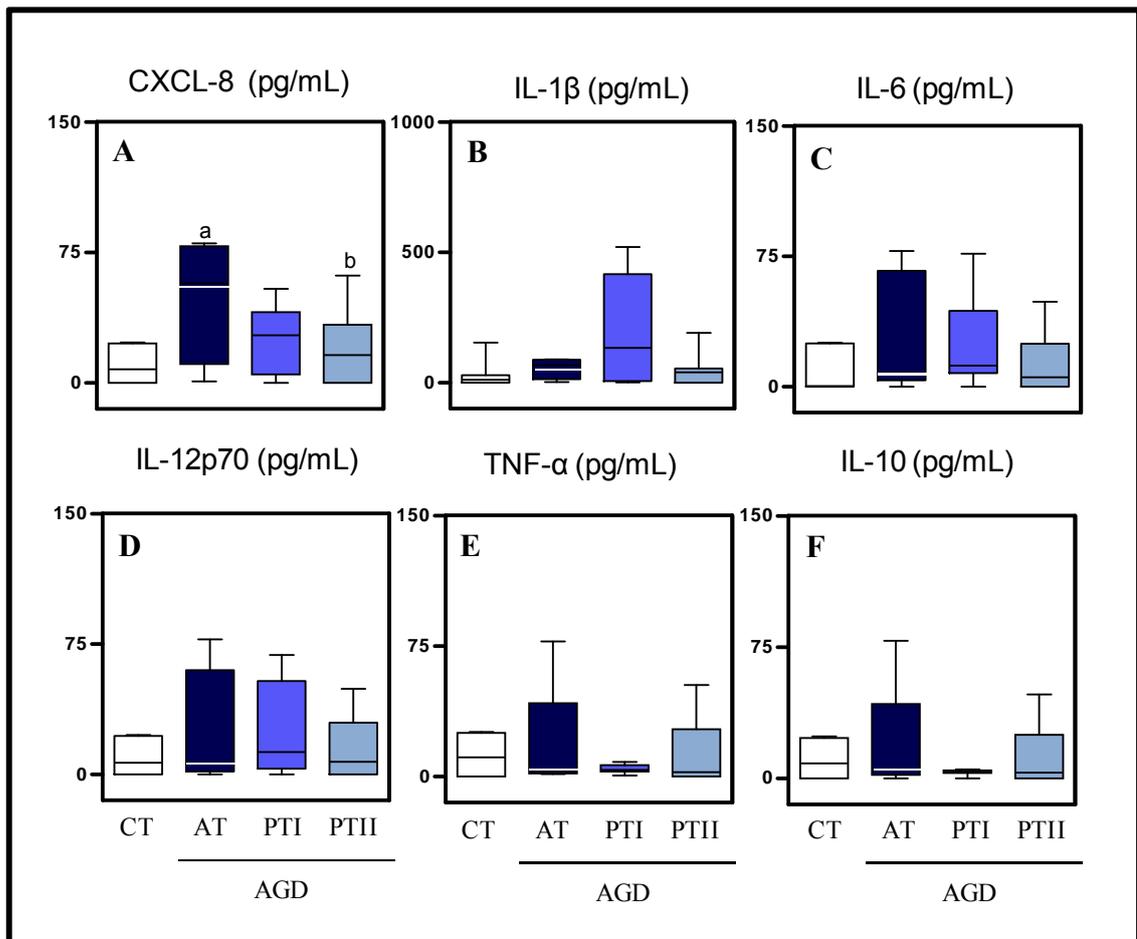
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II, em relação à produção da citocina GM-CSF na cultura não estimulada e estimulada com SEA e SWAP. No entanto, a produção de GM-CSF apresentou uma diminuição significativa dessa citocina na cultura estimulada com SWAP em relação à cultura CTL (**Figuras 16D, 16E e 16F**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados e entre os estímulos em relação à produção da quimiocina CCL24 (**Figuras 16G, 16H e 16I**).

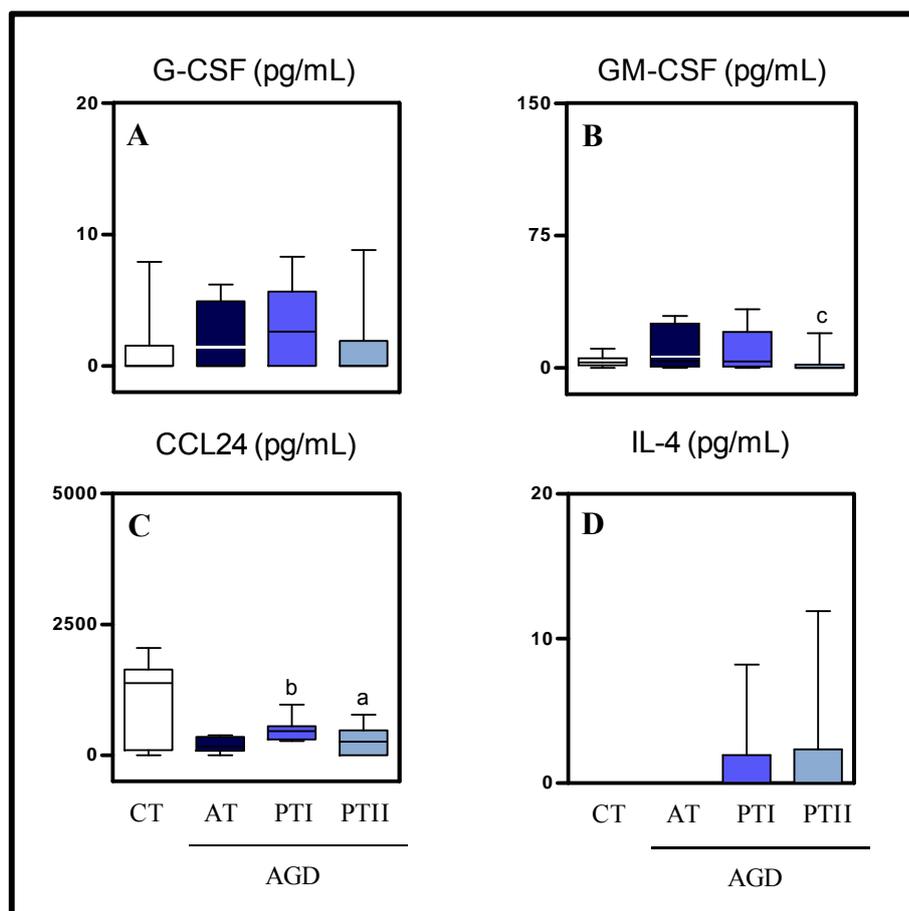
Nos sobrenadantes da cultura controle (CTL - **Figura 16J**) e da cultura estimulada com SWAP (**Figura 16L**) a análise da citocina IL-3 não demonstrou alterações estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 16K**) foi observada uma diminuição estatisticamente significativa no grupo AGD-PT I em relação ao grupo CT. A produção de IL-3 não apresentou diferenças estatisticamente significativas dentro de um mesmo grupo em função dos diferentes estímulos (**Figuras 16J, 16K e 16L**).

A análise da citocina IL-4 nos sobrenadantes provenientes da cultura controle (CTL - **Figura 16M**) e da cultura estimulada com SWAP (**Figura 16O**) não demonstrou alterações estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Nos sobrenadantes da cultura estimulada com SEA (**Figura 16N**) foi observada uma diminuição estatisticamente significativa nos grupos AGD-AT e AGD-PT I em relação ao grupo CT. A produção de IL-4 não apresentou diferenças estatisticamente significativas dentro de um mesmo grupo em função dos diferentes estímulos (**Figuras 16M, 16N e 16O**).

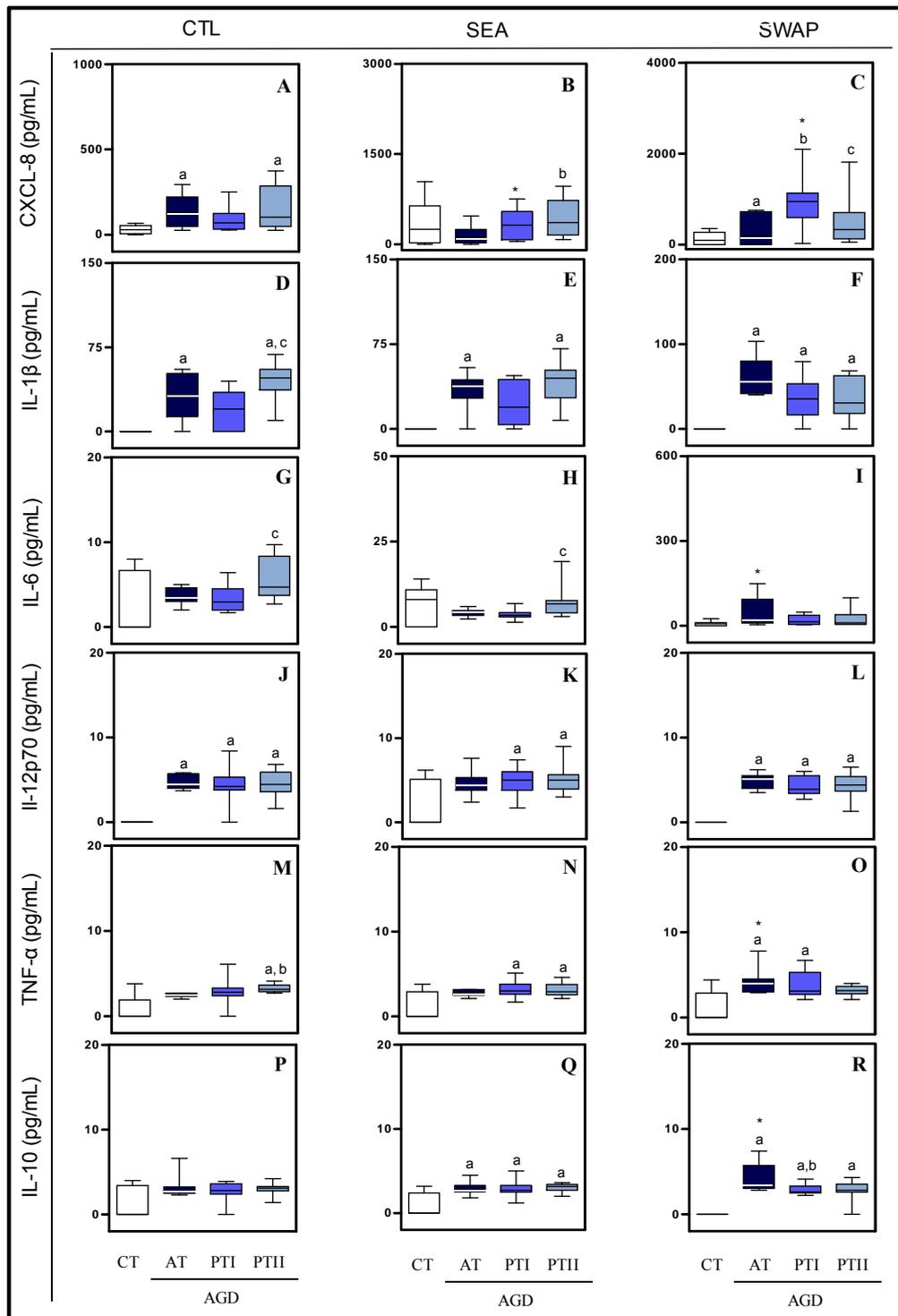
De maneira geral, podemos observar que a avaliação dos sobrenadantes das culturas de granulócitos sem estímulo demonstrou um aumento das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e a quimiocina CXCL-8, já os sobrenadantes provenientes das culturas estimuladas com SEA demonstraram uma elevação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, e por sua vez, os sobrenadantes provenientes das culturas estimuladas com SWAP apresentaram um aumento na produção de IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e TNF- $\alpha$ , sendo que essas alterações persistiram mesmo nos sobrenadantes avaliados dois anos após quimioterapia específica com praziquantel.



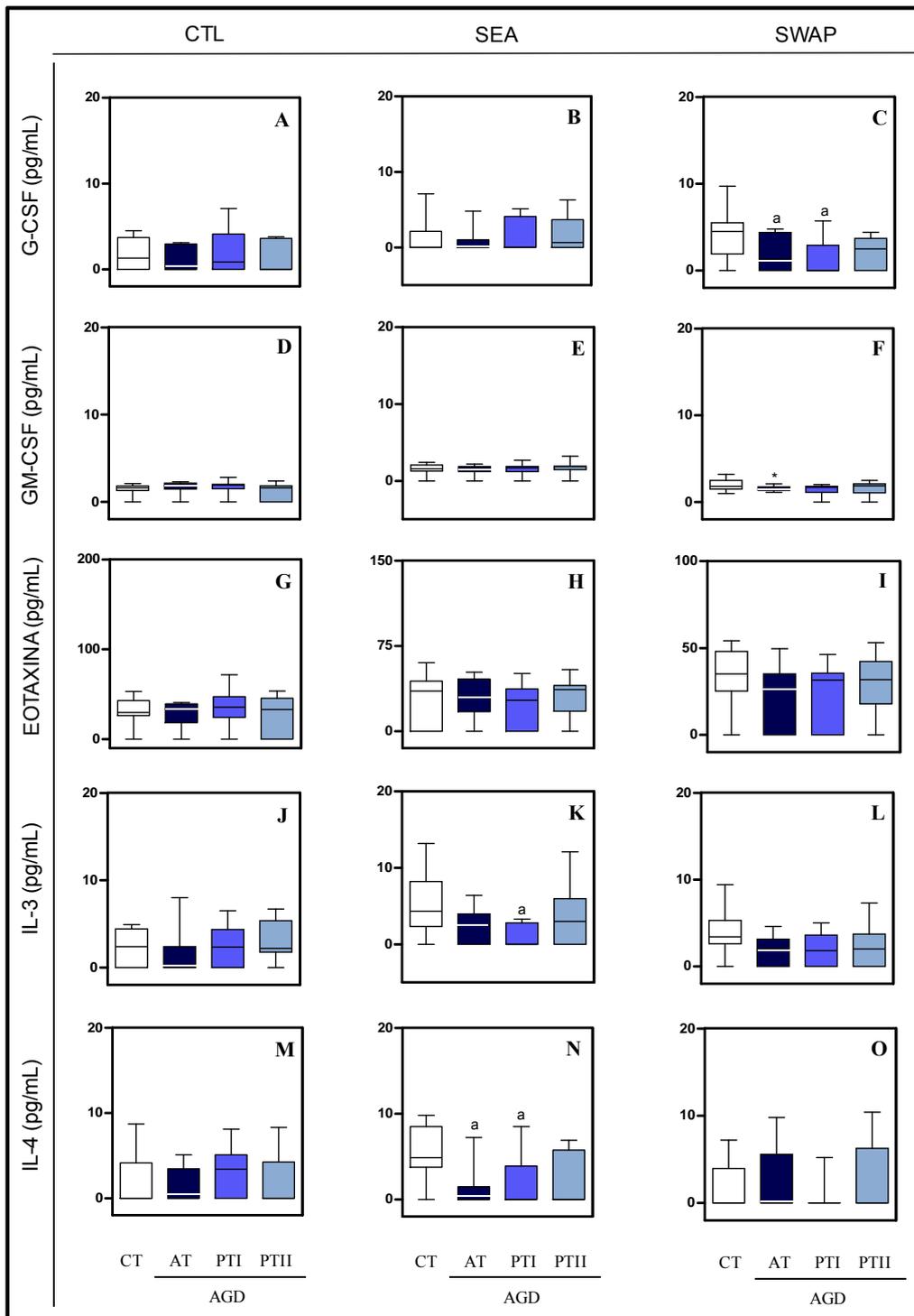
**Figura 13:** Análise da produção de citocinas/quimiocinas CXCL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 do plasma de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose. Os níveis das citocinas/quimiocinas (A) CXCL-8, (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (D) IL-12p70, (E) TNF- $\alpha$  e (F) IL-10 foram quantificados utilizando-se o sistema CBA, a partir do plasma de indivíduos saudáveis (CT  $\square$  = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT  $\blacksquare$  = 16), um ano (AGD-PT I  $\square$  = 13) e dois anos (AGD-PT II  $\square$  = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração plasmática dos níveis de citocinas/quimiocinas avaliados. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.



**Figura 14:** Análise da produção de citocinas/quimiocinas G-CSF, GM-CSF, CCL24 e IL-4 do plasma de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose. Os níveis das citocinas/quimiocinas (A) G-CSF, (B) GM-CSF, (C) CCL24 e (D) IL-4 foram quantificados utilizando-se o sistema CBA, a partir do plasma de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração plasmática dos níveis de citocinas/quimiocinas avaliados. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente.



**Figura 15:** Níveis de citocinas/quimiocinas CXCL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose. Os níveis das citocinas/quimiocinas (A, B, C) CXCL-8, (D, E, F) IL-1 $\beta$ , (G, H, I) IL-6, (J, K, L) IL-12, (M, N, O) TNF- $\alpha$  e (P, Q, R) IL-10 foram quantificados utilizando-se o sistema CBA, em sobrenadantes de cultura de granulócitos de indivíduos saudáveis (CT  $\square$  = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT  $\blacksquare$  = 16), um ano (AGD-PT I  $\square$  = 13) e dois anos (AGD-PT II  $\square$  = 11) após terapêutica específica com praziquantel nas culturas controle (CTL), antígenos solúveis do ovo (SEA) e antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP). Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração das citocinas/quimiocinas avaliadas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente e as diferenças dentro do mesmo grupo estão representadas por \* (CT) e \*\* (SEA).



**Figura 16:** Níveis de citocinas/quimiocinas G-CSF, GM-CSF, CCL24, IL-3 e IL-4 nos sobrenadantes de cultura de granulócitos não-estimulados e estimulados com SEA e SWAP de indivíduos saudáveis e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose. Os níveis das citocinas/quimiocinas (A, B, C) G-CSF, (D, E, F) GM-CSF, (G, H, I) CCL24, (J, K, L) IL-3 e (M, N, O) IL-4 foram quantificados utilizando-se o sistema CBA, em sobrenadantes de cultura de granulócitos de indivíduos saudáveis (CT □ = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT ■ = 16), um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel nas culturas controle (CTL), antígenos solúveis do ovo (SEA) e antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP). Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da concentração das citocinas/quimiocinas avaliadas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CT, AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente e as diferenças dentro do mesmo grupo estão representadas por \* (CT) e \*\* (SEA).

### **5.1.7 Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular em EOSINÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel**

Com o objetivo de se avaliar o panorama imunofenotípico dos eosinófilos do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni, realizou-se uma análise *ex vivo* do perfil de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular, analisando-se o valor absoluto de eosinófilos/mm<sup>3</sup> expressando os diferentes marcadores avaliados e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto no primeiro e segundo ano após o tratamento (**Figuras 17, 18 e 19**). É importante salientar que os dados provenientes das avaliações antes do tratamento e um ano após terapêutica específica, constituíram tema da dissertação de mestrado do estudante Matheus Fernandes Costa e Silva no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR. Em função disso, optou-se por apresentar somente os dados referentes às avaliações do segundo ano após terapêutica, comparando os mesmos com as avaliações referentes ao primeiro ano após o tratamento. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

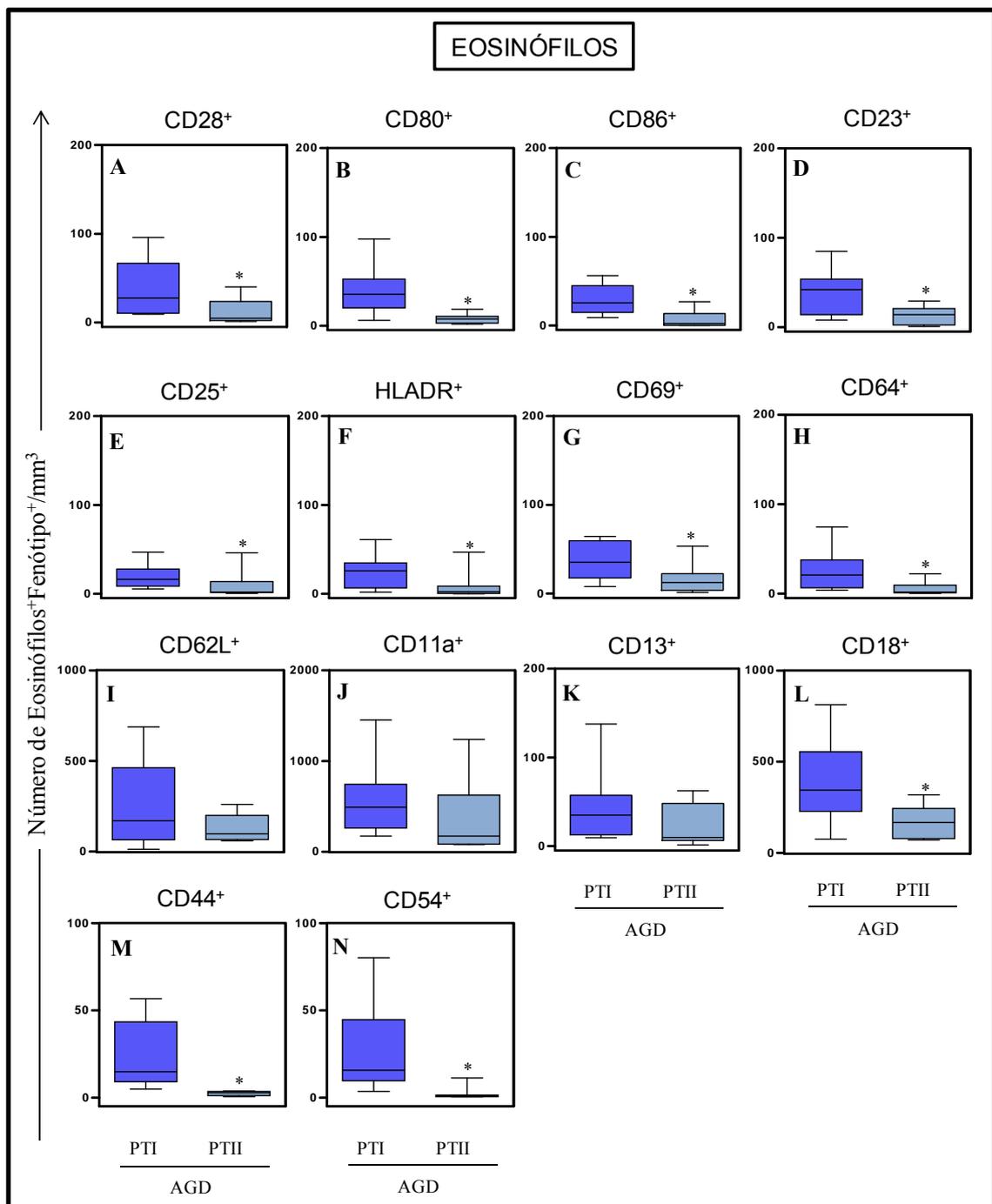
A análise do perfil de moléculas co-estimuladoras (CD28, CD80 e CD86) mostrou diminuição estatisticamente significativa do número de eosinófilos CD28<sup>+</sup> ( $12 \pm 16/\text{mm}^3$  – **Figura 17A**), CD80<sup>+</sup> ( $8 \pm 15/\text{mm}^3$  – **Figura 17B**) e CD86<sup>+</sup> ( $7 \pm 9/\text{mm}^3$  – **Figura 17C**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I (CD28<sup>+</sup>:  $41 \pm 30/\text{mm}^3$ ; CD80<sup>+</sup>:  $24 \pm 19/\text{mm}^3$ ; CD86<sup>+</sup>:  $28 \pm 16/\text{mm}^3$ , **Figuras 17A, 17B e 17C**, respectivamente).

A avaliação do perfil de moléculas de ativação (CD23, CD25, HLA-DR e CD69) demonstrou diminuição significativa do número de eosinófilos CD23<sup>+</sup> ( $12 \pm 10/\text{mm}^3$  – **Figura 17D**), CD25<sup>+</sup> ( $9 \pm 15/\text{mm}^3$  – **Figura 17E**), HLA-DR<sup>+</sup> ( $8 \pm 5/\text{mm}^3$  – **Figura 17F**) e CD69<sup>+</sup> ( $15 \pm 17/\text{mm}^3$  – **Figura 17G**) do grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-PT I (CD23<sup>+</sup>:  $37 \pm 27/\text{mm}^3$ ; CD25<sup>+</sup>:  $20 \pm 14/\text{mm}^3$ ; HLA-DR<sup>+</sup>:  $39 \pm 27/\text{mm}^3$ ; CD69<sup>+</sup>:  $37 \pm 22/\text{mm}^3$ , **Figuras 17D, 17E e 17G**, respectivamente).

A análise do receptor de IgG (CD64) demonstrou diminuição significativa do número de eosinófilos CD64<sup>+</sup> (**Figura 17H**) do grupo AGD-PT II ( $5 \pm 7/\text{mm}^3$ ) em relação ao grupo AGD-PT I ( $26 \pm 23/\text{mm}^3$  – **Figura 17H**).

Dentre as moléculas de adesão celular avaliadas (CD62L, CD11a, CD13, CD18, CD44 e CD54) observou-se uma diminuição estatisticamente significativa de eosinófilos CD18<sup>+</sup> ( $175 \pm 94/\text{mm}^3$  – **Figura 17L**), CD44<sup>+</sup> ( $2 \pm 1/\text{mm}^3$  - **Figura 17M**) e CD54<sup>+</sup> ( $2 \pm 4/\text{mm}^3$  - **Figura 17N**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I (CD18<sup>+</sup>:  $400 \pm$

224/mm<sup>3</sup>; CD44<sup>+</sup>: 24 ± 19/mm<sup>3</sup>; CD54<sup>+</sup>: 32 ± 31/mm<sup>3</sup>, **Figuras 17L, 17M, 17N**, respectivamente). Os demais marcadores avaliados (CD62L, CD11a+ e CD13) não apresentaram alteração estatisticamente significativa (p<0,05).



**Figura 17:** Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), CD80 (B) e CD86 (C), moléculas de ativação CD23 (D), CD25 (E), HLA-DR (F) e CD69 (G), receptor de IgG (Fc $\gamma$ R1) CD64 (H) e moléculas de adesão CD62L (I), CD11a (J), CD13 (K), CD18 (L), CD44 (M) e CD54 (N) em eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de eosinófilos<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

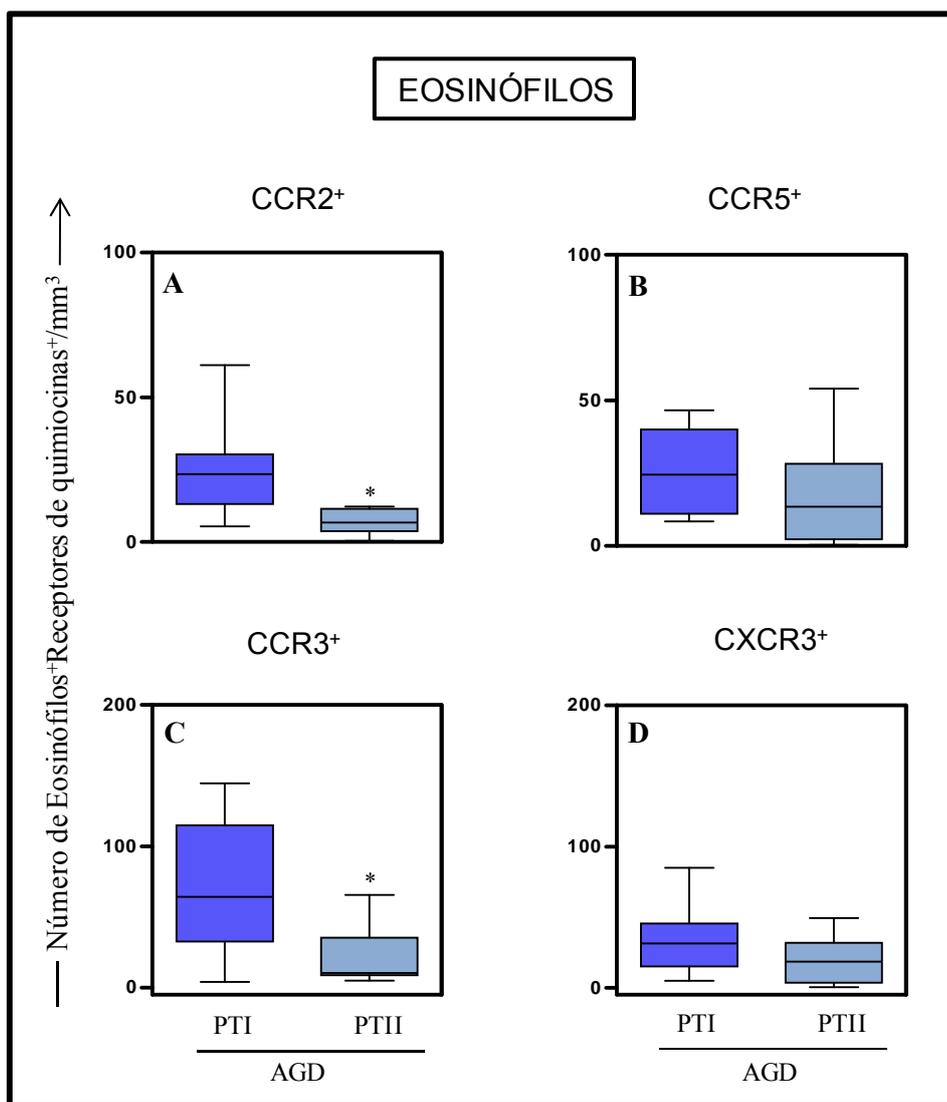
### ***5.1.8 Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em EOSINÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após terapêutica com praziquantel***

A análise do número de receptores de quimiocinas em eosinófilos foi realizada com o objetivo de se avaliar uma possível migração dessas células para o foco inflamatório após a infecção pelo *S. mansoni* e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto. Nesse estudo, foram avaliados os receptores de quimiocinas CCR2, CCR5, CCR3 e CXCR3 (**Figuras 18A, 18B, 18C e 18D**, respectivamente), que foram analisados pelo valor absoluto em mm<sup>3</sup> de eosinófilos positivos para esses marcadores.

A análise dos dados demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de eosinófilos CCR2<sup>+</sup> ( $7 \pm 4/\text{mm}^3$  – **Figura 18A**) e CCR3<sup>+</sup> ( $22 \pm 21/\text{mm}^3$  – **Figura 18C**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I (CCR2<sup>+</sup>:  $26 \pm 17/\text{mm}^3$ ; CCR3<sup>+</sup>:  $71 \pm 48/\text{mm}^3$ , **Figuras 18A e 18C** respectivamente).

Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados imunológicos obtidos com a realização desse estudo, diagramas ilustrativos foram elaborados com as principais alterações no número de moléculas de ativação, co-estimulação, interação, adesão e migração induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e o impacto que o tratamento específico tem sobre esse perfil (**Figura 19**).

De maneira geral, podemos observar que a maioria dos marcadores imunofenotípicos expressos em eosinófilos tiveram uma expressão elevada antes do tratamento, com uma diminuição, um ano após o tratamento, com exceção de marcadores que permaneceram sem alteração, entretanto, dois anos após o tratamento específico podemos observar uma diminuição de quase todos esses marcadores (**Figura 19**).



**Figura 18:** Número de receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) em eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II □ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de eosinófilos<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os receptores de quimiocinas avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

Eosinófilos

|                      | Ativação          |                   |                   | Coestimulação       |                   |                   | Interação         |                    |                   | Adesão            |                   |                   |                   | Migração           |                   |                   |                   |                    |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                      | CD23 <sup>+</sup> | CD25 <sup>+</sup> | CD69 <sup>+</sup> | HLA-DR <sup>+</sup> | CD28 <sup>+</sup> | CD80 <sup>+</sup> | CD86 <sup>+</sup> | CD11a <sup>+</sup> | CD64 <sup>+</sup> | CD13 <sup>+</sup> | CD18 <sup>+</sup> | CD44 <sup>+</sup> | CD54 <sup>+</sup> | CD62L <sup>+</sup> | CCR2 <sup>+</sup> | CCR3 <sup>+</sup> | CCR5 <sup>+</sup> | CXCR3 <sup>+</sup> |
| CT x AGD-AT          | R                 | R                 | R                 | R                   | R                 | R                 | R                 | R                  | R                 | R                 | R                 | R                 | R                 | C                  | R                 | C                 | R                 | R                  |
| AGD-AT x AGD-PT I    | B                 | B                 | C                 | B                   | B                 | B                 | C                 | B                  | C                 | C                 | B                 | B                 | C                 | C                  | B                 | B                 | C                 | C                  |
| AGD-PT I x AGD-PT II | B                 | C                 | C                 | B                   | B                 | B                 | B                 | B                  | C                 | B                 | B                 | B                 | C                 | C                  | B                 | B                 | C                 | C                  |
| CT x AGD-PT II       | C                 | C                 | R                 | C                   | C                 | C                 | C                 | C                  | B                 | C                 | C                 | B                 | C                 | C                  | B                 | C                 | C                 | C                  |

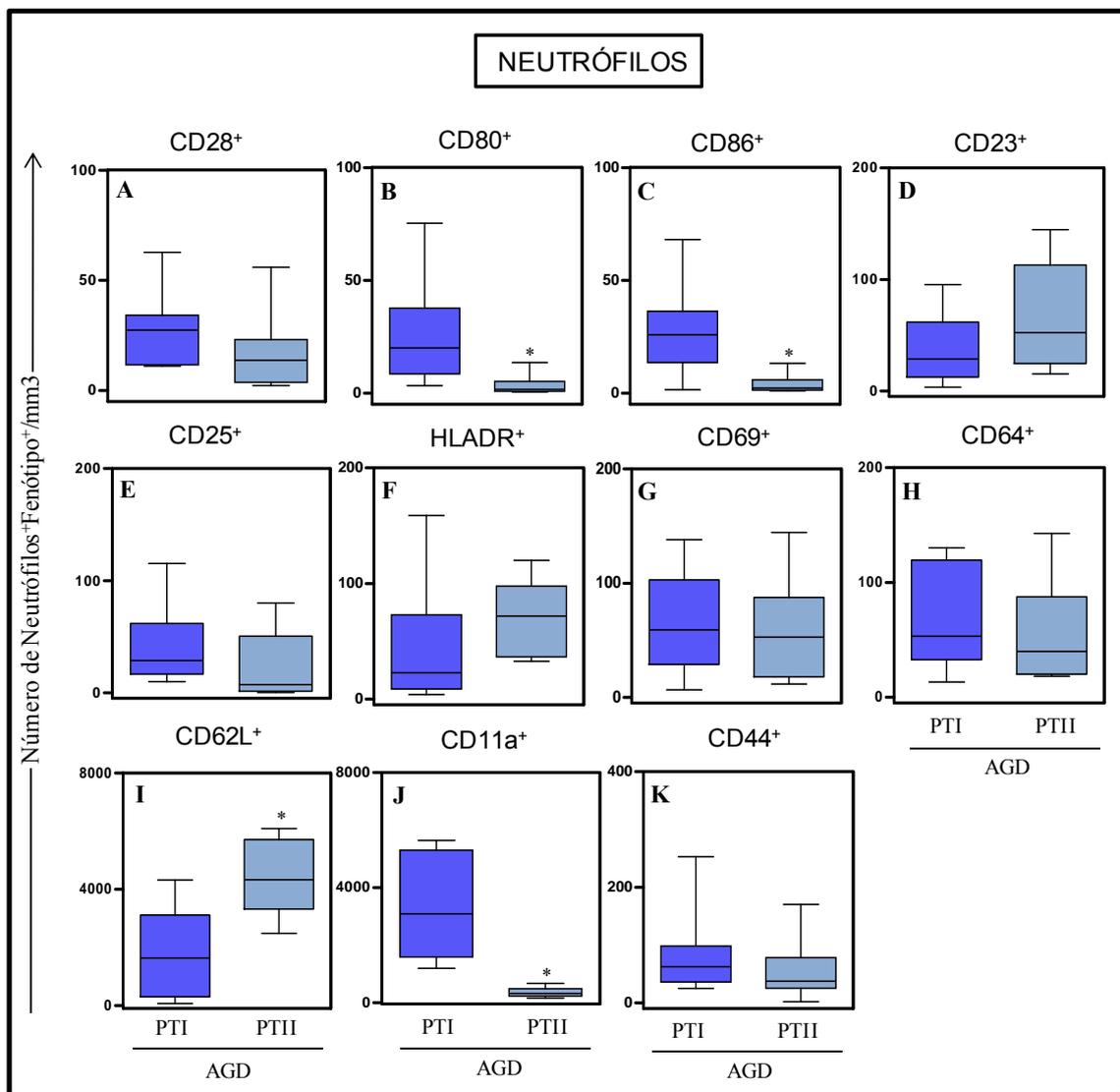
**Figura 19: Principais alterações imunofenotípicas induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e pelo seu tratamento específico.** Os quadrados rosa representam aumento, os azuis diminuição e os cinzas ausência de alteração dos marcadores de superfície celular avaliados em eosinófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CT = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT = 16), um ano (AGD-PT I = 13) e dois anos (AGD-PT II = 11) após terapêutica específica com praziquantel. A primeira linha do diagrama, CT x AGD-AT representa as alterações induzidas pela infecção; a segunda linha do diagrama, AGD-AT x AGD-PT I representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes um ano após a sua realização; a terceira linha do diagrama, AGD-PT I x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização e a quarta linha do diagrama, CT x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização em comparação ao grupo controle.

### **5.1.9 Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por NEUTRÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel**

Da mesma forma que foi realizada a avaliação em eosinófilos, o panorama imunofenotípico de neutrófilos do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, também foi avaliado através de análise *ex vivo* do perfil de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular, analisando-se o valor absoluto de neutrófilos/mm<sup>3</sup> expressando os diferentes marcadores e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto (**Figuras 20, 21 e 22**).

Com relação às moléculas co-estimuladoras (CD28, CD80 e CD86), a análise dos dados demonstrou diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de neutrófilos CD80<sup>+</sup> ( $4 \pm 4/\text{mm}^3$  – **Figura 20B**) e CD86<sup>+</sup> ( $4 \pm 4/\text{mm}^3$  – **Figura 20C**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I (CD80<sup>+</sup>:  $27 \pm 23/\text{mm}^3$ ; CD86<sup>+</sup>:  $35 \pm 30/\text{mm}^3$ , **Figuras 20B e 20C**, respectivamente). As análises do perfil de moléculas de ativação (CD23, CD25, HLA-DR e CD69) e do receptor de IgG (CD64) não demonstraram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) do número de neutrófilos expressando esses marcadores entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II (**Figuras 20D, 20E, 20F, 20G, 20H**).

A avaliação da expressão das moléculas de adesão (CD62L, CD11a e CD44) demonstrou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) do número de neutrófilos CD62L<sup>+</sup> ( $4381 \pm 1310/\text{mm}^3$  – **Figura 20I**) no grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I (CD62L<sup>+</sup>:  $2083 \pm 1425/\text{mm}^3$  - **Figura 20M**). O número de neutrófilos CD11a<sup>+</sup> ( $328 \pm 181/\text{mm}^3$  – **Figura 20J**) do grupo AGD-PT II mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a CD11a<sup>+</sup> ( $3332 \pm 1817/\text{mm}^3$  – **Figura 20J**) do grupo AGD-PT I.



**Figura 20:** Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), CD80 (B) e CD86 (C), moléculas de ativação CD23 (D), CD25 (E), HLA-DR (F) e CD69 (G), receptor de IgG (FcγR1) CD64 (H) e moléculas de adesão CD62L (I), CD11a (J), CD44 (K) em neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de neutrófilos<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

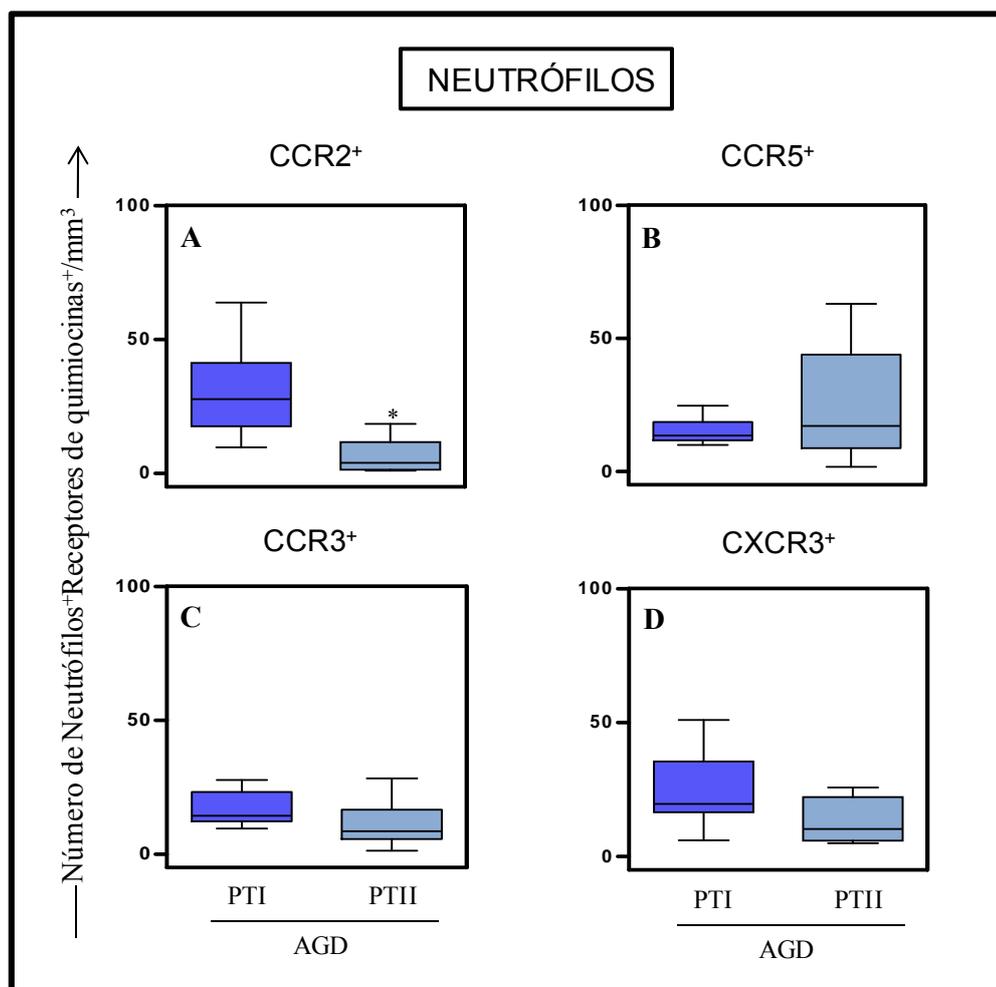
### ***5.1.10 Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em NEUTRÓFILOS do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel***

A avaliação do número de receptores de quimiocinas em neutrófilos foi realizada com o objetivo de se avaliar possível migração dessas células para o foco inflamatório após a infecção pelo *S. mansoni* e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto. Os receptores de quimiocinas CCR2, CCR5, CCR3 e CXCR3 foram analisados pelo valor absoluto em mm<sup>3</sup> de neutrófilos positivos para esses marcadores (Figuras **21A**, **21B**, **21C** e **21D**, respectivamente).

Os resultados demonstraram diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de neutrófilos CCR2<sup>+</sup> ( $7 \pm 6/\text{mm}^3$  – **Figura 21A**) do grupo AGD-PT II quando comparado aos grupos AGD-PT I (CCR2<sup>+</sup>:  $30 \pm 17/\text{mm}^3$  – **Figura 21A**). Os demais marcadores avaliados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II.

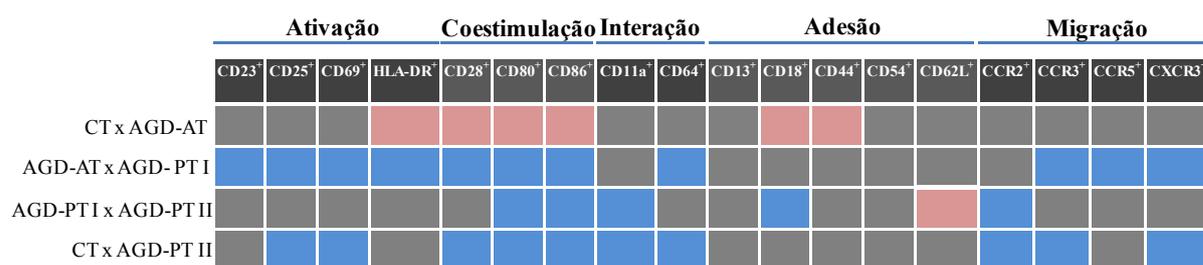
Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados imunológicos obtidos com a realização desse estudo, diagramas ilustrativos foram elaborados com as principais alterações no número de moléculas de ativação, co-estimulação, interação, adesão e migração induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e o impacto que o tratamento específico tem sobre esse perfil (**Figura 22**).

De maneira geral, podemos observar que alguns marcadores imunofenotípicos expressos em neutrófilos tiveram sua expressão elevada antes do tratamento, com uma diminuição, um ano após o tratamento, com exceção de alguns marcadores que permaneceram sem alteração, entretanto, dois anos após o tratamento específico podemos observar uma diminuição desses marcadores, com exceção de CD62L (**Figura 22**).



**Figura 21:** Número dos receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) em neutrófilos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II □ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de neutrófilos<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os receptores de quimiocinas avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

Neutrófilos

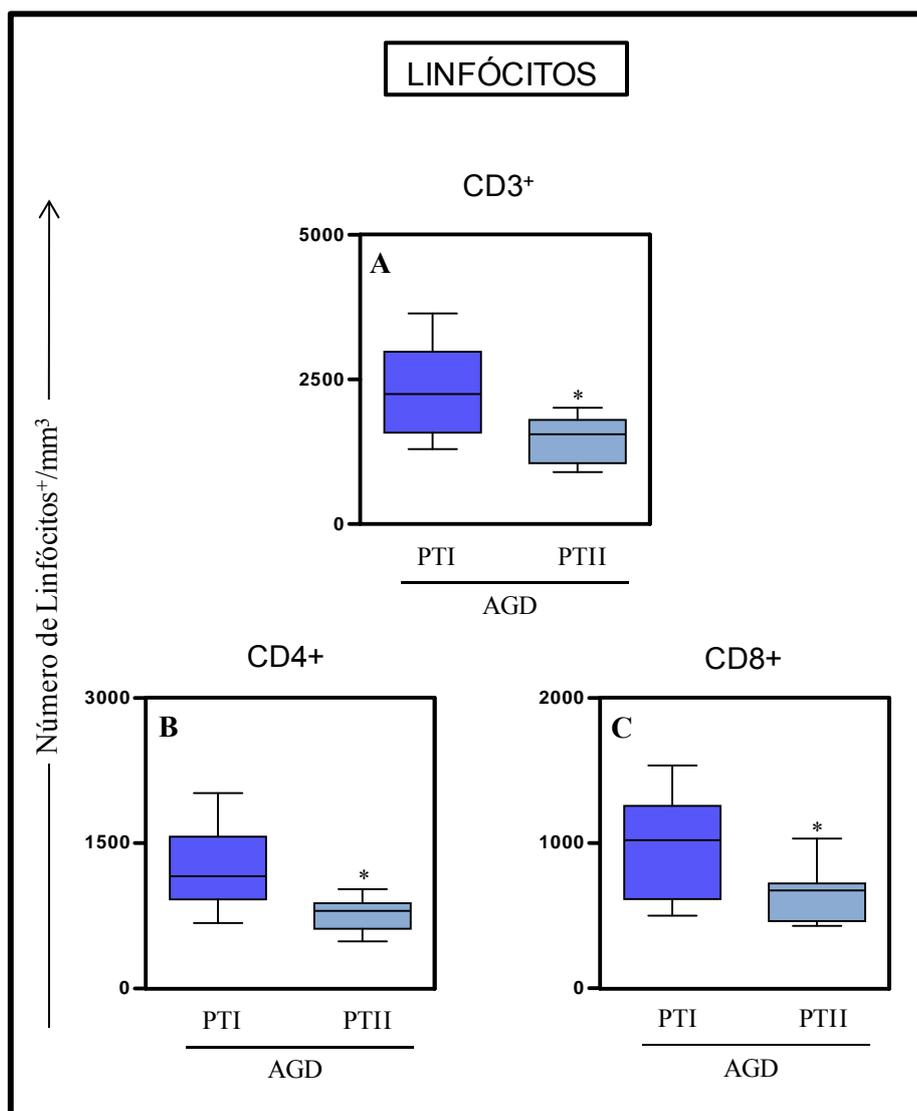


**Figura 22: Principais alterações imunofenotípicas induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e pelo seu tratamento específico.** Os quadrados rosa representam aumento, os azuis diminuição e os cinzas ausência de alteração dos marcadores de superfície celular avaliados em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CT = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT = 16), um ano (AGD-PT I = 13) e dois anos (AGD-PT II = 11) após terapêutica específica com praziquantel. A primeira linha do diagrama, CT x AGD-AT representa as alterações induzidas pela infecção; a segunda linha do diagrama, AGD-AT x AGD-PT I representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes um ano após a sua realização; a terceira linha do diagrama, AGD-PT I x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização e a quarta linha do diagrama, CT x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização em comparação ao grupo controle.

**5.1.11 Análise ex vivo do número absoluto de LINFÓCITOS T (CD3<sup>+</sup>) e suas subpopulações, linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>), do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel**

Nesse estudo foi realizada a análise do número absoluto de linfócitos T e suas subpopulações/mm<sup>3</sup> do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose com o objetivo de se avaliar a participação dessas células na fase aguda da infecção pelo *S. mansoni* e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto (**Figura 23**).

A análise dos resultados mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos TCD3<sup>+</sup> ( $1484 \pm 399/\text{mm}^3$  – **Figura 23A**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I ( $2312 \pm 797/\text{mm}^3$ ). Essa diferença foi representada tanto pela diminuição significativa do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> ( $762 \pm 170/\text{mm}^3$  – **Figura 23B**) como de TCD8<sup>+</sup> ( $641 \pm 190/\text{mm}^3$  – **Figura 23C**) do grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-PT I ( $1262 \pm 416/\text{mm}^3$ ;  $877 \pm 293/\text{mm}^3$ , respectivamente).



**Figura 23:** Número de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) (A), linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) (B) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) (C) do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de linfócitos T/mm<sup>3</sup>, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

### 5.1.12 Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por LINFÓCITOS TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel

Com o intuito de se avaliar o perfil imunofenotípico dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose foi realizada uma análise *ex vivo* de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular, avaliando-se o valor absoluto em mm<sup>3</sup> de linfócitos TCD4<sup>+</sup> positivos para esses marcadores e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto (**Figura 24**).

A análise da molécula co-estimuladora CD28 demonstrou diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> do grupo AGD-PT II ( $830 \pm 584/\text{mm}^3$  – **Figura 24A**) em relação ao grupo AGD-PT I ( $1237 \pm 391/\text{mm}^3$ ).

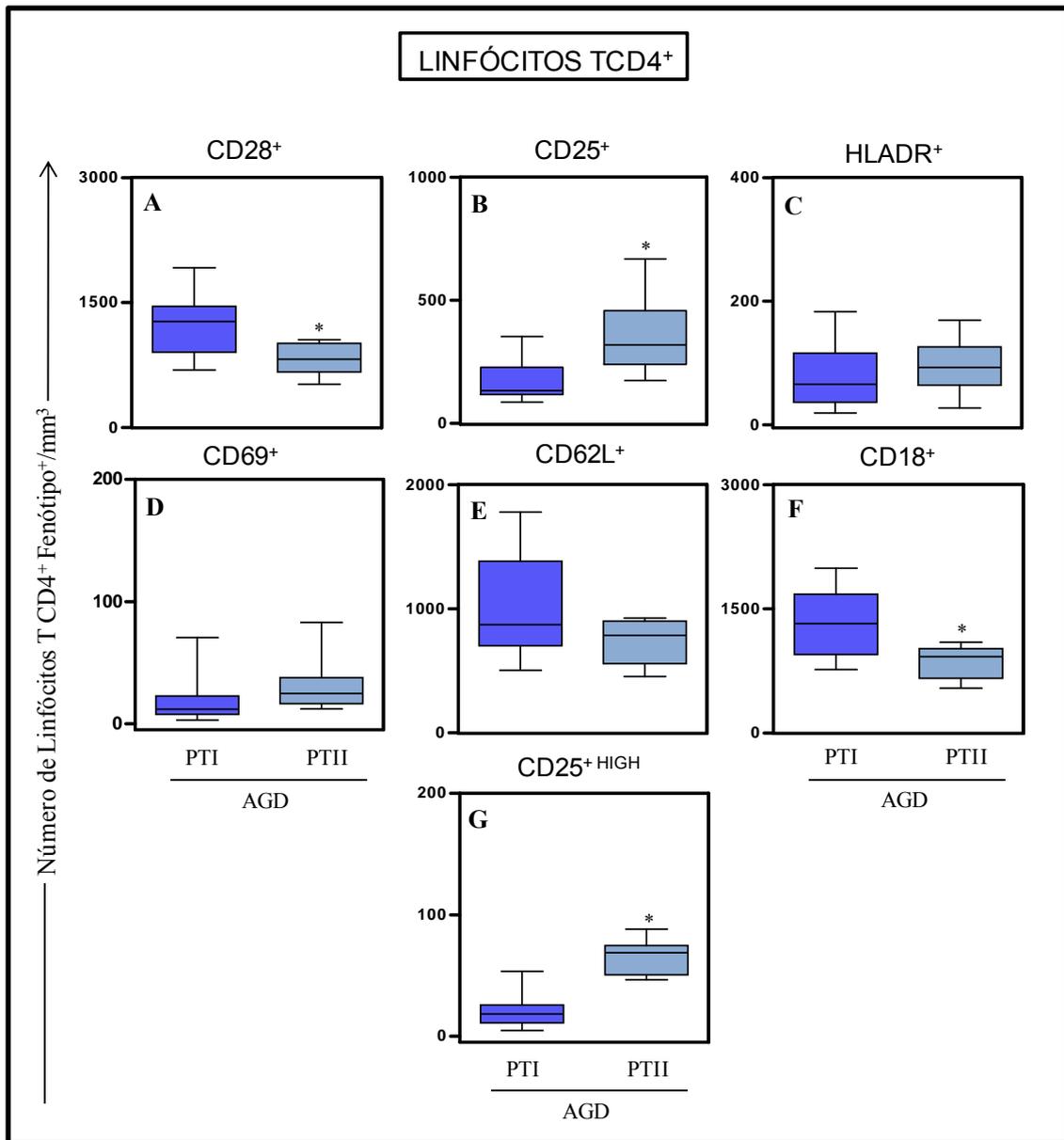
A avaliação do perfil de moléculas de ativação (CD25, HLA-DR e CD69) mostrou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $349 \pm 164/\text{mm}^3$  – **Figura 24B**) do grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-PT I (CD25<sup>+</sup>:  $170 \pm 91/\text{mm}^3$  – **Figura 24B**). Os demais marcadores avaliados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II.

Dentre as moléculas de adesão celular avaliadas (CD62L, CD18) verificou-se diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> do grupo AGD-PT II ( $855 \pm 200/\text{mm}^3$  – **Figura 24F**) quando comparado ao grupo AGD-PT I ( $1322 \pm 422/\text{mm}^3$  – **Figura 24F**).

A análise do número absoluto de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> HIGH/mm<sup>3</sup>, com possível papel regulador (Baecher-Allan et al. 2001), mostrou um aumento significativo do número desses linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> HIGH no grupo AGD-PT II ( $65 \pm 15/\text{mm}^3$  - **Figura 24G**) em relação à AGD-PT I ( $21 \pm 14/\text{mm}^3$  - **Figura 24G**).

Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados imunológicos obtidos com a realização desse estudo, diagramas ilustrativos foram elaborados com as principais alterações no número de moléculas de ativação, co-estimulação, interação, adesão e migração induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e o impacto que o tratamento específico tem sobre esse perfil (**Figura 25**).

De maneira geral, podemos observar que a maioria dos marcadores imunofenotípicos expressos em linfócitos TCD4<sup>+</sup> tiveram uma expressão elevada antes do tratamento, com uma diminuição, um ano após o tratamento, com exceção de alguns marcadores que permaneceram sem alteração, entretanto, dois anos após o tratamento específico podemos observar uma diminuição de quase todos esses marcadores, com exceção de CD25 e CD25H (**Figura 25**).



**Figura 24:** Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), moléculas de ativação CD25 (B), HLA-DR (C) e CD69 (D), moléculas de adesão CD62L (E) e CD18 (F) e CD25<sup>+</sup>HIGH (G) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II □ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de linfócitos TCD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

Linfócitos CD4<sup>+</sup>

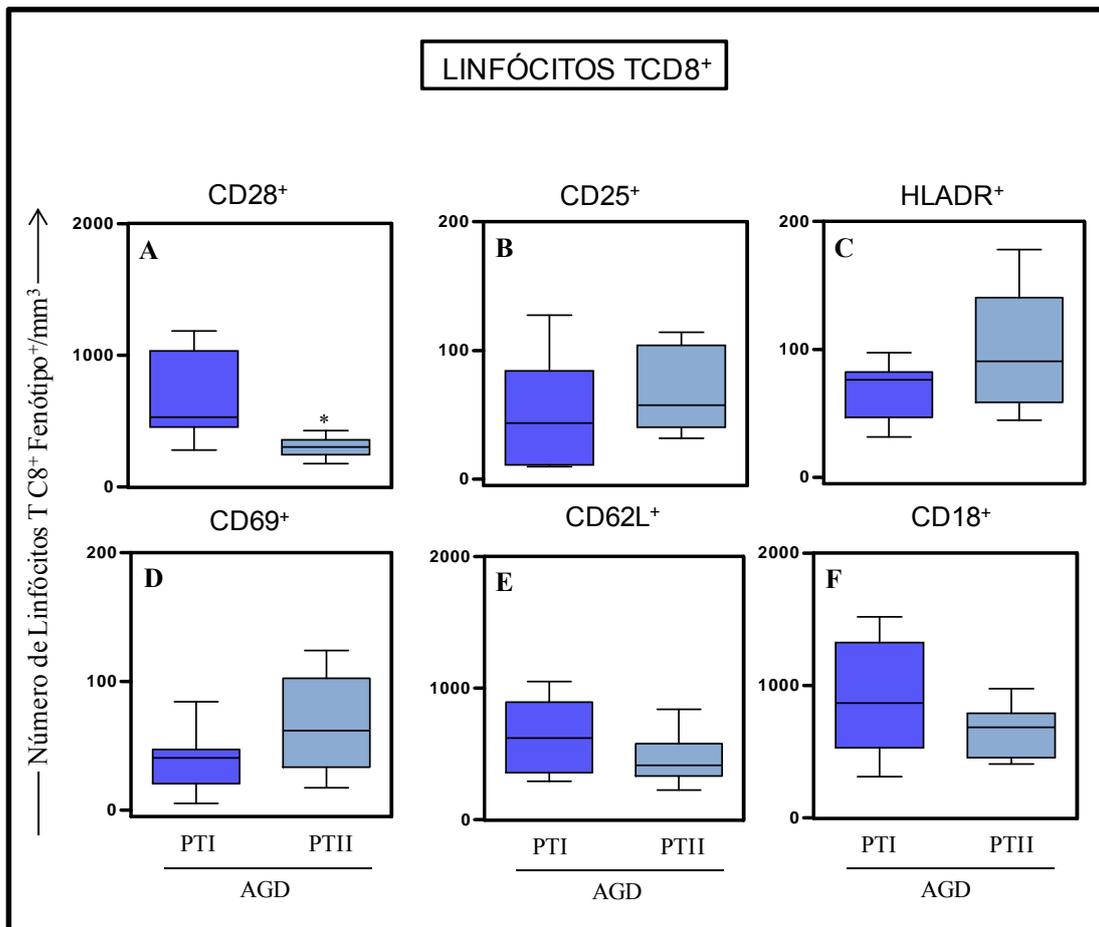
|                      | CD4 <sup>+</sup> |                   | Ativação          |                    |                   | Coestimulação       |                   |                   | Interação         |                    | Adesão            |                   |                   |                   |                    |
|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                      | CD4 <sup>+</sup> | CD23 <sup>+</sup> | CD25 <sup>+</sup> | CD25H <sup>+</sup> | CD69 <sup>+</sup> | HLA-DR <sup>+</sup> | CD28 <sup>+</sup> | CD80 <sup>+</sup> | CD86 <sup>+</sup> | CD11a <sup>+</sup> | CD64 <sup>+</sup> | CD18 <sup>+</sup> | CD44 <sup>+</sup> | CD54 <sup>+</sup> | CD62L <sup>+</sup> |
| CT x AGD-AT          |                  |                   |                   |                    |                   |                     |                   |                   |                   |                    |                   |                   |                   |                   |                    |
| AGD-AT x AGD-PT I    |                  |                   |                   |                    |                   |                     |                   |                   |                   |                    |                   |                   |                   |                   |                    |
| AGD-PT I x AGD-PT II |                  |                   |                   |                    |                   |                     |                   |                   |                   |                    |                   |                   |                   |                   |                    |
| CT x AGD-PT II       |                  |                   |                   |                    |                   |                     |                   |                   |                   |                    |                   |                   |                   |                   |                    |

**Figura 25: Principais alterações imunofenotípicas induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e pelo seu tratamento específico.** Os quadrados rosa representam aumento, os azuis diminuição e os cinzas ausência de alteração dos marcadores de superfície celular avaliados em linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CT = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT = 16), um ano (AGD-PT I = 13) e dois anos (AGD-PT II = 11) após terapêutica específica com praziquantel. A primeira linha do diagrama, CT x AGD-AT representa as alterações induzidas pela infecção; a segunda linha do diagrama, AGD-AT x AGD-PT I representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes um ano após a sua realização; a terceira linha do diagrama, AGD-PT I x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização e a quarta linha do diagrama, CT x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização em comparação ao grupo controle.

**5.1.13 Análise ex vivo do número de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular por LINFÓCITOS TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel**

De forma semelhante à análise realizada para linfócitos TCD4<sup>+</sup>, realizou-se uma análise *ex vivo* de moléculas co-estimuladoras, de ativação e de adesão celular em linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, avaliando-se o valor absoluto em mm<sup>3</sup> de linfócitos TCD8<sup>+</sup> que expressam esses marcadores e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto (**Figura 26**).

Na análise da molécula co-estimuladora CD28 (**Figura 26A**) foi observada uma diminuição estatisticamente significativa no grupo AGD-PTII quando comparado ao grupo AGD-PTI (AGD-PTII: 303 ± 77/mm<sup>3</sup>; AGD-PT I: 652 ± 303/mm<sup>3</sup>). Os demais marcadores avaliados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos.



**Figura 26:** Número de moléculas co-estimuladoras CD28 (A), moléculas de ativação CD25 (B), HLA-DR (C) e CD69 (D), e moléculas de adesão CD62L (E) e CD18 (F) em linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II □ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de linfócitos TCD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

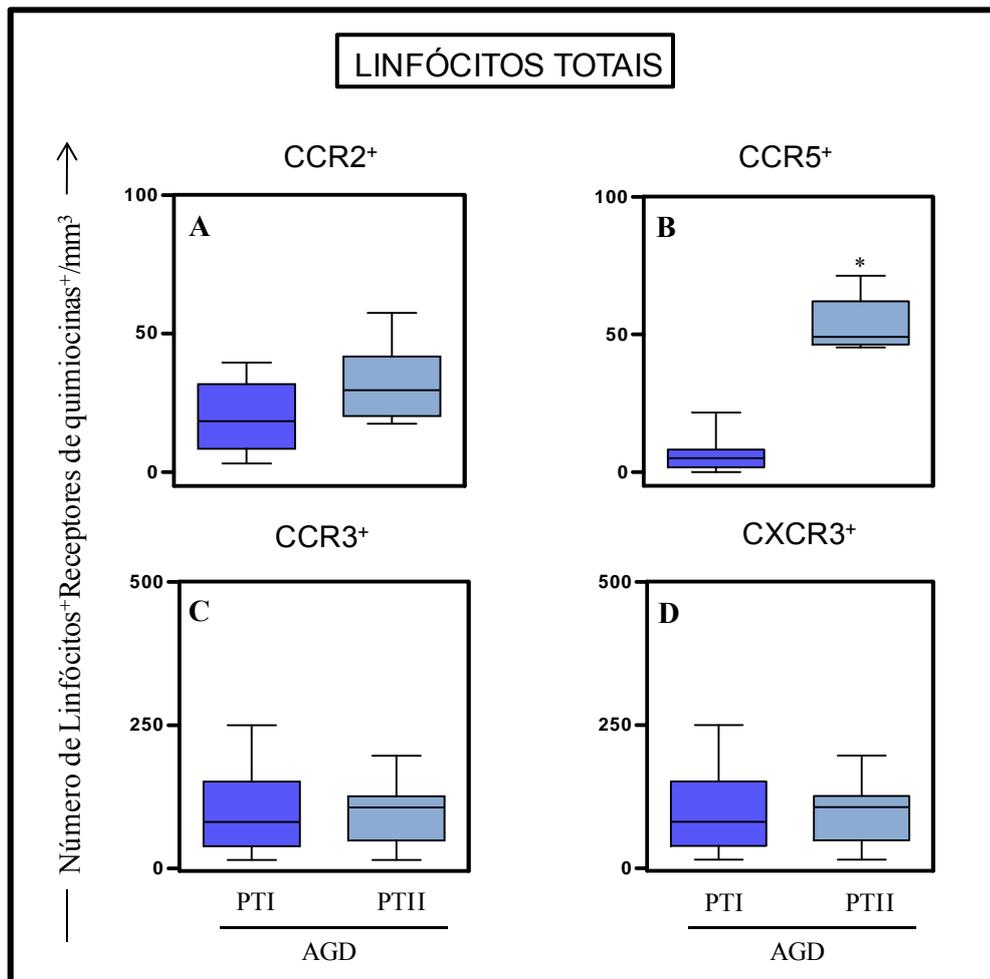
#### ***5.1.14 Análise ex vivo do número de receptores de quimiocinas em LINFÓCITOS T do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, após terapêutica específica com praziquantel***

Os receptores de quimiocinas possuem funções que coordenam a diferenciação e o tráfego de leucócitos. Em função disso, neste estudo foi realizada a análise do número de receptores de quimiocinas em linfócitos T dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose com o objetivo de se avaliar uma possível migração dessas células para o foco inflamatório após a infecção pelo *S. mansoni* e o impacto que a terapêutica específica teria nesse contexto. Os receptores de quimiocinas avaliados nesse estudo (CCR2, CCR5, CCR3, e CXCR3) (**Figuras 27A, 27B, 27C e 27D**, respectivamente), foram analisados pelo valor absoluto em  $\text{mm}^3$  de linfócitos positivos para esses marcadores.

A análise dos resultados demonstrou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos  $\text{CCR5}^+$  ( $53 \pm 11/\text{mm}^3$  – **Figura 27B**) do grupo AGD-PT II quando comparado ao grupo AGD-PT I ( $\text{CCR5}^+$ :  $6 \pm 6/\text{mm}^3$  - **Figuras 27B**). Os demais marcadores avaliados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II.

Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados imunológicos obtidos com a realização desse estudo, diagramas ilustrativos foram elaborados com as principais alterações no número de moléculas de ativação, co-estimulação, interação, adesão e migração induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e o impacto que o tratamento específico tem sobre esse perfil (**Figura 28**).

De maneira geral, podemos observar que a maioria dos marcadores imunofenotípicos expressos em linfócitos tiveram sua expressão elevada antes do tratamento, com uma diminuição, um ano após o tratamento, com exceção de alguns marcadores que permaneceram sem alteração, entretanto, dois anos após o tratamento específico podemos observar uma diminuição de todos esses marcadores, com exceção de CCR5 (**Figura 28**).



**Figura 27:** Número dos receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR5 (B), CCR3 (C) e CXCR3 (D) em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, um ano (AGD-PT I ■ = 13) e dois anos (AGD-PT II ■ = 11) após terapêutica específica com praziquantel. Os resultados estão apresentados como valor absoluto de linfócitos<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, expressando os receptores de quimiocinas avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AGD-PT I e AGD-PT II estão representadas por \*.

**Linfócitos CD8<sup>+</sup>**

|                      | <b>CD8<sup>+</sup></b> |                   | <b>Ativação</b>   |                   |                     | <b>Coestimulação</b> |                   |                   | <b>Interação</b>   |                   | <b>Adesão</b>     |                   |                   |                    |
|----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                      | CD8 <sup>+</sup>       | CD23 <sup>+</sup> | CD25 <sup>+</sup> | CD69 <sup>+</sup> | HLA-DR <sup>+</sup> | CD28 <sup>+</sup>    | CD80 <sup>+</sup> | CD86 <sup>+</sup> | CD11a <sup>+</sup> | CD64 <sup>+</sup> | CD18 <sup>+</sup> | CD44 <sup>+</sup> | CD54 <sup>+</sup> | CD62L <sup>+</sup> |
| CT x AGD-AT          | Rosa                   | Rosa              | Cinza             | Rosa              | Cinza               | Cinza                | Rosa              | Rosa              | Rosa               | Rosa              | Rosa              | Rosa              | Rosa              | Cinza              |
| AGD-AT x AGD-PT I    | Cinza                  | Azul              | Cinza             | Azul              | Cinza               | Cinza                | Azul              | Azul              | Cinza              | Azul              | Cinza             | Azul              | Azul              | Cinza              |
| AGD-PT I x AGD-PT II | Azul                   | Azul              | Cinza             | Cinza             | Cinza               | Azul                 | Azul              | Azul              | Azul               | Azul              | Azul              | Azul              | Azul              | Cinza              |
| CT x AGD-PT II       | Cinza                  | Cinza             | Cinza             | Cinza             | Cinza               | Cinza                | Cinza             | Cinza             | Cinza              | Cinza             | Cinza             | Cinza             | Cinza             | Cinza              |

**Figura 28: Principais alterações imunofenotípicas induzidas pela infecção aguda pelo *S. mansoni* e pelo seu tratamento específico.** Os quadrados rosa representam aumento, os azuis diminuição e os cinzas ausência de alteração dos marcadores de superfície celular avaliados em linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CT = 09) e pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes (AGD-AT = 16), um ano (AGD-PT I = 13) e dois anos (AGD-PT II = 11) após terapêutica específica com praziquantel. A primeira linha do diagrama, CT x AGD-AT representa as alterações induzidas pela infecção; a segunda linha do diagrama, AGD-AT x AGD-PT I representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes um ano após a sua realização; a terceira linha do diagrama, AGD-PT I x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização e a quarta linha do diagrama, CT x AGD-PT II representa o impacto do tratamento no perfil imunológico dos pacientes dois anos após a sua realização em comparação ao grupo controle.



As doenças negligenciadas (DNs) afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, com cerca de 2 bilhões de indivíduos vivendo em condições de risco de infecções, ou seja, quase 1 em cada 3 indivíduos do planeta. A Organização Mundial de Saúde (OMS) já identificou cerca de 13 DNs dentre as mais comuns nas regiões mais pobres do planeta (Ault 2007). Dentre as DNs, as doenças causadas por helmintos demonstram números expressivos, afetando mais de dois bilhões de pessoas em todo o mundo. Embora, essas infecções quase nunca sejam fatais aos seres humanos, elas estão associadas a altas taxas de morbidade (WHO 2010). Na América Latina um número superior a 210 milhões de indivíduos vivem abaixo da linha de pobreza, sofrendo com uma série de DNs, como a esquistossomose (Ault 2008).

No Brasil, cerca de 1,5 milhão de pessoas estão infectadas pelo *S. mansoni* (Coura & Amaral 2004, Steinmann et al. 2006, Amaral et al. 2006). Entretanto, estudos recentes acerca do perfil epidemiológico da esquistossomose vêm demonstrando que a transmissão tem diminuído significativamente em muitas regiões (Engels et al. 2002, Steinmann et al. 2006, Wilson et al. 2007). Segundo a FUNASA/MS, houve uma redução da prevalência da doença ao longo do tempo, já que na década de 1970 a prevalência alcançava percentuais de até 23,3%, caindo gradativamente nos anos seguintes, chegando a apresentar percentuais de 6,3%, em 2003, fato relacionado principalmente à implementação de programas de controle da doença (OMS 2010). Porém, alguns estudos ainda divergem em relação aos dados de prevalência da esquistossomose, demonstrando um desconhecimento parcial da atual situação da doença.

A forma clínica aguda da esquistossomose é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade sistêmica contra a migração dos esquistossômulos e ovos, podendo ocorrer dentro de 16-90 dias após a infecção primária (Lambertucci 1987). A incidência da fase aguda da esquistossomose é ainda subestimada e pouco compreendida (Evengard et al. 1990, Rabello 1995). Provavelmente, casos agudos de esquistossomose vêm sendo negligenciados, mal diagnosticados, subestimados e subnotificados ao longo do tempo, principalmente pelo fato da doença apresentar uma sintomatologia variada e inespecífica que dificulta o diagnóstico preciso pelos serviços de saúde (Lambertucci 2010, Enk et al. 2010).

Barbosa et al. (2000 e 2001), De Jesus et al. (2002), Enk et al. (2003, 2004 e 2010) e Lambertucci et al. (2010) relataram surtos da esquistossomose aguda no Brasil, principalmente relacionados as regiões turísticas e/ou aos centros urbanos. Esses dados sugerem uma expansão da doença para áreas indenes, associada principalmente a eventos de movimentos migratórios de indivíduos infectados pelo parasito e exploração de novas alternativas de lazer e/ou turismo, destacando-se a participação de turistas e viajantes sem

contato anterior com o parasito, que visitam regiões tropicais endêmicas (Evergard et al. 1990, Rabello 1995, Enk et al. 2003, 2004, 2010).

A fase aguda da esquistossomose mansônica é caracterizada por uma grande variedade de sinais e sintomas (Manson-Bahr & Bell 1989, Rocha et al. 1996) e a contribuição do processo de co-evolução entre parasito/hospedeiro dentre os fatores que influenciam a patogênese da doença ainda não foi completamente estabelecida (Hiatt et al. 1979, Greco et al. 1987, Rocha et al. 1996, Berriman et al. 2009). Os sinais e sintomas mais prevalentes nos portadores da forma clínica aguda são febre, mal-estar, diarreia, vômitos, anorexia, cefaleia, dor abdominal, perda de peso, tosse seca e hepatoesplenomegalia, acompanhada por eosinofilia acentuada e leucocitose (Wynn et al. 2004, Gryseels et al. 2006, Manzella et al. 2008, Enk et al. 2010). De acordo com alguns autores, esses sinais e sintomas são causados, provavelmente, por imunocomplexos circulantes e alterações celulares que podem surgir no decorrer da doença (De Jesus et al. 2002, Wynn et al. 2004, Jaureguiberry et al. 2010).

Em relação às alterações no perfil hematológico, o presente estudo demonstrou que os pacientes do grupo AGD-AT apresentaram leucocitose, caracterizada pelo aumento de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. Possivelmente, em função da ativação do sistema imune por antígenos de esquistossômulos, antígenos secretados pelos ovos, bem como antígenos do verme adulto (Gazzinelli et al. 1985, Weiss et al. 1987, Sher et al. 1990). Um ano após quimioterapia específica com praziquantel, os pacientes apresentaram valores normais de leucócitos, perfil que se manteve também dois anos após o tratamento, corroborando com dados da literatura (Rabello et al. 1997, De Souza et al. 2007).

Em indivíduos saudáveis, a contagem de eosinófilos no sangue periférico varia de 400 a 600 células/mm<sup>3</sup>, sendo considerada, portanto, uma população minoritária entre os leucócitos (Babapulle 2003). Em nosso estudo, os pacientes do grupo AGD-AT ( $12325 \pm 5301/\text{mm}^3$ ) apresentaram número significativamente maior de eosinófilos no sangue periférico, corroborando com dados descritos na literatura (Barbosa et al. 2001, De Souza et al. 2007, Lambertucci et al. 2010, Silveira-Lemos et al. 2010). Embora os pacientes do grupo AGD-PT I ( $665 \pm 489/\text{mm}^3$ ) apresentassem níveis estatisticamente maiores de eosinófilos em relação ao grupo CT ( $160 \pm 84/\text{mm}^3$ ), esses níveis estão de acordo com os parâmetros considerados de referência para esse tipo celular. Por outro lado, os pacientes avaliados dois anos após quimioterapia específica demonstraram redução significativa dos níveis de eosinófilos (AGD-PT II -  $359 \pm 398/\text{mm}^3$ ) em relação aos valores apresentados pelo grupo controle. Já considerando o número absoluto da população de linfócitos, os pacientes do grupo AGD-AT ( $4219 \pm 971/\text{mm}^3$ ) apresentaram níveis superiores de linfócitos em relação ao grupo CT ( $2534 \pm 488/\text{mm}^3$ ), reduzindo significativamente no grupo AGD-PT I, assim como

observado por Rabello et al. (1997) que relataram redução de linfócitos 6 meses após tratamento específico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose.

A discriminação entre a forma aguda e as formas crônicas da doença permite o tratamento precoce e a prevenção do desenvolvimento das formas mais graves da esquistossomose. Com isso, a possibilidade de um diagnóstico diferencial torna-se relevante para o controle da doença (Beck et al. 2008, Pinto-Silva 2010). Nesse contexto, a ultrasonografia ou ecografia abdominal tornou-se uma ferramenta complementar importante na abordagem ao paciente portador da fase aguda da esquistossomose. Algumas das alterações ultra-sonográficas observadas no presente estudo foram consistentes com alterações descritas por Rabello et al. (1997) que avaliaram 18 pacientes com infecção aguda causada pelo *S. mansoni*, entre adultos e crianças, e observaram que dois anos após o tratamento específico com praziquantel ou oxaminiquine, nenhum dos pacientes adultos apresentou linfonodos visíveis, no entanto, seis das oito crianças tratadas e curadas parasitologicamente tiveram discreto aumento dos linfonodos e hepatomegalia. Barata et al. (1999) destacam ainda que pacientes portadores da esquistossomose aguda apresentaram um aumento inespecífico do tamanho do fígado e do baço, fibrose periportal incipiente e linfonodos periportais. No entanto, seis meses após o tratamento com oxaminiquine, o espessamento periportal desapareceu e dois anos depois houve involução do fígado e do baço. Outros estudos também já demonstraram redução da fibrose três anos após o tratamento (Homeida et al. 1991, Cota et al. 2006). Entretanto, segundo Alves-Oliveira et al. (2006), atualmente não existem dados suficientes para correlacionar o espessamento periportal incipiente, visto ao exame ultrasonográfico, com fibrose inicial.

Os linfonodos periportais normalmente não são visualizados pelo exame ultrasonográfico em indivíduos saudáveis. A avaliação ultra-sonográfica realizada no presente estudo demonstrou a presença de linfonodos periportais ovalados, hipoecóicos com a região central ecogênica e contornos regulares, somente em pacientes antes do tratamento específico, desaparecendo após o mesmo. Segundo alguns trabalhos, outras patologias também estão associadas com alterações morfológicas em linfonodos, entretanto, essas alterações são diferentes das observadas na esquistossomose (Vassallo et al. 1992, Rabello et al. 1994).

As características ultra-sonográficas significativamente alteradas no presente estudo, como o aumento do tamanho do fígado e do baço e a presença de linfonodos periportais, embora sejam relevantes, não são consideradas características exclusivas da forma clínica aguda da esquistossomose, podendo ser observadas em outras doenças infecciosas, como hepatites agudas e outras doenças virais (Giorgio et al. 1986, Forsberg et al. 1987).

No presente estudo, os efeitos da quimioterapia específica com praziquantel em relação aos aspectos ultra-sonográficos demonstraram que dois anos após o tratamento, parte das alterações ultra-sonográficas encontradas ainda permaneceram (aumento inespecífico do tamanho do fígado e do baço), sugerindo que esse intervalo de tempo ainda não foi suficiente para que todas as alterações desapareçam. A persistência de algumas alterações morfológicas hepáticas e esplênicas (Rabello et al. 1997, Barata et al. 1999), bem como ausência ou redução da fibrose após quimioterapia específica tem sido descrita em seres humanos (Homeida et al. 1991, Cota et al. 2006) e em camundongos (Andrade & Grimaud 1986, Andrade et al. 2006) infectados pelo *S. mansoni*. Embora, as razões que expliquem a não reversão dessas alterações ainda não estejam claras, Martins-Leite et al. (2008) em uma avaliação de pacientes residentes em área endêmica para a esquistossomose, sugere que as diferenças genéticas, a incapacidade dos indivíduos em desenvolver mecanismos de resposta imune adequados e a exposição a novos antígenos em consequência da destruição dos vermes com o tratamento possam ser causas possíveis para a persistência dessas alterações.

Alguns autores relatam que o praziquantel é uma droga eficaz no controle da infecção pelo *S. mansoni*, principalmente através da redução da excreção de ovos, da regressão da fibrose e da diminuição da morbidade relacionada à esquistossomose, tanto em camundongos quanto em seres humanos tratados após o período de incubação do parasito (Katz et al. 1983, Sabah et al. 1986, Grandiere-Perez et al. 2006) ou cronicamente infectados (Cota et al. 2006, Andrade et al. 2006, Kihara et al. 2007, Martins-Leite et al. 2008, Uneke 2010).

Diferentes tipos de células efectoras, na presença de anticorpos anti-esquistossômulo, participam do mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo (A.D.C.C.), dentre eles os monócitos e eosinófilos (Joseph et al. 1983). Segundo Correa-Oliveira et al. (2000) e Caldas et al. (2000) elevados níveis de IgE anti-parasito estão relacionados à resistência à infecção pelo *S. mansoni*. No presente trabalho, foram quantificados os níveis de IgE total plasmáticos dos pacientes dos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II. Os dados mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de IgE total nos pacientes do grupo AGD-AT, em relação aos pacientes dos outros grupos (**Figura 10**). Sugerindo que os níveis de IgE total possam estar relacionados à morbidade da doença, como estabelecido por Pereira et al. (2010).

O resultado do aumento dos níveis de IgE total nos pacientes do grupo AGD-AT se torna relevante pelo fato de que poucos estudos em esquistossomose humana mostraram relações entre a infecção esquistossomótica e a resposta imune humoral. Esse resultado se assemelha aos dados mostrados por De Souza et al. (2007), que avaliando a resposta imune humoral, por meio da quantificação dos níveis de IgE total, em pacientes portadores da forma

clínica aguda da esquistossomose, antes e após terapêutica específica com oxamniquine, relataram leucocitose com eosinofilia e aumento dos níveis de IgE total em pacientes antes da quimioterapia específica, com uma diminuição significativa do número absoluto de eosinófilos e dos níveis de IgE após o tratamento. Cabe ressaltar, que os nossos dados foram obtidos pela dosagem de IgE total, portanto, baseados nos achados do aumento da expressão do receptor de CD23 em eosinófilos, juntamente aos elevados níveis de IgE total encontrados no grupo AGD-AT, é possível especular que os eosinófilos desses pacientes poderiam estar sendo ativados através do mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo.

Outro fator citotóxico importante e versátil para o sistema imunológico avaliado em nosso estudo foi o óxido nítrico (NO). Foram quantificados os níveis de NO plasmático, dos pacientes dos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II. Os dados mostraram um aumento dos níveis de NO nos pacientes do grupo AGD-AT, em relação aos pacientes dos outros grupos (**Figura 11**). O papel do NO nos processos inflamatórios permanece incerto, uma vez que, propriedades anti- e pró-inflamatórias têm sido atribuídas a ele. Mas, já é sabido que o NO tem um importante papel como mensageiro generalizado intra e intercelular liberado durante diferentes eventos fisiopatológicos, incluindo reações imunológicas e inflamatórias (Oliveira et al. 1998).

O NO pode contribuir para os processos de defesa contra o *S. mansoni* por vias relacionadas a dois pontos críticos do seu ciclo de vida, um deles está relacionado à cascata de sinalização requerida para a sobrevivência do parasito, o outro é relacionado com os processos de interação parasito-hospedeiro, principalmente à resistência do parasito (Flora-Filho & Zilberstein 2000, Kho et al. 2005). Em macrófagos murinos ativados foi observado que o NO é regulado por citocinas ou produtos microbianos (Drapier 1997), exibindo ainda função citotóxica contra o *S. mansoni* (James & Glaven 1989). O NO pode ser ainda um mediador do balanço de citocinas dos Tipos 1 e 2 durante a esquistossomose em modelo murino (Liew 1995). As células do Tipo 1 podem tanto produzir citocinas que induzem a formação do NO, como o IFN- $\gamma$ , quanto produzirem o próprio NO, capaz de inibir a proliferação dessas células e suas citocinas, minimizando assim os seus efeitos prejudiciais (Oswald et al. 1992, Liew 1995). Nesse contexto, sugere-se que os altos níveis de NO observados no grupo antes da terapêutica no presente estudo, poderiam estar relacionados com o aumento de citocinas do Tipo 1 ou aumento da produção de NO por células do Tipo 1.

Os granulócitos são considerados células efetoras no combate às infecções helmínticas por meio de diferentes vias. No intuito de se estabelecer uma relação entre os granulócitos e uma dessas vias é que foi proposta a avaliação dos níveis de NO em sobrenadantes de cultura de granulócitos não estimulados e submetidos à estimulação com SEA e SWAP.

Foram avaliados os níveis de NO em sobrenadantes de cultura de granulócitos não estimulados e submetidos à estimulação com SEA e SWAP dos pacientes dos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II. Nos sobrenadantes não estimulados (CTL - **Figura 12A**), a análise de NO demonstrou um aumento em todos os grupos avaliados, em comparação ao grupo CT. Já com relação aos sobrenadantes estimulados com SEA (**Figura 12B**) a produção de NO se mostrou superior no grupo AGD-PT I em comparação aos grupos CT e AGD-AT. E por fim, nos sobrenadantes estimulados com SWAP (**Figura 12C**) observou-se diminuição no grupo AGD-PT II em relação aos grupos AGD-AT e AGD-PT I. A produção de NO dentro dos grupos AGD-PT I e AGD-PT II foi superior quando estimulados com SWAP (**Figura 12C**).

Em relação ao sistema imunológico já é reconhecida a participação do NO na imunidade protetora, podendo modular direta ou indiretamente a resposta imune inflamatória (Nesello et al. 2010). Alguns trabalhos já descreveram o NO como mensageiro intra e intercelular bastante versátil, capaz de participar de diversos mecanismos fisiopatológicos (Oliveira et al. 1998, 1999).

Brunet et al. (1997) observaram em modelo experimental para esquistossomose, uma correlação entre os níveis de NO e a severidade da doença. Entretanto, nossos resultados não apontam para essa linha, o que se justifica pelo fato do NO poder apresentar efeitos pró- e anti-inflamatórios (Bogdan 1998). Outro fator importante demonstrado por Patton et al. (2002) é que existe uma produção excessiva de NO na ausência de uma resposta do Tipo 2, ou seja, provavelmente a intensidade da resposta do Tipo 1 observada nos sobrenadantes da cultura CTL no presente trabalho, possa estar contribuindo para a produção de NO.

De maneira geral, os estudos que abordam o papel da resposta imune durante os estágios iniciais da infecção pelo *S. mansoni* estão, em sua maioria, restritos a modelos experimentais, sendo os mecanismos de ativação do sistema imune durante a infecção aguda em humanos pouco investigados. Dessa forma, a quantificação de diferentes citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da esquistossomose é de extrema importância, uma vez que essas são moléculas sinalizadoras e fatores quimioatraentes que podem direcionar a polarização da resposta imune (Kourilsky & Truffa-Bachi 2001, Park et al. 2001). No entanto, no presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10, G-CSF e IL-4 avaliados nos pacientes dos grupos AGD-AT, AGD-PT I e AGD-PT II (**Figuras 13 e 14**).

CXCL-8 é uma das citocinas quimiotáticas mais conhecidas, sendo capaz de ativar leucócitos e funcionar como mediadora inicial da inflamação, sendo ainda, fundamental na

quimioatração de neutrófilos. As citocinas IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-3 podem induzir a expressão dessa quimiocina em leucócitos e outros tipos celulares (Baggiolini et al. 1994). O que sugere que os níveis elevados de CXCL-8 observados no grupo AGD-AT tenham relação com o processo inflamatório em resposta à infecção pelo *S. mansoni*, diminuindo no grupo AGD-PT II em consequência de uma diminuição da inflamação (**Figura 13A**).

O fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) tem sido relacionado à formação do granuloma e apresentado níveis elevados contra estímulos específicos (Rezende et al. 2004). No presente estudo observou-se uma diminuição dessa citocina no plasma do grupo AGD-PT II (**Figura 14B**), provavelmente devido à redução das reações inflamatórias.

A quimiocina CCL24 tem sido relacionada com a promoção da ativação celular e o recrutamento e modulação dos eosinófilos (Elsner et al. 1999). Em nosso estudo, houve um aumento significativo dos níveis de CCL24 no grupo AGD-PT I em relação ao grupo AGD-AT (**Figura 14D**), demonstrando que o tratamento pode estar influenciando a produção dessa quimiocina. Sousa-Pereira et al. (2006) compararam indivíduos não infectados com pacientes portadores de mielorradiculopatia esquistossomótica e relataram níveis elevados de CCL24 no plasma desses pacientes após quimioterapia específica. No entanto, Silveira-Lemos et al. (2010) avaliaram o recrutamento de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose, através da avaliação da quimiocina CCL24 e observaram níveis elevados dessa quimiocina, sugerindo ainda que a CCL24 possa influenciar a cinética das quimiocinas e seus receptores no recrutamento eosinófilos.

Entre os leucócitos, os eosinófilos são o tipo celular predominante em hospedeiros infectados por helmintos. Estudos experimentais têm demonstrado que a eosinofilia estaria ocorrendo entre a quinta e a sétima semana após a exposição ao parasito e seria induzida por citocinas do Tipo 2, como IL-4, IL-10, IL-13, IL-9, IL-21 e, principalmente, IL-5 (Cara et al. 2000, Davies et al. 2005, Anthony et al. 2007). Diferentes estudos têm demonstrado que os eosinófilos são células produtoras de citocinas e fatores de crescimento, podendo desempenhar um papel importante na resposta imune contra infecções helmínticas (Reimert et al. 2006, Swartz et al. 2006). Além disso, em modelos experimentais já foi demonstrado a importância dessas células no mecanismo de citotoxicidade *in vitro* contra o estágio larval do *S. mansoni* (Butterworth et al. 1975, Ramalho-Pinto et al. 1978).

O tratamento da infecção pelo *S. mansoni* têm sido associado a uma diminuição significativa na prevalência, nas taxas de reinfeção e desenvolvimento de formas clínicas severas da doença (Bina 1977, Katz 1998, Toure et al. 2008, Jaureguiberry et al. 2010).

Embora, o tratamento não seja capaz de eliminar a transmissão da esquistossomose, ele colabora na diminuição das formas mais severas da doença, assim como, induz o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva na prevenção da reinfecção após o tratamento (Katz et al. 1980). Tem sido demonstrado que após a quimioterapia específica da fase aguda da esquistossomose, a resposta imune de alguns indivíduos sofre alterações importantes (Rabello et al. 1994, 1997, De Souza et al. 2007, Costa-Silva 2009).

Alguns autores demonstraram ainda que a atividade central do praziquantel no combate a infecção pelo *S. mansoni* se dá pelo influxo de cálcio através do tegumento do parasito minutos depois da exposição à droga (Cioli 1998). Alguns autores sugerem que a liberação de antígenos, em consequência da destruição ou morte do parasito, cause alterações da resposta imunológica, como aumento na formação de complexos imunes (Harries & Cook 1987), troca de classe de IgA para IgG (Mutapi et al. 1998) e produção de citocinas (Reimert et al. 2006). Entretanto, são escassas as comparações detalhadas dessas alterações imunológicas após a quimioterapia específica.

Nesse contexto, buscou-se avaliar a expressão de citocinas e quimiocinas através da reatividade celular em resposta aos estímulos SEA e SWAP em sobrenadantes de cultura de granulócitos.

Em relação ao grupo AGD-AT, observou-se um aumento na produção de IL-1 $\beta$  e IL-10 e uma diminuição de IL-4 quando comparado ao grupo CT, em resposta ao SEA, já frente à estimulação com SWAP, observou-se um aumento de CXCL-8, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10, com uma diminuição de G-CSF quando comparado ao grupo CT. Em relação ao grupo AGD-PT I, observou-se um aumento na produção de IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 com uma diminuição de IL-3 e IL-4 quando comparado ao grupo CT, em resposta ao SEA, já frente à estimulação com SWAP, observou-se um aumento de CXCL-8 quando comparado ao grupo AGD-AT e IL-1 $\beta$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 quando comparado ao grupo CT, com uma diminuição de IL-10 quando comparado ao grupo AGD-AT e G-CSF quando comparado ao grupo CT. Finalmente, em relação ao grupo AGD-PT II, detectou-se um aumento de CXCL-8 quando comparado ao grupo AGD-AT, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10 quando comparado ao grupo CT e IL-6 quando comparado ao grupo AGD-PT I, com uma diminuição de IL-3 e IL-4 quando comparado ao grupo CT em resposta ao SEA, já frente à estimulação com SWAP, observou-se um aumento de IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-10 quando comparado ao grupo CT, com uma diminuição de CXCL-8 quando comparado ao grupo AGD-PT I. Destaca-se ainda, que a estimulação com SWAP, mostrou-se mais eficiente na indução da maioria das citocinas e quimiocinas avaliadas. As concentrações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12p70 e da

quimiocina CXCL8 nos sobrenadantes de cultura não estimulados foram elevadas nos grupos AGD-AT e AGD-PT II (**Figuras 15 e 16**).

A resposta imune protetora contra helmintos tem sido associada a uma resposta do Tipo 2, caracterizada pela presença tanto de componentes da resposta imune inata quanto da adaptativa. A resposta do Tipo 2 é caracterizada pelo aumento da expressão dos níveis de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-21, ativação e expansão de células TCD4<sup>+</sup>, aumento na secreção de IgE e elevação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, sendo essas, células que contribuem significativamente para a produção de diferentes citocinas do Tipo 2. Por outro lado, a resposta do Tipo 1 é caracterizada pelo aumento da expressão de IFN- $\gamma$ , linfócitos TCD8<sup>+</sup>, neutrófilos e macrófagos. Embora, IL-10 tenha sido inicialmente caracterizada como uma citocina do Tipo 2, dados recentes e bem estabelecidos na literatura demonstram que essa citocina teria um papel modulador tanto relacionada a respostas do Tipo 1 quanto do Tipo 2 (Anthony et al. 2006, 2007).

Estudos de alterações relacionadas aos níveis de citocinas em pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose após quimioterapia já foram relatados na literatura. Montenegro et al. (1999) demonstraram que PBMC, de pacientes dois meses após o tratamento, quando estimuladas em cultura com SEA ou SWAP, produzem níveis significativos de IFN- $\gamma$  em comparação aos pacientes crônicos, já os níveis de IL-10 mantiveram-se similares nos dois grupos. De Souza et al. (2007) também observaram elevados níveis de IFN- $\gamma$  seis meses após o tratamento. De Jesus et al. (2002) observaram elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC não estimuladas e detectaram ainda a presença de TNF- $\alpha$  no soro de 87% desses pacientes cinco meses após o tratamento. Silveira-Lemos (2004) observou um aumento de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 em linfócitos, IFN- $\gamma$  e IL-4 em linfócitos T, IL-4 em linfócitos TCD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  e IL4 em linfócitos TCD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  e IL-4 em células NK, IL-4 e IL-10 em neutrófilos e uma diminuição de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 em eosinófilos avaliados em culturas de leucócitos do sangue periférico não estimuladas, já nas culturas após breve estimulação com SEA observou-se um perfil de produção de citocinas similar em todas as populações avaliadas, provavelmente demonstrando que o estímulo SEA não foi capaz de estimular eficientemente essas populações.

Por outro lado, Martins-Leite et al. (2008) avaliaram o papel das citocinas do Tipo 1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Tipo 2 (IL-13) e reguladoras (IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ) no desenvolvimento de fibrose periportal em pacientes cronicamente infectados pelo *S. mansoni* e o impacto que a quimioterapia específica com praziquantel teria nesse contexto. Os resultados dessa análise mostraram que após o tratamento, pacientes com fibrose periportal regrediram o grau de

fibrose e apresentaram maior produção de IL-4 e IL-13 e menor de IFN- $\gamma$  quando comparados aos pacientes sem fibrose, sugerindo que essas citocinas estariam envolvidas nos mecanismos de desenvolvimento de fibrose.

A elevação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 em sobrenadantes de cultura não estimulados, corrobora com os elevados níveis dessas citocinas em portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes e após quimioterapia, observados por De Jesus et al. (2002). A elevação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12p70, nos sobrenadantes estimulados com SEA e SWAP, demonstram o perfil inflamatório exibido pelos granulócitos, principalmente no grupo não submetido à quimioterapia.

Nesse contexto, pode-se inferir que antes da quimioterapia específica com praziquantel, os pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose exibem um perfil de citocinas do Tipo 1, que sofre alterações significativas após o tratamento. Com destaque para os níveis elevados de citocinas sob estimulação com SWAP, demonstrando que essas células seriam mais imunogênicas aos antígenos do verme adulto, tanto antes, quanto após o tratamento.

Uma propriedade particular dos eosinófilos está relacionada à capacidade de se apresentarem sob diferentes estados de ativação na circulação (Munitz & Levi-Schaffer 2004). Dessa forma, a migração direcionada de eosinófilos para o foco inflamatório depende de vários fatores, como a expressão de moléculas de co-estimulação, ativação, adesão celular e receptores de quimiocinas, bem como as próprias quimiocinas que favorecem sua migração (Pearlman et al. 1997, Tachimoto et al. 2000). No presente estudo foi investigado o perfil de ativação de eosinófilos circulantes de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, por meio da avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras, de ativação e adesão celulares. Essa investigação mostrou uma diminuição de todas as moléculas co-estimuladoras avaliadas (CD28, CD80 e CD86) (**Figuras 17A, 17B e 17C**) em eosinófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. Provavelmente, essa diminuição dos níveis das moléculas de co-estimulação em eosinófilos dois anos após o tratamento, está relacionada a uma diminuição dos fatores que induzem a proliferação, maturação e ativação dos eosinófilos, como antígenos circulantes, citocinas e quimiocinas específicas para eosinófilos.

Neste estudo foi observado também uma diminuição da expressão de todas as moléculas de ativação avaliadas (CD23, CD25, HLA-DR e CD69) (**Figuras 17D, 17E, 17F e 17G**, respectivamente) em eosinófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. O que nos sugere que após a

ocorrência de uma ativação persistente dessas células até um ano após a infecção pelo *S. mansoni*, ocorra uma regulação da ativação.

Gopinath et al.(2000) já relataram que CD25, HLA-DR e CD69 são moléculas importantes na definição de um fenótipo de ativação celular. Silveira-Lemos (2008) observou em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose uma expressão distinta dos marcadores de ativação em eosinófilos, demonstrando um papel regulador desses marcadores na ativação celular. Ganley-Leal et al. (2006) demonstraram que eosinófilos de pacientes infectados pelo *S. mansoni* portadores da fase crônica apresentam associação entre a expressão do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e os marcadores CD25 e CD69, sugerindo uma ativação dessas células durante a infecção. Plumas et al. (1991) mostraram que eosinófilos do sangue periférico de pacientes com síndrome hipereosinofílica sintetizam e expressam CD25, sugerindo que em processos de estimulação antigênica contínua, essas células apresentam o fenótipo de ativação celular com o intuito de eliminar novas infecções ou infecções persistentes, o que corrobora a idéia de uma expressão persistente desse marcador um ano após a infecção e sua diminuição posterior.

Estudos já mostraram que a presença do receptor CD23 (receptor para IgE - FcεRII) em eosinófilos está relacionada à resposta imune mediada por IgE, incluindo citotoxicidade contra parasitos e agentes alergênicos (Capron et al. 1991). Assim como em nosso estudo, Silveira-Lemos et al. (2008), mostraram aumento da molécula CD23 em eosinófilos, porém, em pacientes portadores da forma crônica da esquistossomose. Monteseirin et al. (1996) demonstraram que a expressão de CD23 na superfície de eosinófilos é frequente, seguido da ativação dessas células por IgE, representando um fator importante para a função efetora mediada por eosinófilos dependente de IgE. No presente estudo, entretanto não foi possível correlacionar a expressão de CD23 aos níveis de IgE, mesmo considerando os elevados níveis de CD23 e IgE no grupo AGD-AT.

Além disso, neste estudo, foram avaliadas moléculas de adesão celular em eosinófilos (CD62L, CD11a, CD13, CD18, CD44 e CD54) e observou-se uma diminuição significativa de CD18, CD44 e CD54 no grupo AGD-PT II em relação ao grupo AGD-PT I (**Figuras 17L, 17M e 17N**, respectivamente), a molécula CD62L não sofreu alteração em nenhum dos grupos avaliados, já as moléculas CD11 e CD13 diminuíram significativamente na avaliação dos grupos AGD-AT para AGD-AT PT I (dados não mostrados). De acordo com alguns autores, eosinófilos expressam constitutivamente algumas integrinas, como CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 (gp150,95) e CD49d/CD29 (VLA-4) (Hartnell et al. 1990, Walsh et al. 1991). Segundo Katoh et al. (2003), CD44 exerce um papel essencial no recrutamento de linfócitos do Tipo 2 e eosinófilos durante processos alérgicos. Além disso,

evidências sugerem que moléculas de adesão celular exercem um importante papel sobre as funções eosinofílicas, como desgranulação e produção de superóxidos aniônicos (Horie et al. 1997). Esse contexto nos leva a crer que ocorra um aumento dessas moléculas na superfície de eosinófilos no grupo AGD-AT, contribuindo para o processo de ativação celular e migração para o foco inflamatório, com posterior regulação da ativação, através da diminuição progressiva dessas moléculas nos grupos AGD-PT I e AGD-PT II.

Em nossos resultados foi observada uma diminuição da molécula CD64 (FC $\gamma$ RI – receptor Fc para IgG) na superfície de eosinófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. De acordo com alguns trabalhos, receptores Fc para IgG (Fc $\gamma$ R) participam de importantes processos celulares durante a invasão de agentes infecciosos, como desgranulação, explosão respiratória, fagocitose, eliminação de imunocomplexos e A.D.C.C. (Unkeless 1989, Fanger et al. 1989), sugerindo que o aumento da expressão dessa molécula possa contribuir para o desenvolvimento de mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *S. mansoni*.

O conjunto das alterações na população de eosinófilos, observadas um e dois anos após quimioterapia específica com praziquantel, sugere que o tratamento pode promover reversibilidade das alterações imunofenotípicas nessa população celular a longo prazo.

Estudos recentes têm mostrado que em infecções helmínticas, neutrófilos são também ativados e recrutados para o sítio de infecção (Morimoto et al. 2004, Galioto et al. 2006, Anthony et al. 2006). Cada vez mais essa população celular é reconhecida como componente importante no desenvolvimento de uma resposta imunológica do Tipo 2 em infecções helmínticas (Antony et al. 2007). Segundo esses autores, após migrarem para o foco de infecção, os neutrófilos e outras populações celulares, como eosinófilos e macrófagos atuam coordenadamente, podendo provocar a morte de helmintos e outros agentes agressores.

Nesse contexto, investigou-se o perfil de ativação de neutrófilos circulantes de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, através da avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras, de ativação e adesão celular.

A investigação mostrou uma diminuição das moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) (**Figuras 20B e 20C**, respectivamente) em neutrófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. Alguns trabalhos demonstram que em indivíduos saudáveis as moléculas CD 80 e CD86 não são expressas em neutrófilos, entretanto em casos de patologias granulomatosas diversas, essas moléculas passam a ser expressas na superfície dos neutrófilos (Konert et al. 2001). As moléculas de co-estimulação são capazes de regular a inflamação na imunidade inata através do contato com macrófagos e neutrófilos. Nolan et al. (2009) descreveram que a ligação de

CD80 e CD86 é requerida para máxima ativação de macrófagos e neutrófilos e em camundongos deficientes para CD80 e CD86 observou-se uma redução da mortalidade e produção de citocinas inflamatórias em modelo experimental de sepse.

Nesse estudo, não se observou quaisquer alterações na avaliação das moléculas de ativação (CD23, CD25, HLA-DR e CD69) (**Figuras 20D, 20E, 20F e 20G**, respectivamente) em neutrófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PTII, quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PTI. Entretanto, vale ressaltar que diminuições significativas em todas as moléculas de ativação avaliadas já haviam sido observadas na avaliação dos grupos AGD-AT e AGDP-PT I, com os níveis de expressão se mantendo no grupo AGD-PT II (dados não mostrados).

Na avaliação das moléculas de adesão celular (CD62L, CD11a, CD13, CD18, CD44 e CD54) observou-se um aumento de CD62L e uma diminuição de CD11 (**Figuras 20I e 20J**, respectivamente) em neutrófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. O recrutamento de neutrófilos para tecidos inflamados envolve uma série de moléculas de adesão que atuam de forma interdependente, permitindo a rápida migração dessas células para o foco inflamatório (Carlos & Harlan 1994, Landis & Malhotra 2003). Segundo Weber et al. (2001) a molécula de adesão celular CD62L ou L-selectina é expressa constitutivamente em neutrófilos, sendo responsável por mediar a ligação das células ao endotélio vascular, ou seja, controlar o tráfico contínuo para os tecidos periféricos, tanto em condições normais quanto infecciosas. Outro mecanismo utilizado pelos neutrófilos é através da via das integrinas, incluindo  $\beta$ 2-integrinas (Ebnet & Vestweber 1999, Khan & Kubes 2003). Segundo Takashi, Okubo & Horie (2001), processos inflamatórios e rejeição de aloenxerto podem induzir a expressão de CD54 em leucócitos, fibroblastos e células endoteliais; essa molécula liga-se às  $\beta$ 2-integrinas, CD11a/CD18 (LFA-1) (Marlin & Springer 1987) e CD11b/CD18 (Mac-1) (Diamond et al. 1990) e promove adesão de leucócitos ao endotélio. A diminuição da expressão de CD62L em neutrófilos já foi relatada na literatura em casos de asma severa (Mann & Chung 2006), crianças infectadas pelo HIV (Meddows-Taylor et al. 2000), pacientes diabéticos (Mastej & Adamiec 2008) e outras condições inflamatórias (Rogowski et al. 1998), demonstrando a relação do CD62L com a ativação celular dos neutrófilos. Cabe ressaltar ainda, que o aumento da frequência de CD62L observado nesse estudo alcançou níveis equivalentes aos expressos por indivíduos do grupo controle, demonstrando que dois anos após o tratamento específico os níveis de CD62L estariam retornando as condições basais do organismo.

O conjunto das alterações na população de neutrófilos após quimioterapia específica com praziquantel sugere que o tratamento possa promover reversibilidade das alterações imunofenotípicas nessa população celular.

A patogênese da esquistossomose tem como evento crucial a reação inflamatória granulomatosa em resposta aos antígenos do ovo de *S. mansoni* (Cheever et al. 2002, Stadecker et al. 2004). De acordo com alguns trabalhos, inicialmente o granuloma é caracterizado por um intenso infiltrado celular e alta produção de citocinas (Boros et al. 1975, Boros 1989). A participação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> na reatividade granulomatosa durante a esquistossomose humana já foi demonstrada por diversos autores (Mathew & Boros 1986, Doughty et al 1987, Iacomini, Ricklan & Stadecker 1995). Teixeira-Carvalho (2004) observou que o infiltrado inflamatório hepático de pacientes portadores da fase crônica hepatoesplênica era composto preferencialmente por linfócitos TCD4<sup>+</sup>, população celular que quando avaliada no sangue periférico por meio de culturas estimuladas com SEA não foi capaz de produzir significativamente citocinas do Tipo 2, como IL-4 e IL-5, sendo o microambiente de citocinas composto principalmente por citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , na ausência dos efeitos moduladores de IL-10.

Martins-Filho et al. (1997) foram pioneiros na avaliação das populações e subpopulações de linfócitos T, por citometria de fluxo no sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose humana. Esses autores observaram diminuição no percentual de linfócitos TCD3<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> e aumento de linfócitos TCD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> em pacientes portadores da fase aguda em comparação aos indivíduos não infectados, sugerindo que esses pacientes teriam um aumento de células T ativadas, fato que corrobora com os dados de linfócitos T ativados apresentados no presente estudo no grupo AGD-AT, que regrediram nos grupos avaliados após o tratamento específico.

Durante a infecção pelo *S. mansoni* dois subtipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, Tipo 1 e Tipo 2, já foram descritos (King et al. 1996). As células do Tipo 1 são produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  e auxiliam, principalmente, a resposta imune celular. As células do Tipo 2 são produtoras das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e auxiliam a resposta imune humoral (Mosmann & Moore 1991, Malaquias et al. 1997, Chiaramonte et al. 1999). Como essas células exercem uma modulação entre si, por intermédio tanto de IFN- $\gamma$ , que suprime a resposta Tipo 2, quanto de IL-10, que suprime a resposta Tipo 1, muitos autores buscam o entendimento dos mecanismos de patogênese pela imunomodulação entre esses dois tipos celulares.

Trabalhos recentes demonstraram que a resposta imune humana predominante no período pré-postural da forma clínica aguda é do Tipo 1, com alta produção de IFN- $\gamma$  e baixa

de IL-5, sendo a produção de IL-10 baixa nesse período (Montenegro et al. 1999, De Jesus et al. 2002) e elevada no período pós-postural (Montenegro et al. 1999, De Jesus et al. 2002, Silveira-Lemos 2004). Com base nesses dados, pode-se inferir que a resposta do Tipo 1 seria mediadora da lesão tecidual e responsável pelo quadro clínico da esquistossomose aguda.

Nesse contexto, no presente estudo realizou-se análises acerca do número absoluto de linfócitos T ( $CD3^+$ ), linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ) e linfócitos T citotóxicos/supressores ( $CD8^+$ ) do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose. Essa análise revelou diminuição do número de linfócitos T (**Figura 23A**) do grupo AGD-PT II, quando comparado aos indivíduos do grupo AGD-PT I, representado pela diminuição de linfócitos  $TCD4^+$  e  $TCD8^+$  (**Figuras 23B e 23C**, respectivamente).

Nesse estudo investigou-se também o perfil de ativação dos linfócitos T circulantes de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, através da avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras, de ativação e adesão celulares. A análise da molécula co-estimuladora CD28 em linfócitos T do sangue periférico mostrou uma diminuição de linfócitos  $TCD4^+CD28^+$  e  $TCD8^+CD28^+$  do grupo AGD-PT II (**Figuras 24A e 26A**) em relação aos indivíduos do grupo AGD-PT I. De acordo com alguns autores, CD28 e seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) são moléculas acessórias e a interação CD28/B7 seria o principal evento co-estimulador envolvido na ativação primária de linfócitos T (Lenschow et al. 1996, Margulies 2003, Acuto & Michel 2003). Diante dos resultados obtidos, é possível especular que a diminuição da expressão de CD28 em linfócitos  $TCD4^+$  e  $TC8^+$  do grupo AGD-PT II, estaria relacionada com uma regulação da ativação dos linfócitos a níveis comparáveis aos de indivíduos saudáveis.

Avaliamos também o perfil de moléculas de ativação (CD25, HLA-DR e CD69) em linfócitos T, que demonstrou um aumento de CD25 (**Figura 24B**) em linfócitos  $TCD4^+$  do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. Rumbley et al. (1998), em um estudo da infecção experimental pelo *S. mansoni*, demonstraram que linfócitos derivados de granulomas hepáticos apresentam maior expressão de CD25, que é um marcador de ativação intermediária. De acordo com esses resultados, os autores sugeriram que durante a formação do granuloma na infecção pelo *S. mansoni*, a produção de citocinas e o aumento da expressão de CD25, promoveriam o recrutamento e ativação de linfócitos.

Embora alguns estudos demonstrem que linfócitos  $TCD8^+$ , em doenças infecciosas, possam ser ativadas por antígenos extracelulares (Den Haan & Bevan 2001, Manfras et al. 2002), inclusive na esquistossomose humana (Martins-Filho et al 1999, Teixeira-Carvalho et al 2008), através da estimulação antigênica persistente ou pela influência de citocinas

presentes no foco inflamatório, no presente trabalho não foi observada alterações na ativação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> em relação aos grupos avaliados.

A investigação das moléculas de adesão celular, CD62L e CD18, mostrou uma diminuição de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> (**Figura 24F**) e nenhuma alteração de linfócitos TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados aos indivíduos do grupo AGD-PT I. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> sofreram diminuição no grupo AGD-PT I em relação ao grupo AGD-AT, mantendo esse perfil em AGD-PT II (dados não mostrados). Em um estudo realizado por Langley & Boros (1995), os autores mostraram que o bloqueio de LFA-1 (CD11a/CD18) e CD54 inibe a resposta linfoproliferativa. Dessa forma, cabe especular que a diminuição de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> estaria relacionada a uma inibição da capacidade proliferativa dessas células, já a diminuição de TCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> estaria relacionada a uma diminuição na adesão e migração dessas células.

Mais uma vez, pode-se inferir, que o perfil de resposta imune encontrado na população de linfócitos um e dois anos após quimioterapia específica com praziquantel, sugere que o tratamento pode promover reversibilidade das alterações imunofenotípicas nessa população celular a longo prazo.

Há dados na literatura indicando que as células que saem do timo com o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> <sup>HIGH</sup> são desenvolvidas continuamente como uma linhagem independente e possuem um papel importante no processo de regulação da resposta imune, sendo denominadas células T reguladoras (Baecher-Allan et al. 2001, Sakaguchi 2005). Infecções por helmintos podem induzir e expandir naturalmente células T reguladoras (Treg) em humanos e camundongos, o que sugere um papel dessas células na modulação da inflamação nessas infecções (Anthony et al. 2007). Na esquistossomose experimental, Singh et al. (2005) demonstraram que células T<sub>REG</sub> podem controlar as respostas do Tipo 1 e 2 e participar dos processos de regulação da formação do granuloma. No presente estudo, a análise de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> <sup>HIGH</sup> com provável fenótipo regulador, mostrou quantidades similares dessa população celular no sangue periférico de pacientes dos grupos AGD-AT e AGD-PT I (Dados não mostrados), porém, quando comparados ao grupo AGD-PT II observou-se aumento significativo de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> <sup>HIGH</sup>, com níveis similares ao do grupo CT. Trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que pacientes portadores da forma clínica intestinal apresentam uma frequência maior de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> <sup>HIGH</sup> quando comparados àqueles portadores das outras formas clínicas da doença (Castro-Silva 2006, Teixeira-Carvalho et al. 2008). Nesse contexto, é possível inferir que linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> <sup>HIGH</sup> dos pacientes dos grupos AGD-AT e AGD-PT I teriam sua atividade suprimida pela secreção de

citocinas pró-inflamatórias, já que, a longo prazo, no grupo AGD-PT II, existiria uma diminuição na secreção das citocinas pró-inflamatórias e os linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> HIGH retornariam aos níveis basais.

O processo imune relacionado à infecção pelo *S. mansoni* é complexo e envolve mecanismos de ativação e regulação dependentes tanto de fatores solúveis, como da expressão de receptores celulares que promovem a interação entre células. Alguns trabalhos já demonstraram que a expressão de quimiocinas e seus receptores têm papel central na regulação e variação dos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o tráfego homeostático, inflamatório, hematopoiético, angiogênico, crescimento tumoral e infecção viral (Sallusto et al. 2000, Ono et al. 2003). Considerando que as quimiocinas e seus receptores são elementos fundamentais para ativação e migração de leucócitos para o foco inflamatório, torna-se relevante avaliar a concentração de quimiocinas plasmáticas, bem como a presença de receptores de quimiocinas na superfície de leucócitos circulantes do sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose mansoni. Essas análises podem contribuir para um melhor entendimento da migração dos leucócitos e da forma com que essas células atuam no estabelecimento/manutenção da resposta imune levando às diferentes manifestações da infecção pelo *S. mansoni*.

Ainda são escassos os estudo que avaliam a importância dos receptores de quimiocinas no recrutamento de eosinófilos e neutrófilos durante a infecção esquistossomótica. Heath et al. 1997 demonstraram a expressão constitutiva de CCR1, CCR3, CXCR1, CXCR2, CXCR3 e CXCR4 em eosinófilos circulantes. No presente estudo, observou-se uma diminuição da expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 na superfície de eosinófilos (**Figura 18A**) e neutrófilos (**Figura 21A**) e CCR3 (**Figura 18C**) somente na superfície de eosinófilos do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados ao grupo AGD-PT I, corroborando com os dados obtidos por Warmington et al. (1999) que observaram uma alteração da expressão de CCR2 no decorrer da evolução da infecção pelo *S. mansoni*. Ainda segundo esses autores, camundongos deficientes em CCR2 submetidos ao modelo experimental de embolização com SEA, apresentaram regressão do granuloma. Segundo Silveira-Lemos (2008), os eosinófilos de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose apresentam aumento da expressão de CCR3, diferentemente dos grupos negativo para a infecção e portadores de fibrose. No entanto, Silveira-Lemos et al. (2010) avaliaram o recrutamento de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose e observaram níveis reduzidos de CXCR1 e CXCR2 e uma correlação positiva entre a expressão de CCR2 e CCR5 e o número absoluto de eosinófilos, demonstrando que esses receptores tem função primordiais para o

recrutamento de eosinófilos. Diferentes trabalhos relatam que CCR3 é o principal receptor de quimiocinas envolvido no recrutamento de eosinófilos (Sabroe et al. 1999, Zimmermann et al. 2000, Gurish et al. 2002) e que após a ligação de CCL24 à esse receptor, uma série de eventos é desencadeada, como liberação de cálcio, ativação de proteínas quinases ativadoras de mitógeno (MAPK), mudanças relacionadas com a resposta quimiotática e liberação de grânulos (Tenscher et al 1996, Sabroe et al. 1999, Boehme et al. 1999, Lukacs 2001).

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir, que os eosinófilos e neutrófilos de pacientes do grupo AGD-PT II não estariam mais em processo de migração para o foco inflamatório, via receptores CCR2 e CCR3, considerando a ausência de antígenos do parasito.

Nesse trabalho foi observado também um aumento da expressão do receptor CCR5 (**Figura 27B**) na superfície de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes do grupo AGD-PT II, quando comparados ao grupo AGD-PT I. Recentes avanços na análise de receptores de quimiocinas demonstraram que a expressão do receptor CCR5 é um importante evento na diferenciação e polarização da resposta imune mediada por linfócitos T e na diferenciação da resposta imune para Tipo 1 e Tipo 2 (Bonecchi et al. 1998, Sallusto, Lanzavecchia & Mackay 1998). A expressão dos receptores CXCR3, CCR1 e CCR5 têm sido associada a uma resposta do Tipo 1. Por outro lado, os receptores CCR3, CCR4 têm sido associados a uma resposta do Tipo 2, CCR2, a uma resposta do Tipo 0, enquanto, CXCR4 e CCR7 estão relacionados aos linfócitos T não primados por antígeno (Sallusto et al. 1998). Em outro estudo, também realizado por Silveira-Lemos (2004), a autora mostrou que linfócitos TCD4<sup>+</sup> de pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose apresentam aumento da expressão de CCR5. Com base nos resultados de expressão de CCR5 e na avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos TCD4<sup>+</sup>, demonstrou-se um perfil preferencialmente do Tipo 2, sugerindo que os pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose apresentariam um perfil misto de resposta imunológica.

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo permitem especular a persistência de um aumento do número de linfócitos totais positivos para CCR5 (receptor associado à resposta do Tipo 1) a níveis mais elevados do que os expressos no grupo CT. Entretanto, não podemos deixar de destacar que a grande maioria das alterações imunofenotípicas nos receptores de quimiocinas avaliados retornaram aos níveis basais, após quimioterapia específica.

Já é sabido que a atividade do praziquantel mostra um sinergismo com a resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelo *S. mansoni*. Estudos a respeito da atividade do praziquantel dependente da resposta imune do hospedeiro são realizados em sua maioria em

camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratados com praziquantel. Doenhoff et al. (1987) relataram que o praziquantel tem sua eficiência reduzida em camundongos com imunossupressão de células T. Doenhoff et al. (1988) observaram esse sinergismo principalmente em culturas estimuladas com extratos de SWAP, demonstrando que a dependência do praziquantel ao sistema imune estaria relacionada principalmente aos danos induzidos pela droga na superfície do verme e consequente exposição dos antígenos aos anticorpos específicos. Ribeiro et al. (2004) avaliaram ainda a interação entre a resposta imune específica ao *S. mansoni* e o praziquantel em camundongos portadores de imunidade concomitante, parasitos com 6 dias de idade e tratados com praziquantel, foram eliminados mais eficazmente do que parasitos de apenas 24 horas, apesar de ambos mostrarem uma redução significativa da carga parasitária quando comparados com os respectivos controles tratados. Esses resultados demonstram que o praziquantel pode ser eficaz nos estágios de pele e pulmão durante o desenvolvimento do *S. mansoni*, agindo principalmente com uma resposta imune específica estabelecida.

Com base nesse contexto considera-se que o praziquantel é reconhecidamente uma droga que apresenta sinergismo com a resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelo *S. mansoni*, o que justifica sua eficácia relacionada aos estágios mais tardios e imunogênicos do parasita (SWAP), assim como seu forte impacto em relação aos diferentes fatores do sistema imunológico como citocinas, quimiocinas, IgE e NO.

Em suma, os dados apresentados nesse trabalho mostraram que após tratamento específico com praziquantel grande parte das alterações imunológicas observadas previamente ao tratamento de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose mansônica foram normalizadas. Contudo, algumas dessas alterações se reverteram apenas quando foram avaliadas dois anos pós-tratamento, sugerindo um impacto a longo prazo da terapêutica específica pós-fase aguda da infecção esquistossomótica sobre o perfil geral dos pacientes.

## **7 CONCLUSÃO**

Após a realização deste trabalho, pode-se concluir que dois anos após terapêutica específica com praziquantel, a maioria das alterações observadas nos pacientes portadores da forma clínica aguda da esquistossomose, antes e persistentes um ano após o tratamento, como leucocitose, eosinofilia, elevados níveis de IgE e NO, expressão persistente de moléculas co-estimuladoras, de ativação e adesão celular em leucócitos circulantes, elevados níveis de expressão de algumas citocinas e quimiocinas sintetizadas por granulócitos, foram normalizadas, sugerindo que o tratamento pode promover, a longo prazo, a reversibilidade das alterações imunofenotípicas das principais populações celulares envolvidas no contexto da infecção esquistossomótica aguda.



Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 939-951.

Alisson ACM, Andrade Z, Brunner KT, Butterworth AE, Capron A, Cohen S, Colley DG, Coombs RRA, David JR, Davis A, Hoffman DB, Hopewood BCC, Hoube U, Jordan P, Lambert PH, Mahmoud AAF, Sher A, Smithers SR, Sturrock RF, Torrigian G, Warren KS, Webbe G, Weigle W. *Immunology of schistosomiasis*. WHO press 1974; 51: 553-95.

Allam G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiol* 2009; 214: 712–727.

Alves-Brito CF, Simpson AJ, Bahia-Oliveira LM, Rabello AL, Rocha RS, Lambertucci JR, Gazzinelli G, Katz N, Corrêa-Oliveira R. Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis acute schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 53-56.

Alves-Oliveira LF, Moreno EC, Gazzinelli G, Martins-Filho OA, Silveira AM, Gazzinelli A, Malaquias LC, LoVerde P, Leite PM, Correa-Oliveira R. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. *Infect Immun* 2006; 74: 1215-1221.

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 79-85.

Andrade ZA, Grimaud JA. Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. *Am J Pathol* 1986; 124: 59-65.

Andrade ZA, Baptista AP, Santana TS. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 Suppl I: 267-72.

Anthony B, Mathieson W, Castro-Borges W, Allen J. *Schistosoma mansoni*: Egg-induced downregulation of hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. *Exp Parasitol* 2010; 124: 409–420.

Anthony RM, et al. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Med* 2006; 12: 955-960.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF JR, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 975-987.

Atta A M, Magalhães LA, Alcântara FG, Pareja G. Esquistossomose mansônica. I Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. *Rev Saúde Pública* 1981; 15: 72-92.

- Ault S. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 99-107.
- Babapulle FB. The eosinophilias, including the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *British J Haematol* 2003; 121: 203-23
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245-1253.
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565–658.
- Bahia-Oliveira LM, Gazzinelli G, Eloi-Santos SM, Cunha-Melo JR, Oliveira LF, Silveira AM, Viana IR, Carmo J, Souza A, Correa-Oliveira. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 57-61.
- Bandeira-Melo C, Weller PF. Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 73-81.
- Barata CH, Pinto-Silva RA, Lambertucci JR. Abdominal ultrasound in acute schistosomiasis mansoni. *Br J Radiol* 1999; 72: 949-52.
- Barbosa CS, Pieri OS, Silva CB, Barbosa FS. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 93: 265-266.
- Barbosa CS, Montenegro SML, Abath FG, Domingues AL. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 169-172.
- Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol* 2006; 176: 5374-5387.
- Beck L, Van-Lüme DSM, Souza JR, Domingues ALC, Favre T, Abath FGC, Montenegro SM. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop* 2008; 108: 229-233.
- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-360.
- Berriman M, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 2009; 460: 352-359.
- Bevilacqua M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *An Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.

Bina JC. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia.; 1977.

Bina JC. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansônica. Rev Patol Trop 1981; 10: 221-267.

Bina J, Prata A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 211-216.

Boehme SA, Sullivan SK, Crowe PD, Santos M, Conlon PJ, Sriramarao P, Bacon KB. Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. J Immunol 1999; 163: 1611-8.

Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. Int J. Parasitol 1998; 28: 121-34.

Bogliolo, L. Patologia. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1959; 11: 2-3.

Boisier P, Ramarokoto CE, Ravaoalimalala VE, Rabarijaona L, Serieye J, Roux J, Esterre P. Reversibility of *Schistosoma mansoni*-associated morbidity after yearly mass praziquantel therapy: ultrasonographic assessment. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92: 451-453.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J Exp Med 1998; 187: 129-34.

Boros DL, Pelley RP, Warren KS. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. J Immunol 1975; 114: 1437-1441.

Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 250-269.

Bouree P, Caumes E. Cercarial dermatitis. Presse Med 2004; 33: 490-493.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Grupo Técnico das Parasitárias. Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil. Brasília: MS/SVS, 2010. 18 p. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao\\_esquistossomose\\_brasil\\_abril2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_esquistossomose_brasil_abril2011.pdf). Acesso em: 01 junho 2010.

Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. J Immunol 1997; 159: 777-785.

- Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, Mahmoud AA, Sher A, Rees PH. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 1975; 256: 727-9.
- Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, et al. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* infection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 57-64.
- Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira MAS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 2008; 108: 109-117.
- Capron M, Coffman RL, Papin JP, Ajana F, Capron A. Fc epsilon receptor II expression in parasitic diseases: effects of cytokines on IgE-dependent activation of eosinophils. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991; 21B: 975-82.
- Cara DC, Negrao-Correa D, Teixeira MM. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. *Histol Histopathol* 2000; 15: 899-920.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-101.
- Castro-Silva P. Avaliação do efeito da esplenectomia sobre a resposta imune celular de pacientes portadores da forma crônica hepatoesplênica da esquistossomose mansoni. Belo Horizonte; 2006. Mestrado [Dissertação em Imunologia]. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cerri GG, Oliveira IRS. Ultra-sonografia abdominal. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002; 618.
- Checkley AM, Sanderson F. The investigation of eosinophilia. *Medicine* 2009; 38: 30-36.
- Checkley AM, Chiodini PL, Dockrell DH, Bates I, Thwaites GE, Booth HL, Brown M, Wright SG, Grant AD, Mabey DC, Whitty CJM, Sanderson F. Eosinophilia in returning travellers and migrants from the tropics: UK recommendations for investigation and initial management. *J Infect* 2010; 60: 1-20.
- Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 917-40.
- Chen LH, et al. Wilson ME, Davis X, Loutan L, Schwartz E, Keystone J, Hale D, Lim PL, McCarthy A, Gkrania-Klotsas E, Schlagenhauf P. Illness in Long-Term Travelers Visiting GeoSentinel Clinics. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1773-1782.
- Chiaromonte MG, Schopf LR, Neben TY, Cheever AW, Donaldson DD, Wynn TA. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol* 1999; 162: 920-30.

- Cioli D. Chemotherapy of Schistosomiasis: An Update. *Parasitol Today* 1998; 14: 418-422.
- Clutterbuck E, Hirst E, Sanderson C. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-4, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 1989; 73: 1504-1512.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol* 1993; 5: 657-663.
- Coelho PMZ, Enk MJ, Katz N. Treatment of clinical schistosomiasis at the prepatent phase: an option? *Trends Parasitol* 2009; 25: 299-300.
- Contigli C, Silva-Teixeira DN, Del Prete G, D'Elios MM, De Carli M, Manghetti M, Amedei A, Almerigogna F, Lambertucci JR, Goes AM. Phenotype and Cytokine Profile of *Schistosoma mansoni* Specific T Cell Lines and Clones Derived from Schistosomiasis Patients with Distinct Clinical Forms. *Clin Immunol* 1999; 91: 338-344.
- Corachan M. Schistosomiasis and international travel. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 446-450.
- Correa-Oliveira R, Caldas I, Martins-Filho A, Queiroz C, Lambertucci J, Cunha-Melo J, Silveira A, Prata A, Wilson R, Gazzinelli G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop* 2000; 77: 141-146.
- Costa e Silva, MF. Acompanhamento clínico, epidemiológico e imunológico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose mansoni, submetidos à terapêutica específica com Praziquantel. Belo Horizonte: S.N, 2009. 215 p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias)- Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D\\_5.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_5.pdf). Acesso em: 01 jun 2010.
- Cota GF, Pinto-Silva RA, Antunes CM, Lambertucci JR. Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. *Am J Trop Hyg* 2006; 74: 103-7.
- Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 13-19.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748.
- Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. 7th ed. London: Churchill Livingstone; 1991.

- Davies SJ, Smith SJ, Lim KC, Zhang H, Purchio AF, McKerrow JH, West DB. In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *Int J Parasitol* 2005; 35: 851-9.
- Davis GM. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. *Prog Clin Parasitol* 1993; 3: 145-204.
- Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179: 135-43.
- De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, Almeida RP, Rego MAV, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EC. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 2002; 185: 98-105.
- Den Haan JM, Bevan MJ. Antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 437-441.
- De Souza JR, Morais CN, Aroucha ML, Miranda PJ, Barbosa CS, Domingues AL, Carvalho Júnior LB, Abath FG, Montenegro SM. Treatment of human acute schistosomiasis with oxamniquine induces an increase in interferon-gamma response to *Schistosoma mansoni* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 225-228.
- De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993; 111: 4754-4765.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougères AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1990; 111: 3129-39.
- Diaz-Rivera RS, Ramos-Morales F, Koppisch E. Acute Manson's schistosomiasis. *Am J Med* 1956; 21: 918-943.
- Disch J, Katz N, Pereira e Silva Y, de Gouvêa Viana L, Andrade MO, Rabello A. Factors associated with *Schistosoma mansoni* infection 5 years after selective treatment in a low endemic area in Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 133-42.
- Doenhoff MJ, Sabah AAA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 947-951.
- Doenhoff MJ, Modha J, Lambertucci JR. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. *Immunology* 1988; 65: 507-510.
- Doughty BL, Goes AM, Parra JC, Rocha RS, Katz N, Colley DG, Gazzinelli G. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. I. Granuloma formation and modulation around polyacrylamide antigen-conjugated beads. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82 Suppl 4: 47-54.

- Drapier JC. Nitric oxide and macrophages. *Pathol Biol* 1997; 45: 110-114.
- Durner J, Gow A J J, Stamler S, Glazebrook J. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14206-14207.
- Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 1-23.
- Elsner J, Petering H, Kimmig D, Wells TN, Proudfoot AE, Kapp A. The CC chemokine receptor antagonist met-RANTES inhibits eosinophil effector functions. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 462-5.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* 2002; 82: 139-146.
- Enk MJ, Amorim A, Schall VT. Acute Schistosomiasis Outbreak in the Metropolitan Area of Belo Horizonte, Minas Gerais: Alert about the Risk of Unnoticed Transmission Increased by Growing Rural Tourism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 745-750.
- Enk MJ, Caldeira RL, Carvalho OS, Schall VT. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 105-108.
- Enk MJ, Lima AC, Drummond SC, Schall VT, Coelho PM. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop* 2008; 108: 222-228.
- Enk MJ, Amaral GL, Costa-Silva MF, Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Gazinnelli G, Zech-Coelho PM, Massara CL. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 537-540.
- Evengard B, Hammarstrom L, Smith CIE, Linder E. Early antibody responses in human schistosomiasis. *Clin Exper Immunology* 1990; 80: 69-76.
- Falcão PL, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Talvani A, Proudfoot AEI, Wells TN, Williams TJ, Jose Peter J, Teixeira MM. Plasma Concentrations and Role of Macrophage Inflammatory Protein-1a during Chronic *Schistosoma mansoni* Infection in Humans. *J Infect dis* 2002; 186: 1696-1700.
- Fanger MW, Shen L, Graziano RF, Guyre PM. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today* 1989; 10: 92-9.
- Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol* 2003; 19: 509-515.

Fitzsimmons CM, Joseph S, Jones FM, Reimert CM, Hoffmann KF, Kazibwe F, Kimani G, Mwatha JK, Ouma JH, Tukahebwa EM, Kariuki HC, Vennervald BJ, Kabatereine NB, Dunne DW. Chemotherapy for schistosomiasis in Ugandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm-specific immunoglobulin E. *Infect Immun* 2004; 72: 4023-4030.

Flora-Filho R, Zilberstein B. Óxido Nítrico: O Simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med Bras* 2000; 46: 265-271.

Forsberg L, Floren CM, Mederstrom E, Prytz H. Ultrasound examination in diffuse liver disease: clinical significance of enlarged lymph nodes in the hepato-duodenal ligament. *Acta Radiol* 1987; 28: 281-284.

Freeman CM, et al. CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. *J Immunol* 2005; 174: 1962-1970.

Frenzel K, Grigull L, Odongo-Aginya E, Ndugwa CM, Laroni-Lakwo T, Schweigmann U, Vester U, Spannbrucker N, Doehring E. Evidence for a long-term effect of a single dose of praziquantel on *Schistosoma mansoni*-induced hepatosplenic lesions in northern Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 927-931.

Galioto AM, et al. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 2006; 74: 5730-5738.

Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, Cetre-Sossah CB, Andove J, Hightower AW, Karanja DM, Colley DG, Secor WE. Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans. *Infect Immun* 2006; 74: 2169-76.

Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* 1983; 130: 2891-2895.

Gazzinelli G, Lambertucci JR, Katz N, Rocha RS, Lima MS, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni: XI. Immunologic Status of Patients with Acute Infections and After Treatment. *J Immunol* 1985; 135: 2121-2127.

Goes AM, Rocha RS, Gazzinelli G, Doughty BL. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1989; 11: 695-711.

Gopinath R, Hanna LE, Kumaraswami V, Perumal V, Kavitha V, Vijayasekaran V, Nutman TB. Perturbations in eosinophil homeostasis following treatment of lymphatic filariasis. *Infect Immun* 2000; 68: 93-9.

Gordon RM, Griffiths RB. Observations on the means by which the cercariae of *S. mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Ann Trop Med* 1951; 45: 227-243.

Grandiere-Perez L, Ansart S, Paris L et al. Efficacy of Praziquantel during the incubation and invasive phase of *Schistosoma haematobium* schistosomiasis in 18 travellers. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 814-818.

Greco DB, Pedroso ER, Lambertucci JR, Rocha MO, Coelho PM, Raso P, Ferreira CS. Pulmonary Involvement in schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 221-227.

Gryseels B, Nkulikyinka L, Engels D. Impact of repeated community-based selective chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 634-641.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet* 2006; 368: 1106-1118.

Gurish MF, Humbles A, Tao H, Finkelstein S, Boyce JA, Gerard C, Friend DS, Austen KF. CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol* 2002; 168: 5730-6.

Harries AD, Cook GC. Acute schistosomiasis (Katayama fever): clinical deterioration after chemotherapy. *J Infect* 1987; 14: 159-161.

Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, Bradley B, Kay AB. Fc gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* 1990; 69: 264-70.

Harvey CJ, Pilcher JM, Eckersley RJ, Blomley MJK, Cosgrove DO. Advances in ultrasound. *Clin Radiol* 2002; 57: 157-177.

Hatz CF. The use of ultrasound in schistosomiasis. *Adv Parasitol* 2001; 48: 225-84.

Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997; 99: 178-184.

Herbert DBR, Orekov T, Roloson A, Ilies M, Perkins C, O'Brien W, Cederbaum S, Christianson DW, Zimmermann N, Rothenberg ME, Finkelman FD. Arginase I Suppresses IL-12/IL-23p40-Driven Intestinal Inflammation during Acute Schistosomiasis. *J Immunol* 2010; 184: 6438-6446.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 2001;167: 6533-6544.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leunskink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10- producing innate effector and regulatory. T cells *J Immunol* 2004; 172: 3157-3166.

Hiatt RA, Sotomayor ZR, Sanchez G, Zambrana M, Knight WB. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 1979; 139: 659-666.

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 709-50.

Homeida MA, el Tom I, Nash T, Bennett JL. Association of the therapeutic activity of praziquantel with the reversal of Symmers' fibrosis induced by *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 360-5.

Horak P, Kolarova L. Molluscan and vertebrate immune responses to bird schistosomes. *Parasite Immunol* 2005; 27: 247-55.

Horie S, Okubo Y, Hossain M, Momose T, Suzuki J, Isobe M, Sekiguchi M. Intercellular adhesion molecule-1 on eosinophils is involved in eosinophil protein X release induced by cytokines. *Immunology* 1997; 90: 301-7.

Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 313-335.

Iacomini J, Ricklan DE, Stadecker MJ. T cells expressing the gamma delta T cell receptor are not required for egg granuloma formation in schistosomiasis. *Eur J Immunol* 1995; 25: 884-8.

Iskander R, Das PK, Aalberse RC. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. *Int Archs Allergy Apply Immunol* 1981; 66: 200-7.

James SL, Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *S. mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 1989; 143: 4208-12.

Jaureguiberry S, Perez L, Paris L, Bricaire F, Danis M, Caumes E. Invasive schistosomiasis. *Presse Med* 2005; 34: 1641-1645.

Jaureguiberry S, Ansart S, Perez L, Danis M, Bricaire F, Caumes E. Acute neuroschistosomiasis: two cases associated with cerebral vasculitis. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 964-966.

Jaureguiberry S, Paris L, Caumes E. Difficulties in the diagnosis and treatment of acute schistosomiasis. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1163-4.

- Jaureguiberry S, Paris L, Caumes E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 225-231.
- Jose P, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179: 881-887.
- Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelet independent killing of schistosomes. *Nature* 1983; 303: 810-815.
- Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, Kamau T, Kariuki HC, Kazibwe F, Tukahebwa E, Kabatereine NB, Ouma JH, Vennervald BJ, Dunne DW. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *J Infect Dis* 2004; 190: 835-842.
- Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *J Clin Invest* 2003; 111: 1563-70.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1972; 14: 397-400.
- Katz N. Experiências com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1980; 22: 40-51.
- Katz N, Rocha RS, Lambertucci JR, Greco DB, Pedroso ERP, Rocha MOC, Flan S. Clinical trial with oxamniquine and praziquantel in the acute and chronic phases of schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1983; 25: 173-177.
- Katz N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 33-35.
- Katz N, Peixoto SV. Critical analysis of the estimated number schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 303-308.
- Katz N, Coelho PMZ. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. *Acta Trop* 2008; 108: 72-78.
- Khan AI, Landis RC, Malhotra R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation* 2003; 27: 265-80.
- Khan AI, Kubes P. L-selectin: an emerging player in chemokine function. *Microcirculation* 2003; 10: 351-8.
- Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB, Vane JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P-450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11147-11152.

Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005; 52: 5-14.

Kihara JH, Muhoho N, Njomo D, Mwobobia IK, Josyline K, Mitsui Y, Awazawa T, Amano T, Mwandawiro C. Drug efficacy of praziquantel and albendazole in school children in Mwea Divison, Central Province, Kenya. *Acta Trop* 2007; 102: 165-71.

King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP. CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2448-2455.

Kita H, Gleich GJ. Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. *J Exp Med* 1996; 183: 2421-2426.

Konert C, Ostendorf B, Sander O, Jost M, Wagner C. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1436-1442.

Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol* 2001; 22: 502-509.

Lambertucci JR, Greco DB, Pedroso ER, da Costa Rocha MO, Salazar HM, de Lima DP. A double blind trial with oxamniquine in chronic schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 751-755.

Lambertucci JR, Rocha RS, Carvalho OS, Katz NA. Esquistossomose mansoni em Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 20: 47-52.

Lambertucci JR. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; 35: 399-404.

Lambertucci JR, da Silva RA, Gerspacher-Lara R, Barata CH. Acute Manson's schistosomiasis: sonographic features. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 76-77.

Lambertucci JR, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Rayes AA, Teixeira R, Nobre V, Antunes CM. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop* 2000; 77: 101-109.

Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 422-435.

Langley JG, Boros DL. T-lymphocyte responsiveness in murine schistosomiasis mansoni is dependent upon the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, lymphocyte function-associated antigen-1, and very late antigen-4. *Infect Immun* 1995; 63: 3980-6.

Leiper RT. Report on the results of the Bilharzia Mission in Egypt. *J R Army Med Corps* 1915; XXV, n. 1.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *An Rev Immunol* 1996; 14: 233-258.

Liew FY. Nitric oxide in infections and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp* 1995; 195: 234-239.

Lukacs NW, Boros DL. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 57-63.

Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 108-16.

Lunde MN, Ottesen EA. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 82-85.

Machado MM, Rosa ACF, Oliveira IRS, Cerri GG. Aspectos ultra-sonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. *Radiol Bras* 2002; 35: 41-45.

Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001; 2: 95-101.

MacKenzie JR, Mattes J, Dent LA, Foster PS. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4<sup>+</sup> Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 2001; 167: 3146-55.

Magalhães TVB. Impacto da ultra-sonografia do abdômen e o efeito de um agente eco-realçador para o diagnóstico e prognóstico da doença hepática da esquistossomose mansoni [dissertação]. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Biomedicina da Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais.; 2002.

Magalhães KG, Almeida PE, Atella GC, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto HC, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Bozza MT, Bozza PT. Schistosomal-Derived Lysophosphatidylcholine Are Involved in Eosinophil Activation and Recruitment through Toll-Like Receptor-2-Dependent Mechanisms. *J Individ Differ* 2010; 202: 1369-1379.

Makarova E, Goes TS, Marcatto AL, Leite MF, Goes AM. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. *Parasitol Int* 2003; 52: 269-79.

Malaquias LCC, Falcão PL, Silveira AMS, Gazzinell G, Prata A, Coffman RL, Pizziolo V, Souza CO, Colley DG, Correa-Oliveira R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol* 1997; 46: 393-398.

Manfras BJ, Reuter S, Wendland T, Kern P. Increased activation and oligoclonality of peripheral CD8(+) T cells in the chronic human helminth infection alveolar echinococcosis. *Infect Immun* 2002; 70: 1168-1174.

Mann BS, Chung KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res* 2006; 7: 59-69.

- Manson-Bahr PEC, Bell DR. Manson's Tropical Diseases, 19 ed. London: Baillière Tindall; 1989.
- Manzella A, Ohtomo K, Monzawa S, Lim JH. Schistosomiasis of the liver. *Abdom Imaging* 2008; 33: 144-150.
- Margulies DH. CD28, costimulator or agonist receptor? *J Exp Med* 2003; 197: 949-53.
- Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987; 51: 813-9.
- Martins-Filho OA, Dutra WO, Freeman GL, Silveira AM, Rabello A, Colley DG, Prata A, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra J. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. *Scand J Immunol* 1997; 46: 304-311.
- Martins-Filho OA, Cunha-Mello JR, Lambertucci JR, Silveira AMS, Colley DG, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 570-577.
- Martins-Leite P. Efeito da quimioterapia com praziquantel na fibrose e no perfil de citocinas associado à infecção pelo *Schistosoma mansoni* [dissertação]. Governador Valadares: Programa de Mestrado em Ciências Biológicas Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce.; 2008.
- Martins-Leite P, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Gazzinelli A, Malaquias LC, Correa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A, Silveira AM. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2780-2786.
- Massara CL, Amaral GL, Caldeira RL, Drummond SC, Enk MJ, Carvalho OS. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2008; 24: 1709-1712.
- Mastej K, Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol* 2008; 45: 183-90.
- Mathew RC, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 1986; 54: 820-6.
- Mckee AS, Pearce EJ. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* 2004; 173: 1224-1231.
- McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Brière F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3735-9.

- Meddows-Taylor S, Kuhn L, Meyers TM, Sherman G, Tiemessen CT. Defective Neutrophil Degranulation Induced by Interleukin-8 and Complement 5a and Down-Regulation of Associated Receptors in Children Vertically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 21-30.
- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993; 362: 248-50.
- Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 1999; 103: 1719-27.
- Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Gonçalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis* 1999; 179: 1502-14.
- Montesano AM, Freeman GL Jr, Secor WE, Colley DG. Immunoregulatory idiotypes stimulate Th1 cytokine responses in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Immunol* 1997; 158: 3800-4.
- Monteseirin J, Prados M, Delgado J, Guardia P, de la Calle A, Bonilla I, Conde MA, Conde J. Eosinophil receptors. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1996; 24: 226-34.
- Morimoto M, et al. Peripheral CD4 T cells rapidly accumulate at the host: parasite interface during an inflammatory Th2 memory response. *J Immunol* 2004; 172: 2424-2430.
- Moser B, Willimann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 84-89.
- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991; 12: A49-53.
- Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 2004; 59: 268-275.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145-176.
- Mutapi F, Ndhlovu PD, Hagan P, Spicer JT, Mduluzi T, Turner CM, Chandiwana SK, Woolhouse ME. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. *J Infect Dis* 1998; 178: 289-93.
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 65-70.

Nesello F, Silva JJN, Panis C, Costa IC, Menezes MCND, Oliviera FJA, Cunha TM, Watanabe MAE, Pavanelli WR. Experimental chemotherapy in schistosomiasis using ruthenium nitric oxide donor. In: Gault CE, Pieri OS, Favre TC, Thiengo S, Carvalho O, Passos LKJ, editores. Anais do 12º Simpósio Internacional Sobre Esquistossomose. Programa Integrado de Esquistossomose; 2010, Jan 5-8; Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Brasil; 2010. p. 295.

Nolan A, Kobayashi H, Naveed B, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, Karulf MR, Rom WN, Weiden MD, Gold JA. Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis. PLoS One 2009; 4: 1-8.

Olds GR, Dasarathy S. Schistosomiasis. Curr Treat Options Infect Dis 2000; 2: 88-99.

Oliveira DM, Carmo SA, Silva-Teixeira DN, Goes AM. Immunization with PIII, a Fraction of *Schistosoma mansoni* Soluble Adult Worm Antigenic Preparation, Affects Nitric Oxide Production by Murine Spleen Cells. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93: 175-180.

Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Carmo SA, Goes AM: Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansoni: up-regulation of *in vitro* granuloma formation by L-NAME. Nitric Oxide 1998; 2: 57, 62.

Oliveira DM, Gustavson S, Silva-Teixeira DN, Goes A M. Nitric Oxide and IL-10 Production Induced by PIII—A Fraction of *Schistosoma mansoni* Adult Worm Antigenic Preparation—Associated with Downregulation of *In Vitro* Granuloma Formation. Hum Immunol 1999; 60: 305-311.

Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Gustavson S, Oliveira SMP, Goes A M. Nitric oxide interaction with IL-10, MIP-1a, MCP-1 and RANTES over the *in vitro* granuloma formation against different *Schistosoma mansoni* antigenic preparations on human schistosomiasis. Parasitology 2000; 120: 391-398.

Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 1185-1199.

Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL 1992. IL-10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor a required as a costimulatory factor for IFN-g induced activation. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8676-878.

Othman AA, Shoheib ZS, Saied EM, Soliman RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: Impact on the future immuneresponse and the disease outcome. Immunobiology 2009; 1-12.

Pancre V, Delacre M, Herno J, Auriault C. Schistosomal egg antigen-responsive CD8 T-cell population in *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice. Immunology 1999; 98: 525-534.

- Patton EA, La Flamme AC, Pedras-Vasoncelos JA, Pearce EJ. Central Role for Interleukin-4 in Regulating Nitric Oxide-Mediated Inhibition of T-Cell Proliferation and Gamma Interferon Production in Schistosomiasis. *Infect Immun* 2002; 177-184.
- Park MK, Hoffmann KF, Cheever AW, Amichay D, Wynn TA, Farber JM. Patterns of Chemokine Expression in Models of *Schistosoma mansoni* Inflammation and Infection Reveal Relationships between Type 1 and Type 2 Responses and Chemokines In Vivo. *Infect Immun* 2001; 6755-6768.
- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 Cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1991; 173: 159-166.
- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth. *J Exp Med* 1992; 173: 159-166.
- Pearce WJ. Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. *Pharmacol Ther* 1995; 65: 75-91.
- Pearlman E, Lass JH, Bardenstein DS, Diaconu E, Hazlett FE Jr, Albright J, Higgins AW, Kazura JW. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. *J Immunol* 1997; 158: 827-33.
- Pereira WR, Kloos H, Crawford SB, Velásquez-Melendez JG, Matoso LF, Fujiwara RT, Cañado GGL, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Gazzinelli A. *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: Analysis of exposure risk. *Acta Trop* 2010; 113: 34-41.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 2009; 5: 1000371.
- Pessoa SB. *Parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1967.
- Pinto-Silva RA, Queiroz LC, Azeredo LM, Silva LCS, Lambertucci JR. Ultrasound in schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 479-484.
- Plumas J, Gruart V, Aldebert D, Truong MJ, Capron M, Capron A, Prin L. Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1265-70.
- Rabello ALT, Pinto-Silva RA, Rocha RS, Katz N. Abominal ultrasonography in acute clinical schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 748-752.
- Rabello ALT. Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 277-280.

- Rabello ALT, Garcia MMA, Pinto da Silva RA, Roberto S, Katz N. Humoral Immune Responses in Patients with Acute *Schistosoma mansoni* Infection Who Were Followed Up for Two Years After Treatment. Clin Infect Dis 1997; 24: 304-8.
- Ramalho-Pinto FJ, McLaren DJ, Smithers SR. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. J Exp Med 1978; 147: 147-156.
- Ramaswamy K, He YX, Salafsky B. ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol 1997; 86: 118-132.
- Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. Infect Immun 2006; 74: 1471-1479.
- Reimert CM, Fitzsimmons CM, Joseph S, Mwath JK, Jones FM, Kimani G, Hoffmann KF, Booth M, Kabatereine NB, Dunne DW, Vennervad BJ. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre- and posttreatment with praziquantel. Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 584-593.
- Renganathan E, Cioli D. An International initiative on praziquantel use. Parasitol Today 1998; 14: 390-391.
- Rezende SA, Lambertucci JR, Goes AM. Role of immune complexes from patients with different clinical forms of schistosomiasis in the modulation of in vitro granuloma reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 683-687.
- Rezende CMF, Goes TS, Goes VS, Vasco Azevedo, Leite MF, Goes AM. GM-CSF and TNF synergize to increase in vitro granuloma size of PBMC from humans induced by *Schistosoma mansoni* recombinant 28-kDa GST. Immunol Lett 2004; 95: 221-228.
- Ribeiro F, Mello RT, Tavares CAP, Kusel JR, Coelho PMZ. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. Rev Inst Med trop S Paulo 2004; 46: 231-233.
- Ritter DM, Mckerrow JH. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. Infect Immun 1996; 64: 4706-4713.
- Richter J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. Acta Trop 2003; 86: 161-83.
- Rocha MOC, Pedroso ERP, Neves J, Rocha RS, Greco DB, Lambertucci JR, Rocha RL, Katz N. Characterization of the non-apparent clinical form in the initial phase of schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop São Paulo 1993; 35: 247-251.

Rocha MOC, Pedroso ERP, Greco DB, Lambertucci JR, Katz N, Rocha RL, Rocha RS, Rezende DF, Neves J. Pathogenetic factors of acute schistosomiasis mansoni: correlation of worm burden, IgE, blood eosinophilia and intensity of clinical manifestations. *Trop Med Int Health* 1996; 2: 213-220.

Rogowski O, Sasson Y, Kassirer M, Zeltser D, Maharshak N, Arber N, Halperin P, Serrov J, Sorkin P, Eldor A, Berliner S. Down-regulation of the CD62L antigen as a possible mechanism for neutrophilia during inflammation. *Br J Haematol* 1998; 101: 666-669.

Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 218-224.

Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338: 1592-600.

Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 11-28.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 147-174.

Rottman JB. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet Pathol* 1999; 36: 357-367.

Rumbley CA, Zekavat SA, Sugaya H, Perrin PJ, Ramadan MA, Phillips SM. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *J Immunol* 1998. 161: 4129-37.

Rutitzky LI, Lopes da Rosa JR, Stadecker MJ. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J Immunol* 2005; 175: 3920-3926.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol* 1986; 61: 294-303.

Sabroe I, Hartnell A, Jopling LA, Bel S, Ponath PD, Pease JE, Collins PD, Williams TJ. Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways. *J Immunol* 1999; 162: 2946-55.

Saconato H, Atallah A. Interventions for treating schistosomiasis mansoni. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD000528.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19: 568-574.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 875-83.

Sallusto R, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *An Rev Immunol* 2000; 18: 593-620.

Salvioli L, Renganathan E, Montresor A, Davis A, Behbehani K. Control of schistosomiasis - a global picture. *Parasitol Today* 1997; 13: 444-448.

Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect Immun* 2007; 75: 397-407.

Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 61-5.

Silva LC, Pereira AC, Queiroz LC, Andrade LM, Antunes CM, Lambertucci JR. Disagreement between ultrasound and magnetic resonance imaging in the identification of schistosomal periportal fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 Suppl 1: 279-282.

Silveira-Lemos D. Avaliação do perfil de expressão de receptores de quimiocinas e do padrão de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose mansoni. Belo Horizonte; 2004. Mestrado [Dissertação em Imunologia] - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Silveira-Lemos D. Avaliação fenotípica e funcional de eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose mansoni. Belo Horizonte; 2008. Tese [Doutorado em Imunologia]. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Souza-Soares AL, Castro-Silva P, Costa-Silva MF, Guimarães PHG, Ferraz HB, Oliveira-Fraga LA, Teixeira M M, Corrêa Oliveira R. Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 380-386.

Smith PM, Shainheit MG, Bazzone LE, Rutitzky LI, Poltorak A, Stadecker M J. Genetic Control of Severe Egg-Induced Immunopathology and IL-17 Production in Murine Schistosomiasis. *J Immunol* 2009; 183: 3317-3323.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Reddy TR, Boros DL. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology* 2005; 114: 410-417.

Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory markers and a history of trauma. *Ann Int Med* 1984; 101: 847-51.

Sousa-Pereira S, Teixeira AL, Silva LC, Souza AL, Antunes CM, Teixeira MM, Lambertucci JR. Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol* 2006; 28: 473-478.

- Speziali E, Aranha CHM, Teixeira-Carvalho A, Santiago AF, Oliveira RP, Rezende MC, Carneiro CM, Negrão-Correa D, Coelho PMZ, Faria AMC. Ageing Down-Modulates Liver Inflammatory Immune Responses to Schistosome Infection in Mice. *Scand j immunol* 2010; 71: 240-248.
- Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* 2004; 201: 168-79.
- Stanworth DR, Smith AK. Inhibition of reagin-mediated PCA reactions in baboons by the human IgG4 sub-class. *Clin Allergy* 1973; 3: 37-41.
- Stavitsky AB. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect Immun* 2004; 72: 1-12.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 411–25.
- Stelma FF, Talla I, Sow S, Kongs A, Niang M, Polman K, Deelder AM, Gryseels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 167-170.
- Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML. Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. Washington: International Nutritional Anemia Consultative Group; 1998.
- Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF Jr, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2034-41.
- Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 2006; 108: 2420-7.
- Tachimoto H, Burdick MM, Hudson SA, Kikuchi M, Konstantopoulos K, Bochner BS. CCR3-active chemokines promote rapid detachment of eosinophils from VCAM-1 in vitro. *J Immunol* 2000; 165: 2748-54.
- Takashi S, Okubo Y, Horie S. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol* 2001; 91: 613-22.
- Talaat RM, El-bassiouny AI, Osman AM, Yossif M, Charmy R, Al-sherbiny MM. Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S.mansoni*-infected Egyptian patients. *Parasitol Res* 2007; 101: 289-299.
- Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol* 2006; 176: 5839-5847.

Teixeira-Carvalho A. Estudo de aspectos imunocitoquímicos associados as formas clínicas da esquistossomose mansoni humana. Belo Horizonte; 2004. Tese [Doutorado em Imunologia]. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LCC, Alves-Oliveira LF, Silveira AMS, Gazzinelli A, Alvarez MCB, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Cytokines, chemokines receptors, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH+</sup> T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Trop* 2008; 108: 139-149.

Tenscher K, Metzner B, Schöpf E, Norgauer J, Czech W. Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. *Blood* 1996; 88: 3195-9.

Tomé CM, Cipolli E, Coelho da Silva CLPA, Borges DA, Soares MS. Esquistossomose na estância turística de Holambra (SP, Brasil). In: Gault CE, Pieri OS, Favre TC, Thiengo S, Carvalho O, Passos LKJ, editores. Anais do 9º Simpósio Internacional Sobre Esquistossomose. Programa Integrado de Esquistossomose; 2003, Oct 3-5; Belo Horizonte, Minas Gerais. Brasil; 2003. p. 68.

Torres VM. Dermatologic manifestations of Schistosomiasis Mansoni. *Arch Dermatol* 1976; 112: 1539-1542.

Toure S, Zhang Y, Bosque-Oliva E, Ky C, Ouedraogo A, Koukounari A, Gabrielli AF, Sellin B, Webster JP, Fenwick A. Two-year impact of single praziquantel treatment on infection in the national control programme on schistosomiasis in Burkina Faso. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 782-791.

Uneke CJ. Soil transmitted helminth infections and schistosomiasis in school age children in sub-Saharan Africa: Efficacy of chemotherapeutic intervention since World Health Assembly Resolution 2001. *J health res* 2010; 12: 1-15.

Unkeless JC. Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. *J Clin Invest* 1989; 83:355-61.

Utzinger J, N'goran EK, N'dri A, Lengeler C, Tanner M. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop Med Int Health* 2000; 5: 771-778.

Vassallo P, Wernecke K, Roos N, Peters PE. Differentiation of benign from malignant superficial lymphadenopathy: the role of high-resolution US. *Radiology* 1992; 183: 215-220.

Veronesi R, Focaccia R. Esquistossomose mansoni. In: Veronesi R, Focaccia R. editores. Tratado de Infectologia. 2nd ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. v. 2, capítulo 107, p. 1374-1392.

Verweij JJ, Polderman AM, Visser LG, Deelder AM. Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 48-50.

Xiao S, Tanner M, N'goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R, Chen M, Zheng J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop* 2002; 82: 175-181.

Walsh GM, Mermoud JJ, Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha 4 beta 1 (very late antigen-4) dependent. *J Immunol* 1991; 146: 3419-23.

Warmington KS, Boring L, Ruth JH, Sonstein J, Hogaboam CM, Curtis JL, Kunkel SL, Charo IR, Chensue SW. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation - analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *Am J Pathol* 1999; 154: 1407-1416.

Warren KS, Domingo EO, Cowan RB. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am J Pathol* 1967; 51: 735-56.

Weber PSD, Madsen SA, Smith GW, Ireland JJ, Burton JL. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 213-240.

Weller PF. Cytokine regulation of eosinophil function. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 88: 7430-7435.

Weinstock JV. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the aschistosome ova and the host. *Immunol Invest* 1992; 21: 455-475.

Weiss JB, Aronstein WS, Strand M. *Schistosoma mansoni*: stimulation of artificial granuloma formation in vivo by carbohydrate determinants. *Exp Parasitol* 1987; 64: 228-36.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 148-154.

World Health Organization. Meeting on ultrasonography in schistosomiasis: Proposal for a practical guide to the standardized use of ultrasound in the assessment of pathological changes. Geneva: WHO, 1991. (Technical Report Series).

World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2010. 184 p. ISBN: 978 92 4 1564090. Disponível em:

[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf). Acesso em: 01 jun 2010.

Wynn TA, THompson RW, Cheever AW, Mentink-Nake MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Rev* 2004; 201: 156-167.

Zimmermann N, Daugherty BL, Kavanaugh JL, El-Awar FY, Moulton EA, Rothenberg ME. Analysis of the CC chemokine receptor 3 gene reveals a complex 5' exon organization, a functional role for untranslated exon 1, and a broadly active promoter with eosinophil-selective elements. *Blood* 2000; 96: 2346-54.