

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

Caracterização da resposta imune celular de pacientes portadores da esquistossomose mansônica residentes em áreas endêmicas para doença

por

RENATO ABDALA

BELO HORIZONTE  
FEVEREIRO/ 2012

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

Caracterização da resposta imune celular de pacientes portadores da esquistossomose mansônica residentes em áreas endêmicas para doença

por

RENATO ABDALA

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

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

Co-orientação: Dr<sup>a</sup>. Cristina Toscano Fonseca

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO/2012

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

A135c  
2012

Abdala, Renato.

Caracterização da resposta imune celular de pacientes portadores da esquistossomose mansônica residentes em áreas endêmicas para doença / Renato Abdala. – Belo Horizonte, 2012.

XXVI, 150 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 143 - 176

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: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Imunidade nas Mucosas/imunologia 4. Proteínas Recombinantes/imunologia I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira de (Orientação). III. Fonseca, Cristina Toscano (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

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

Caracterização da resposta imune celular de pacientes portadores da esquistossomose mansônica residentes em áreas endêmicas para doença

por

RENATO ABDALA

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

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

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Adriana Bozzi de melo

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Elaine Speziali de Faria

**Suplente: Dr<sup>a</sup>.** Ana Carolina Campi Azevedo

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2012

## **COLABORADORES**

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

*Msc.* Amanda Cardoso de Oliveira Silveira– Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

*Msc.* Matheus Fernandes Costa e Silva – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Dr. Giovanni Gazzinelli – Laboratório de Imunologia celular e Molecular

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

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Laboratório de Esquistossomose

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira – Laboratório de Imunologia celular e Molecular

### **Escola de Enfermagem/UFMG – Belo Horizonte**

Dr<sup>a</sup>. Andréa Gazzinelli

### **Instituto de Ciências Biológicas/UFMG – Belo Horizonte**

Dr. Sérgio Costa Oliveira

## **SUPORTE FINANCEIRO:**

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

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

INCT-DT: Instituto Nacional de Ciência e tecnologia de Doenças Tropicais

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram em minhas escolhas. Agradeço pela compreensão, força, suporte e amor. Sem vocês essa conquista não seria possível.

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho, agradeço por ter me escolhido como aluno e pela confiança e credibilidade depositadas. Obrigado pelos ensinamentos que carregarei por toda a vida, pelo caráter, profissionalismo, respeito e dedicação. Um exemplo a ser seguido. Sinto-me lisonjeado em terminar esta dissertação sob sua orientação.

À Dr<sup>a</sup>. Cristina Toscano Fonseca, agradeço por ter aceitado o convite de ser minha co-orientadora. Obrigado pela ajuda nos momentos que precisei, pelo tempo dedicado, pelas sugestões, apoio, pelo conhecimento compartilhado, profissionalismo e caráter.

Ao Dr. Olindo Martins Assis Filho por me aceitar em seu laboratório. Pelo exemplo de pesquisador a ser seguido, competência e profissionalismo.

Ao Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo, agradeço pela disponibilidade e prestatividade sempre que preciso.

Aos Amigos do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, agradeço à Maísa Oliveira, Amanda Cardoso de Oliveira Silveira, Laís de Carvalho Maroni, Matheus Fernandes Costa e Silva, Cristiano Bandeira, Camila Arlen Diniz Jardim, Christiane Costa Pereira, Fernanda Trindade Madeira Araújo, Marcela de Lima Moreira, Camila Paula Magalhães, Dâmárys Pires de Andrade, Erick Eidy Nakagaki Silva, Luiza Pacheco de Araújo Porto, Marco Túlio Porto Gonçalves, Marcos Henrique Pereira, Marília Vasconcelos Fernandes de Oliveira, Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz, Bruno Henrique Marteleto, Danielle Alves Gomes Zauli, Fabiana Rocha da Silva, Fernanda Freire Campos Nunes, Rebeca Mascarenhas Lima, Salvina Maria de Campos, Simone Brutman Elias Mansur, Cíntia Marília Santana, Fabiana Rodrigues da Paixão e Jamilson Neves Ribeiro Filho por terem me ajudado sempre que precisei, pelos momentos vividos, pelo companheirismo e amizade de cada um de vocês que levo comigo para o resto de minha vida.

Aos membros do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelo convívio e pela disponibilização de suas instalações sempre que precisei.

Agradeço ainda aos amigos de outros laboratórios e aos colegas da pós-graduação pelo bom convívio, amizade e aprendizagem.

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.

À República Matutos, minha eterna casa, pelo companheirismo e apoio ao longo de minha formação acadêmica até os dias de hoje.

Aos meus pais Izabel e Roberto e toda a minha família que sempre me deram apoio e acreditaram em mim.

A todos os meus amigos de Caratinga e Belo Horizonte pelas alegrias e momentos vividos.

Aos órgãos financiadores que proporcionaram a realização desse trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar desse trabalho

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.



## S mario

Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas.....	XVIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIX
Resumo.....	XXIII
Abstract.....	XXV
<b>1 INTRODU�O</b> .....	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	32
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	32
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>33</b>
3.1 <i>Aspectos epidemiológicos e ciclo biológico da esquistossomose mansônica</i> .....	34
3.2 <i>Formas clínicas da esquistossomose mansônica</i> .....	36
3.3 <i>Resposta imune na esquistossomose</i> .....	38
3.4 <i>Desenvolvimento de vacinas para a esquistossomose</i> .....	44
3.5 <i>Diagn�stico da esquistossomose</i> .....	45
3.6 <i>Tratamento da esquistossomose mans�nica</i> .....	48
<b>4 POPULA�O, MATERIAIS E M�TODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 <i>Caracteriza�o da popula�o estudada</i> .....	52
4.2 <i>Exame parasitol�gico de fezes</i> .....	52
4.3 <i>Avalia�o de par�metros hematol�gicos</i> .....	53
4.4 <i>Obten�o de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou vermes adultos (SWAP) do S.mansoni</i> .....	53
4.5 <i>Obten�o da proteína recombinante Sm22.6</i> .....	54
4.6 <i>Obten�o da proteína recombinante Sm29</i> .....	54
4.7 <i>Imunofenotipagem ex vivo de linfócitos do sangue periférico</i> .....	55
4.8 <i>Aquisi�o e análise ex vivo do fenótipo celular de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo</i> .....	62
4.9 <i>Aquisi�o e análise ex vivo do fenótipo celular de células dendríticas do sangue periférico por citometria de fluxo</i> .....	64

<i>4.10 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de células NK do sangue periférico por citometria de fluxo.....</i>	<i>66</i>
<i>4.11 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de Linfócitos B do sangue periférico por citometria de fluxo.....</i>	<i>68</i>
<i>4.12 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de Monócitos CD14<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo.....</i>	<i>70</i>
<i>4.13 Detecção de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes portadores da fase crônica da infecção pelo S. mansoni.....</i>	<i>72</i>
<i>4.14 Aquisição e análise dos dados de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T do sangue periférico.....</i>	<i>74</i>
<i>4.15 Análise Estatística.....</i>	<i>77</i>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>78</b>
<i>5.1 Avaliação do perfil hematológico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose .....</i>	<i>79</i>
<i>5.2 Análise ex vivo do percentual de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>), linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose....</i>	<i>83</i>
<i>5.3 Análise ex vivo do percentual de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), expressando receptores de ativação NKp46 e NKp80, no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose .....</i>	<i>86</i>
<i>5.4 Análise ex vivo da expressão de TLR2 (Toll-like receptor) (CD282<sup>+</sup>) por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos (CD14<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), células dendríticas (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose .....</i>	<i>88</i>
<i>5.5 Análise ex vivo da expressão de moléculas co-estimuladoras CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos (CD14<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose .....</i>	<i>90</i>
<i>5.6 Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão e ativação celulares por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos CD14<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose .....</i>	<i>93</i>

5.7 <i>Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão celular por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose</i> .....	95
5.8 <i>Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão celular por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose</i> .....	97
5.9 <i>Análise ex vivo da expressão de moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose</i> .....	99
5.10 <i>Análise ex vivo da expressão de moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose.</i> .....	101
5.11 <i>Análise ex vivo da expressão das moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose</i> .....	103
5.12 <i>Principais diferenças encontradas entre os grupos na avaliação da resposta imune celular ex vivo</i> .....	105
5.13 <i>Deteção de citocinas intracelulares em monócitos (CD14<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose e indivíduos do grupo controle de área endêmica, após estimulação antigênica in vitro</i> .....	108
5.14 <i>Deteção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose e de indivíduos do grupo controle de área endêmica, após estimulação antigênica in vitro</i> .....	111
5.15 <i>Deteção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose indivíduos do grupo controle de área, após estimulação antigênica in vitro</i> .....	113
5.16 <i>Principais alterações do perfil de citocinas intracelulares produzidas após estimulação in vitro</i> .....	115
5.17 <i>Principais alterações celulares que conferem resistência e susceptibilidade à infecção pelo S. mansoni</i> .....	120
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	122
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	136
<b>8 ANEXOS</b> .....	138

<i>8.1 Questionário demográfico e socioeconômico .....</i>	<i>139</i>
<i>8.2 Questionário de contato com a água .....</i>	<i>142</i>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>143</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Análise *ex vivo* de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....63
- Figura 2:** Análise *ex vivo* de células dendríticas do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....65
- Figura 3:** Análise de células NK do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....67
- Figura 4:** Análise de linfócitos B CD19<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....69
- Figura 5:** Análise de monócitos CD14<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....71
- Figura 6:** Análise de monócitos CD14<sup>+</sup>IL-4<sup>HIGH</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....75
- Figura 7:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo.....76
- Figura 8:** Análise do perfil hematológico, da série vermelha, do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em área endêmica para esquistossomose.....81
- Figura 9:** Análise do perfil hematológico, série branca, do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em área endêmica para esquistossomose.....82

**Figura 10:** Análise de células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) (A) e de monócitos ( $CD14^+$ ) (B) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....84

**Figura 11:** Análise de linfócitos T  $CD4^+$  (A) e linfócitos T  $CD8^+$  (B) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....85

**Figura 12:** Percentual de Células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) expressando os receptores NKp46 (A) e NKp80 (B) no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....87

**Figura 13:** Expressão do receptor toll-2 ( $CD282^+$ ) em monócitos ( $CD14^+$ ) (A), células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) (B), células dendríticas ( $Lin^-HLA-DR^+CD11c^+$ ) (C), linfócitos T  $CD4^+$  (D) e linfócitos T  $CD8^+$  (E) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....89

**Figura 14:** Expressão dos receptores  $CD80^+$  (A) e  $CD86^+$  (B) em monócitos ( $CD14^+$ ) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....91

**Figura 15:** Expressão dos receptores  $CD80^+$  (A) e  $CD86^+$  (B) em linfócitos B ( $CD19^+$ ) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....92

**Figura 16:** Expressão da molécula de adesão CD54 (A) e ativação HLA-DR (B) em monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....94

**Figura 17:** Expressão das moléculas de adesão CD62L (A) e CD18 (B) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....96

**Figura 18:** Expressão das moléculas de adesão CD54 (A), CD62L (B) e CD18 (C) em linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....98

**Figura 19:** Expressão das moléculas reguladoras CD1d (A) e CD5 (B) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes em áreas endêmicas (CA) para esquistossomose.....100

**Figura 20:** Expressão das moléculas reguladoras CD1d (A) e CD5 (B) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em áreas endêmicas para esquistossomose.....102

**Figura 21:** Expressão das moléculas reguladoras CD5 (A) e CD86 (B) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em áreas endêmicas para esquistossomose.....104

**Figura 22:** Principais alterações imunofenotípicas em monócitos de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....105

**Figura 23:** Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....106

**Figura 24:** Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos B de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose.....107

**Figura 25:** Monócitos CD14<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área (CA) cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares.....110

**Figura 26:** Linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área endêmica (CA) cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares.....112

**Figura 27:** Linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área endêmica (CA) cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em



ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares.....114

**Figura 28:** Principais alterações nas citocinas sintetizadas por monócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29).....115

**Figura 29:** Principais alterações nas citocinas sintetizadas por monócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29).....116

**Figura 30:** Principais alterações nas citocinas sintetizadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29).....117

**Figura 31:** Perfil de citocinas sintetizadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29).....118

**Figura 32:** Principais alterações nas citocinas produzidas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29).....119

**Figura 33:** Principais alterações nas populações de monócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B que conferem resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*.....121

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de leucócitos circulantes.....	56
---	----

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

**<100** – Grupo infectado pelo *S. mansoni* que apresentava menos de 100 ovos por grama de fezes pelo método de Kato-Katz.

**>100** – Grupo infectado pelo *S. mansoni* que apresentava mais de 100 ovos por grama de fezes pelo método de Kato-Katz.

**Ag** – Antígeno.

**APC** – *Antigen-Presenting Cells* - Células apresentadoras de antígenos.

**CA** – Grupo controle residente em área endêmica para a esquistossomose.

**CD11c** – *Cluster of differentiation* – Grupo de diferenciação 11c.

**CD14** – *Cluster of differentiation* 14.

**CD16** – *Cluster of differentiation* 16.

**CD18** – *Cluster of differentiation* 18.

**CD19** – *Cluster of differentiation* 19.

**CD1d** – *Cluster of differentiation* 1d.

**CD21** – *Cluster of differentiation* 21.

**CD23** – *Cluster of differentiation* 23.

**CD28** – *Cluster of differentiation* 28.

**CD282** – Toll2 – *Cluster of differentiation* 282.

**CD3** – *Cluster of differentiation* 3.

**CD4** – *Cluster of differentiation* 4.

**CD40** – *Cluster of differentiation* 40.

**CD43** – *Cluster of differentiation* 43.

**CD5** – *Cluster of differentiation 5.*

**CD54** – *Cluster of differentiation 54.*

**CD56** – *Cluster of differentiation 56.*

**CD62L** – *Cluster of differentiation 62L.*

**CD69** – *Cluster of differentiation 69.*

**CD8** – *Cluster of differentiation 8.*

**CD80** – *Cluster of differentiation 80.*

**CD86** – *Cluster of differentiation 86.*

**CFA** – Adjuvante de Freud.

**CPqRR** – Centro de Pesquisas René Rachou.

**CT** – Grupo controle residente em área não endêmica para a esquistossomose.

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

**DALY** – *Disability Adjusted Life Years* – Anos de vida de incapacidade ajustados.

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetraacético.

**FACS** *Fluorescence Activated Cell Sorter* – Separador de células ativado por fluorescência – Equipamento para separar células por citometria.

**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína.

**FSC** – Forward Scatter – Dispersão frontal.

**g** – Velocidade de Centrifugação.

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

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama.

**Ig** – Imunoglobulina.

**IL** – Interleucina.

**IMF** – Intensidade Média de Fluorescência.

**INF** – Grupo infectado pelo *S. mansoni*.

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-Galactopiranosídeo.

**L** – Litro.

**LINF** – Linfócitos.

**MFF** – Macs Facs Fix – Solução fixadora de células.

**mM** – mili-Molar

**MON** – Monócitos.

**NK** – Natural Killer – Células Matadoras Naturais.

**NKp46** – Expresso em células NK. Associado a citotoxicidade de células NK.

**NKp80** – Estimula a citotoxicidade de células NK e a liberação de citocinas. Expresso em células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória.

**OPG** – Ovos por grama de fezes.

**PBS** – Tampão Fosfato Salínico.

**PE** – Ficoeritrina.

**PerCP** – Proteína Clorofila Piridinina.

**RPMI 1640** – *Roswell Park Memorial Institute Medium* – Meio de cultivo celular.

**SEA** – *Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo.

**Sm22.6** – Proteína de superfície do *S. mansoni* que possui 22.6 kDa.

**Sm29** – Proteína de superfície do *S. mansoni* que possui 29 kDa.

**SSC** – Side Scatter– Dispersão lateral.

**SWAP** – *Soluble Worm Antigen Preparation* – Antígenos solúveis do verme adulto de *S. mansoni*.

**TC** – Tricolor.

**TGF- $\beta$**  – *Transformant Growing Factor-beta* – Fator de transformação do crescimento-beta.

**Th** – *T-helper* – Linfócito T auxiliar.

**TLR2** – *Toll-Like Receptor 2* – Receptor do tipo Toll-2.

**TNF- $\alpha$**  – *Tumor necrosis factor-alfa* – Fator de necrose tumoral-alfa.

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais.

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

## Resumo

Neste estudo foram avaliadas as principais alterações hematológicas e imunofenotípicas em pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose (INF), subcategorizados por cargas parasitárias distintas, apresentando menos de 100 ovos por grama de fezes (<100) e mais de 100 ovos por grama de fezes (>100) e indivíduos negativos para ovos residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para a doença. Amostras de fezes e sangue periférico foram coletadas para realização de exame parasitológico pelo método de Kato-Katz e hemograma, respectivamente. Logo após, foi realizado a avaliação do perfil imunofenotípico *ex vivo* dos leucócitos circulantes e a produção de citocinas em culturas de células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antigênica *in vitro* por 12 horas na ausência ou presença de antígenos solúveis do ovo (SEA), do verme adulto (SWAP) e proteínas recombinantes (Sm22.6 e Sm29) do *Schistosoma mansoni*. Os resultados mostraram aumento no número absoluto de eosinófilos nos grupos INF e >100. Em relação ao perfil imunofenotípico, foi observado aumento da expressão dos receptores do Tipo Toll-2, CD80, CD86 e CD54 em monócitos dos grupos CA, INF, e >100 em relação ao grupo CT. Foi observado também aumento do receptor CD18 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos grupos CA e <100 em relação ao grupo CT, diminuição do CD18 no grupo >100 em relação ao grupo <100 e aumento da expressão do CD18 no grupo <100 em relação ao grupo CA. Em linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi observado aumento na expressão do receptor do tipo Toll-2 nos grupos INF, <100 e >100 em relação ao grupo CT, aumento do CD18 nos grupos <100 e CA em relação ao grupo CT e diminuição do CD18 no grupo >100 em relação ao grupo <100. Em linfócitos B, foi observado aumento da expressão do receptor CD80 e CD86 no grupo <100 em relação ao CT e aumento na expressão do CD86 no grupo CA em relação ao grupo CT. A análise após estimulação antigênica revelou, em monócitos, aumento da síntese de TGF- $\beta$  nos grupos INF e >100 estimulados com Sm22.6 e SEA em relação ao CA, redução na síntese de IL-10 e IL-12 no grupo INF em relação ao grupo CA estimulado com Sm22.6 e redução na síntese de IL-1 $\alpha$  nos grupos CA, INF, <100 e >100 estimulados com Sm22.6 e SEA em relação ao meio. Houve também, redução de expressão de IL-5 no grupo <100 em relação ao CA estimulado com Sm22.6, aumento na síntese de IFN- $\gamma$ , nos grupo INF e >100 estimulados com SEA em relação ao meio e aumento na síntese de TNF- $\alpha$  e IL-10 nos grupo INF e >100 estimulados com Sm22.6 e SEA em

relação ao grupo CA em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Além disso, houve aumento da síntese de IL-12 e TNF- $\alpha$  no grupo INF em relação ao CA estimulado com SEA, redução de IL-8 no grupo >100 em relação ao grupo <100 estimulados com SEA, SWAP e Sm22.6 e redução de síntese de IL-5 no grupo INF estimulado com SWAP em relação ao CA em linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Após a realização desse trabalho, pode-se concluir que indivíduos portadores da fase crônica e residentes em área endêmica para a doença apresentam forte expressão de moléculas co-estimuladoras, de adesão e de ativação celular em monócitos, linfócitos B, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, sugerindo que estes indivíduos possuam intensa atividade das células envolvidas na resposta imune contra a infecção pelo *S. mansoni*. Além disso, de uma maneira geral, os indivíduos infectados apresentaram, após estimulação antigênica com antígenos recombinantes, redução na síntese de citocinas pró inflamatórias e aumento da síntese de citocinas reguladoras tanto para monócitos quanto para linfócitos. Isto mostra uma enorme capacidade que esses antígenos possuem em induzir uma modulação da resposta imune relacionada à resistência a infecção e a uma menor gravidade da doença. A categorização da população estudada, segundo intensidades de infecção distintas, definiu a contribuição dessa variável para os mecanismos de resistência e susceptibilidade durante a infecção esquistossomótica.



## Abstract

In this study, hematological and immunological features were determined in patients with chronic phase of schistosomiasis (INF), subcategorized by distinct parasitic loads in those with less than 100 eggs per gram of feces (<100) or more than 100 eggs per gram of feces (> 100). Non infected patients resident (CA) or not (CT) in endemic areas for the disease were evaluated as control groups. Stool samples and peripheral blood were collected to perform parasitological exams and hemogram, respectively. Afterwards, it was performed the immunophenotypic profile of circulating leukocytes and cytokine pattern in peripheral blood mononuclear cells cultures after antigenic stimulation *in vitro* at 12 hours in the absence or presence of soluble egg antigens (SEA), soluble worm antigen preparation (SWAP) and recombinant proteins of *Schistosoma mansoni* (Sm22.6 and Sm29 ). The results showed an increase in the absolute number of eosinophils in INF and >100 groups. It was also observed an increase in expression of TLR2, CD80, CD86 and CD54 on monocytes from CA, INF, and >100 groups as compared to CT group. It was still observed an increase in the CD18 receptor expression in T CD4<sup>+</sup> lymphocytes from CA and <100 groups as compared to CT group. Decreased CD18 expression on >100 as compared to <100 group as well as increased expression of CD18 in <100 group as compared to CA group were also detected. Analyses of T CD8<sup>+</sup> lymphocytes demonstrated an increase in the TLR2 expression from INF, <100 and >100 groups as compared to the CT group. Increased CD18 expression in <100 and CA groups as compared to CT group as well as decreased in CD18 expression from >100 as compared to <100 group were still revealed. In B lymphocytes, there was an increase in the both CD80 and CD86 expressions on <100 group as compared to CT group, and an increase in the CD86 expression from CA group as compared to CT group. The analysis after antigenic stimulation revealed in monocytes increased TGF- $\beta$  synthesis from INF and >100 groups stimulated with SEA and Sm22.6 as compared to CA group, and decreased IL-10, IL-12 synthesis from INF group as compared to CA group, and decreased IL-1 $\alpha$  syntheses from CA, INF, <100 and >100 groups estimated with SEA and Sm22.6 as compared to absence of stimulation. There was also reduction in positivity for IL-5 from <100 group stimulated with Sm22.6 as compared to CA group and increase in the IFN- $\gamma$  from INF and >100 groups stimulated with SEA as compared to absence of

stimulation, increase in TNF- $\alpha$  and IL-10 synthesis from INF and >100 groups stimulated with SEA and Sm22.6 as compared to absence of stimulation by T CD4<sup>+</sup> lymphocytes besides of increased IL-12 and TNF- $\alpha$  from INF group stimulated with SEA as compared to CA group decreased IL-8 syntheses from >100 group stimulated with SEA, SWAP and Sm22.6 as compared to <100 group and decreased IL-5 syntheses from INF group stimulated with SWAP as compared to CA group by T CD8<sup>+</sup> lymphocytes. In conclusion, the individuals with chronic phase of schistosomiasis and residents in endemic areas for the disease have strong expression of co-stimulatory, adhesion and cell activation molecules in circulating monocytes, B cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, suggesting that these individuals have intense cellular activity that might be involved in immune response against *S. mansoni* infection. Overall, infected individuals presented, after antigenic stimulation *in vitro* with recombinant specific antigens, reduced syntheses of pro-inflammatory cytokines apart of increased regulatory cytokine synthesis from both monocytes and lymphocytes revealing a great ability of these antigens to induce a modulation of immune response related to the resistance to infection as well as a lower disease severity. The subcategorization of the study population according to distinct intensity of infection better define the contribution of this parameter to resistance or susceptibility during *Schistosoma mansoni* infection.

## **1 INTRODUÇÃO**

A Esquistossomíase, também conhecida como esquistossomose ou bilharziose, foi descrita pela primeira vez no Brasil pelo médico e pesquisador Pirajá da Silva em 1908 (Paulini 1969). Foi introduzida provavelmente através dos portos de Pernambuco e Bahia em meados do século XVI, com o comércio de escravos infectados. A partir dessa localização, a infecção se espalhou pelo sudeste e demais regiões acompanhando os movimentos migratórios do século XVIII (Amaral & Porto 1994). A patologia continua sendo uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo e possui consequências significativas para a economia e saúde pública (Chitsulo 2000).

A esquistossomose está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico que expõe as populações ao uso de coleções hídricas contaminadas. Por sua elevada prevalência em certas populações e devido ao déficit orgânico que provoca, comprometendo o desenvolvimento dos jovens e prejudicando a produtividade dos adultos, esforços têm sido feitos para a ampliação dos conhecimentos desta parasitose (Barbosa & Costa, 1981).

Apesar de sua distribuição ter mudado nos últimos 50 anos e do sucesso dos programas de controle da doença, o número de pessoas infectadas ou em risco de infecção continua inalterado (Tibiriçá et al., 2011). Atualmente, estima-se que 240 milhões de pessoas estejam infectadas somente na África e 700 milhões se encontram em risco de infecção (WHO, 2010). No Brasil, 25 milhões de pessoas vivem em área endêmica e cerca de 1,5 milhões estão infectadas, sendo o país mais afetado das Américas (Katz, 2000).

No hospedeiro definitivo, a infecção pode induzir manifestações clínicas associadas às fases agudas ou crônicas da doença, sendo que na fase crônica são caracterizadas três formas da doença (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica) (Bina 1983). A doença começa a se cronificar a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos. Durante a fase crônica aparecem os sinais e sintomas de evolução da patologia no acometimento de vários órgãos, com níveis extremos de gravidade. As manifestações clínicas variam, dependendo da localização do parasito e da intensidade da carga parasitária (Pordeus, 1997).

As manifestações clínicas em área endêmica estão associadas ao perfil imunológico do hospedeiro, à genética da população e a vários fatores como idade, contato com água, carga parasitária, duração da infecção, infecções múltiplas com outros helmintos e tratamento prévio. Como consequência, a população infectada de

área endêmica é heterogênea e consiste de grupos clínicos distintos (Gazzinelli et al., 1992).

Durante a fase crônica da infecção, os estudos realizados em modelos experimentais mostram que a patologia esquistossomótica é desencadeada principalmente pelos granulomas formados por meio de uma reação imunológica em resposta aos ovos do parasito retidos nos tecidos do hospedeiro. Antígenos solúveis do ovo induzem uma reação granulomatosa por meio de uma resposta imune de hipersensibilidade retardada mediada por células T CD4<sup>+</sup> (Warren, 1972; Warren, Domingo & Cowan, 1976). Após a fase aguda da doença, o granuloma diminui de tamanho, resultando na redução da inflamação ao redor dos ovos, processo denominado de imunomodulação. Provavelmente, a modulação da resposta imune e a hipossensibilidade aos antígenos do ovo ocorrem devido à modulação das células T (Stadecker & Flores-Villanueva, 1992) e a IL-10 desempenha papel importante nesse contexto (Flores-Villanueva et al. 1993; Corrêa-Oliveira et al., 1998). Diversos mecanismos envolvidos nesse controle da resposta imune já foram descritos, por meio de ensaios de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro*, na presença de estimulação antígeno-específica. Entre eles, pode-se citar a modulação da resposta de células T por anticorpos anti-idiotipos (Lima et al., 1986; Doughty et al., 1989; Parra et al., 1991), a participação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Doughty & Philips, 1982), a regulação da proliferação celular por fatores solúveis presentes no plasma dos pacientes (Colley et al., 1977) e a função de células aderentes no controle da proliferação linfocitária (Ottesen, 1979).

Diante dos mecanismos imunológicos expostos, fica evidente que a intensidade da resposta imune está relacionada à gravidade da doença. A infecção pelo *Schistosoma mansoni* envolve múltiplas vias de ativação, adesão, interação e co-estimulação de receptores presentes em várias populações celulares, assim como a produção de diversas citocinas e outros fatores reguladores desta resposta.

Proteínas presentes no tegumento do parasito são de grande importância para o desenvolvimento de uma resposta imune, uma vez que estão presentes em abundância na interface parasito-hospedeiro (Oliveira et al., 2008). O *S. mansoni* possui um ciclo de vida complexo e um dimorfismo sexual que dificultam a seleção de uma proteína alvo a ser utilizada como uma vacina eficaz. Porém, o êxito na vacinação de primatas e roedores com cercárias atenuadas indica que o desenvolvimento de uma vacina é possível (Coulson 1997).

Apesar de alguns estudos na literatura que avaliam aspectos específicos da resposta imune na fase crônica da esquistossomose humana, muito se tem a descobrir sobre a susceptibilidade/resistência à infecção em indivíduos infectados. Além disso, a melhor compreensão dos eventos imunológicos relacionados à infecção pelo *S. mansoni*, poderá contribuir futuramente no desenvolvimento de uma vacina que vise reduzir os danos causados pelo parasito no indivíduo.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar parâmetros imunológicos em leucócitos circulantes de pacientes portadores de esquistossomose crônica e indivíduos não infectados residentes ou não em área endêmica e associá-los a mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*.

## **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o perfil hematológico (contagem de hematócrito, 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, linfócitos e monócitos) do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose mansônica, categorizados por cargas parasitárias distintas;

Analisar o perfil *ex vivo* da imunidade celular (subpopulações celulares, marcadores de ativação, co-estimulação, adesão celular) em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose mansônica, categorizados por cargas parasitárias distintas;

Avaliar o perfil de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) em monócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> circulantes da população estudada, após estimulação curta *in vitro* na presença de antígenos brutos (SEA e SWAP) e proteínas recombinantes do *S. mansoni* (Sm22.6 e Sm29), categorizados por cargas parasitárias distintas.



### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

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

A esquistossomose é uma doença antiga em humanos: ovos do parasito foram encontrados em múmias chinesas e egípcias de milênios de idade (Nunn & Tapp 2000). Porém, estudos científicos se iniciaram apenas na metade do século XIX de forma independente. Primeiro por trabalhadores japoneses que descreveram a síndrome aguda de Katayama que se evidencia por febre, erupção cutânea semelhante a uma urticária, tosse, dor abdominal e inflamação do fígado e baço (Fuji 1847). Depois por Bilharz (1852) que encontrou vermes nos vasos urogenitais durante necropsia de camponeses egípcios, para qual deu o nome de *Distomum haematobium*. Posteriormente, Weinland (1958) denominou o gênero deste helminto de *Schistosoma*, uma vez que o macho apresenta corpo fendido, sendo uma designação aceita até hoje.

A denominação da espécie *Schistosoma mansoni* foi dada em 1907, por Sambon. As observações desse autor, que o levaram a criar uma espécie nova, foram independentemente vistas por Pirajá da Silva na Bahia, na mesma época, que a denominou *Schistosoma americanum*. Sambon, em Londres, examinando poucas amostras fecais adiantou-se e descreveu a nova espécie, que, entretanto, não foi muito aceita na época. Pirajá da Silva, fazendo inúmeros exames de fezes e necropsias, pôde confirmar que o *Schistosoma* que produzia ovos com esporão lateral vivia nas veias mesentéricas e era realmente uma espécie distinta. Os trabalhos de Pirajá da Silva dirimiram todas as dúvidas, mas a denominação da espécie coube a Sambon.

O tráfico de escravos africanos, por volta do século XVI, provavelmente introduziu a esquistossomose no Brasil. A presença de moluscos susceptíveis ao desenvolvimento das larvas e os movimentos migratórios foram responsáveis por disseminar a doença do litoral para o interior (Araújo 1986, Paraense 1986).

Considerada um problema de saúde mundial, a esquistossomose atinge, principalmente, países em desenvolvimento situados em áreas tropicais e subtropicais como o continente africano, o sudeste asiático, América do Sul, o leste do mediterrâneo e o oeste do pacífico (Katz & Peixoto 2000). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008, 240 milhões estão infectados e apenas 17,5 milhões receberam tratamento. Além disso, estima-se que mais de 700 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco de infecção (WHO 2010).

Atualmente, no Brasil, a transmissão ocorre em uma vasta área, do Maranhão ao Espírito Santo e Minas Gerais. Há também focos isolados no Distrito federal e nos

estados do Pará, Piauí, Tocantins, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, existem casos notificados de pessoas provenientes de área endêmica em praticamente todo território nacional (Coura & Amaral 2004). Aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de transmissão e 1,5 milhões encontram-se infectadas, sendo o país mais afetado das Américas (Kato 2000). No estado de Minas Gerais, a doença é prevalente numa área de 300.000 Km<sup>2</sup>, ou seja, em 519 dos 853 municípios, sendo 1 milhão o número estimado de pessoas infectadas (Drumond 1994) e 10 milhões o número de indivíduos expostos à infecção (Katz 1998).

Um dos maiores problemas de saúde pública em países em que a esquistossomose possui alta endemicidade, como é o caso do Brasil, é o seu controle. Isso ocorre pelos seguintes problemas: grande disseminação do hospedeiro intermediário e os seus mecanismos de escape aos moluscidas e controles biológicos; falta de investimentos para implementação de condições sanitárias associado ao intenso contato das populações rurais com águas contaminadas; tempo longo necessário para a comunidade aderir à educação sanitária e ao programa de controle; ineficiência das medidas de tratamento individual e em massa no controle da transmissão e prevalência; inexistência de uma vacina efetiva para a prevenção da esquistossomose (Coura & Amaral 2004).

Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem infectar o homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi* e o *Schistosoma malayensis*; mas somente uma espécie existe no Brasil, o *Schistosoma mansoni*. Os hospedeiros intermediários deste parasito são caramujos do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*). Além dessas espécies, duas outras (*B. amazonica* e *B. peregrina*) são consideradas hospedeiras intermediárias potenciais, uma vez que elas só foram infectadas experimentalmente (Paraense 1966, 1981).

A infecção pelo *S. mansoni* ocorre quando o hospedeiro definitivo entra em contato com águas infectadas por cercárias liberadas pelo hospedeiro intermediário, o caramujo *B. glabrata*. No hospedeiro definitivo as cercárias penetram ativamente através da pele e transformam-se em esquistossômulos, que migram em direção aos vasos sanguíneos e, através da circulação, são carregados passivamente até os pulmões (Gordon & Griffiths 1951). Posteriormente, os vermes jovens migram para o sistema porta hepático, onde sofrem maturação em vermes adultos. Os vermes adultos, macho e fêmea, acasalam-se, maturam sexualmente e migram para as veias mesentéricas

inferiores iniciando a postura de ovos que é, em média, de 300 ovos por fêmea. Parte dos ovos alcança a luz intestinal e é eliminada para o meio externo juntamente com as fezes. 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***

A penetração percutânea das cercárias pode provocar urticária temporária que algumas vezes persiste por dias como lesões papulopruriginosas, especialmente após infecção primária como a que ocorre em turistas e migrantes (Bottieau et al. 2006). No entanto, a dermatite cercariana não é muito frequente em áreas endêmicas (Appleton 1984).

A esquistossomose aguda (febre de Katayama) é uma reação sistêmica de hipersensibilidade contra a migração dos esquistossômulos, ocorrendo poucas semanas após a penetração das cercárias (Lambertucci 1993; Rocha et al. 1995). De acordo com alguns autores, esses sinais e sintomas são causados, provavelmente, por imunocomplexos circulantes (Hiatt et al. 1980; Wynn et al. 2004) e pela elevação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (De Jesus et al. 2002; Wynn et al. 2004). Esta doença se inicia, repentinamente, com febre, fadiga, mialgia, eosinofilia e tosse. Sintomas abdominais podem se desenvolver mais tarde, causados pela migração e deposição dos vermes adultos. A maioria dos pacientes se recupera após 2 a 10 semanas, mas alguns desenvolvem sintomas mais graves como perda de peso, dispnéia, diarreia, dor abdominal, anorexia, tenesmo e hepatoesplenomegalia (Bina & Prata, 1984; Gryseels et al. 2006).

A fase aguda da esquistossomose é raramente observada em populações endêmicas. Isso provavelmente se deve ao fato de que crianças são expostas à infecção de maneira muito precoce nessas áreas. Por outro lado, indivíduos de áreas não endêmicas aparentam ser mais susceptíveis a desenvolverem infecção sintomática aguda. Após o primeiro contato com a doença, um indivíduo de área não endêmica possui resposta imune pouco efetiva contra antígenos de *Schistosoma*. No entanto, várias crianças de áreas endêmicas nasceram de mães que tiveram esquistossomose

durante a gravidez e, portanto, tiveram o primeiro contato com os antígenos e anticorpos no útero e/ou colostro (Novato-Silva et al. 1992; Montesano et al. 1999). Estas crianças estão provavelmente ativas a várias respostas anti-*Schistosoma* a partir do primeiro momento de exposição às cercárias. Esta hipótese é reforçada por estudos experimentais envolvendo camundongos, nascidos de mães infectadas, que foram capazes de modular rapidamente as lesões em torno do granuloma (Andrade and Warren, 1964).

Nos casos humanos de esquistossomose aguda em que exames patológicos foram realizados, a severidade da reação imunoinflamatória em torno dos ovos maduros foi enfatizada (Bogliolo 1964). Os granulomas são grandes, com predominância de exsudado necrótico que aparece como grânulos translúcidos disseminados na superfície serosa do fígado e intestinos. Outros órgãos, como pulmões, linfonodos intra-abdominais, pele, cérebro e pâncreas, também são afetados (Lambertucci 2010).

A forma crônica intestinal é aquela apresentada pela maioria das pessoas infectadas nas áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas assintomáticos ou com queixas vagas, geralmente discretas, inespecíficas. Pode-se supor que algumas manifestações intestinais podem ocorrer por conta de uma infecção de instalação recente, mas que tendem a desaparecer, com ou sem tratamento. Alguns clínicos sugerem a existência, entre os casos leves, de uma forma hepática e outra hepatointestinal, mas não há uma base anatômica que justifique tal classificação. Na realidade, em qualquer infecção esquistossomótica, o fígado está sempre lesado (Cheever & Andrade, 1964). Por outro lado, o intestino, mesmo sendo sede da eliminação dos ovos, é encontrado geralmente pouco lesado nos casos de esquistossomose mansoni no Brasil. Em estudo de necrópsias em que foram comparadas as lesões intestinais presentes em 502 infectados e 933 controles (não infectados), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de colites, enterocolites, pólipos ou fibroses intestinais nos dois grupos (Cheever & Andrade, 1967).

A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, dita *pipestem*, descrita por Symmers (1904). Esta é uma lesão representada por expansão fibrosa sistematizada dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema portal intra-hepático, mas com preservação da arquitetura normal do parênquima. Este quadro pode aparecer em indivíduos sem sinais de hipertensão do sistema porta, e portanto, sem esplenomegalia. Em muitos outros casos a repercussão clínica se traduz nos sinais de

hipertensão porta: esplenomegalia e circulação colateral (varizes esofagianas). Daí a designação de forma hepatoesplênica, associada com altas cargas parasitárias e geralmente desenvolvida na infância (Prata, 1991).

### ***3.3 Resposta imune na esquistossomose***

A infecção esquistossomótica, como outras infecções helmínticas, está associada a uma forte resposta imune celular do Tipo 2. Contudo, nos estágios iniciais (3-5 semanas), a reação imunológica envolve em sua maioria células do Tipo 1, na qual citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  podem ser mensuradas no plasma. A resposta Tipo 2 segue conforme a postura de ovos e causa a produção de uma série de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. 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). As células Tipo 2 suprimem a resposta pró-inflamatória Tipo 1 e produzem proteção granulomatosa ao redor dos ovos novos depositados, porém permitem o desenvolvimento de fibrose. A inabilidade em desenvolver uma resposta Tipo 2 a fim de regular a reação pró-inflamatória inicial pode ser fatal. A IL-13 é conhecida por induzir não só a hiper-responsividade das vias aéreas superiores, mas também a expressão de moléculas de adesão celular endotelial, desempenhando assim um papel na asma, lesão pulmonar aguda e fibrose (Chiaromonte et al. 1999).

Após a fase aguda da doença, o granuloma diminui de tamanho, resultando na redução da inflamação ao redor dos ovos, processo denominado de imunomodulação (Andrade & Warren, 1964). Nessa fase, linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos ativados secretam citocinas que promovem a regulação do granuloma (Weistock & Blum, 1987). Dados na literatura evidenciaram que tanto células do Tipo 1, secretando IFN- $\gamma$  e IL-2, como células do Tipo 2, secretando IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  tornam-se sensibilizadas e contribuem para a formação do granuloma (Stadecker & Flores-Villanueva, 1994). No entanto, durante a fase crônica da infecção, a resposta do Tipo 1 é drasticamente reduzida e as funções associadas à resposta do Tipo 2, bem como a eosinofilia e a produção de anticorpos, persistem (Colley, 1975; Pearce & Macdonald, 2002).

As células dendríticas, são células apresentadoras de antígenos que possuem um papel essencial na geração e regulação das respostas imunes adaptativas. Essas células fornecem sinais que induzem linfócitos T helper a proliferar e a diferenciar em células do Tipo 1, Tipo 2 ou células T reguladoras (Kapsenberg et al., 2003). Para se tornarem aptas a ativar linfócitos T, as células dendríticas precisam sofrer um processo de maturação (Mellman & Steinman, 2001). A maturação pode ser induzida por sinais intrínsecos do sistema imune, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD40L (Galluci & Matzinger, 2001) ou por sinais derivados de patógenos (Akira & Takeda, 2004). As células dendríticas expressam uma variedade enorme de receptores para o reconhecimento de produtos microbianos, dentre eles, receptores do tipo Toll (TLR) (Van die et al., 2003). Estudos recentes indicam que componentes do *Schistosoma mansoni* interagem com os TLR. RNA derivado do ovo já foi reportado como ligante de TLR3 (Aksoy et al., 2005) e em camundongos o reconhecimento de lipopolissacarídeos pelo TLR4 presente em células apresentadoras de antígenos foi relacionado ao desenvolvimento de uma resposta celular do Tipo 2 (Thomas et al., 2003). Lisofosfatidilserina, um lipídeo presente tanto em ovos como em vermes adultos do *S. mansoni*, é apta a induzir a polarização de células T para o Tipo 2 através de um mecanismo envolvendo TLR2 (Van der Kleij et al., 2002) E o tegumento de esquistossômulo do *S. mansoni* é capaz de promover a ativação de células dendríticas *in vitro* através da ligação de suas moléculas ao TLR4 (Durães et al., 2009).

As células NK reconhecem glicolipídeos apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) de uma variedade enorme de microrganismos como vírus, fungos, bactérias, e protozoários (Mallevey et al., 2006). As células NK produzem grandes quantidades de citocinas do Tipo 1 e/ou Tipo 2, especialmente IFN- $\gamma$  e IL-4, o que leva a ativação de células dendríticas, células NK, linfócitos T e B, exercendo papel fundamental na imunidade inata e adquirida (Carnaud et al., 1999; Eberl, 2000; Eberl & MacDonald, 2000; Fujii et al., 2003; Galli et al., 2003). Através dessa propriedade, as células NK mostraram-se capazes de promover a polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> convencionais em células do Tipo 1 e 2 e a regular diferentes tipos de resposta imune. De fato, vários estudos *in vivo* demonstraram que as células NK, sob ativação natural ou intencional, são extremamente flexíveis e podem tanto suprimir como potencializar doenças mediadas pelo sistema imune, incluindo inflamação, câncer e doenças auto-imunes (Kronenberg & Gapin, 2004; Godfrey et al., 2004). Evidências experimentais também sugerem que durante algumas infecções, as células NK podem

estar ativadas e produzir citocinas imunorregulatórias, em particular, IFN- $\gamma$  (Skold, M & Behar 2003; Hansen & Schofield, 2004). Através deste mecanismo, células NK geralmente contribuem para a polarização da resposta para o Tipo 1, o que pode ser tanto benéfico (eliminação do patógeno) como prejudicial (inflamação excessiva) para o hospedeiro (Baron et al., 2002; Duthie et al., 2002; Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2002; Arrunategui-Correa & Kim. 2004; Duthie et al., 2005; Ronet et al., 2005). Apesar de vários estudos envolvendo infecções virais, bacterianas, fúngicas, e protozoárias, o papel das células NK envolvendo infecções helmínticas permanece pouco conhecida (Mallevaey et al., 2006).

Vários estudos descrevem a relação entre altos níveis de IgE e a resistência à infecção pelo *S. mansoni*. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos de regulação do IgE continuam limitados. Apesar de linfócitos B serem produtores de IgE, pouco se sabe sobre a função destas células na infecção esquistossomótica (Dunne et al., 1992; Mwinzi et al., 2009). Em modelos murinos, as células B mostraram exercer um importante papel na resposta imune contra o parasito, não apenas produzindo anticorpos, mas também promovendo a otimização por parte da resposta de linfócitos T (Hernandez et al., 1997).

Já se encontra bem estabelecido que a maioria dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose e que desenvolvem uma fase crônica assintomática apresentam uma resposta do Tipo 2 caracterizada predominantemente pela presença de IL-4 e IL-5 (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). Vários estudos têm demonstrado que os pacientes que apresentam essa forma clínica desenvolvem mecanismos que estão envolvidos no controle da resposta imune, com consequente redução no tamanho dos granulomas (Bogliolo, 1959; Raso, 1994), enquanto os pacientes que apresentam a forma clínica hepatoesplênica são incapazes de modular a resposta imune contra a infecção. Diversos mecanismos envolvidos no controle da resposta imune já foram descritos por meio de ensaios de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro* e na presença de estimulação antígeno-específica. Entre outros, pode-se citar a modulação da resposta de células T por anticorpos anti-idiotipos (Lima et al., 1986; Doughty et al., 1989; Parra et al., 1991), a participação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Doughty & Philips, 1982) e a influência de IL-10 (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Falcão et al., 1998). Outros fatores que também contribuem para modulação da resposta imune durante essa forma clínica são a regulação da proliferação celular por fatores



solúveis presentes no plasma dos pacientes (Colley et al., 1977), o papel de células aderentes no controle da proliferação linfocitária (Ottesen, 1979), bem como o envolvimento de prostaglandinas e de IL-10 na resposta imune induzida por imunocomplexos (Goes et al., 1994; Rezende et al., 1997; Rezende, Lambertucci Jr. & Goes, 1997).

Um número considerável de trabalhos na literatura utilizando modelos murinos tem evidenciado o envolvimento de subpopulações distintas de células T na resposta imune frente aos ovos de *Schistosoma mansoni*. Células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel crucial tanto no desenvolvimento dos granulomas murinos, quanto nos eventos de modulação da reatividade granulomatosa (Mathew & Boros, 1986). Enquanto a resposta imune predominante aos antígenos dos vermes de *S. mansoni* parece estar direcionada para a produção de citocinas do Tipo 1, dados ainda controversos vêm sendo obtidos para o verdadeiro papel das células do Tipo 1 e Tipo 2 e das citocinas secretadas por elas no desenvolvimento da resposta granulomatosa, após a deposição de ovos nos tecidos do hospedeiro (Wynn & Cheever, 1995). Dados na literatura evidenciaram que tanto células do Tipo 1 secretando IFN- $\gamma$  e IL-2, como células do Tipo 2, secretando IL-4 e IL-10 tornam-se sensibilizadas e contribuem para a formação do granuloma (Stadecker & Flores-Villanueva, 1994). No entanto, durante a fase crônica da infecção, a resposta do Tipo 1 é drasticamente reduzida e as funções associadas à resposta do Tipo 2, bem como a eosinofilia e a produção de anticorpos persistem (Colley, 2002).

Durante a infecção humana por *S. mansoni*, há um padrão diferenciado de produção de citocinas por PBMC de pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença (de Jesus et al., 1993; Viana et al., 1994; Malaquias et al., 1997; Corrêa-Oliveira et al., 1998; Montenegro et al., 1999; Brito et al., 2000). Alguns desses estudos mostraram que, em ensaios de proliferação celular *in vitro*, a adição de anticorpos anti-IL-10 leva a um aumento da reatividade de PBMC de pacientes portadores da forma clínica intestinal, frente a estímulos específicos do parasito (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997). A análise da reatividade *in vitro* de PBMC de indivíduos portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose sugere que a produção de IL-10 por PBMC é um dos eventos primordiais na modulação da resposta imune observada naqueles indivíduos (Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). O estabelecimento da fase crônica intestinal está correlacionado a uma redução no percentual de células T CD4<sup>+</sup> ativadas, que se associa diretamente com a elevação da produção de IL-10 por células mononucleares estimuladas *in vitro* e com a modulação

da reatividade celular antígeno-específica (Corrêa-Oliveira et al., 1998). Por outro lado, os baixos níveis de IL-10 observados em culturas de células de pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica correlacionam-se com a elevação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados no sangue periférico e com a alta reatividade celular antígeno-específica nos ensaios de reatividade celular *in vitro* (Malaquias et al., 1997; Martins-Filho et al., 1997; Falcão et al., 1998; Corrêa-Oliveira et al., 1998). Estudos mais detalhados de aspectos fenotípicos e funcionais de linfócitos T durante a infecção crônica assintomática demonstraram que linfócitos T CD4<sup>+</sup> são a principal fonte de IL-10, comprovando o seu papel central na modulação da resposta imune durante a infecção crônica por *S. mansoni* (Teixeira-Carvalho et al., 2008).

Em relação à avaliação *ex vivo* do fenótipo celular no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, a análise pioneira realizada por Zwingenberger et al. (1989) já demonstrava uma alteração na composição celular dos linfócitos circulantes. Esses investigadores observaram que os pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica apresentavam uma diminuição na frequência de células CD3<sup>+</sup> e um aumento na frequência de células CD8<sup>+</sup>. Posteriormente, um estudo detalhado realizado por Martins-Filho et al. (1997) demonstrou um aumento do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados no sangue periférico dos pacientes apresentando a forma clínica hepatoesplênica, sendo a intensidade dessa expansão celular diretamente relacionada à patogenia da infecção. Esses resultados corroboram a existência de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que podem estar correlacionadas ao desenvolvimento de patologia ou de mecanismos moduladores da resposta imune, via produção de diferentes fatores solúveis. Dados obtidos por Teixeira-Carvalho et al. 2008, reforçam esses achados. Em relação à população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, existe uma elevação no percentual de células ativadas apenas durante a fase crônica da infecção, tanto em indivíduos portadores da forma clínica intestinal, quanto em indivíduos portadores da forma clínica hepatoesplênica. Provavelmente, uma dicotomia na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> seria a responsável pela diferença de resposta imune nos dois grupos de indivíduos, sendo a redução no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> um elemento-chave neste processo (Martins-Filho et al., 1999; Teixeira-Carvalho et al., 2008).

A avaliação de clones de células T isoladas de pacientes portadores da forma aguda ou crônica da esquistossomose revelou um padrão diferenciado de produção de citocinas em ambos os grupos de indivíduos. Clones de células T CD4<sup>+</sup> derivados de

indivíduos infectados apresentaram um perfil Th2/Th0, produzindo IL-4 e IL-5 ou IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ , enquanto clones derivados de doadores não infectados, sensibilizados *in vitro* com antígenos de *S. mansoni*, apresentaram um perfil Th1/Th0, produzindo IFN- $\gamma$  ou IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  (Contigli et al., 1999).

Ainda no contexto das citocinas, estudos revelam que o IFN- $\gamma$  é fundamental no mecanismo protetor contra a fibrose periportal, enquanto que a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  pode agravar a doença (Booth et al., 2004). Além disso, citocinas do Tipo 2, como IL-4 e IL-13, também expressas por eosinófilos, regulam as quimiocinas dos fibroblastos, a expressão de matriz protéica e a contração do gel de colágeno (Doucet et al., 1998; Teran et al., 1999; Liu et al., 2002). Foi demonstrado ainda que a produção de mediadores pró-fibróticos pelos eosinófilos induzem a resposta Tipo 2, ilustrando, direta e indiretamente o papel destas células e da IL-5 na patogênese da fibrose hepática na esquistossomose (Reiman et al., 2006). Assim, a inibição da atividade da IL-5 ou dos eosinófilos podem ser eficazes para uma variedade de doenças crônico-fibróticas (Reiman et al., 2006). Portanto, IL-4, IL-5 e IL-13 também devem ser incluídas entre as citocinas pró-fibróticas importantes (de Jesus et al., 2004).

Até o momento, existem poucos trabalhos na literatura abordando o papel dos receptores de quimiocinas na infecção esquistossomótica. Estudo pioneiro avaliando o perfil de receptores de quimiocinas na infecção em humanos foi realizado por Teixeira-Carvalho (2004). Esse estudo revelou que os pacientes portadores da forma clínica intestinal apresentam um perfil preferencialmente do Tipo 2 modulado, sendo caracterizado pelo aumento da frequência de linfócitos totais positivos para CCR2, associado a um aumento do percentual de linfócitos T CXCR4<sup>+</sup> e a uma diminuição da frequência de linfócitos T CXCR3<sup>+</sup> na análise após estimulação *in vitro*. Esses achados mostraram que os pacientes portadores da forma clínica intestinal apresentam preferencialmente uma resposta imune modulada. Estudos adicionais demonstraram ainda que, em pacientes assintomáticos, a síntese de IL-10 está positivamente correlacionada à expressão de CXCR4 e inversamente correlacionada com a expressão de CXCR3, sugerindo que a IL-10 seria um fator importante no controle do padrão de migração celular durante a infecção crônica intestinal (Teixeira-Carvalho et al., 2008). Recentemente, a expressão de receptores de quimiocinas em células do granuloma esquistossomótico pulmonar murino foi investigada. Os resultados mostraram que os receptores CCR2 e CCR3 são importantes na formação do granuloma pulmonar em

camundongos infectados por *S. mansoni* e a sua expressão é regulada por IL-4 e IL-13 (Warmington et al. 1999; Chiu & Chensue, 2002). Esses trabalhos demonstraram que os receptores de quimiocinas são capazes de determinar o(s) tipo(s) celular(es) que irá(ão) migrar para o foco inflamatório e esse processo é influenciado pelo ambiente de citocinas formado que, por sua vez, também influencia a expressão desses receptores.

### ***3.4 Desenvolvimento de vacinas para a esquistossomose***

O desenvolvimento de uma vacina continua a ser, a longo prazo, uma importante meta para controle da esquistossomose. Trabalhos extensivos têm sido realizados para identificar moléculas do *Schistosoma* capazes de conferir proteção significativa em diferentes modelos animais. Partindo deste pressuposto, vários candidatos a vacina já foram identificados (Bergquist. 1995), mas ainda não está claro qual formulação vacinal estaria apta a ser testada em humanos, uma vez que diferentes antígenos podem ser alvos de diferentes respostas imunológicas. Essa caracterização seria fundamental para o desenvolvimento de estratégias de imunização apropriadas (Hernandez et al., 1999).

Antígenos utilizados em vacinas são geralmente secretados ou ancorados nas superfícies dos patógenos. Proteínas que são secretadas ou ancoradas na superfície do *S. mansoni* estão expostas ao sistema imunológico do hospedeiro e, por isso, apresentam-se como candidatas ao desenvolvimento de novas vacinas. Já foi demonstrado que membranas isoladas do tegumento foram capazes de estimular imunidade protetora em camundongos (Smithers et al. 1990). Além disso, os principais antígenos associados à membrana do verme adulto não induzem reatividade cruzada com antígenos presentes na superfície do ovo, o qual está envolvido na imunopatologia da doença (Simpson et al., 1990).

Vários investigadores centraram-se na proteção imunológica contra a esquistossomose usando protocolos de vacina contendo proteínas recombinantes do parasito, porém nenhuma foi capaz de induzir uma proteção superior a 67% (Zoauin et al., 2001). O *S. mansoni* possui dimorfismo sexual e um ciclo de vida complexo, essas características tornam difíceis a identificação de uma proteína alvo para ser usada em uma vacina efetiva. Contudo, o sucesso na vacinação de roedores e primatas com cercárias atenuadas indica que o desenvolvimento da mesma é possível (Coulson.

1997). O projeto genoma do *S. mansoni* identificou vários novos genes codificadores de proteínas que são estudados com o propósito de desenvolver uma vacina (Verjovski-Almeida et al. 2003).

Dentre estas proteínas, podemos destacar a Sm22.6 (Pacífico et al. 2006), uma proteína de 22.6 kDa com grande similaridade entre a Sj22.6 (*S. japonicum*) e a Sh22.6 (*S. haematobium*) as quais desencadeiam aumento de produção de IgE na resposta humana. Altos níveis desta imunoglobulina estão correlacionados com a resistência à infecção após quimioterapia (Dunne et al. 1997, Santiago et al. 1998). Além disso, ela é encontrada em todas as fases do ciclo de vida do parasito, com exceção dos ovos (Stein & David 1988). A Sm22.6 desencadeou proteção parcial de 34,5% quando associada ao adjuvante de Freund (CFA) e alta produção de IgG1, IFN- $\gamma$  e IL-4 resultando em uma resposta mista do Tipo 1 e 2 (Pacífico et al. 2006).

Outra proteína promissora é a Sm29 (Cardoso et al., 2006), uma proteína de 29 kDa que apresenta um peptídeo sinal N-terminal de 26 aminoácidos. Além disso, possui vários peptídeos de ligação aos MCH de classe II humanos. Mostrando que esta proteína é capaz de induzir uma resposta imune efetora no combate à esquistossomose, envolvendo produção de anticorpos e ativação de células T. Estudos realizados por Cardoso et al. (2008) mostraram que camundongos imunizados com Sm29 foram capazes de reduzir a carga parasitária em 51%. A Sm29 é expressa nas fases de verme adulto e na fase pulmonar ou de esquistossômulo do parasito. Por isso, uma resposta a essa proteína seria capaz de combater a esquistossomose em uma fase recente da infecção, não permitindo o desenvolvimento de formas mais severas da doença (Oliveira et al. 2010). A Sm29 é capaz de induzir, em humanos, o aumento da produção de IgG1 e IgG3 que são responsáveis pela opsonização, citotoxicidade célula dependente e ativação da via clássica do complemento em indivíduos resistentes à infecção e à re-infecção (Cardoso et al. 2006).

### ***3.5 Diagnóstico da esquistossomose***

Os ovos de *S. mansoni* podem ser detectados nas fezes por métodos qualitativos e quantitativos. A seleção do método apropriado depende do propósito do diagnóstico (Rabello. 1992). A fim de medir a carga parasitária, o número de ovos de *S. mansoni* na amostra fecal pode ser determinado. A estimativa do número de ovos nas fezes pode ser

calculada por meio de técnicas de concentração e preparação de esfregaços devido à distribuição uniforme dos ovos nas fezes (Martin, 1965; Martin & Beavis, 1968). Dentre os métodos quantitativos podemos destacar o método de *Kato-Katz* - É o procedimento internacionalmente recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1994) para o diagnóstico de *S. mansoni*, porque apresenta sensibilidade similar, ou melhor, do que os demais métodos quantitativos, com a vantagem da simplicidade de execução, do baixo custo e da possibilidade do armazenamento e transporte das lâminas em temperatura ambiente por meses, sem prejuízo dos resultados. Em 1972, Katz, Chaves & Pellegrino modificaram o método anteriormente descrito por Kato e Miura (1954) e, posteriormente, aperfeiçoado por Kato (1960), simplificando a realização de técnica quantitativa, por tornar desnecessária a pesagem prévia da amostra de fezes. Aqueles autores usaram um pequeno retângulo de papelão (4 x 3 cm) com espessura de 1,37 mm, dotado de orifício de 6 mm de diâmetro em seu centro, para medir a quantidade de fezes a ser examinada. Colocando o cartão sobre uma lâmina de microscópio e preenchendo o orifício com fezes após passá-las através de malha quadrada de 200 micra, obtém-se amostra que, em média, pesa 43,7 mg. As fezes obtidas são espalhadas sobre lâmina de vidro e cobertas com lamínula de celofane previamente tratada com verde malaquita ou azul de metileno. O método permite o diagnóstico de outros helmintos, exceto de larvas de *Strongyloides sp.* Um fator limitante do método de Kato-Katz está relacionado à consistência das fezes e, conseqüentemente, à quantificação da excreção de ovos (Bell, 1963; Bout, Santoro & Capron, 1975; Hoshino-Shimizu et al, 1968). Uma amostra de fezes seca pode ter uma contagem de ovos até sete vezes maiores que uma amostra úmida obtida do mesmo indivíduo (Hagan & Abath, 1992). Além disso, fezes líquidas, que podem estar associadas à esquistossomose, não podem ser processadas por este método (Jassim, Catty & Hassan, 1987). Outro fator que limita a precisão da quantificação dos ovos nas fezes é a flutuação diária na eliminação dos ovos (Barreto, Smith & Sleight, 1990; De vas et al., 1997; Engels et al., 1997).

A biópsia da mucosa retal constitui um procedimento invasivo, em que se retira, por retoscopia e biópsia, um fragmento de mucosa retal, para exame microscópico e verificação da presença de ovos. O método foi descrito por Ottolina & Atêncio, em 1943. Cançado et al. 1965, introduziram o oograma quantitativo, método ainda usado para avaliação de atividade de drogas, que permite a classificação dos ovos (imaturos, maduros e mortos) e a demonstração rápida de modificações da ovoposição (Araújo et al.,

2008). A dependência de pessoal treinado e o desconforto para o paciente limitam este método ao uso antes descrito.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) atualmente disponível para o diagnóstico da esquistossomose mansônica (Pontes, Dias Neto & Rabello, 2002; Pontes et al., 2003) se baseia na amplificação de uma sequência de DNA altamente repetitiva encontrada no genoma do parasito e descrita por Hamburger et al., em 1991. Esta sequência é extremamente abundante, correspondendo a cerca de 10% de todo o material genético do *S. mansoni*, sendo encontrada em ambos os sexos do parasito. A sensibilidade da técnica para a detecção desta sequência do parasito se mostrou bastante satisfatória, sendo o limite de detecção do DNA isolado dos ovos de apenas um fentograma ( $10^{-15}$ g). As desvantagens associadas ao uso do PCR para diagnóstico da esquistossomose são semelhantes às encontradas em outras doenças. Em termos técnicos, os principais problemas são a possibilidade de inibição da enzima e o risco de contaminação das amostras analisadas. Além disso, seu alto custo torna a técnica pouco utilizada no diagnóstico da *S. mansoni* (Pontes et al., 2003).

Existe uma ampla variedade de testes imunológicos, entretanto, eles apresentam valor limitado ao diagnóstico da esquistossomose. Os métodos disponíveis apresentam reações cruzadas com outras helmintoses, não detectam a intensidade da infecção, não diferenciam infecção passada e recente e podem permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica (Smithers & Doenhoff, 1982; Mott & Dixon, 1982; Montenegro, 1992). Portanto, até o momento, não parece existir nenhuma técnica imunodiagnóstica com as características ideais, que são: efetividade, utilização de poucos reagentes, baixo custo, uso de equipamentos simples, rapidez na execução e facilidade de realização no campo (Rabello, 1997). De modo geral, grande número de estudos relacionados à utilização de métodos imunológicos de detecção da reação antígeno/anticorpo para o diagnóstico da esquistossomose consistem em demonstração prática, não sendo os métodos usados de modo efetivo. Esses métodos imunológicos permanecem na etapa de pesquisa laboratorial, sendo experimentalmente utilizados para estudos da relação hospedeiro/parasito.

### ***3.6 Tratamento da esquistossomose mansônica***

Nas três últimas décadas houve uma melhoria significativa na eficiência terapêutica do tratamento contra a esquistossomose mansoni, com a introdução de duas novas drogas (oxamniquine e praziquantel) que, administradas em dose única, por via oral, apresentam atividade terapêutica elevada e baixos efeitos colaterais, o que permitiu o tratamento de milhões de pessoas infectadas. Porém, devido à ocorrência da esquistossomose somente em países em desenvolvimento com baixa capacidade de compra, as indústrias farmacêuticas não se interessam em promover investimentos vultuosos para descobrirem novos fármacos contra essa importante parasitose.

A fase aguda da esquistossomose (febre de Katayama) pode ser inicialmente tratada com corticosteróides para suprimir a reação de hipersensibilidade e, posteriormente, com praziquantel para eliminar os vermes adultos (Lambertucci 1993, Horak & Kolarova 2005). Uma vez que os vermes imaturos não são susceptíveis ao medicamento, o tratamento deverá ser repetido quatro a seis semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas. No caso de hemorragias esofágicas, beta-bloqueadores, escleroterapia endoscópica, esplenectomia ou desvio portocaval poderão ser indicados (Lambertucci 1993, Olds & Dasarathy 2000). Corticosteróides e anticonvulsivantes podem ser utilizados como possíveis adjuvantes ao praziquantel no tratamento da neuroesquistossomose, que é uma forma clínica que requer cuidados especiais (Ferrari 2004).

O oxamniquine foi produzido e descrito pela primeira vez na década de 1960 como o mais promissor esquistossomicida (Richards & Foster 1969). Ao contrário do praziquantel, que possui atividade contra todas as espécies de esquistossomose humana, a eficácia do oxamniquine é confirmada para o *S. mansoni*. Assim como o praziquantel, o oxamniquine também é eficaz contra as formas invasivas (cercária e esquistossômulos) e vermes adultos são mais afetados do que as formas jovens presentes no estágio hepático (Foster et al. 1971). O mecanismo de ação da droga está associado à inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos nos parasitos, sendo mais pronunciado em machos do que fêmeas (Pica-Mattocchia et al. 1989). O oxamniquine é bem absorvido no trato gastrointestinal (Kaye & Woolhouse 1976). Atinge pico de concentração plasmática de 1 a 4 horas após a administração oral e é eliminada com um tempo de meia vida de 2,2 horas (Kokwaro & Taylor 1991).



O praziquantel foi sintetizado e teve sua atividade contra esquistossomose e cestódeos testada em meados da década de 1970 (Pellegrino et al. 1977). Sua atividade antiesquistossomótica foi primeiro testada contra o *S. mansoni* em diferentes hospedeiros animais (Pellegrino et al. 1977) e depois confirmada para todas as esquistossomoses humanas (Webbe & James 1977). O praziquantel é efetivo contra todas as espécies que parasitam o homem (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, e *S. mekongi*). Contudo, as formas jovens (entre 7 e 28 dias) são menos suscetíveis à droga do que os adultos. Foi demonstrada também, em modelos murinos, a eficácia do praziquantel contra os estágios invasivos (cercárias e esquistossômulos) e verme adulto de *S. mansoni*. (Gönnert & Andrews 1977; Utzinger et al. 2003).

Apesar dos esforços consideráveis, o mecanismo de ação do praziquantel não foi totalmente elucidado (Cioli et al. 1995). A droga causa rompimento do tegumento do verme, com subsequente exposição dos antígenos, o que permite a ação de mecanismos do sistema imune do hospedeiro (Modha et al. 1990; Ribeiro et al. 2004). Além disso, foi observado que o praziquantel depleta as reservas de glutatona do parasito (Ribeiro et al. 1998) e interrompe a função dos canais de cálcio (Greenberg 2005; Pica-Mattoccia et al. 2007). O aumento do influxo de íons  $Ca^{2+}$  resulta em alterações fisiológicas no *S. mansoni* (Jeziorski & Greenberg 2006). O praziquantel é administrado por via oral e atinge seu pico plasmático de 1 a 2 horas após ingestão (Leopold et al. 1978). A droga sofre elevado metabolismo de primeira passagem, desaparecendo rapidamente do plasma e possui tempo de meia vida variando de 1 a 3 horas. A eliminação ocorre essencialmente através da urina e fezes com mais de 80% completa dentro de 24 horas (Steiner et al. 1976).

Em modelos murinos, a eficácia do praziquantel mostrou-se dependente da resposta imune do hospedeiro (Brindley & Sher 1987; Doenhoff et al. 1988) e a exposição de antígenos na superfície do *Schistosoma* aumenta com o tratamento (Harnett & Kusel 1986). Também foi proposto que a sinergia entre praziquantel e resposta imune ocorra devido à fixação de anticorpos e de células do hospedeiro aos antígenos que são expostos na superfície do parasito pela droga. Esta resposta imune-efetora impede o verme de se recuperar do tratamento medicamentoso (Fallon et al. 1992). No entanto, revelou-se difícil de identificar os fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam a eficácia do praziquantel contra a esquistossomose em humanos (Karanja et al. 1998; van Lieshout et al. 1999). Estudos em pessoas co-infectadas com *S. mansoni* e o vírus HIV não mostraram indicação de que o praziquantel é menos efetivo

naqueles indivíduos com baixa contagem de células T CD4<sup>+</sup> comparados com aqueles com alta contagem de células T CD4<sup>+</sup> (Karanja et al. 1998; Kallestrup et al. 2006).

Apesar das vantagens do praziquantel no tratamento da esquistossomose, existe preocupação sobre o desenvolvimento de resistência à droga por parte do parasito. O desenvolvimento desta resistência foi estudado tanto experimentalmente quanto de maneira clínica. De fato, há um desacordo sobre uma resistência real ou não. De qualquer forma, devem-se tomar precauções sobre a possibilidade de surgimento de resistência ao praziquantel e outras drogas usadas no tratamento da doença (Abdul-Ghani et al. 2009).

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

#### **4.1 Caracterização da população estudada**

Esse é um estudo transversal onde serão utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose e de indivíduos não infectados pelo *S. mansoni*.

Os pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose foram recrutados no estado de Minas Gerais, mais especificamente em Ponto dos Volantes, região endêmica para doença no norte de Minas Gerais. Entre os pacientes que aceitaram participar voluntariamente do estudo, indivíduos com idade entre 17 a 76 anos, com exames de fezes positivos para ovos de *S. mansoni*, após exame desse material, empregando-se a metodologia de Katz et al., 1972, foram selecionados para compor o grupo infectado (INF, n=37), que foi subcategorizado em dois subgrupos: Portadores de menos de 100 ovos por grama de fezes (Grupo <100, n=16) e portadores com mais de 100 ovos por grama de fezes (Grupo >100, n=21). É importante ressaltar que o exame parasitológico foi realizado anteriormente à coleta sanguínea. Após a realização da coleta, todos foram submetidos ao tratamento com praziquantel na dose padrão brasileira (50-60 mg de praziquantel), independente da participação nesse estudo. Informações adicionais sobre os pacientes foram obtidas por meio de realização de questionário, pontuando-se existência de infecção esquistossomótica prévia ou tratamento para a doença, contato com água e condições sócio-econômicas.

Para compor o grupo controle foram selecionados indivíduos com idade entre 18 a 55 anos (Grupo CT, n=6), sadios e que não apresentavam relatos de infecção prévia para a esquistossomose, sendo doadores de sangue da Fundação Hemominas. Outro grupo controle também foi recrutado e foi constituído por indivíduos residentes em área endêmica (Grupo CA, n=16) para esquistossomose e que apresentavam exames parasitológicos de fezes persistentemente negativos pelo método Kato-Katz.

Todo o estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

#### **4.2 Exame parasitológico de fezes**

O exame parasitológico de fezes foi realizado utilizando-se o método Kato-Katz (Katz et al., 1972). Foram coletadas 3 amostras de fezes de cada um dos participantes do

estudo, em 3 dias diferentes. Os vasilhames foram identificados com o nome, número de identificação pessoal do participante e número designado para o domicílio. Cada vasilhame foi entregue separadamente, em local determinado após o retorno da amostra. As lâminas foram preparadas por pessoal técnico qualificado e analisadas até 2 horas após o preparo, por meio de microscopia óptica. Foram preparadas 2 lâminas para cada amostra de fezes em um total de 6 lâminas por indivíduo. A carga parasitária foi determinada pela média do número de ovos por grama de fezes (opg) e a média aritmética de opg calculada para as 6 lâminas ( $OPG = \text{Soma do número de ovos} \times 24 / \text{número de lâminas analisadas}$ ) determinando, assim, a intensidade de infecção de *S. mansoni*.

#### ***4.3 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, linfócitos e monócitos.

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

Os antígenos SEA e 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 ressuspendidos 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 24 horas a 4° C e esterilizado utilizando-se 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.

#### ***4.5 Obtenção da proteína recombinante Sm22.6***

A proteína Sm22.6 foi obtida segundo descrito por Pacífico e colaboradores (2006) e cedida pelo Laboratório de Esquistossomose do CPqRR. A expressão da proteína de fusão composta por Sm22.6 e proteína de ligação da maltose foi induzida por 0,6 mM de IPTG (Isopropil-B-D-Galactopiranosídeo). Após 3 horas a 37°C e 65 x g, as células bacterianas da espécie *Escherichia coli* foram colhidas por centrifugação a 4000 x g por 20 minutos a 4°C. O pellet foi ressuscitado em 100 mL de tampão fosfato (PBS, pH 8,4) contendo 25 mg de lisozima. Em seguida sofreu lise por choque térmico (banho Maria à 37°C e congelamento com gelo seco) e por sonificação por 3 ciclos de 30 segundos para liberar a fusão protéica que se encontrava no sobrenadante após centrifugação a 4000 x g por 20 minutos a 4°C. A proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade usando resina amilose.

#### ***4.6 Obtenção da proteína recombinante Sm29***

A proteína Sm29 foi obtida segundo descrito por Cardoso e colaboradores (2006) e cedida pelo Laboratório de Esquistossomose do CPqRR. A expressão da proteína recombinante foi induzida por 1 mM de IPTG. Após 5 horas de incubação a 37°C sob agitação de 65 x g, as células foram isoladas por centrifugação 4000 x g por 20 minutos a 4°C e ressuscitadas em 50 mL de tampão fosfato com 10 mM de imidazol. As células foram lisadas por sonificação 3 ciclos a 30% de amplitude e centrifugadas a 5400 x g, 4°C por 20 minutos. A proteína recombinante foi recuperada em corpúsculos de inclusão que foram ressuscitados em tampão contendo 8M de

uréia. A purificação da proteína foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel sob condições desnaturantes. A renaturação da proteína foi realizada pela substituição do tampão desnaturante por tampão fosfato.

#### ***4.7 Imunofenotipagem ex vivo de linfócitos 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; Peridinin-chlorophyll proteins - PerCP; *Cychrome* - CYCHR; Tricolor - TC) para o receptor celular de interesse (**Tabela 1**). 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 Maxs Facs Fix - MFF (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.), avaliando-se pelo menos 20.000 eventos por amostra.

**Tabela 1:** Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de leucócitos circulantes

MARCADOR	FLUOCROMO	CLONE	CONCENTRAÇÃO	FUNÇÕES
Anti-IgG1	FITC	679.1Mc7	0,5 µg	Controle isotópico.
Anti-CD1d	PE	CD1d42	0,5 µg	Apresentação de Ag não peptídicos para subpopulações de células B e células dendríticas
Anti-CD3	PerCP	SK7	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	RPA-T4	0,5 µg	Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T auxiliares, monócitos e macrófagos.



Anti-CD5	FITC	H11-86.1	0,5 µg	Regula a interação entre linfócitos T e B. Presente em timócitos e subpopulações de linfócitos T e B
Anti-CD8	PERCP	SK1	0,5 µg	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos e/ou supressores
Anti-CD11c	PE	S-HCL-3	0,5 µg	Adesão celular. Expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos e subpopulações de células T e B.
Anti-CD14	FITC/ PERCP	TÜK4/MφP9	0,5 µg	Receptor para complexo lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo. Expresso em células mielomonocíticas.

Anti-CD16	APC/TC	3G8/3G8	0,5 µg	Receptor Fc de baixa afinidade. Medeia fagocitose e citotoxicidade dependente de anticorpos. Expresso em neutrófilos, macrófagos e células NK.
Anti-CD18	PE	6.7	0,5 µg	Molécula de adesão celular expressa em leucócitos.
Anti-CD19	PERCP	4G7	0,5 µg	Transdução de sinal de células dendríticas. Expressa em Linfócitos B
Anti-CD21	APC	B-ly4	0,5 µg	Transdução de sinal. Expressa em linfócitos B maduros, e linfócitos T
Anti-CD23	FITC/PE	Tü1	0,5 µg	Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII).

Anti-CD40	APC	5C3	0,5 µg	Co-estimulação de crescimento de linfócitos B. Expresso em macrófagos, monócitos e linfócitos B.
Anti-CD43	APC	1G10	0,5 µg	Anti-adesão, bloqueia o CD-45 que medeia a adesão. Expressa em leucócitos.
Anti-CD54	PE	HA58	0,5 µg	Molécula de adesão de leucócitos. Liga-se à CD11a/CD18.
Anti-CD56	FITC	NCAM16.	0,5 µg	Adesão homofílica e heterofílica. Expressa em células NK, linfócitos T.
Anti-CD62L	PE	Dreg 56	0,5 µg	Molécula de adesão celular expressa em leucócitos.
Anti-CD69	PE	FN50	0,5 µg	Molécula de ativação de leucócitos.
Anti-CD80	PE	L307.4	0,5 µg	Co-regulação de ativação de linfócitos T.
Anti-CD86	PE	BAF141	0,5 µg	Co-regulação de ativação de linfócitos T.

HLA-DR	PE	TÜ36	0,5 µg	Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.
Anti-Lin	FITC	SK 7/3G8/SJ2 5C1/L27/ MφP9/NC AM16.2	0,5 µg	Coquetel de anticorpos expresso em linfócitos T, macrófagos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos, células NK, linfócitos B.
Anti-NKp46	PE	9E2/NKp6	0,5 µg	Citotoxicidade de células NK. Expresso em células NK.
Anti-NKp80	PE	5d12	0,5 µg	Estimula a citotoxicidade de células NK e a liberação de citocinas. Expresso em células NK e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de memória.

---

CD282 (TLR2)	APC	mT2.7	0,5 µg	Resposta imune inata para bactérias Gram- positivas. Expressa em monócitos, macrófagos e células dendríticas.
-----------------	-----	-------	--------	--

---

---

### **Anticorpos Becton Dickinson e Invitrogen**

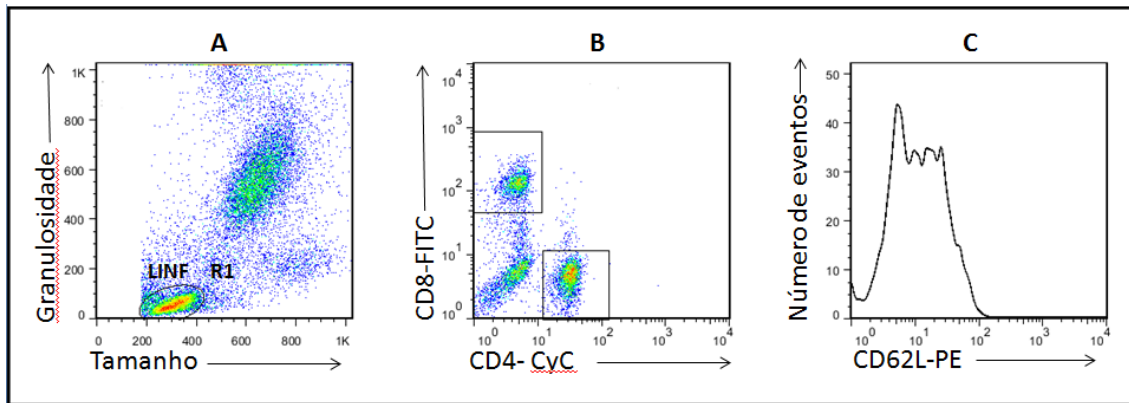
---

*Fonte:* CD Reference Chart. 12th HLDA International Workshop, 2010. MASON et al. 2003, D'AMBROSIO et al. 2003, ONO et al. 2003.

#### ***4.8 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo***

A identificação da população celular de interesse e a determinação da intensidade média de fluorescência dos marcadores de superfície analisados nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram realizadas através do software FlowJo. A **Figura 1** representam de forma esquemática o método utilizado para a análise desses resultados.

O primeiro passo (**Figura 1**) consistiu na identificação da população de Linfócitos (**LINF**). A população de linfócitos foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através de gráficos de densidade de tamanho celular (Forward Scatter – FSC) versus granulosidade celular (Side Scatter – SSC). A **Figura 1B** ilustra, dentro da população de linfócitos, a seleção das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4-CyC) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8-FITC). A **Figura 1C** ilustra a intensidade média de fluorescência para o marcador de superfície CD62L dentro da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em histograma de fluorescência 2 (CD62L-PE) versus número de eventos.

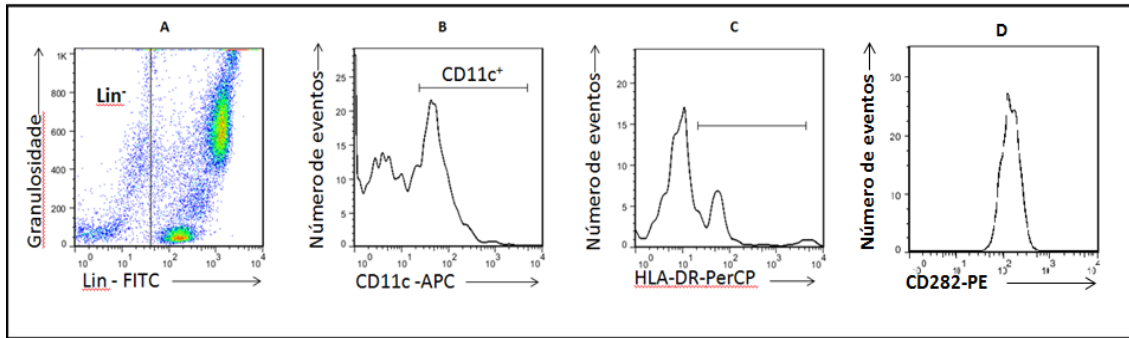


**Figura 1:** Análise *ex vivo* de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo. **(A)** representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de densidade de tamanho (Forward Scatter – FSC) versus granulosity (Side Scatter – SSC). **(B)** representa a distinção, dentro da população de linfócitos, entre células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> em gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD8-FITC) versus Fluorescência 3 (CD4-CyC). **(C)** representa a intensidade média de fluorescência para o marcador de superfície CD62L, dentro da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em histograma de Fluorescência 2 (CD62L-PE) versus número de eventos.

#### ***4.9 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de células dendríticas do sangue periférico por citometria de fluxo***

A identificação da população de células dendríticas e a determinação da intensidade média de fluorescência do marcador de superfície expresso nesta população celular foram realizadas através do software FlowJo. A **Figura 2** representa de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figura 2A**) consistiu na identificação da população de células negativas para o marcador Lin (**Lin<sup>-</sup>**). A população de lin<sup>-</sup> foi selecionada por uma janela – “gate”, através de gráficos de densidade de Lin-FITC versus granulosidade celular. A **Figura 2B** ilustra a seleção da população de CD11c<sup>+</sup> através de histograma de fluorescência 4 (CD11c<sup>+</sup>-APC) versus número de eventos. A **Figura 2C** ilustra a seleção da população de HLA-DR<sup>+</sup> através de histograma de fluorescência 3 (HLA-DR<sup>+</sup>-PerCP) versus número de eventos. A **Figura 2D** ilustra a seleção da população de CD282<sup>+</sup> através de histograma de fluorescência 2 (CD282<sup>+</sup>-PE) versus número de eventos.

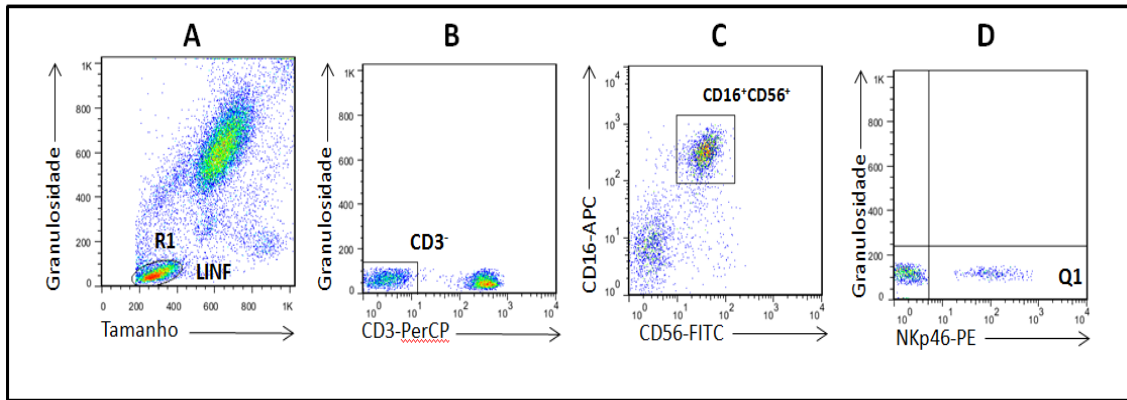




**Figura 2:** Análise de células dendríticas do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo. **(A)** representa o perfil celular da população negativa para o marcador Lin (Lin<sup>-</sup>), selecionada no “gate” em gráfico de densidade de fluorescência 1 (Lin-FITC) versus granulicidade (Side Scatter – SSC). **(B)** representa o perfil celular da população de células CD11c<sup>+</sup>, dentro da população de lin<sup>-</sup> em histograma de fluorescência 4 (CD11c<sup>+</sup>-APC) versus número de eventos. **(C)** representa o perfil celular da população de células HLA-DR<sup>+</sup>, dentro da população de CD11c<sup>+</sup>-em histograma de fluorescência 3 (HLA-DR<sup>+</sup>-PerCP) versus número de eventos. **(D)** representa o perfil celular da população de células CD282<sup>+</sup>, dentro da população de HLA-DR<sup>+</sup> em histograma de fluorescência 2 (CD282<sup>+</sup>-PE) versus número de eventos.

#### ***4.10 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de células NK do sangue periférico por citometria de fluxo***

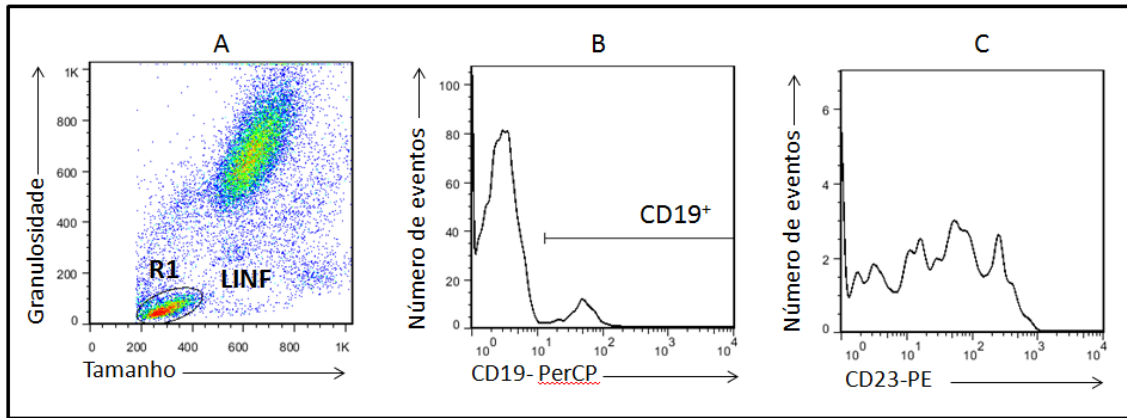
A identificação da população de células NK e a determinação do valor percentual de marcadores de superfície expressos nesta população celular foram realizadas através do software FlowJo. A **Figura 3** representa de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figura 3A**) consistiu na identificação da população de linfócitos (LINF). A população de linfócitos foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através de gráficos de densidade de tamanho versus granulosidade celular. A **Figura 3B** ilustra a seleção de células CD3<sup>-</sup> em um gráfico de densidade de granulosidade versus fluorescência 3 (CD3-Per-CP). Posteriormente, dentro dessa população celular foi selecionada a subpopulação de células NK por meio da positividade para os marcadores CD16 e CD56 (**Figura 3C**) em um gráfico de densidade de CD16-APC versus CD56-FITC. Em seguida, foram construídos gráficos de densidade de granulosidade versus NKp46-PE (**Figura 3D**) A fração celular selecionada no quadrante Q1 representa o valor percentual de células NK que expressam o marcador.



**Figura 3:** Análise de células NK do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo. **(A)** representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de densidade de tamanho (Forward Scatter – FSC) versus granulosity (Side Scatter – SSC). **(B)** representa o perfil celular da população de células CD3<sup>+</sup>, dentro da população de Linfócitos em um gráfico de densidade de granulosity versus fluorescência 3 (CD3-Per-CP). **(C)** representa o perfil celular da população de células CD3<sup>+</sup>, dentro da população de células NK em um gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD56-FITC) versus fluorescência 4 (CD16-APC). **(D)** representa o perfil de análise da população de células NK para o marcador de superfície NKp46 no quadrante (Q1) em um gráfico de granulosity versus fluorescência 2 (NKp46-PE).

#### ***4.11 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de Linfócitos B do sangue periférico por citometria de fluxo***

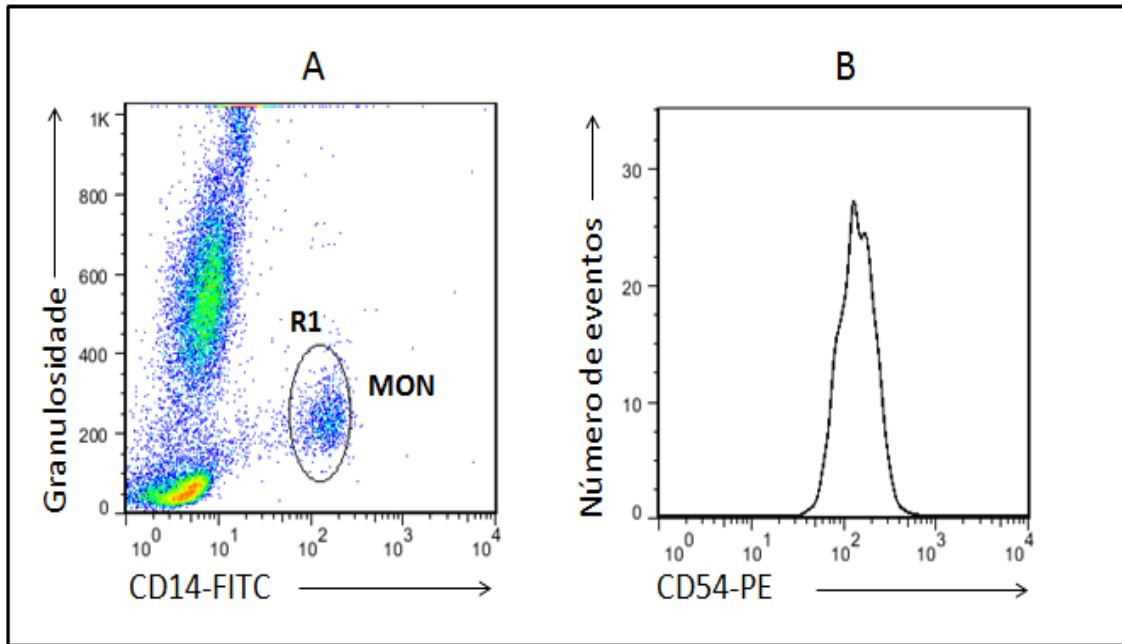
A identificação da população de linfócitos B e a determinação do valor percentual de marcadores de superfície presentes nesta população celular foram realizadas através do software FlowJo. A **Figura 4** representa de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figura 4A**) consistiu na identificação da população de linfócitos. A população de linfócitos foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através de gráficos de densidade de tamanho versus granulosidade celular. A **Figura 4B** ilustra a seleção da população de linfócitos B através de histograma de fluorescência 3 (CD19-PerCP) versus número de eventos. A **Figura 4C** ilustra a intensidade média de fluorescência para o marcador de superfície CD23 dentro da população de linfócitos B em histograma de fluorescência 2 (CD23-PE) versus número de eventos.



**Figura 4:** Análise de linfócitos B do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo. **(A)** representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de densidade de tamanho (Forward Scatter – FSC) versus granulosidade (Side Scatter – SSC). **(B)** representa o perfil celular da população de células CD19<sup>+</sup>, dentro da população de linfócitos em histograma de fluorescência 3 (CD19-PerCP) versus número de eventos. **(C)** representa a intensidade média de fluorescência para o marcador de superfície CD23, dentro da população de linfócitos CD19<sup>+</sup> em histograma de Fluorescência 2 (CD23-PE) versus número de eventos.

#### *4.12 Aquisição e análise ex vivo do fenótipo celular de Monócitos CD14<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo*

A identificação da população de monócitos e a determinação do valor percentual de marcadores de superfície presentes nesta população celular foram realizadas através do software FlowJo. A **Figura 5** representa de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (**Figura 5A**) consistiu na identificação da população de monócitos. A população de monócitos (MON) foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através de gráficos de densidade de fluorescência 1 (CD14-FITC) versus granulosidade celular. A **Figura 5B** ilustra a intensidade média de fluorescência, dentro da população de monócitos, para o marcador de superfície CD54 em histograma de fluorescência 2 (CD54-PE) versus número de eventos.



**Figura 5:** Análise de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo. **(A)** Representa o perfil celular da população de monócitos (MON), selecionada no “gate” R1 em gráfico de fluorescência 1 (CD14- FITC) versus granulosidade. **(B)** representa a intensidade média de fluorescência para o marcador de superfície CD54 em histograma de fluorescência 2 (CD54-PE) versus número de eventos.

#### ***4.13 Detecção de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes portadores da fase crônica da infecção pelo S. mansoni***

Alíquotas de 1,5 mL do sangue periférico dos indivíduos avaliados, coletado a vácuo em tubos de 10 mL contendo Heparina sódica (Vacutainer – BD, E.U.A.), foram adicionadas a tubos de polipropileno de 5 mL (Falcon – BD, E.U.A.), contendo 500 µL de RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A.). Em seguida, as amostras foram incubadas por doze horas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C na presença ou ausência de estimulação antígeno-específica, em uma concentração de 0,644 µg/mL para Sm22.6, 0,171 µg/mL para Sm29, 25 µg/mL para SEA e 25 µg/mL SWAP. Quatro horas antes do término da incubação, foi acrescentado 10 µL de brefeldina (1mg/mL) numa concentração final de 10 µg/mL. Após a incubação, alíquotas do sobrenadante das culturas foram armazenadas em microtubos estéreis a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Em seguida, à suspensão celular foram adicionados 100 µL de EDTA (SIGMA, E.U.A.) 20 mM, obtidos de uma solução estoque de 200 mM. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 400g, por 10 min a 18°C. Em seguida, foram lavadas com 4 mL de PBS-W (PBS 0,15M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica - BSA e 0,1% de azida sódica - reagentes SIGMA, E.U.A.). Quatrocentos microlitros das células foram adicionados a 5 µL dos anticorpos de superfície (CD4, CD8 e CD14) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As amostras foram incubadas durante 30 min. Posteriormente, as amostras de sangue foram lisadas com 4 mL de solução de lise comercial (FLS – BD, E.U.A.) por 10 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as suspensões celulares foram centrifugadas a 400g, por 10 min a 18°C, quando novamente foram lavadas com 0,5 mL de PBS-W e permeabilizadas com 6 mL PBS-P (PBS 0,15M, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina - reagentes SIGMA, E.U.A.) por 10 min a temperatura ambiente. As suspensões celulares foram centrifugadas a 400g, por 10 min a 18°C e lavadas com PBS-W. Em seguida, 50 µL da suspensão celular foram adicionados em poços de placas de 96 poços de fundo em U (Falcon - BD, E.U.A.), contendo 20 µL dos anticorpos anti-citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) marcados com ficoeritrina (PE). Este anticorpo foi diluído

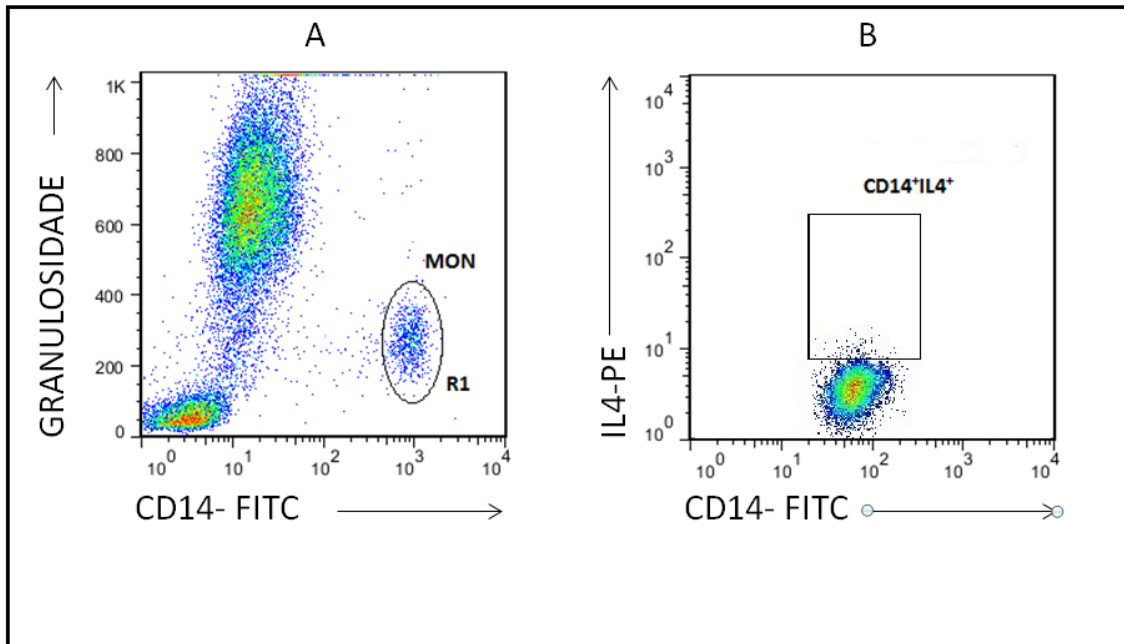


previamente em 1:50 em PBS-P. Após realização desse procedimento, as amostras foram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Todo o protocolo foi realizado em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (BBL, modelo 60474, E.U.A). Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 150  $\mu$ L de PBS-P e, em seguida, com 200  $\mu$ L de PBS-W. No final, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução fixadora contendo MFF. As amostras foram transferidas para tubos de 500  $\mu$ L (Thomas Laboratory Specialities, E.U.A) e, posteriormente, adquiridas em citômetro de fluxo (FACScan – BD, E.U.A), analisando-se pelo menos 30.000 eventos/amostra.

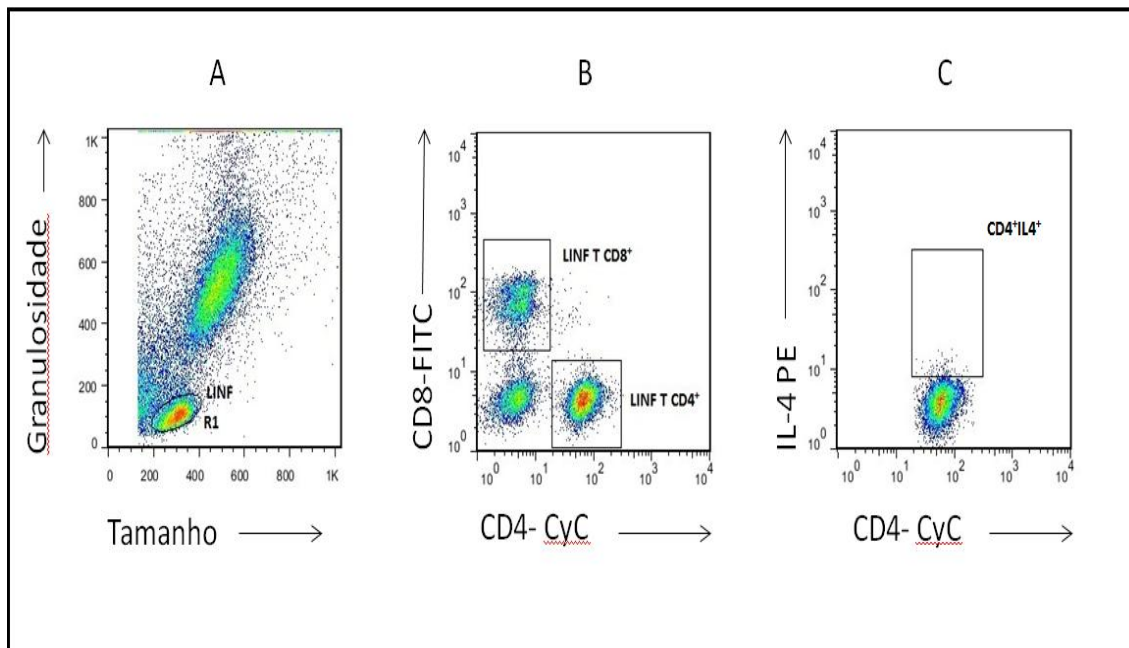
#### *4.14 Aquisição e análise dos dados de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos T do sangue periférico*

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de citocinas foram realizadas através do software FlowJo. As **Figuras 6 e 7** representam de forma esquemática o método utilizado para a análise desses resultados.

O primeiro passo (**Figuras 6A e 7A**) consistiu na identificação das populações de monócitos (MON) e Linfócitos (LINF), respectivamente. A população de monócitos foi selecionada por meio do gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD14-FITC - células com granulosidade intermediária e fortemente positivas para o marcador) versus de granulosidade celular. Já a população de linfócitos foi selecionada por uma janela – “gate” (R1), através de gráficos de densidade de tamanho celular (Forward Scatter – FSC) versus granulosidade (Side Scatter – SSC) celular. A **Figura 7B** ilustra, dentro de cada população de monócitos foi selecionado uma janela -“gate” em que foi detectada a porcentagem de células CD14<sup>+</sup> expressando a respectiva citocina, como mostra a **Figura 6B**. Dentro da população de linfócitos, a seleção das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4-CyC) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8-FITC). Dentro de cada população de linfócitos selecionada foi detectada a porcentagem de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> expressando a respectiva citocina de interesse, tendo como exemplo a IL-4, como mostra a **Figura 7C**.



**Figura 6:** Análise de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo, após estimulação *in vitro*. **(A)** representa o perfil celular da população de monócitos (MON), selecionada no “gate” R1 em gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD14- FITC) versus granulidade celular. **(B)** representa o perfil de análise da população de monócitos positivos pra IL-4 em gráfico de densidade de fluorescência 1 (CD14-FITC) versus fluorescência 2 (IL-4-PE).



**Figura 7:** Análise de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica crônica da esquistossomose por citometria de fluxo, após estimulação *in vitro*. **(A)** representa o perfil celular da população de linfócitos (LINF), selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho versus granulosidade. **(B)** representa a distinção, dentro da população de linfócitos, entre células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> em um gráfico de fluorescência 1 (CD8-FITC) versus Fluorescência 3 (CD4-CyC). **(C)** Representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para a citocina IL-4 em um gráfico de Fluorescência 2 (IL-4-PE) versus Fluorescência 3 (CD4-CyC).

#### ***4.15 Análise Estatística***

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA), onde foram consideradas as variáveis de independência, normalidade e variância para definição dos dados. Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste Mann-Whitney. Para a análise comparativa entre vários grupos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Em todos os casos, intervalo de confiança foi definido como 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação do perfil hematológico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose**

O hemograma foi realizado em amostras do sangue periférico de indivíduos residentes em área endêmica com exame de fezes negativo para ovos (CA) e indivíduos infectados (INF) portadores da fase crônica com menos de 100 ovos por grama de fezes (<100) e mais de 100 ovos por grama de fezes (>100).

A análise da série vermelha não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos analisados na concentração de hemoglobina (CA:  $13,25 \pm 1,3$  g/dL; INF:  $13,29 \pm 1,6$  g/dL; <100:  $13,3 \pm 1,89$  g/dL; >100:  $13,27 \pm 1,26$  g/dL) (**Figura 8A**), hematócrito (CA:  $41,6 \pm 4,4$  g/dL; INF:  $41,4 \pm 5,0$  g/dL; <100:  $41,3 \pm 5,9$  g/dL; >100:  $41,5 \pm 4,0$  g/dL) (**Figura 8B**), número de hemácias (CA:  $4,8 \pm 0,39 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; INF:  $4,8 \pm 0,52 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; <100:  $4,8 \pm 0,57 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; >100:  $4,8 \pm 0,47 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) (**Figura 8C**), número de plaquetas (CA:  $213 \pm 68 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; INF:  $232 \pm 53 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; <100:  $225 \pm 51 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; >100:  $239 \pm 55 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) (**Figura 8D**), volume corpuscular médio (VCM) (CA:  $86,4 \pm 5,2$  fL; INF:  $86,13 \pm 6,0$  fL; <100:  $87,00 \pm 6,7$  fL; >100:  $85,14 \pm 5,18$  fL) (**Figura 8E**), hemoglobina corpuscular média (HCM) (CA:  $27,55 \pm 1,8$  pg; INF:  $27,6 \pm 2,1$  pg; <100:  $28,0 \pm 2,2$  pg; >100:  $27,1 \pm 1,9$  pg) (**Figura 8F**) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (CA:  $31,9 \pm 1,3$  g/dL; INF:  $32,0 \pm 1,1$  g/dL; <100:  $32,1 \pm 0,86$  g/dL; >100:  $31,9 \pm 1,34$  g/dL) (**Figura 8G**).

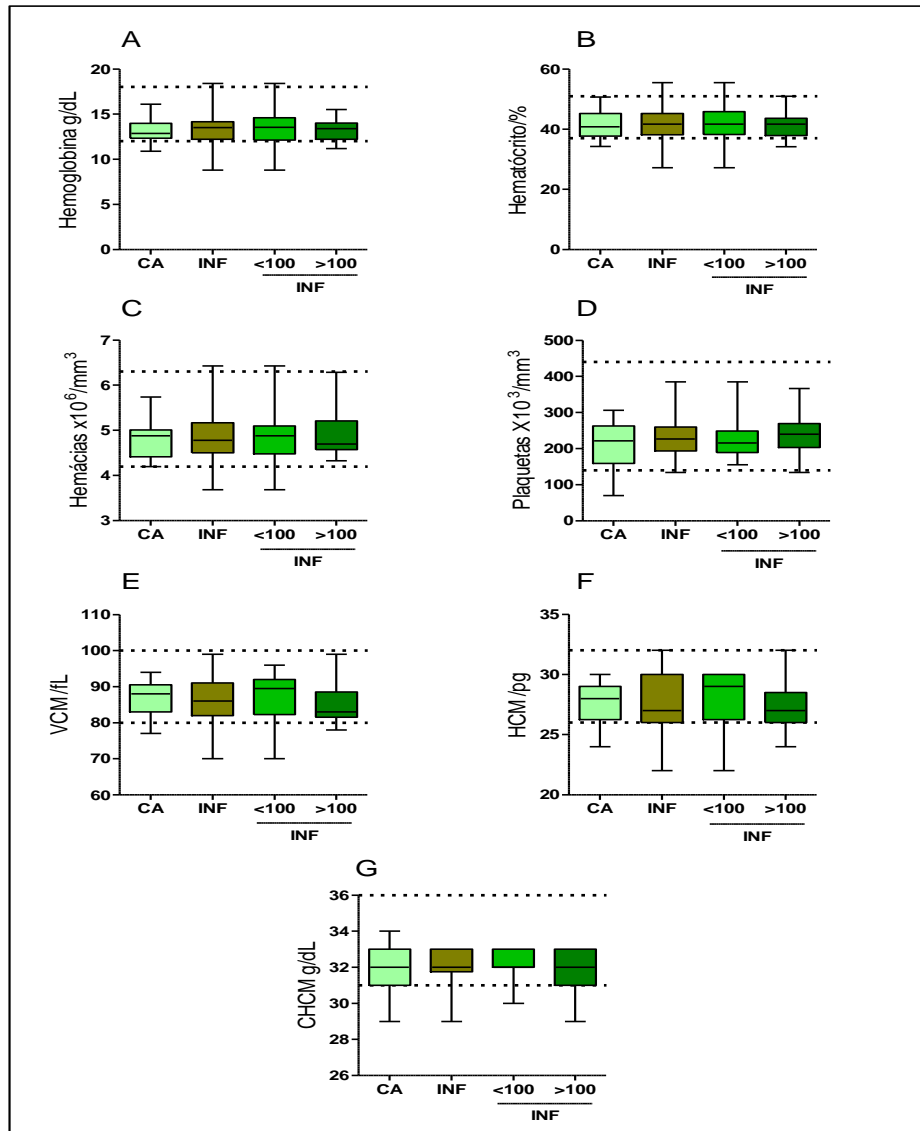
A análise da série branca mostrou aumento estatisticamente significativo no número de eosinófilos dos grupos INF ( $236 \pm 140/\text{mm}^3$ ) e >100 ( $284 \pm 184/\text{mm}^3$ ) em relação ao grupo CA ( $119 \pm 85/\text{mm}^3$ ) (**Figura 9C**).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na global de leucócitos (CA:  $5590 \pm 1897/\text{mm}^3$ ; INF:  $5974 \pm 2100/\text{mm}^3$ ; <100:  $5654 \pm 2103/\text{mm}^3$ ; >100:  $6323 \pm 2088/\text{mm}^3$ ) (**Figura 9A**), número de neutrófilos (CA:  $2173 \pm 1115/\text{mm}^3$ ; INF:  $2632 \pm 1319/\text{mm}^3$ ; <100:  $2420 \pm 1344/\text{mm}^3$ ; >100:  $2863 \pm 1281/\text{mm}^3$ ) (**Figura 9B**), número de monócitos (CA:  $463 \pm 156/\text{mm}^3$ ; INF:  $487 \pm 174/\text{mm}^3$ ; <100:  $475 \pm 178/\text{mm}^3$ ; >100:  $500 \pm 174/\text{mm}^3$ ) (**Figura 9D**) e número de linfócitos (CA:  $2460 \pm 636/\text{mm}^3$ ; INF:  $2395 \pm 537/\text{mm}^3$ ; <100:  $2358 \pm 581/\text{mm}^3$ ; >100:  $2457 \pm 612/\text{mm}^3$ ) (**Figura 9E**).

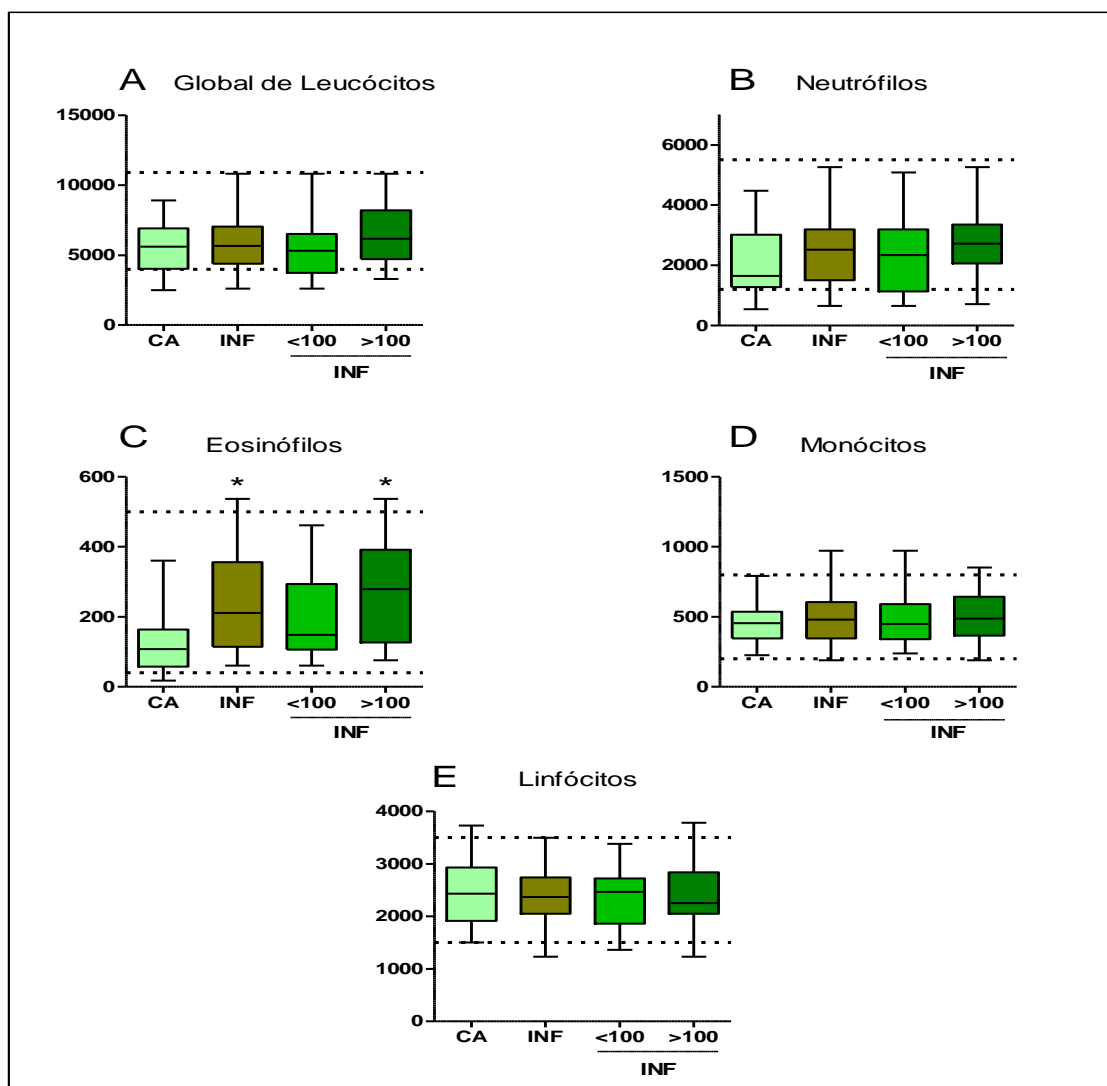
De maneira geral, com base em valores de referência para análises hematológicas utilizados atualmente na rotina laboratorial, deve-se ressaltar que os

dados observados neste trabalho se enquadram nos valores de referência para indivíduos adultos, não demonstrando alterações realmente significativas do ponto de vista biológico.





**Figura 8:** Análise do perfil hematológico, série vermelha e plaquetas, do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em área endêmica para esquistossomose. **(A)** concentração de hemoglobina em g/dL, **(B)** percentual do hematócrito, **(C)** representa o número de hemácias  $\times 10^6$  por  $\text{mm}^3$ , **(D)** representa o número de plaquetas  $\times 10^3$  por  $\text{mm}^3$ , **(E)** o volume corpuscular médio (VCM) em fL, **(F)** a hemoglobina corpuscular média (HCM) em pg, **(G)** representa a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em g/dL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos.



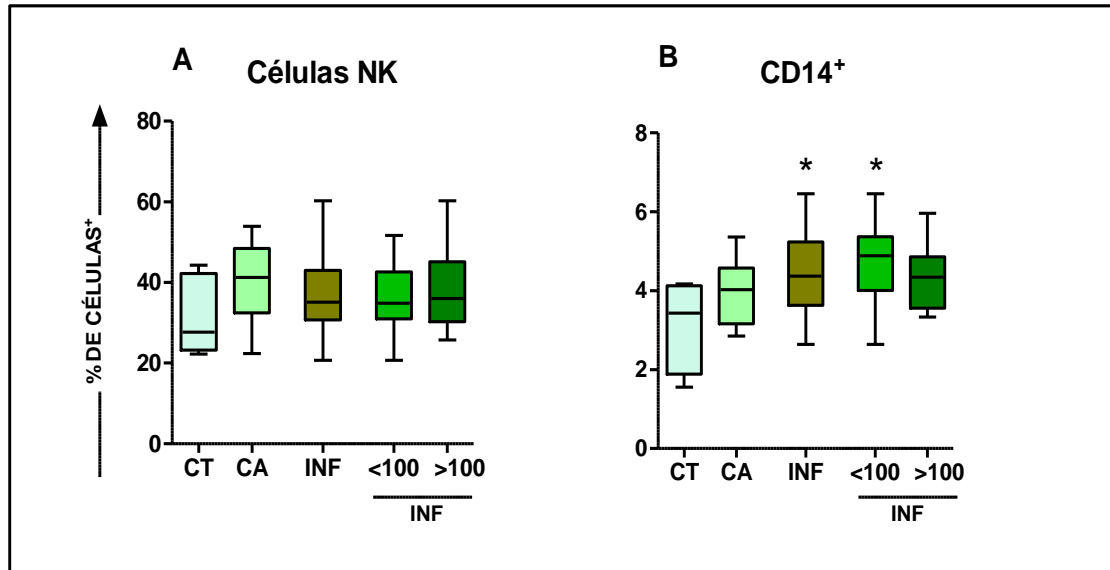
**Figura 9:** Análise do perfil hematológico, série branca, do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em área endêmica para esquistossomose. (A) Representa a global de leucócitos, (B) a subpopulação de neutrófilos, (C) a subpopulação de eosinófilos, (D) a subpopulação de monócitos, (E) a subpopulação de linfócitos. 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 ( $p < 0,05$  pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CA em relação aos grupos INF e >100) estão representadas por (\*).

## **5.2 Análise ex vivo do percentual de células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ), monócitos ( $CD14^+$ ), linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ) e linfócitos T citotóxicos/supressores ( $CD8^+$ ) do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose**

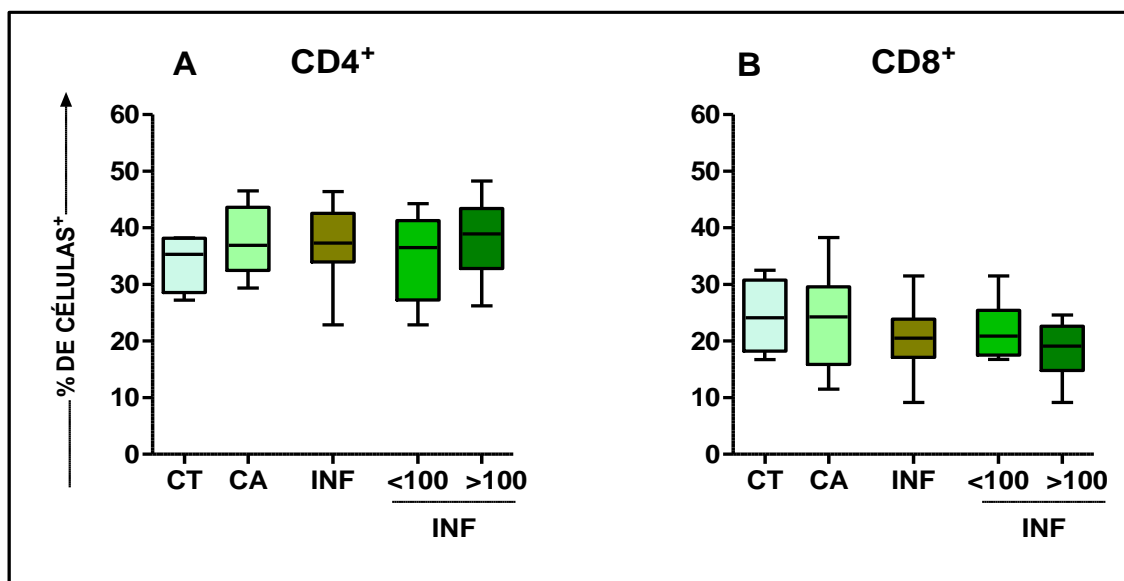
Neste estudo foi analisado o percentual de células da imunidade inata (NK e monócitos) e da imunidade adaptativa (linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$ ) no sangue periférico de pacientes portadores da esquistossomose mansônica, categorizados por intensidade de infecção distintas, com o objetivo de avaliar a participação dessas células na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni* e a influência da carga nesse contexto.

A análise dos resultados mostrou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no percentual de monócitos  $CD14^+$  do grupo INF ( $4,46\% \pm 0,94$  de células) e  $<100$  ( $4,6\% \pm 1,1$  de células) em relação ao grupo CT ( $3,15\% \pm 1,2$  de células) como mostra a **Figura 10B**.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no percentual de células NK dentro da população de células  $CD3^-$  (CT:  $31,17\% \pm 9,4$  de células; CA:  $40,4\% \pm 9,46$  de células; INF:  $37,23\% \pm 8,77$  de células;  $<100$ :  $36,09\% \pm 8,03$  de células;  $>100$ :  $38,11\% \pm 9,33$  de células) (**Figura 10A**), linfócitos T  $CD4^+$  (CT:  $34,03\% \pm 5,21$  de células; CA:  $37,58\% \pm 5,76$  de células; INF:  $37,14\% \pm 7,24$  de células;  $<100$ :  $34,99\% \pm 7,54$  de células;  $>100$ :  $38,10\% \pm 6,80$  de células) (**Figura 11A**) e linfócitos T  $CD8^+$  entre os grupos (CT:  $24,35\% \pm 6,55$  de células; CA:  $22,86\% \pm 8,03$  de células; INF:  $20,38\% \pm 5,13$  de células;  $<100$ :  $22,17\% \pm 4,85$  de células;  $>100$ :  $18,73\% \pm 4,64$  de células) (**Figura 11B**)



**Figura 10:** Análise de células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) dentro das células  $CD3^-$  (A) e de monócitos ( $CD14^+$ ) (B) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em percentual de células positivas para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CT em relação aos grupos INF e <100 estão representadas por (\*).

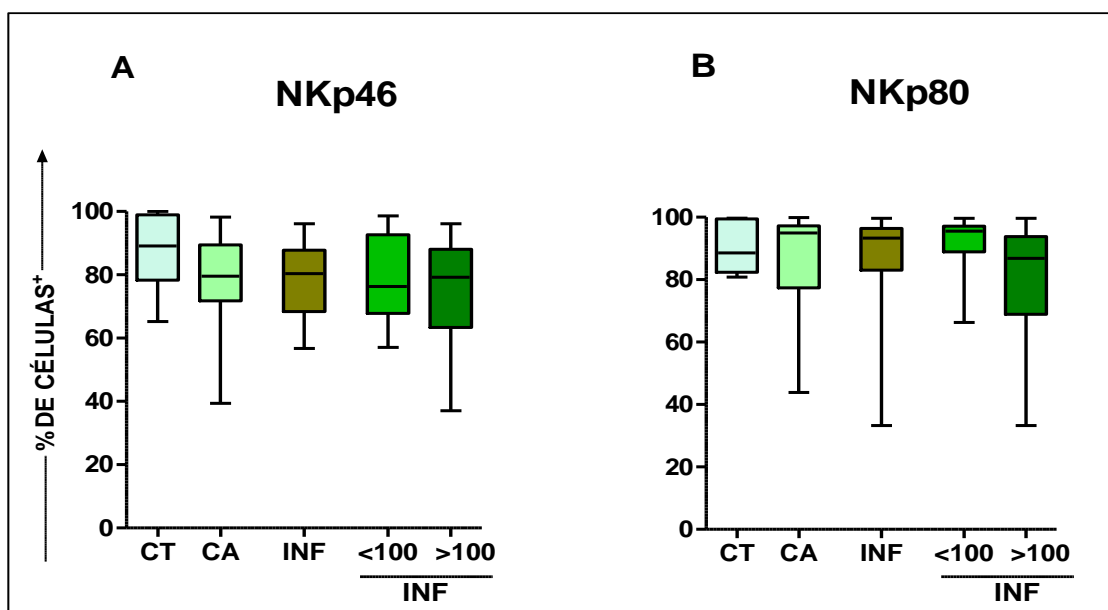


**Figura 11:** Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (B) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em percentual de células positivas para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos avaliados.

### ***5.3 Análise ex vivo do percentual de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), expressando receptores de ativação NKp46 e NKp80, no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose***

Em relação à atividade das células NK, Freud et al. (2006) demonstraram que a expressão dos marcadores CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> está aumentada em células de estágio avançado de maturação com capacidade produtora de citocinas e elevada citotoxicidade. Os receptores NKp46 e NKp80 contribuem para a lise de células infectadas e estão expressos tanto em células jovens quanto em células ativadas, não sendo expresso em linfócitos T e B (Vankayalapati et al., 2002). O aumento destes receptores induz elevação dos níveis de cálcio no meio intracelular, levando à produção de citocinas (Mallevaey et al., 2006). Dessa forma, a análise do percentual das células NK com esse perfil presentes no sangue periférico de pacientes em fase crônica, foi realizada com o intuito de se avaliar o papel da imunidade inata neste contexto.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no percentual de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) expressando o receptor NKp46 entre os grupos avaliados (CT: 87,4% ± 13,0 de células; CA: 77,99% ± 15,58 de células; INF: 78,29% ± 11,96 de células; <100: 78,4% ± 13,4 de células; >100: 75,8% ± 15,58 de células) (**Figura 12A**). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no percentual de células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) expressando o receptor NKp80 entre os grupos avaliados (CT: 89,9% ± 8,8 de células; CA: 86,29% ± 17,58 de células; INF: 84,62% ± 18,54 de células; <100: 92,5% ± 8,4 de células; >100: 78,74% ± 21,78 de células) (**Figura 12B**).



**Figura 12:** Percentual de Celulas NK ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) expressando os receptores NKp46 (A) e NKp80 (B) no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em percentual de células positivas para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos.

**5.4 Análise ex vivo da expressão de TLR2 (Toll-like receptor) (CD282<sup>+</sup>) por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos (CD14<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), células dendríticas (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose**

Receptores do tipo toll são moléculas que reconhecem antígenos compartilhados entre vários patógenos, desempenhando papel fundamental na resposta imune inata de vertebrados e invertebrados. Dentre os vários tipos de receptor do tipo toll, encontramos o TLR2, que reconhece antígenos lipoprotéicos e glicolipídicos presentes em uma variedade de microrganismos, incluindo helmintos. Com o intuito de se avaliar a expressão desses receptores em células do sistema imune, a intensidade média de fluorescência (IMF) foi mensurada por citometria de fluxo.

Ao se avaliar a população de monócitos (CD14<sup>+</sup>) observou-se um aumento da IMF nos grupos CA (2966 ± 722), INF (2760 ± 615), <100 (2787 ± 720) e >100 (2756 ± 550) em relação ao grupo CT (218 ± 34) como mostra a **Figura 13A**.

Quando se avaliou as Células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na IMF entre os grupos analisados (CT: 5,1 ± 1,6; CA: 5,0 ± 0,9; INF: 5,4 ± 1,6; <100: 5,1 ± 1,3; >100: 5,5 ± 1,8) como mostra a **Figura 13B**.

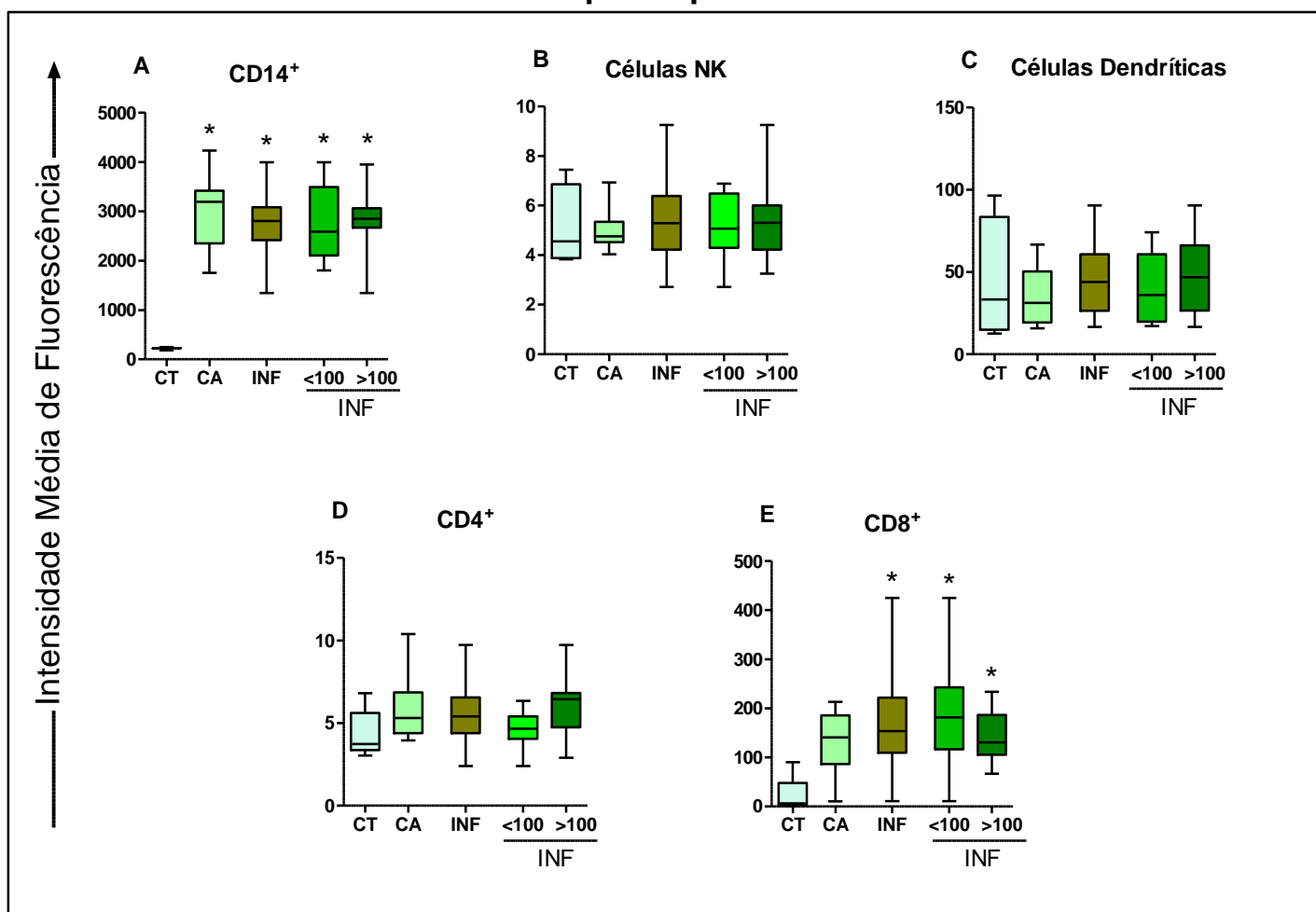
Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na IMF de células dendríticas (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) expressando o receptor do tipo Toll-2 entre os grupos analisados (CT: 43,8 ± 37,4; CA: 35,4 ± 16,8; INF: 45,4 ± 22,2; <100: 41,6 ± 19,9; >100: 48 ± 23,9) como mostra a **Figura 13C**.

Não foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na IMF nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os grupos analisados (CT: 5,8 ± 1,7; CA: 4,3 ± 1,4; INF: 5,4 ± 1,5; <100: 4,5 ± 1,2; >100: 5,9 ± 1,5) como mostra a **Figura 13D**.

De forma interessante, em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, foi verificado aumento estatisticamente significativo na IMF nos grupos INF (166 ± 85), <100 (192 ± 110) e >100 (138 ± 60) em relação ao grupo CT (23 ± 34) como mostra a **Figura 13E**.



## Receptor Tipo Toll 2



**Figura 13:** Expressão do receptor toll-2 (CD282<sup>+</sup>) em monócitos (CD14<sup>+</sup>) (A), células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) (B), células dendríticas (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (C), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (D) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (E) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular nas populações celulares, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CT em relação aos grupos CA, INF, <100 e >100 estão representadas por (\*).

### *5.5 Análise ex vivo da expressão de moléculas co-estimuladoras CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos (CD14<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose*

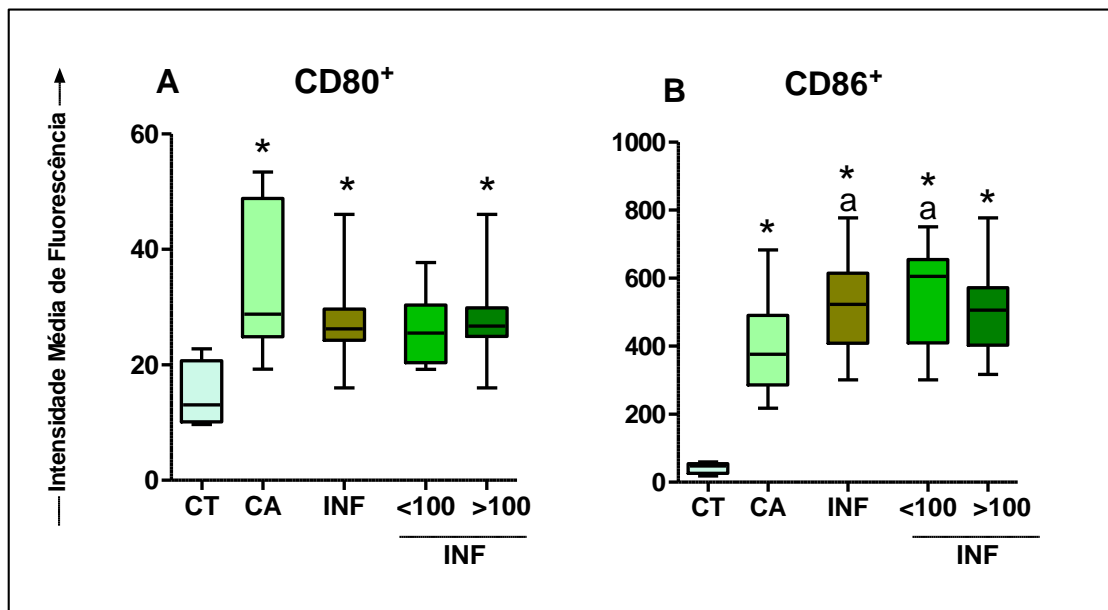
As moléculas CD80 e CD86 são proteínas de superfície encontradas em células B ativadas e monócitos que fornecem um sinal co-estimulador necessário para ativação e sobrevivência de células T (Lanier et al., 1995). Essas moléculas se ligam às proteínas CD28 e CTLA-4 presentes nos linfócitos T desencadeando um importante papel na imunomodulação da resposta imune (Vasu et al., 2003). A fim de verificar essa expressão, foram mensuradas as intensidades médias de fluorescências destas duas moléculas em monócitos e linfócitos B por meio de citometria de fluxo.

Para a população de monócitos (CD14<sup>+</sup>) houve um aumento na IMF do CD80<sup>+</sup> nos grupos CA ( $34 \pm 12,5$ ), INF ( $27,5 \pm 6,5$ ) e >100 ( $28,9 \pm 7,4$ ) em relação ao grupo CT ( $14,6 \pm 5,7$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo <100 ( $25,9 \pm 5,6$ ) (**Figura 14A**).

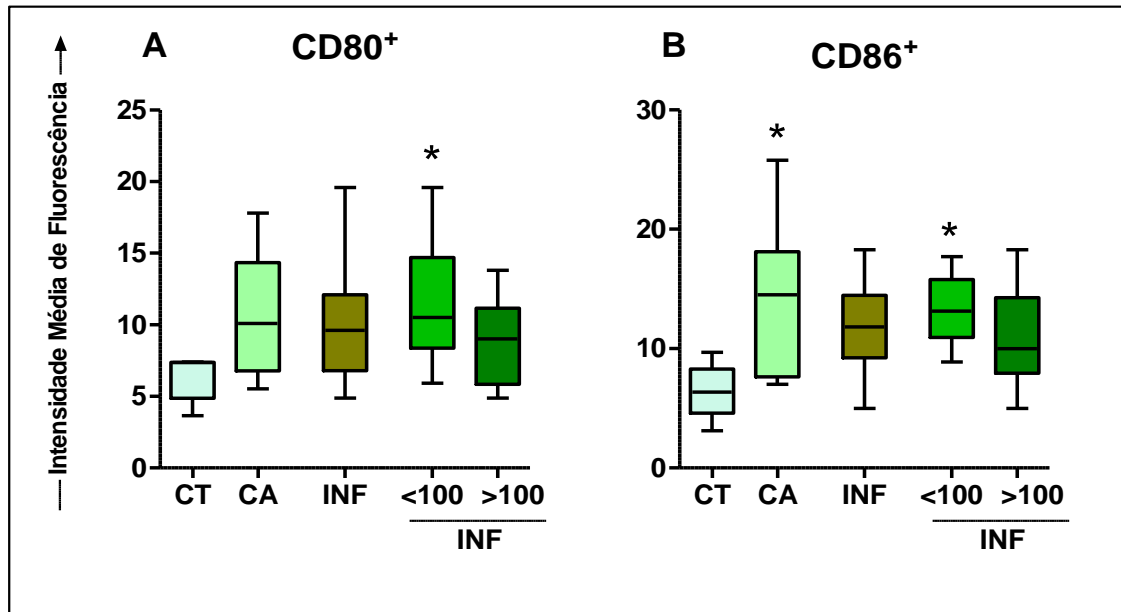
Ainda em relação à população de monócitos (CD14<sup>+</sup>), houve um aumento da IMF do CD86<sup>+</sup> nos grupos CA ( $398 \pm 129$ ), INF ( $527 \pm 133$ ), <100 ( $555 \pm 142$ ) e >100 ( $504 \pm 126$ ) em relação ao grupo CT ( $42 \pm 16$ ) (**Figura 14B**). Além disso, houve aumento da IMF nos grupos INF ( $527 \pm 133$ ) e <100 ( $555 \pm 142$ ) em relação ao grupo CA ( $398 \pm 129$ ) (**Figura 14B**).

Foi encontrado um aumento da IMF do CD80<sup>+</sup> nos linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do grupo <100 ( $11,6 \pm 4,2$ ) em relação ao grupo CT ( $6,3 \pm 1,6$ ) enquanto nos demais grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (CA:  $10,6 \pm 4,0$ ; INF:  $9,9 \pm 0,6$ ; >100:  $8,7 \pm 2,8$ ) (**Figura 15A**).

Em relação à IMF do CD86<sup>+</sup> em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), foi encontrado um aumento nos grupos CA ( $14,1 \pm 6,1$ ) e <100 ( $13,2 \pm 2,7$ ) em relação ao grupo CT ( $6,4 \pm 2,3$ ) (**Figura 15B**). Nos demais grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (INF:  $11,8 \pm 3,7$ ; >100:  $11,01 \pm 3,09$ ).



**Figura 14:** Expressão dos receptores CD80<sup>+</sup> (A) e CD86<sup>+</sup> (B) em monócitos (CD14<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT em relação aos grupos CA, INF, <100 e >100 estão representadas por (\*). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$  pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CA em relação aos grupos INF e <100 estão representadas pela letra **a**.



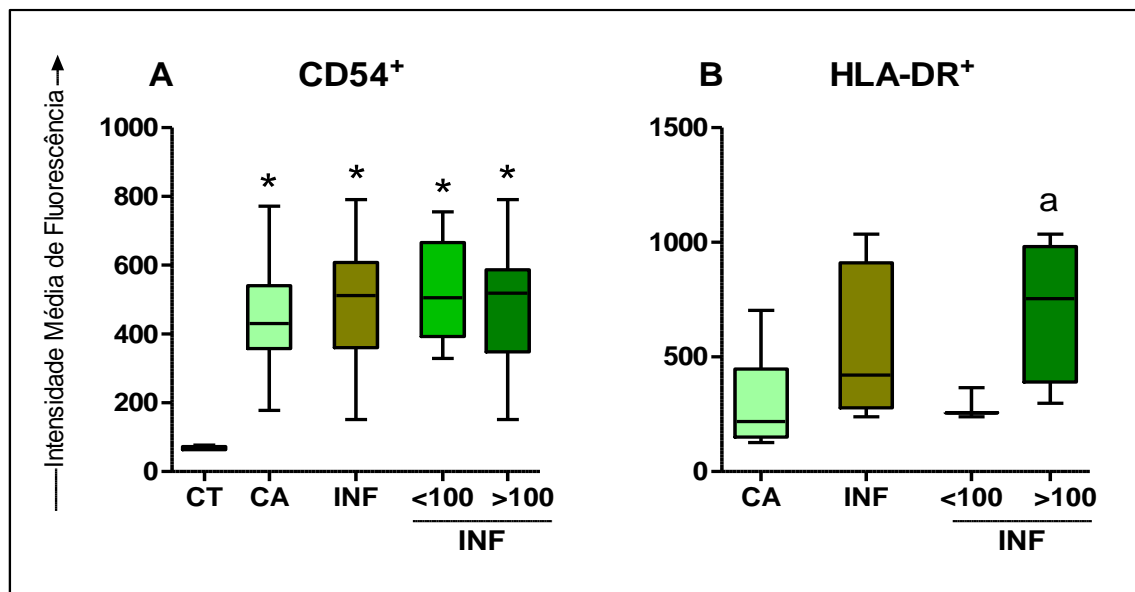
**Figura 15:** Expressão dos receptores CD80<sup>+</sup> (A) e CD86<sup>+</sup> (B) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CT em relação CA e <100 estão representadas por (\*).

***5.6 Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão e ativação celulares por intensidade média de fluorescência (IMF) em monócitos CD14<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose***

Com o intuito de se avaliar o perfil imunofenotípico dos monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico dos pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose foi realizada uma análise *ex vivo* de moléculas de adesão e ativação celulares, avaliando-se a intensidade média de fluorescência destes marcadores (**Figura 16**).

A análise da molécula de adesão CD54<sup>+</sup> mostrou um aumento, estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), na IMF nos grupos CA ( $443,2 \pm 162,8$ ), INF ( $496,4 \pm 155,5$ )  $< 100$  ( $530,5 \pm 142,1$ ) e  $> 100$  ( $473,1 \pm 163,5$ ) em relação ao grupo CT ( $68,3 \pm 5,5$ ) (**Figura 16A**).

Em relação à molécula de ativação celular HLA-DR<sup>+</sup> foi encontrada um aumento, estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), no grupo  $> 100$  ( $704,5 \pm 299,4$ ) em relação ao grupo CA ( $303,8 \pm 198,1$ ) (**Figura 16B**). Em relação aos outros grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (INF:  $565,3 \pm 317,5$ ;  $< 100$ :  $287,0 \pm 68,15$ ).



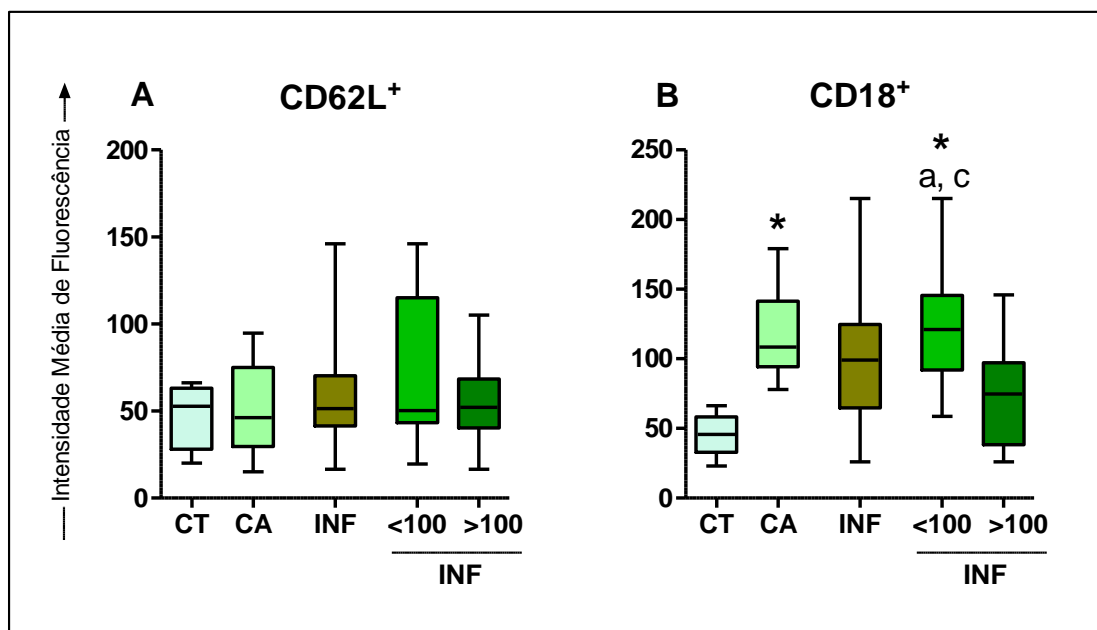
**Figura 16:** Expressão da molécula de adesão CD54 (A) e ativação HLA-DR (B) em monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CT e os grupos CA, INF, <100 e >100 estão representadas por (\*). A diferença entre o grupo CA e o grupo >100 está representada pela letra **a**.

***5.7 Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão celular por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose***

Com o intuito de avaliar o perfil imunofenotípico dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico dos pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose, avaliou-se a intensidade média de fluorescência dos marcadores CD62L e CD18 (**Figura 17**).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, quando se analisou a IMF da molécula de adesão CD62L<sup>+</sup> (CT:  $47,9 \pm 19,6$ ; CA:  $52,4 \pm 26,6$ ; INF:  $53,4 \pm 24,6$ ; <100:  $69,6 \pm 45,5$ ; >100:  $53,7 \pm 23,2$  - **Figura 17A**).

Em relação à análise da molécula de adesão CD18<sup>+</sup> verifico-se aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), na intensidade média de fluorescência dos grupos CA ( $117 \pm 30$ ) e <100 ( $123 \pm 43$ /MFI) em relação ao grupo CT ( $45,5 \pm 15,5$ ). Também houve um aumento no grupo <100 ( $123 \pm 43$ ) em relação aos grupos >100 ( $72,5 \pm 35$ ) e CA ( $45,5 \pm 15,5$ ) como mostra a **Figura 17B**.



**Figura 17:** Expressão das moléculas de adesão CD62L (A) e CD18 (B) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CT e os grupos CA e <100 estão representadas por (\*). A diferença entre o grupo CA e o grupo <100 está representada pela letra **a**, a diferença entre os grupos <100 e >100 está representadas pela letra **c**.



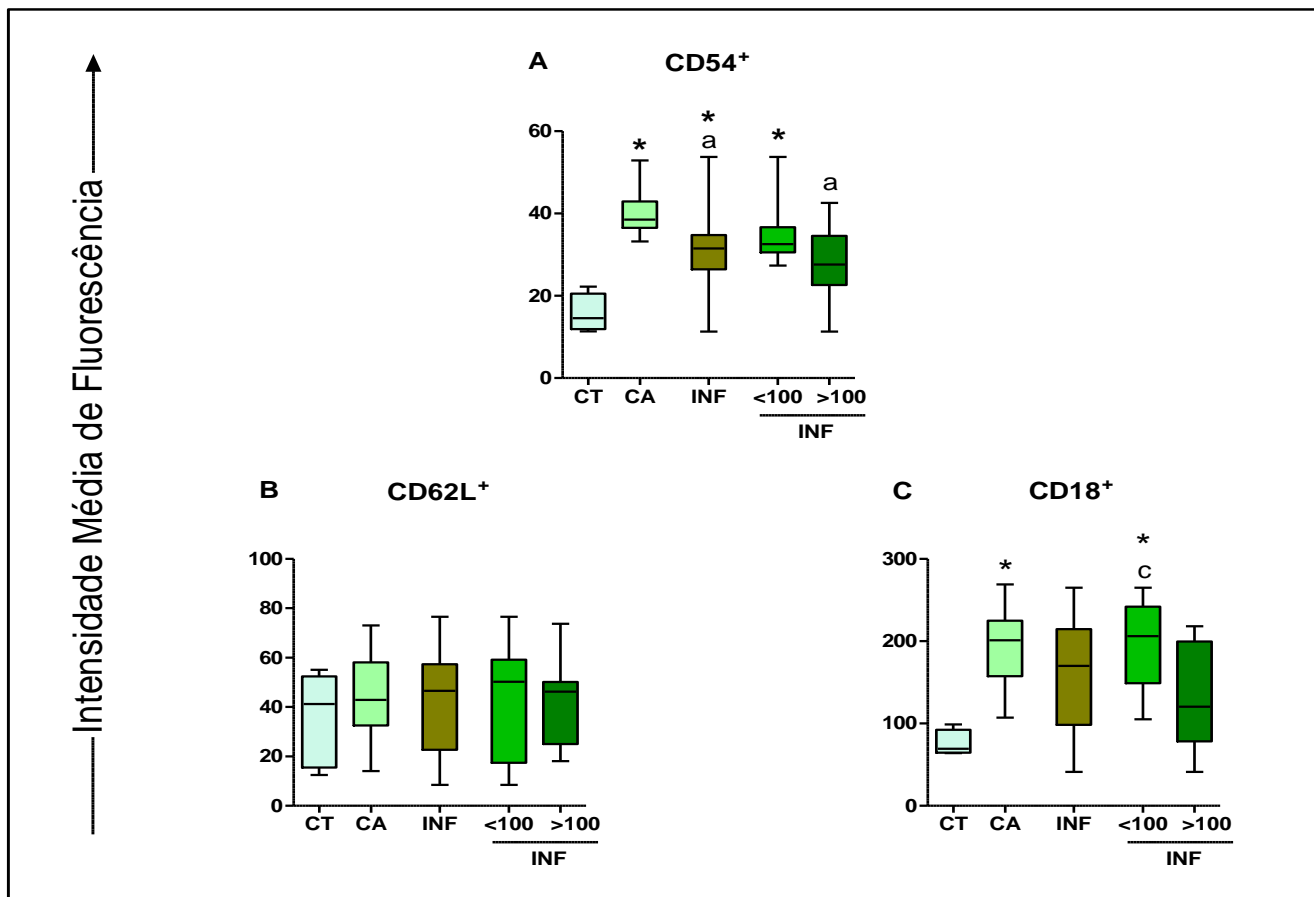
**5.8 Análise ex vivo da expressão de moléculas de adesão celular por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose**

De forma semelhante à análise realizada para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, realizou-se uma análise *ex vivo* de moléculas de adesão celular em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose, avaliando-se a intensidade média de fluorescência destes marcadores (**Figura 18**).

A análise da molécula de adesão CD54<sup>+</sup> mostrou aumento na IMF nos grupos CA (40,2 ± 5,7), INF (30,4 ± 8,4) e <100 (34,7 ± 7,2) em relação ao grupo CT (15,6 ± 4,6). Também foi observada uma redução nos grupos INF (30,4 ± 8,4) e >100 (27,8 ± 8,8) em relação ao grupo CA (40,2 ± 5,7) como mostra a **Figura 18A**.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) entre os grupos quando foi analisada a IMF da molécula de adesão CD62L<sup>+</sup> (CT 35,4 ± 18,9; CA: 43,4 ± 17,5; INF: 41,8 ± 19,5; <100: 41,5 ± 22,4; >100: 42,2 ± 17,5 - **Figura 18B**).

Em relação à análise da molécula de adesão CD18<sup>+</sup> foi verificado aumento na IMF nos grupos CA (193 ± 48) e <100 (196 ± 54) em relação ao grupo CT (75,3 ± 1). Também houve um aumento da intensidade média de fluorescência no grupo <100 (196 ± 54) em relação aos grupos >100 (133 ± 63) (**Figura 18C**).



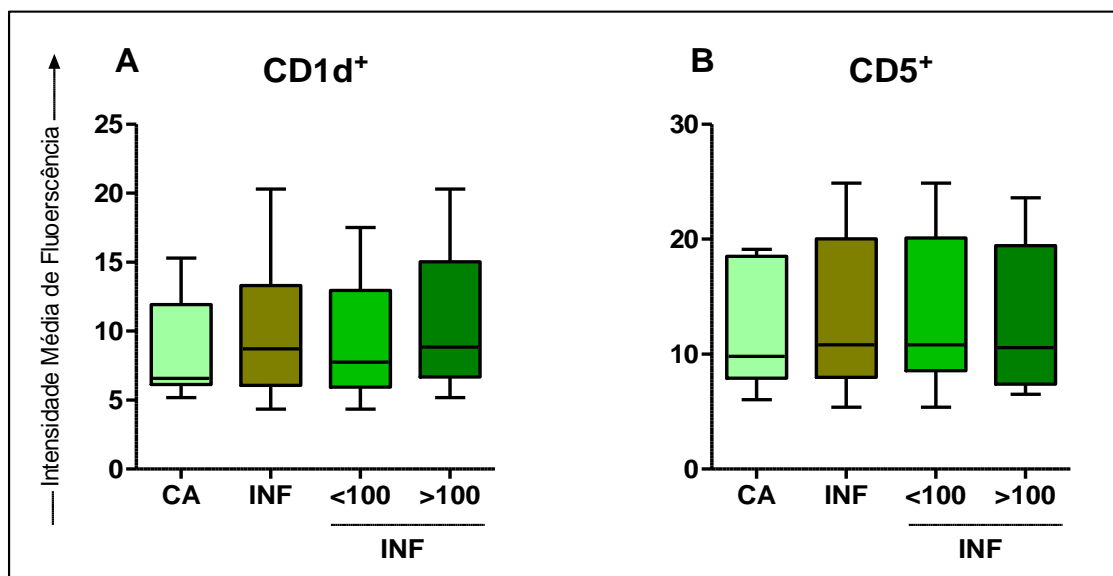
**Figura 18:** Expressão das moléculas de adesão CD54 (A), CD62L (B) e CD18 (C) em linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Para a molécula CD54, as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre o grupo CA em relação aos grupos INF e >100 estão representadas pela letra **a**. As diferenças entre o grupo CT e os grupos CA, INF e <100 estão representadas por (\*). Para a molécula CD18, as diferenças estatisticamente significativas entre o grupo CT e os grupos CA e <100 estão representadas por (\*); a diferença entre o grupo <100 e > 100 está representada pela letra **c**.

***5.9 Análise ex vivo da expressão de moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose***

Ainda em relação aos linfócitos B, foram analisadas as IMF das moléculas reguladoras CD5 e CD1d por meio de citometria de fluxo (**FIGURA 19**).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos quando se analisou a IMF da molécula reguladora CD1d<sup>+</sup> (CA:  $8,4 \pm 3,7$ ; INF:  $10 \pm 4,7$ ; <100:  $9,4 \pm 4,4$ ; >100:  $10,4 \pm 5,1$  - **Figura 19A**).

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos quando se analisou a IMF da molécula reguladora CD5<sup>+</sup> (CA:  $11,4 \pm 5,2$ ; INF:  $11,5 \pm 5,2$ ; <100:  $13,9 \pm 6,6$ ; >100:  $12,7 \pm 6,2$  - **Figura 19B**).



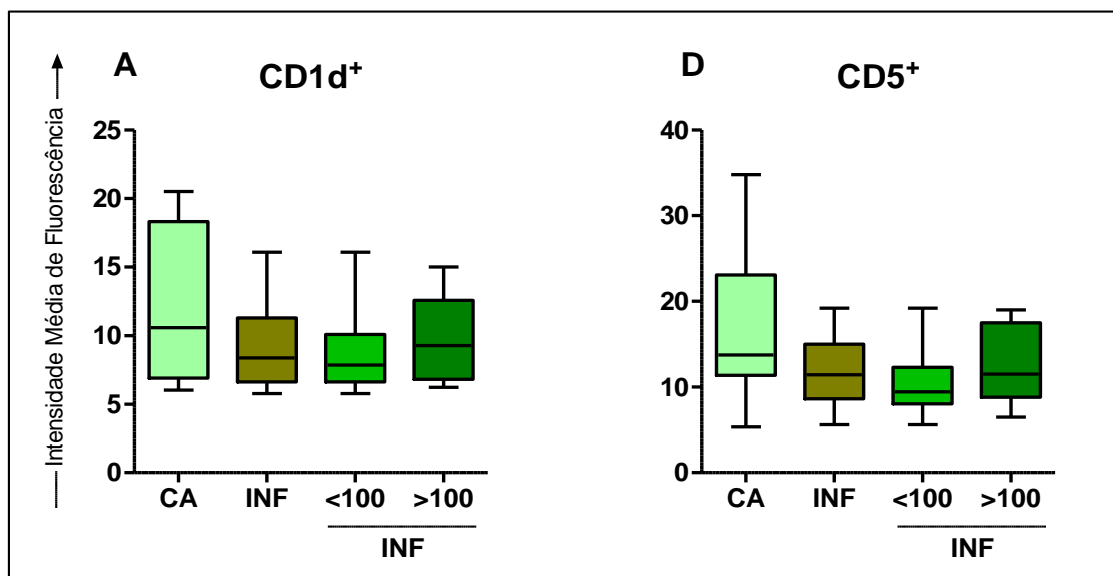
**Figura 19:** Expressão das moléculas reguladoras CD1d (A) e CD5 (B) em linfócitos B ( $CD19^+CD62L^+$ ) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes em áreas endêmicas (CA) para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos.

**5.10 Análise ex vivo da expressão de moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose.**

As moléculas de ativação CD1d<sup>+</sup> e CD5<sup>+</sup> foram reavaliadas por IMF em linfócitos B expressando o marcador CD40<sup>+</sup>, que está presente ao longo do desenvolvimento e relacionado à sobrevivência e diferenciação das células B (Yanaba et al., 2008) (**FIGURA 20**).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos quando se analisou a IMF da molécula reguladora CD1d<sup>+</sup> (CA:  $12,1 \pm 5,4$ ; INF:  $9,3 \pm 3,0$ ; <100:  $8,7 \pm 3,0$ ; >100:  $9,8 \pm 3,0$  - **Figura 20A**).

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos quando se analisou a IMF da molécula reguladora CD5<sup>+</sup> (CA:  $16,5 \pm 8,6$ ; INF:  $11,6 \pm 4,1$ ; <100:  $10,7 \pm 4,0$ ; >100:  $12,5 \pm 4,1$  - **Figura 20B**).



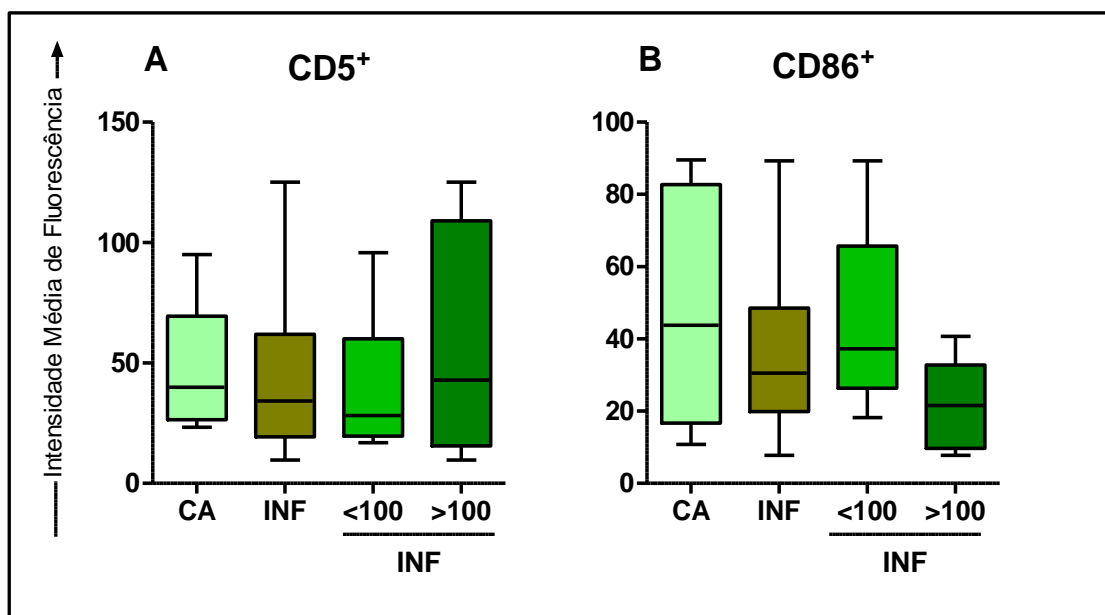
**Figura 20:** Expressão das moléculas reguladoras CD1d (A) e CD5 (B) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos.

***5.11 Análise ex vivo da expressão das moléculas reguladoras por intensidade média de fluorescência (IMF) em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose***

Foram analisadas as intensidades médias de fluorescência das moléculas reguladoras CD5<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) por meio de citometria de fluxo (**FIGURA 21**). O CD43 está presente nos estágios finais de maturação de células B com grande capacidade de resposta a antígenos de natureza lipopolissacarídica (Wells et al., 1994)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, quando analisou-se a IMF da molécula CD5<sup>+</sup> (CA:  $47,7 \pm 27,3$ ; INF:  $45,6 \pm 34,6$ ; <100:  $38,7 \pm 27,2$ ; >100:  $55,5 \pm 44,4$  - **Figura 21A**).

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, quando analisou-se a intensidade média de fluorescência da molécula reguladora CD86<sup>+</sup> (CA:  $48,5 \pm 33,7$ ; INF:  $36,4 \pm 23,8$ ; <100:  $45,9 \pm 24,0$ ; >100:  $21, \pm 12,4$  - **Figura 21B**).



**Figura 21:** Expressão das moléculas reguladoras CD5 (A) e CD86 (B) em linfócitos B ( $CD19^+CD43^+$ ) do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência para o marcador celular, sendo apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$  pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Tukey Dunns entre os grupos).



### 5.12 Principais diferenças encontradas entre os grupos na avaliação da resposta imune celular *ex vivo*

As Figuras 22 a 24 mostram em diagramas o sumário das principais diferenças encontradas entre os grupos na avaliação da resposta imune celular *ex vivo*.

	Coestimulação			Adesão
	Toll-2	CD80	CD86	CD54
CT X INF	■	■	■	■
CT X <100	■	■	■	■
CT x >100	■	■	■	■
CT X CA	■	■	■	■
<100 X >100	■	■	■	■
INF X <100	■	■	■	■
INF X >100	■	■	■	■
CA X INF	■	■	■*	■
CA X <100	■	■	■*	■
CA X >100	■	■	■*	■

**Figura 22:** Principais alterações imunofenotípicas em monócitos de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao grupo CT. O quadrante verde escuro com um asterisco representa aumento em relação ao grupo CA.

	LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup>			LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup>			
	Adesão			Adesão			
	Toll-2	CD62L	CD18	Toll-2	CD62L	CD54	CD18
CT X INF				■		■	
CT X <100			■	■		■	■
CT x >100				■			
CT X CA			■			■	■
<100 X >100			■				■
INF X <100							
INF X >100							
CA X INF						*	
CA X <100			■*				
CA X >100						*	

**Figura 23:** Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os quadrantes verdes escuro representam aumento relação ao grupo CT. O quadrante verde claro representa redução do grupo >100 em relação ao grupo <100. O quadrante verde escuro com um asterisco representa aumento em relação ao grupo CA. Os quadrantes verdes claro com um asterisco representam redução em relação ao grupo CA.

## LINFÓCITOS B

	Coestimulação			Ativação				
	CD80	CD86	CD43 CD86	CD1d CD62L <sup>+</sup>	CD5 CD62L <sup>+</sup>	CD1d CD40 <sup>+</sup>	CD5 CD40 <sup>+</sup>	CD5 CD43 <sup>+</sup>
CT X INF								
CT X <100								
CT x >100								
CT X CA								
<100 X >100								
INF X <100								
INF X >100								
CA X INF								
CA X <100								
CA X >100								

**Figura 24:** Principais alterações imunofenotípicas em linfócitos B de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e de indivíduos do grupo controle residentes (CA) ou não (CT) em áreas endêmicas para esquistossomose. Os quadrantes verdes escuro representam aumento relação ao grupo CT.

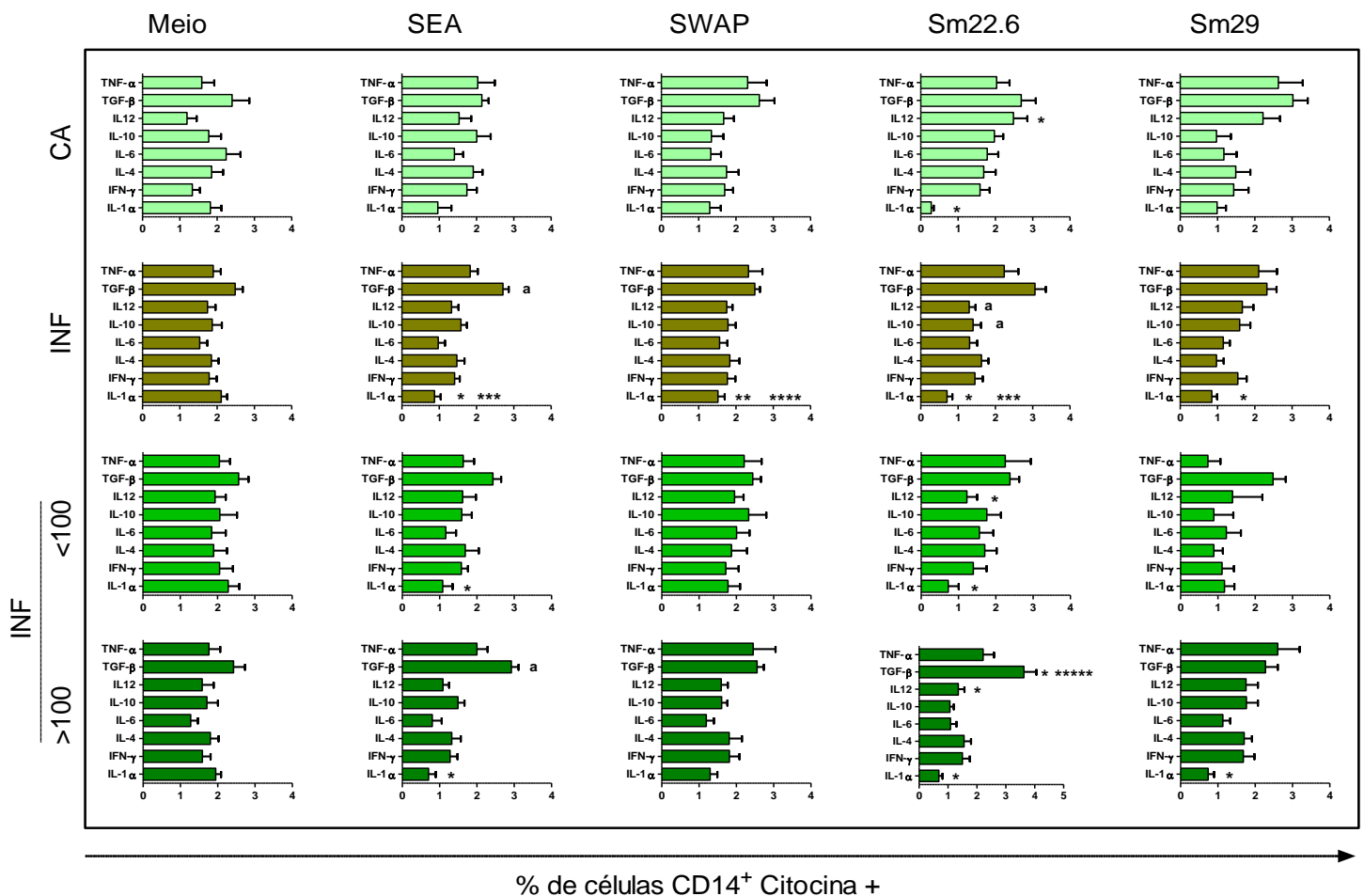
### ***5.13 Detecção de citocinas intracelulares em monócitos (CD14<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose e indivíduos do grupo controle de área endêmica, após estimulação antigênica in vitro***

A produção *in vitro* das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  por monócitos (CD14<sup>+</sup>) na ausência (Meio) ou presença de estimulação antígeno-específica com antígenos brutos do ovo (SEA), do verme adulto (SWAP) e antígenos recombinantes (Sm22.6 e Sm29) em pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100), e do grupo controle de área endêmica (CA), foi avaliada por meio de citometria de fluxo, conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo seus resultados expressos em porcentagem de células sintetizando a citocina de interesse. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes grupos, considerando mesmo estímulo estão representadas por letras e as diferenças dentro de um mesmo grupo considerando estímulos diferentes estão representadas por asteriscos.

A comparação entre grupos, após estimulação com SEA, mostrou um aumento da produção de TGF- $\beta$  por monócitos nos grupos INF e >100 (INF: 2,1%  $\pm$  0,18 de células; >100: 2,9%  $\pm$  0,62 de células) em relação ao grupo CA (CT: 2,7  $\pm$  0,15% de células). Houve também uma diminuição na produção de IL-12 e IL-10 no grupo INF (IL-12: 1,38%  $\pm$  0,19 de células; IL-10 1,3%  $\pm$  0,16 de células) em relação ao grupo CA (IL-12: 2,16%  $\pm$  0,22 de células; IL-10: 2,4%  $\pm$  0,37 de células), quando monócitos foram estimulados com Sm22.6 (**Figura 25**).

A comparação entre estímulos diferentes dentro de indivíduos de um mesmo grupo mostrou, em relação ao grupo CA, que Sm22.6 induziu uma diminuição na produção de IL-1 $\alpha$  nos monócitos estimulados (0,28%  $\pm$  0,22 de células) em relação aqueles não estimulados (Meio) (1,82%  $\pm$  0,92 de células) e aumentou a produção de IL-12 (2,48%  $\pm$  0,37 de células) em relação aqueles não estimulados (Meio) (1,19%  $\pm$  0,79 de células). Reduções estatisticamente significativas na produção de IL-1 $\alpha$  no grupo INF estimulado com SEA (0,87%  $\pm$  0,75 de células), Sm22.6 (0,70%  $\pm$  0,65 de células) e Sm29 (0,84%  $\pm$  0,56 de células) também foram observadas, em relação ao Meio (2,1%  $\pm$  0,73 de células). Houve ainda, dentro do grupo INF, diminuição na produção de IL-1 $\alpha$  em monócitos estimulados com SEA (0,87%  $\pm$  0,75 de células) e Sm22.6 (0,70%  $\pm$  0,65 de células), em relação aqueles estimulados com SWAP (1,5%  $\pm$  0,86 de células). Ao se avaliar indivíduos com cargas parasitárias distintas (<100,

>100), em relação ao grupo <100, houve uma diminuição na produção de IL-12 em relação ao meio ( $1,19\% \pm 0,79$  de células), quando estimulado com Sm22.6 ( $2,4\% \pm 1,2$  de células). Além disso, ainda em relação ao grupo <100, houve também uma diminuição da produção de IL-1 $\alpha$ , após estímulo com SEA ( $1,08\% \pm 0,85$  de células) e Sm22.6 ( $0,72\% \pm 0,87$  de células), em relação ao meio ( $2,28\% \pm 0,93$  de células). Observou-se ainda uma maior produção de TGF- $\beta$  no grupo >100, após estímulo dos monócitos com Sm22.6 ( $3,6\% \pm 1,5$  de células) em relação ao Meio ( $2,4\% \pm 1,1$  de células) e Sm29 ( $2,2\% \pm 1,1$  de células). Houve uma redução na produção de IL-12 no grupo >100 ( $2,48\% \pm 1,19$  de células) estimulado com Sm22.6 em relação ao meio ( $1,19\% \pm 0,79$  de células). Observou-se uma diminuição na produção de IL-1 $\alpha$  no grupo >100 estimulado com SEA ( $0,70\% \pm 0,65$  de células), Sm22.6 ( $0,68\% \pm 0,43$  de células) e Sm29 ( $0,73\% \pm 0,55$  de células) em relação ao Meio ( $1,94\% \pm 0,47$  de células). Os resultados das demais citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-8) não foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



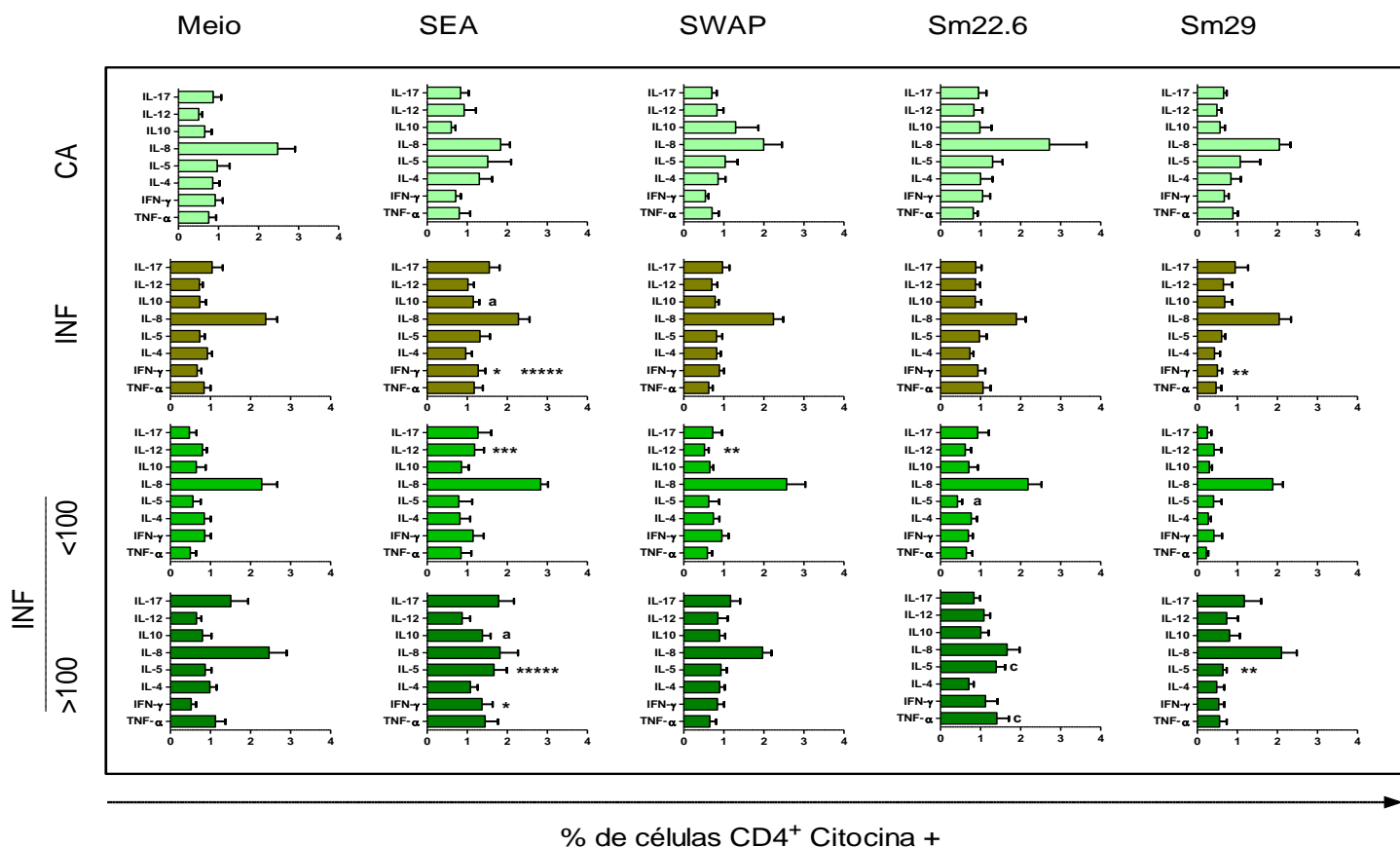
**Figura 25:** Perfil de citocinas de monócitos  $CD14^+$  presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área (CA) foram cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares. Os resultados estão expressos como média do percentual de células positivas para as citocinas avaliadas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-12, IL-10, IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ ) na população de monócitos, mais desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos INF e >100 em relação ao grupo CA, dentro de um mesmo estímulo, são representadas pelas letras **a**. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney existentes dentro de um mesmo grupo avaliado com estímulos diferentes em relação ao SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29 estão representados por (\*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\* e \*\*\*\*\*) respectivamente; apenas 1 asterisco (\*) representa diferenças significativas em relação ao cultivo na presença de meio de cultura.

### ***5.14 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose e de indivíduos do grupo controle de área endêmica, após estimulação antigênica in vitro***

A produção *in vitro* das citocinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por Linfócitos T CD4<sup>+</sup> na ausência (Meio) ou presença de estimulação antígeno-específica com antígenos brutos do ovo (SEA), do verme adulto (SWAP) e antígenos recombinantes (Sm22.6 e Sm29) em pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100), e grupo controle de área endêmica (CA), foi avaliada por meio de citometria de fluxo, conforme descrito em materiais e métodos, sendo seus resultados expressos em porcentagem de células sintetizando a citocina de interesse. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos diferentes, considerando mesmo estímulo estão representadas por letras e as diferenças entre o mesmo grupo considerando estímulos diferentes estão representadas por asteriscos.

A comparação entre grupos após estimulação com SEA revelou um aumento na produção de IL-10 no grupo INF (1,15%  $\pm$  0,72 de células) e >100 (1,37%  $\pm$  0,76 de células) em relação ao grupo CA (0,60%  $\pm$  0,34 de células). A produção de IL-5 após estimulação com Sm22.6 foi menor no grupo <100 (0,42%  $\pm$  0,38 de células) em relação aos grupos CA (1,40%  $\pm$  0,78 de células) e >100 (1,39%  $\pm$  0,74 de células). A produção de TNF- $\alpha$  após estimulação com Sm22.6 diminuiu no grupo <100 (0,64%  $\pm$  0,47 de células) em relação ao grupo >100 (1,41%  $\pm$  1,03 de células) (**Figura 26**).

A comparação entre estímulos diferentes dentro de indivíduos de um mesmo grupo mostrou aumento na produção de IL-12 no grupo <100 estimulado com SEA (1,18%  $\pm$  0,74 de células) em relação ao grupo <100 estimulado com SWAP (0,51%  $\pm$  0,33 de células). A produção de IL-5 foi maior no grupo >100 estimulado com SEA (1,67%  $\pm$  1,15 de células) em relação ao grupo >100 estimulado com Sm29 (0,64%  $\pm$  0,31 de células). A produção de IFN- $\gamma$  no grupo INF estimulado com SEA foi maior (1,27%  $\pm$  0,89 de células) em relação ao meio (0,67%  $\pm$  0,48 de células) e ao estimulado com Sm29 (0,50%  $\pm$  0,48 de células). A produção de IFN- $\gamma$  no grupo >100 estimulado com SEA (1,37%  $\pm$  0,95 de células) também foi maior em relação ao meio (0,51%  $\pm$  0,43 de células). Os resultados das demais citocinas (IL-4, IL-6, IL-8 e IL-17) não foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



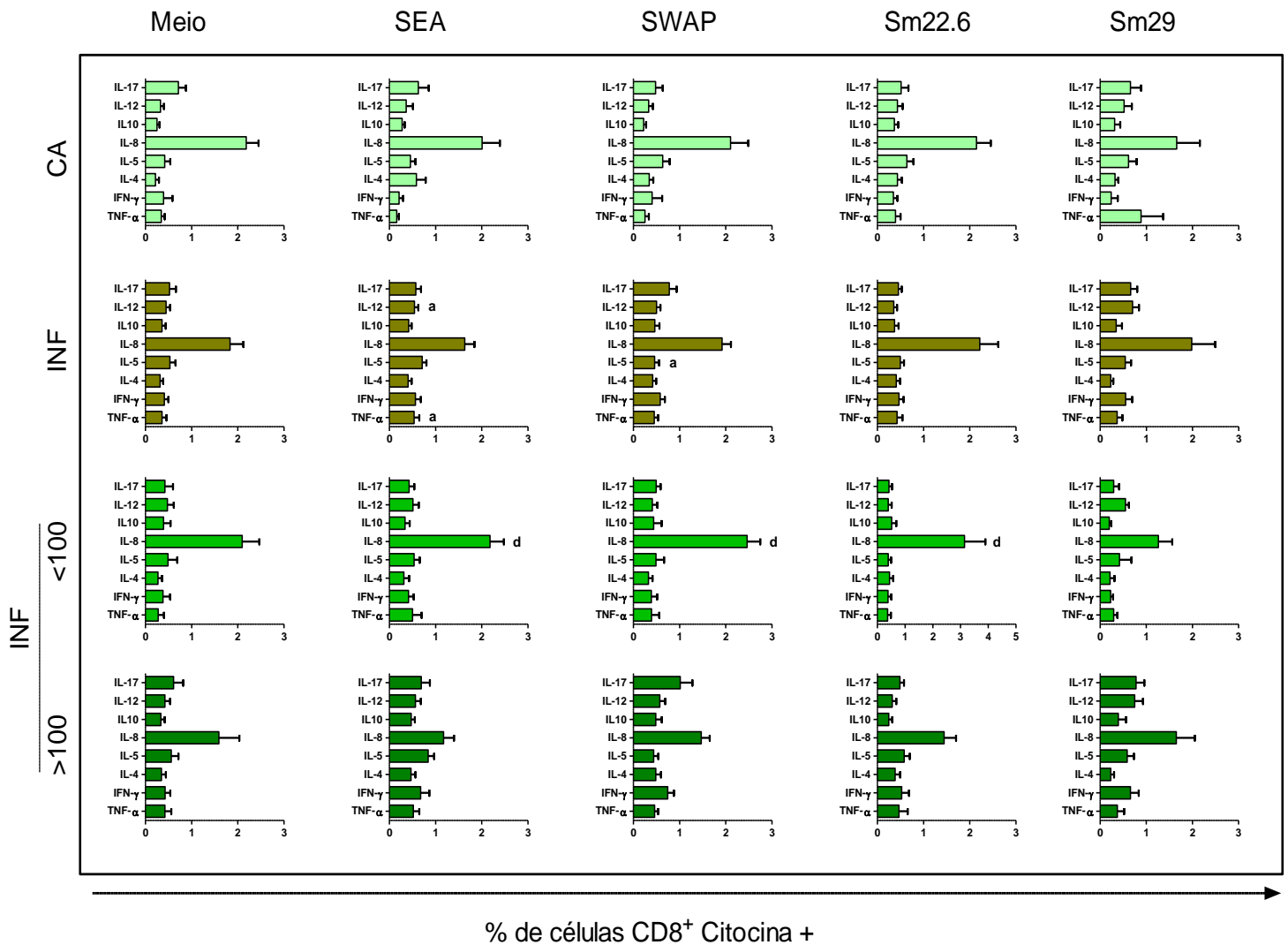
**Figura 26:** Perfil de citocinas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área endêmica (CA) foram cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares. Os resultados são expressos como média do percentual de células positivas para as citocinas avaliadas (IL-17 IL-12, IL-10, IL-8, IL-5, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) na população de linfócitos, mais desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos avaliados dentro de um mesmo estímulo em relação ao grupo CA estão representadas pela letra (a), as diferenças entre grupos dentro de um mesmo estímulo, está representada pela letra (c) equivalente as diferenças encontradas entre <100 e >100, respectivamente. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney existentes dentro de um mesmo grupo avaliado com estímulos diferentes em relação ao SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29 estão representados por (\*\*, \*\*\*, \*\*\*\* e \*\*\*\*\*) respectivamente; apenas 1 asterisco (\*) representa diferenças significativas em relação ao cultivo na presença de meio de cultura.



### ***5.15 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose indivíduos do grupo controle de área, após estimulação antigênica in vitro***

Semelhante à avaliação de citocinas em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a síntese *in vitro* das citocinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi avaliada em Linfócitos T CD8<sup>+</sup> na ausência (Meio) ou presença de estimulação antígeno-específica com antígenos brutos do ovo (SEA), do verme adulto (SWAP) e antígenos recombinantes (Sm22.6 e Sm29) em pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e no grupo controle de área endêmica (CA), por meio de citometria de fluxo, conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo seus resultados expressos em porcentagem de células sintetizando a citocina de interesse. É importante salientar que as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos diferentes, considerando mesmo estímulo estão representadas por letras e as diferenças entre o mesmo grupo considerando estímulos diferentes estão representadas por asteriscos (**Figura 27**).

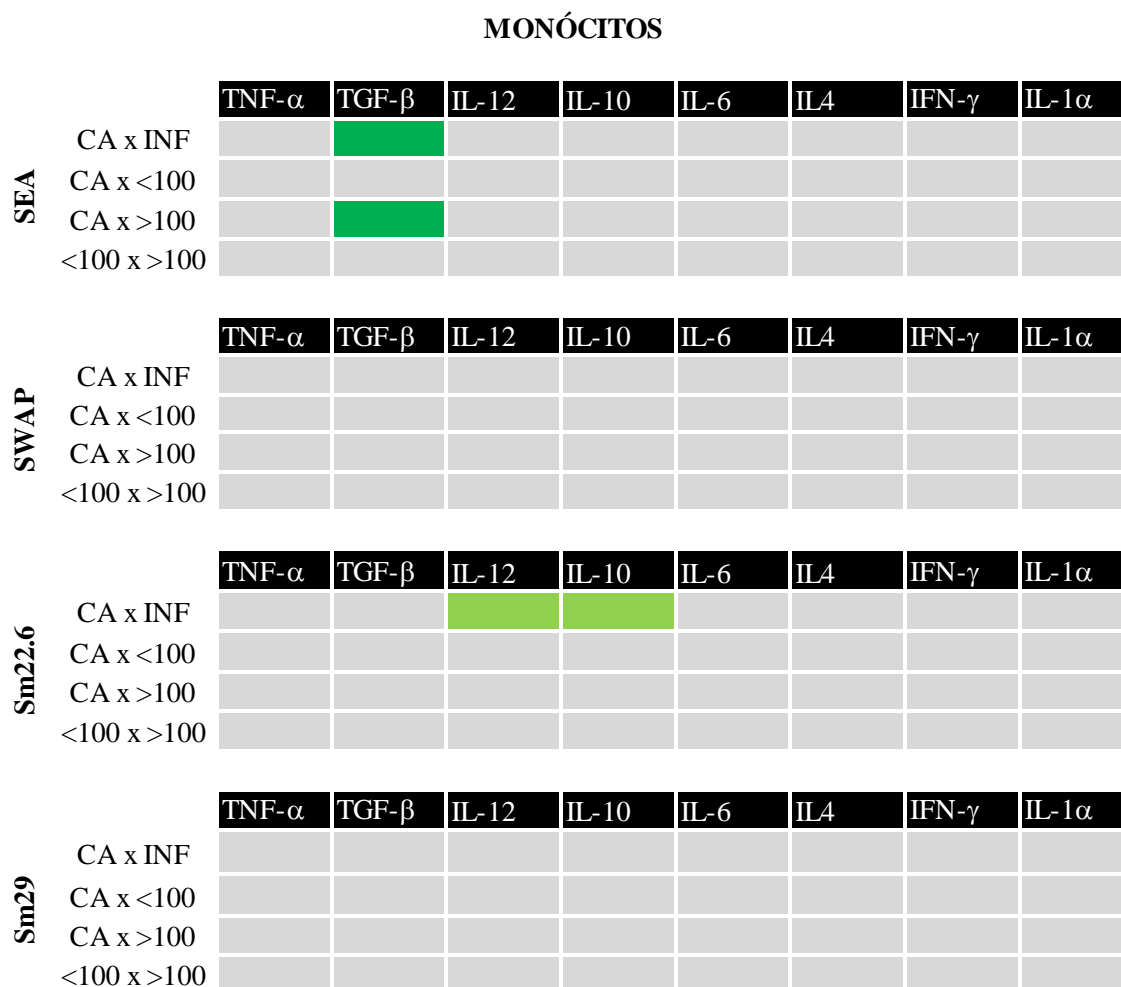
A comparação entre grupos após estimulação com SEA mostrou um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 do grupo INF (TNF- $\alpha$ : 0,58%  $\pm$  0,55 de células; IL-12: 0,56%  $\pm$  0,39 de células) em relação ao grupo CA (TNF- $\alpha$ : 0,14%  $\pm$  0,13 de células; IL-12: 0,54%  $\pm$  0,52 de células). Após estimulação com SWAP houve uma redução na produção de IL-5 no grupo INF (0,40%  $\pm$  0,28 de células) em relação ao CA (0,70%  $\pm$  0,43 de células). Houve um aumento na produção de IL-8 no grupo <100 estimulado com SEA (2,17%  $\pm$  0,94 de células), SWAP (2,46%  $\pm$  0,90 de células) e Sm22.6 (3,14%  $\pm$  2,37 de células) comparados aos grupos >100 estimulados com SEA (1,17%  $\pm$  0,77 de células), SWAP (1,46%  $\pm$  0,64 de células) e Sm22.6 (1,44%  $\pm$  0,89 de células) respectivamente. Os resultados das demais citocinas (IL-4, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ ) não foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 27:** Perfil de citocinas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100, >100) e do grupo controle de área endêmica (CA) foram cultivados *in vitro* por 12 h na ausência (Meio) e na presença de estimulação antigênica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29) e analisados em ensaios de imunofenotipagem celular para detecção de citocinas intracelulares. Os resultados estão expressos como média do percentual de células positivas para as citocinas avaliadas (IL-17 IL-12, IL-10, IL-8, IL-5, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) na população de linfócitos, mais desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos avaliados dentro de um mesmo estímulo em relação ao grupo CA estão representadas pela letra (a), as diferenças entre grupos dentro de um mesmo estímulo, são representadas pelas letras (c e d) equivalentes as diferenças encontradas entre <100 e >100, respectivamente.

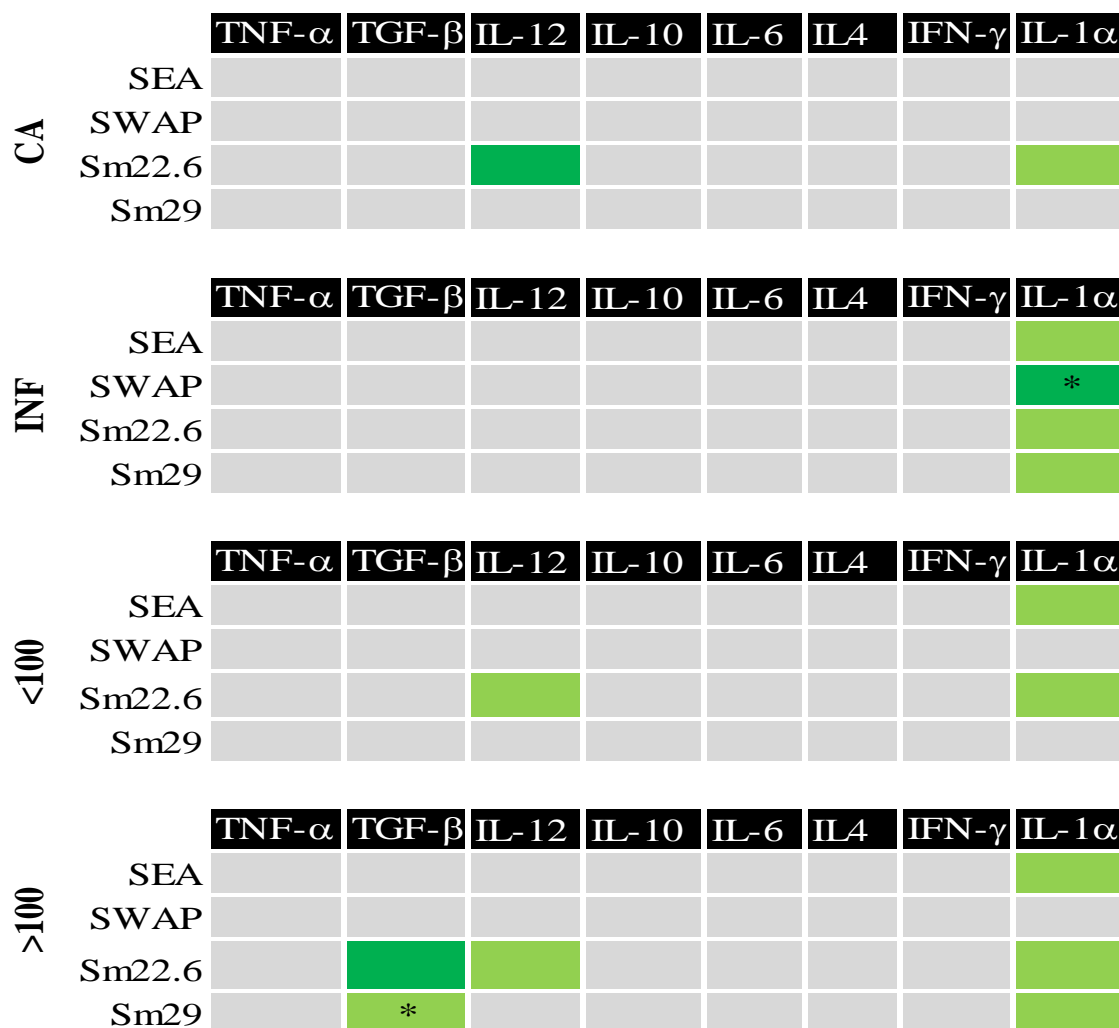
### 5.16 Principais alterações do perfil de citocinas intracelulares produzidas após estimulação *in vitro*

As Figuras 28 a 32 mostram diagramas com as principais diferenças encontradas para o perfil de citocinas intracelulares nos grupos do estudo após estimulação antigênica.



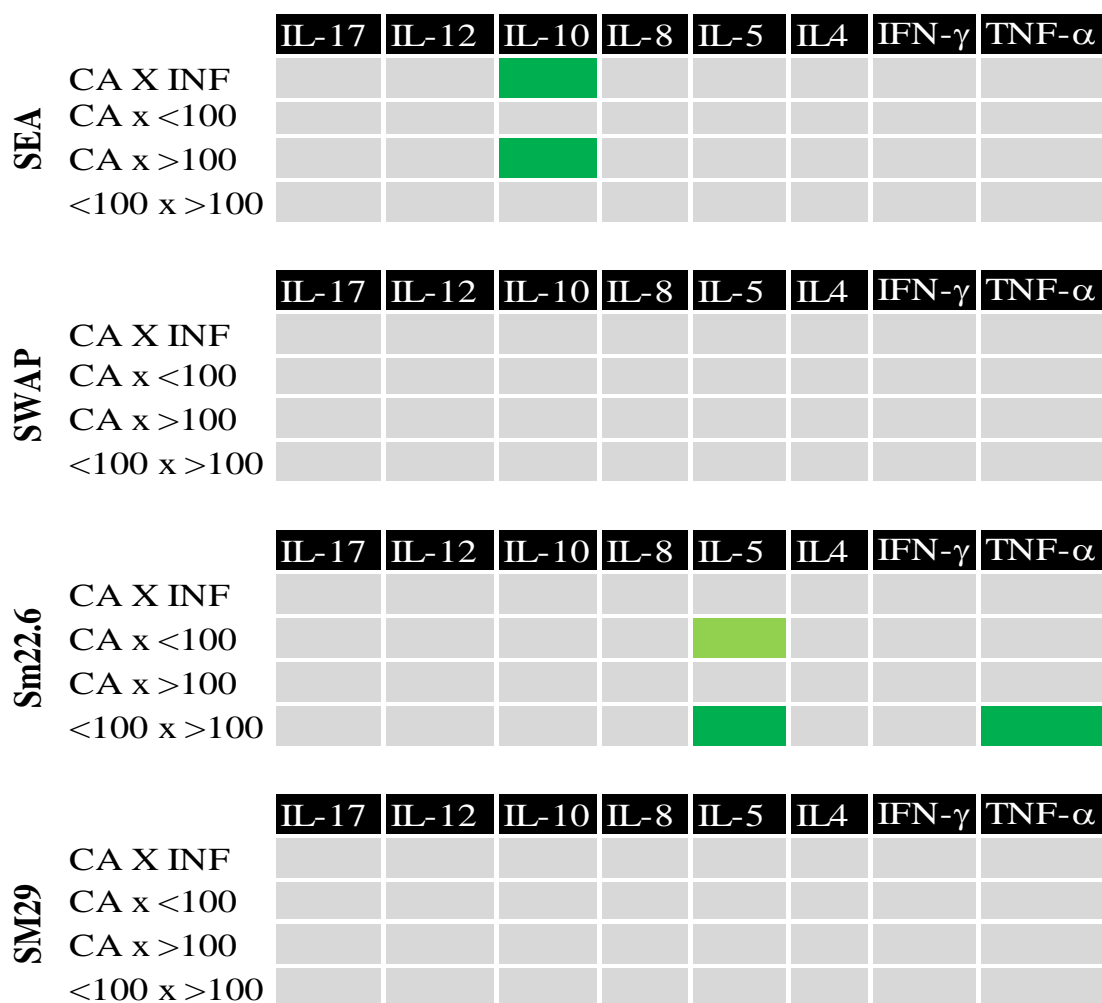
**Figura 28:** Principais alterações nas citocinas sintetizadas por monócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29). Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao grupo CA; os quadrantes verdes claro representam redução em relação ao CA. O diagrama foi organizado considerando-se grupos diferentes sob mesmo estímulo.

## MONÓCITOS



**Figura 29:** Principais alterações nas citocinas sintetizadas por monócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29). Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao meio; os quadrantes verdes claro representam redução em relação ao meio. O quadrante verde escuro com um asterisco representa aumento de IL-1 $\alpha$  em relação ao SEA e Sm22.6 dentro do grupo INF; o quadrante verde claro com um asterisco representa redução na produção de TGF- $\beta$  em relação a estimulação com Sm22.6 dentro do grupo >100. O diagrama foi organizado considerando-se grupos iguais sob estímulos diferentes.

### LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>



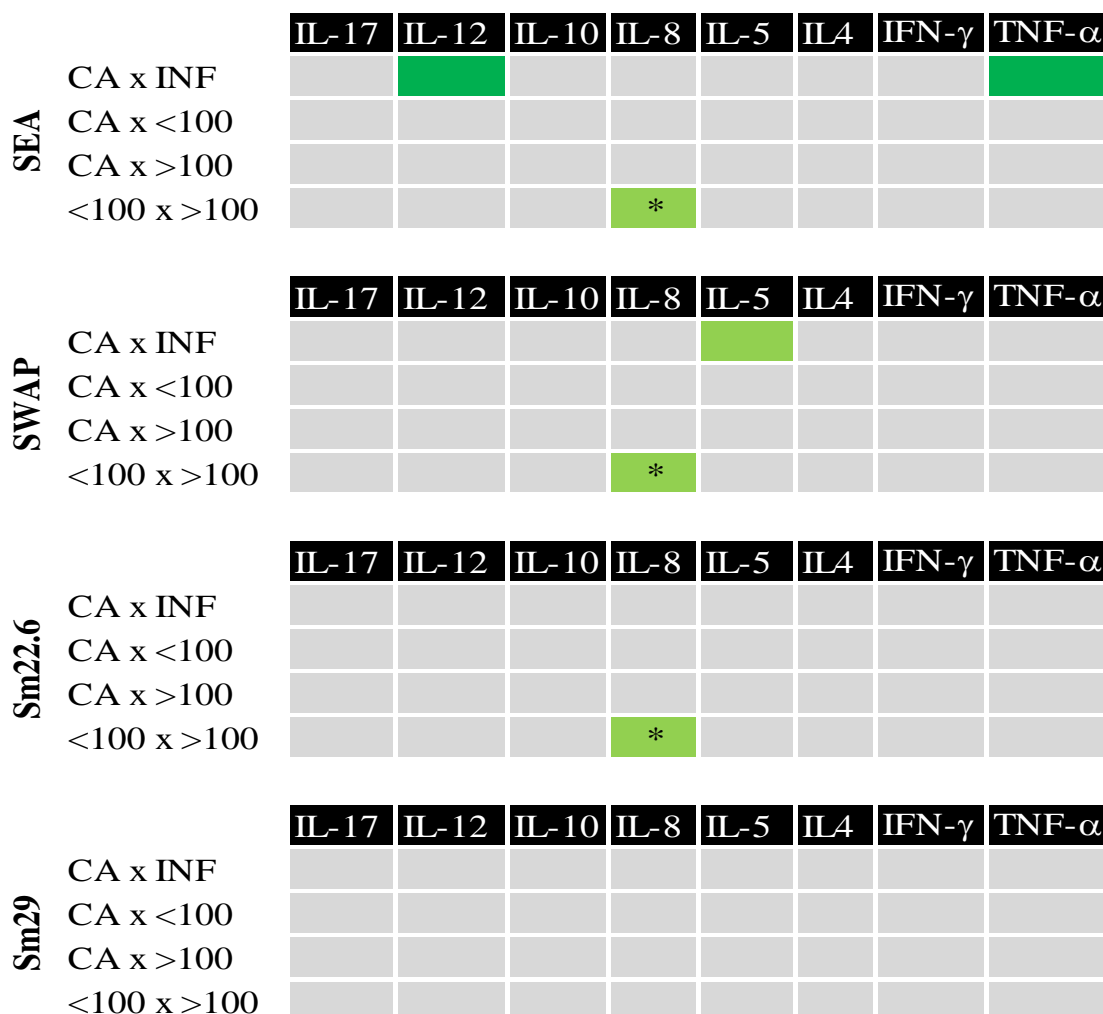
**Figura 30:** Principais alterações nas citocinas produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29). Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao grupo CA; o quadrante verde claro representa redução em relação ao CA. O diagrama foi organizado considerando-se grupos diferentes sob mesmo estímulo.

### LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>

		IL-17	IL-12	IL-10	IL-8	IL-5	IL4	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
CA	SEA								
	SWAP								
	Sm22.6								
	Sm29								
INF	SEA								
	SWAP								
	Sm22.6								
	Sm29							*	
<100	SEA								
	SWAP		*						
	Sm22.6								
	Sm29								
>100	SEA								
	SWAP								
	Sm22.6								
	Sm29					*			

**Figura 31:** Principais alterações nas citocinas produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29). Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao meio; os quadrantes verdes claro com um asterisco representam redução na produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-5 em relação à estimulação com SEA dentro do grupo INF, <100 e >100, respectivamente. O diagrama foi organizado considerando-se grupos iguais sob estímulos diferentes.

## LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup>



**Figura 32:** Principais alterações nas citocinas produzidas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), categorizados por cargas parasitárias distintas (<100 e >100) e do grupo controle de área (CA) após estimulação antigênica específica (SEA, SWAP, Sm22.6 e Sm29). Os quadrantes verdes escuro representam aumento em relação ao grupo CA; o quadrante verde claro representa redução em relação ao grupo CA; o quadrante verde claro com um asterisco representa redução na produção de IL-8 no grupo >100 em relação ao grupo <100, estimulados com SEA, SWAP e Sm22.6. O diagrama foi organizado considerando-se grupos diferentes sob mesmo estímulo.

### ***5.17 Principais alterações celulares que conferem resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni****

Após a realização do trabalho, foram verificadas as principais alterações nas subpopulações celulares que estariam envolvidas no processo de resistência e susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni* conforme mostra a **Figura 33**.

Em indivíduos dos grupos CA e <100, a resistência estaria relacionada ao aumento da síntese de IL-12 em monócitos após a estimulação com Sm22.6. A IL-12 levaria a um perfil de resposta Th1 resultando na morte do esquistossômulo. Nos indivíduos dos grupos INF e >100, a susceptibilidade estaria relacionada ao aumento da síntese de TGF- $\beta$  em monócitos após a estimulação com Sm22.6 e SEA. O TGF- $\beta$  por sua vez estaria induzindo um aumento na síntese de IL-10 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> culminando em um perfil de resposta do tipo Th2 relacionado à sobrevivência do esquistossômulo.

Paralelamente a estes mecanismos, os indivíduos resistentes à infecção estariam com um aumento na expressão do CD86 em linfócitos B. Os linfócitos B, por sua vez, seriam responsáveis por ativar os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, com aumento na expressão de CD54 e CD18 e síntese de IL-8, resultando na morte do esquistossômulo ou então na diminuição da carga parasitária.



	<i>Monócitos</i>	<i>Linfócitos B</i>	<i>Linfócitos T CD4<sup>+</sup></i>	<i>Linfócitos T CD8<sup>+</sup></i>
Resistência	↑ IL-12 (Sm22.6)	↑ CD86	↑ CD18	↑ CD18 e CD54 ↑ IL-8 (SEA, SWAP e Sm22.6)
Susceptibilidade	↑ TGF-β (Sm22.6 e SEA)		↑ IL-10 (SEA)	

**Figura 33:** Principais alterações nas populações de monócitos, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B que conferem resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. As setas azuis representam aumento da expressão do CD86, CD18, CD54 e síntese de IL-12 e IL-8 em indivíduos do grupo CA e <100 (resistentes à infecção). As setas vermelhas indicam aumento na síntese de TGF-β e IL-10 em indivíduos dos grupos INF e >100 (susceptíveis à infecção).



A esquistossomose continua sendo uma das doenças parasitárias mais prevalentes do mundo. Conhecida desde tempos antigos está atrás apenas da malária no que diz respeito ao número de pessoas infectadas e em risco de infecção. De acordo com estimativas, a doença causa anualmente cerca de 1,7 milhão de anos de vida de incapacidade ajustados (DALYs) (Utzinger et al. 2004; WHO, 2010). Usando notificações de casos de morte específicos, a OMS estima que 47.000 indivíduos morram todos os anos vítimas da doença (WHO, 2008).

Por ser uma doença crônica insidiosa, é pouco reconhecida nos estágios iniciais o que a torna uma ameaça ao desenvolvimento, uma vez que acomete homens e mulheres durante suas idades mais produtivas. A doença está relacionada à agricultura e ao contato com coleções hídricas. Considerada uma doença negligenciada, acomete principalmente indivíduos pobres que não possuem acesso ao saneamento ou a medidas preventivas efetivas (Engels et al., 2002).

A expansão da cobertura dos serviços da saúde e a incorporação de novas tecnologias de diagnóstico vêm permitindo a identificação dos velhos e novos quadros sindrômicos da doença. No entanto, toda a expansão tecnológica não foi suficiente para conter o crescimento espacial da doença no Brasil, apesar da redução das taxas de mortalidade e prevalência, dados frequentemente subestimados pela subnotificação (Bernardini et al., 1981; Carvalho et al., 1998).

A atual representação da esquistossomose no Brasil mostra que a endemia perdeu seu caráter eminentemente rural, ocorrendo, cada vez mais, em centros urbanos dos diversos estados do país, conforme Amorim et al. (1997) já apontavam na década de 1990. Estudo prospectivo realizado por Graeff-Teixeira et al. (2004) no período de 1997 a 2000, evidencia que a falta de infra-estrutura, a migração e o deslocamento de pessoas de áreas endêmicas para não endêmicas são fatores determinantes do surgimento de novos focos da doença.

Após a fase aguda, a infecção se cronifica. A fase crônica é o estágio de infecção usualmente presente na área endêmica, mas a maioria dos indivíduos é assintomática. Nesta fase a eliminação de ovos persiste e sua eliminação é praticamente estável (Chen & Mott, 1988). De acordo com Lambertucci et al. (2000) a infecção assintomática pode se tornar sintomática após exposição recorrente e re-infecção ou através da deposição contínua de ovos ao longo do tempo sem tratamento. Os sintomas em geral são fraqueza, fadiga, intestino irregular, dores abdominais e fezes sanguinolentas.

Estudos realizados examinando-se a morbidade da infecção esquistossomótica em humanos encontraram relações entre a intensidade da infecção, avaliada pelo número de ovos por grama de fezes, e a prevalência de variadas formas clínicas da doença (Arap-Siongok et al., 1976). A intensidade da infecção depende de fatores epidemiológicos como intensidade e frequência de exposição às águas contaminadas (Gazzinelli et al., 2001), e também fatores relacionados a idade (Butterworth et al., 1985; Gryseels, 1994), predisposição genética (Bethony et al., 1999; Dessein et al., 1992), além de fatores fisiológicos e imunológicos (Butterworth et al., 1985). No que se refere aos dados imunológicos, já foi reportado que PBMC produzem uma quantidade maior de IFN- $\gamma$  e IL-10 em indivíduos com a forma clínica intestinal da doença (King et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Contigli et al., 1999; Carvalho et al., 2008). O bloqueio da IL-10 em culturas de células de pacientes infectados pelo *S. mansoni* demonstraram que essa citocina contribui para a inibição da síntese de IFN- $\gamma$  (Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). Por outro lado, o aumento na síntese de IFN- $\gamma$  em culturas de PBMC foi observado em indivíduos com exame negativo para ovos do parasito residentes em áreas endêmicas para a doença (Viana et al., 1994).

A descoberta da imunidade contra a esquistossomose em humanos estimulou vários estudos voltados à resposta imune contra antígenos específicos do parasito os quais, se associados à resistência a re-infecção, poderiam se tornar candidatos imunogênicos para uma vacina efetiva (Corrêa-Oliveira et al., 1989). Apesar do desenvolvimento de uma vacina ser uma tarefa difícil, recentes avanços em biologia molecular, especialmente no campo do genoma, forneceram novas percepções sobre o desenvolvimento de uma vacina contra este complexo parasito (Verjovski-Almeida et al., 2004; Hu et al., 2004). Portanto, existe uma grande expectativa que tecnologias genômicas e proteômicas revelarão novos antígenos vacinais promissores. Além disso, estudos em área endêmica envolvendo indivíduos resistentes à infecção e re-infecção, são fundamentais nos testes envolvendo novos candidatos à vacina. A vacinação combinada à terapia como forma de controle da esquistossomose contribuiria significativamente para o controle da doença (Oliveira et al., 2008).

Os dados referentes ao perfil hematológico dos pacientes revelaram aumento no número de eosinófilos no sangue periférico do grupo INF e >100 em relação ao grupo CA (**Figura 9**). O número absoluto de eosinófilos no sangue periférico de indivíduos saudáveis varia de 40 a 600 células/mm<sup>3</sup> (Babapulle 2003), sendo, portanto, uma

população minoritária entre os leucócitos. Nesse estudo, os pacientes dos grupos INF e >100 apresentaram número significativamente maior de eosinófilos no sangue periférico. É importante ressaltar que, embora os grupos INF ( $236 \pm 140/\text{mm}^3$ ) e >100 ( $284 \pm 184/\text{mm}^3$ ) apresentassem níveis estatisticamente maiores de eosinófilos em relação ao grupo CA ( $119 \pm 85/\text{mm}^3$ ), esses valores encontram-se dentro dos valores de referência já descritos na literatura (Babapulle 2003, Failace 2003). Diferentes estudos têm demonstrado que os eosinófilos são células que produzem grande número de citocinas e fatores de crescimento e podem desempenhar papel importante na resposta imune em infecções helmínticas (Ganley-Leal et al. 2006, Reimert et al. 2006, Swartz et al. 2006). Além disso, em modelos experimentais, já foi demonstrada a importância dessas células no mecanismo de citotoxicidade *in vitro* contra o *S. mansoni* (Butterworth et al. 1974, Butterworth et al. 1975, Ramalho-Pinto et al. 1978, Veith & Butterworth 1983). Ovington & Behm (1997) demonstraram que entre os leucócitos, os eosinófilos são o tipo celular predominante em hospedeiros infectados por helmintos. Por outro lado, Klion & Nutman (2004) encontraram relação entre o número de eosinófilos e a intensidade da infecção por helmintos. De acordo com de Krömer et al. (1995), indivíduos com um maior dano tecidual teriam uma maior quantidade de eosinófilos com elevado grau de ativação. No entanto, indivíduos residentes em áreas endêmicas tendem a desenvolver menor eosinofilia em relação aos indivíduos não expostos a infecções prévias por helmintos (Moore & Nutman, 1998). Além disso, alguns medicamentos, como o praziquantel e o oxamniquine, usados no tratamento frequente desta patologia podem contribuir para a redução do número de eosinófilos em pacientes infectados (Nutman et al., 1986). Além do número de eosinófilos, houve um aumento em monócitos CD14<sup>+</sup> nos grupos INF e <100 em relação ao grupo CT (**Figura 10**). Estudos pioneiros realizados por Ellner & Mahmoud (1979) demonstraram a capacidade que os monócitos possuem em matar esquistossômulos, independentemente da ação de anticorpos, do sistema complemento e ativação por macrófagos.

Em relação aos outros parâmetros hematológicos analisados (hemoglobina, hematócrito, número de hemácias, número de plaquetas, VCM, HCM e CHCM) (**Figura 8**), bem como a análise do número de leucócitos e de suas subpopulações (neutrófilos, células NK, linfócitos e suas subpopulações de linfócitos T) (**Figuras 9, 10 e 11**), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Esta ausência de diferenças corrobora com estudos que relacionam a anemia na esquistossomose com

carência alimentar, condições de saúde precárias, e predominância de formas clínicas leves (Pessoa, 1956; Walker, 1956; Coutinho et al., 1972).

Sabe-se que uma resposta imune efetiva de células T é essencial para o desenvolvimento de uma resposta granulomatosa e, conseqüentemente, para a sobrevivência do hospedeiro. Além disso, indivíduos que não conseguem imunomodular uma resposta mediada por células T estariam aptos a desenvolver formas mais graves da doença (Cheng et al., 2008). Para isso, as células T necessitam de sinais co-estimuladores através de um ou mais receptores expressos em sua superfície. Uma das vias co-estimuladoras mais importantes é iniciada quando o CD28 presente na superfície de células T se liga às moléculas CD80 e CD86 presente na superfície de APC e linfócitos B (Vasu et al., 2003). No presente estudo, a avaliação do CD80 revelou um aumento da intensidade média de fluorescência em monócitos dos grupos CA, INF e >100 em relação ao grupo CT (**Figura 14A**). De acordo com Perez et al., (2008), o aumento da expressão do CD80 está relacionado à imunomodulação de linfócitos T com aumento da produção de IL-10 e IL-4, citocinas do Tipo 2 comuns em pacientes com a forma crônica da esquistossomose. Por outro lado, também houve um aumento na intensidade média de fluorescência da molécula CD86 em monócitos dos grupos CA, INF, <100 e >100 em relação ao grupo CT (**Figura 14B**) e dos grupos INF e <100 em relação ao CA (**Figura 14B**). O CD86 está relacionado à produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-2 e IFN- $\gamma$  (Perez et al., 2008). Ambos os receptores atuam de maneira concomitante na resposta imune, estimulando a proliferação de células T, produção de citocinas e geração de linfócitos T citotóxicos (Lanier et al., 1995). Estes resultados confirmam estudos que demonstraram a capacidade funcional dos marcadores CD80 e CD86 em potencializar a resposta imune mediada por células T (Azuma et al., 1993; Freeman et al., 1993). O presente estudo também avaliou a expressão das moléculas CD80 e CD86 em Linfócitos B (CD19<sup>+</sup>). Houve um aumento na intensidade média de fluorescência de CD80 no grupo <100 em relação ao CT (**Figura 15A**) e do CD86 nos grupos CA e <100 em relação ao grupo CT (**Figura 15B**). O papel dos linfócitos B na regulação da esquistossomose ainda é pouco conhecido (Pearce & McDonald, 2002). Contudo, estudos realizados por Hernandez et al. (1997) em modelos murinos mostram que as células B são essenciais para a indução de uma resposta do Tipo 2 durante a infecção. Estudos realizados por Jankovic et al. (1999) mostraram que uma vacinação efetiva contra a esquistossomose envolveria a estimulação simultânea da imunidade mediada por células T e da imunidade humoral.

Em modelos onde a interação entre células T e B está comprometida pela deleção dos receptores CD80 e CD86 foi observado ausência de resposta imune após estimulação antigênica (Lanier et al., 1995; Kasprovicz et al., 2000). A partir deste trabalho, pode-se inferir que esta expressão dos receptores CD80 e CD86 seria um dos fatores que estaria associado a uma menor intensidade de infecção, uma vez que essas moléculas estão relacionadas a uma maior ativação de APC. Neste contexto, é possível deduzir que o aumento da expressão dessas moléculas, juntamente com o diminuição da síntese das citocinas IL-12 e IL-1 $\alpha$  frente à estimulação antigênica, está contribuindo para a imunomodulação da resposta imune do Tipo 2 nos grupos com esquistossomose crônica, comum inclusive em indivíduos moradores de áreas endêmicas.

As células B exercem um papel central na resposta imune humoral, pois regulam a resposta mediada por células T CD4<sup>+</sup> contra antígenos exógenos e próprios (Bouaziz et al., 2007; Xiu et al., 2008), funcionam como células apresentadoras de antígenos, (Constant et al., 1995), produzem citocinas (Harris et al., 2000), fornecem efeitos co-estimuladores (Linton et al., 2003) e promovem, juntamente com as células dendríticas, a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células do Tipo 1 e/ou Tipo 2 (Harris et al., 2000). Estudos realizados por Mizoguchi et al (2002), mostraram que as células B reguladoras exercem efeito imunomodulador em inflamações intestinais crônicas. De acordo Yanaba et al., (2008), o receptor CD5, responsável por evitar autoimunidade, e o CD1d, responsável por apresentar antígenos lipídicos às células T, regulam os processos inflamatórios mediados por células T, através de secreção de IL-10. Partindo deste pressuposto, o trabalho avaliou a expressão destes dois receptores em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) expressando a molécula de adesão CD62L e a co-estimuladora CD40 (**Figuras 19 e 20** respectivamente). Porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre elas. No presente estudo, foi avaliada também a intensidade média de fluorescência dos marcadores CD5 e CD86 em linfócitos B expressando CD43. De acordo com Martin & Kearney (2001), os linfócitos B que expressam o CD43 são células que possuem grande resposta a antígenos lipopolissacárides e geram rápida resposta nos primeiros estágios da resposta imune. Apesar disso, não foram encontradas diferenças significativas na expressão dos receptores CD5 e CD86 em células B reguladoras com o perfil anteriormente descrito (**Figura 21**).

No presente estudo, foi observado aumento na intensidade média de fluorescência do receptor do tipo Toll 2 em monócitos (CD14<sup>+</sup>) nos grupos CA, INF, <100 e >100 em relação ao grupo CT (**Figura 13**). De acordo com Yang et al. (1998) os

receptores do tipo Toll 2 desempenham um papel muito importante na resposta imune inata contra patógenos de natureza lipopolissacáride, sendo expresso principalmente em macrófagos e monócitos. Estudos indicam que os componentes do *S. mansoni* interagem com os receptores do tipo Toll exercendo papel importante na indução de uma resposta do Tipo 2 (Okano et al., 1999; Okano et al., 2001; Thomas et al., 2003), na qual se encontra a maioria dos indivíduos de área endêmica que desenvolvem a fase crônica assintomática (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999).

As células NK são linfócitos efetores do sistema imune inato que controlam vários tipos de infecções microbianas limitando sua disseminação e, conseqüentemente, dano tecidual (Vivier et al., 2008). A resposta das células NK depende do efeito das citocinas presentes no microambiente, bem como da interação com outras células do sistema imune, como linfócitos T, células dendríticas e macrófagos (Long, 2007). Citocinas do Tipo 1 como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-15 e IL-18 são potentes ativadores das funções efectoras das células NK (Walzer et al., 2005). Estudos realizados por Mallevaey et al. (2006) demonstraram que células NK presentes no fígado se tornam ativas e proliferam na presecção de antígenos de *S. mansoni*, produzindo grande quantidade de INF- $\gamma$  e IL-4. Estes dados sugerem que células NK desempenham papel importante na resposta imune adquirida durante a esquistossomose (Mallevaey et al., 2006). Partindo deste pressuposto, avaliou-se a porcentagem de células NK, bem como a expressão dos receptores NKp46 e NKp80, que contribuem para a lise de células infectadas e produção de citocinas (Mallevaey et al., 2006), além da expressão do receptor do tipo Toll 2 no sangue periférico dos diversos grupos. Apesar disto, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados (**Figuras 10, 12 e 13**). Estudos realizados por Benarroch et al. (1988) demonstraram que pacientes com esquistossomose crônica apresentaram redução significativa na atividade das células NK em comparação com indivíduos com infecção recente, o que justifica os resultados apresentados neste trabalho.

As células T CD8<sup>+</sup> também mostraram um aumento na intensidade média de fluorescência para o receptor Toll 2 nos grupos INF, <100 e >100 em relação ao grupo CT (**Figura 13**). Cottalorda et al. (2009) demonstraram a importância desse receptor no processo de proliferação e produção de citocinas por parte das células T CD8<sup>+</sup> e sua diferenciação em células de memória. Estes dados complementam estudos anteriores apresentados por diversos autores que indicam um aumento na população relativa de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e uma redução no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico



de pacientes portadores da fase crônica da esquistossomose (Martins-Filho et al., 1997; Kalinkovich et al., 1998; Borkow et al., 2000; Oliveira Prado et al., 2009).

As células dendríticas residem em um estado imaturo até o contato com antígenos de diversas naturezas e estão envolvidas tanto na resposta inata quanto adquirida, exercendo um elo entre as duas respostas (Banchereau & Steinman, 1998). O processo de maturação das células dendríticas é convencionalmente associado ao MHC de classe II e a expressão de moléculas co-estimuladoras presentes na superfície da célula, mas também é dependente do tipo de estímulo microbiano, o que podem direcionar as células dendríticas a fenótipos distintos (D'Ostiani et al., 2000; de Jong et al., 2002). Van Liempt et al. (2007) demonstraram que antígenos solúveis do ovo (SEA) se ligam fortemente as células dendríticas via receptor do tipo Toll 2 impedindo sua ativação, o que não acontece em monócitos e linfócitos do sangue periférico. Este fato pode explicar a ausência de diferenças estatisticamente significativas nos marcadores das células dendríticas avaliados durante o estudo atual (**Figura 13**), embora a avaliação de marcadores adicionais de ativação de células dendríticas poderiam auxiliar a compreender melhor o papel dessas células no contexto dos mecanismos de resistência e susceptibilidade durante a infecção esquistossomótica.

No presente estudo, foi observado um aumento da intensidade média de fluorescência da molécula de adesão CD54 em monócitos CD14<sup>+</sup> nos grupos CA, INF, <100 e >100 em relação ao grupo CT (**Figura 16A**). Houve também um aumento na expressão da molécula de ativação HLA-DR em monócitos, no grupo >100 em relação ao grupo CA (**Figura 16B**). Podemos inferir de acordo com estes dados que o CD54 pode estar aumentando o recrutamento dos monócitos para o sítio de infecção. Além disso, em indivíduos com alta carga parasitária (grupo >100) poderia ocorrer um aumento da apresentação de antígenos para células T CD4<sup>+</sup> auxiliares via MCH de classe II. De acordo com Ziegler-Heitbrock. (1996), monócitos que possuem expressão elevada de HLA-DR seriam APC mais efetivas. Além disso, o HLA-DR está associado a uma forte resposta imune inflamatória com elevada síntese de IFN- $\gamma$  (Torrinhas et al., 2011).

No presente estudo foi avaliada também a intensidade média de fluorescência das moléculas de adesão celular CD18, CD54 e CD62L em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> presentes no sangue periférico. Tanto para linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto para linfócitos T CD8<sup>+</sup> houve um aumento na expressão do CD18 no grupo <100 em relação ao grupo CT, CA e >100. Além disso, houve aumento na expressão desse marcador no grupo CA

em relação ao grupo CT (**Figuras 17B e 18C**). Para a molécula CD54 em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, houve aumento nos grupos CA, INF e <100 em relação ao grupo CT e aumento do grupo INF em relação ao grupo >100, além de redução nos grupos INF e >100 em relação ao grupo CA (**Figura 18A**). A molécula CD62L não sofreu alteração em nenhum dos grupos avaliados (**FIGURAS 17A e 18B**). Interações entre o *S. mansoni* e o seu hospedeiro vertebrado envolve contato direto entre o parasito e suas células, necessitando de etapas de adesão célula-parasito (Butterworth et al., 1979). Trabalhos realizados com pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mostraram aumento da expressão de CD18 e CD54 em eosinófilos (Silveira-Lemos et al., 2006). O recrutamento de linfócitos 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). Neste contexto, é possível especular que o aumento dessas moléculas na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> está contribuindo para o processo de ativação celular e posterior migração dessas células ativadas para o foco inflamatório. O aumento da expressão das moléculas de adesão, ativação e co-estimulação no grupo CA em relação ao grupo CT observados neste trabalho estão de acordo com estudos realizados por Corrêa-Oliveira et al. (1989), que observaram que indivíduos residentes em áreas endêmicas possuem resposta imune semelhante à resposta desencadeada por indivíduos infectados, após estimulação antigênica apesar de apresentarem exames parasitológicos de fezes persistentemente negativos. Por isso, a análise da resposta imune nestes indivíduos é de suma importância para compreender os mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção esquistossomótica.

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).

A partir deste pressuposto, buscou-se avaliar a síntese de citocinas, através da reatividade celular de monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> frente à estimulação *in vitro* com antígenos brutos (SEA e SWAP) e recombinantes (Sm22.6 e Sm29) do *S. mansoni*.

A resistência à re-infecção 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-13, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-9 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 (Colley, 1975; Pearce & Macdonald, 2002; Teixeira-Carvalho et al., 2008). Por outro lado, a resposta do Tipo 1 é caracterizada pelo aumento da expressão de IFN- $\gamma$ , linfócitos TCD8<sup>+</sup>, neutrófilos, macrófagos e produção de anticorpos. A resposta do Tipo 1 de acordo com Cardoso et al. (2008) estaria associada a uma resistência protetora induzida por imunização, principalmente pelo aumento da expressão de IFN- $\gamma$ . 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).

Já se encontra bem estabelecido que a maioria dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose e que desenvolvem uma fase crônica assintomática apresentam uma resposta do Tipo 2, caracterizada predominantemente pela presença de IL-4 e IL-5 (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999; Teixeira-Carvalho et al., 2008). A intensidade da infecção é um dos fatores que pode alterar a severidade da infecção crônica esquistossomótica. Contudo, a predisposição genética do indivíduo parece tão importante quanto à intensidade da infecção para o desenvolvimento da doença (Dessein et al., 1999; Mohamed-Ali et al., 1999).

Antígenos solúveis do ovo (SEA) do *S. mansoni* são fortes ativadores da resposta Tipo 2, estando associados a aumentos dos níveis séricos de IgE bem como eosinofilia no sangue periférico e nos tecidos em modelos animais e humanos (Grzych et al., 1991; Lukacs et al., 1999). SEA contém oligossacarídeos que direcionam a ativação de células, induzindo linfócitos B a produzir IL-10, o que contribuiria para a imunomodulação de células T CD4<sup>+</sup> (Ko et al., 1990; Velupillai., 1997). No presente estudo, verificou-se a capacidade do SEA de induzir uma resposta imune modulada, principalmente por meio do aumento da síntese de IL-10 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TGF- $\beta$  em monócitos dos grupos INF e >100 em relação ao grupo CA. Estudos realizados por Alves-Oliveira et al. (2006), avaliando grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose hepática, mostraram que altos níveis de TGF- $\beta$  parecem estar relacionados à proteção contra fibrose, principalmente quando associada com aumento da síntese de

IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> (Kitani et al., 2003; Hesse et al., 2004). Os indivíduos infectados, independentemente da carga parasitária, no presente estudo, tiveram uma menor síntese de IL-1 $\alpha$ , por monócitos, após estimulação específica por SEA. A IL-1 $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória do Tipo 1 responsável pela síndrome de Katayama em humanos durante a fase aguda da esquistossomose (de Jesus et al., 2002). Além disso, altos níveis de IL-1 $\alpha$  estão relacionados à fibrose hepática severa e mau prognóstico para a doença (Coutinho et al., 2005). A redução na síntese de IL-1 $\alpha$  anteriormente descrita é um indicador de que uma resposta imunomoduladora estaria ocorrendo nestes indivíduos durante a infecção. Por outro lado, foram encontrados níveis elevados de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos do grupo >100 estimulados com SEA em relação ao meio. Estudos realizados por Teixeira-Carvalho et al. (2008), mostraram que pacientes com a forma clínica intestinal apresentavam maior quantidade de células sintetizando IFN- $\gamma$ . Estes dados estão de acordo com resultados recentes que mostram que a supressão da hipersensibilidade do tipo tardia requer aumento na síntese de IFN- $\gamma$  para um efetivo funcionamento das células reguladoras (Cone et al., 2007), além de contribuir para uma resposta imune protetora durante a infecção crônica. De acordo com estudos realizados por Caldas & Campi-Azevedo (2008), pacientes com a forma hepatoesplênica possuem níveis de IFN- $\gamma$  menores do que os pacientes com a forma clínica intestinal. Estudos sugerem que o IFN- $\gamma$  possui um papel importante na regulação da atividade de fibroblastos e na síntese de colágeno (Kovacs, 1991); os baixos índices desta citocina nas formas mais severas da doença explicam o aumento da fibrose e cicatrizes teciduais nestes indivíduos (Czaja et al., 1989). No presente estudo foi observado aumento na produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do grupo INF estimulado com SEA em relação ao grupo CA. De acordo com Hesse et al. (2008), estas citocinas do Tipo 1 juntamente com o IFN- $\gamma$  são responsáveis por inibir a ação da IL-13, citocina do Tipo 2 principal responsável pela fibrose hepática. Os resultados dessa análise mostraram que SEA provoca uma resposta do tipo mista Tipo 1/Tipo 2 em indivíduos infectados, contribuindo para imunomodulação e diminuição da fibrose. Esses dados corroboram com aqueles anteriormente publicados pelo grupo (Teixeira-Carvalho et al., 2008).

O presente estudo também avaliou o perfil de citocinas produzidas a partir da estimulação com antígenos solúveis do verme adulto (SWAP). Em linfócitos T CD4<sup>+</sup> houve redução na produção de IL-12 no grupo <100 em relação aos indivíduos

estimulados com SEA no mesmo grupo. Além disso, houve aumento na produção de IL-1 $\alpha$  por monócitos estimulados com SWAP em relação ao SEA e Sm22.6 no grupo INF. Estes dados sugerem que o SWAP exerce menor efeito deletério na formação do granuloma, uma vez que o IL-12 é um importante modulador da resposta imune (Hoffmann et al., 2000) e IL-1 $\alpha$  uma citocina pró-inflamatória associada à fibrose severa (Coutinho et al., 2005). Por outro lado, houve menor produção de IL-5 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em indivíduos do grupo INF estimulados com SWAP em relação ao grupo CA. A IL-5 é necessária para o recrutamento de eosinófilos na resposta granulomatosa. Eosinófilos são uma importante fonte de citocinas do Tipo 2, principalmente IL-13. Portanto, IL-5 contribuiria indiretamente para a polarização da resposta imune através do recrutamento destas células (Rumbley et al., 1999; Reiman et al., 2006). A migração de eosinófilos para o sítio granulomatoso sugere, em modelos murinos e humanos, que estas células são importantes no contexto da doença. Embora o papel preciso desse tipo celular esteja ainda pouco determinado (Swartz et al., 2006; Lins et al., 2008), estudos realizados por Silveira-Lemos et al. (2008) demonstraram que os eosinófilos podem existir em diferentes estágios de ativação e serem fonte para uma variedade de citocinas e fatores de crescimento durante a infecção esquistossomótica e, portanto, exerceriam efeitos tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios, além de efeitos imunorreguladores.

No presente estudo foi avaliado o perfil de citocinas produzidas por PBMC, através da estimulação pela proteína Sm22.6 baseado no efeito imunomodulador que esta proteína exerce em modelos experimentais (Cardoso et al., 2010). A Sm22.6 foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 $\alpha$  em monócitos de pacientes dos grupos CA, INF, <100 e >100 em relação ao meio sem estímulo. A Sm22.6 aumentou a síntese de IL-12 em monócitos de pacientes do grupo CA em relação ao meio. Porém, ao avaliar os indivíduos com cargas parasitárias distintas, verificou-se um aumento da produção de TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos do grupo >100 em relação ao grupo <100, fato semelhante foi observado com a produção de IL-5 nos mesmos grupos sob estimulação por Sm22.6. No entanto, a produção de IL-5 foi menor no grupo <100 em relação ao grupo CA sob mesma estimulação com Sm22.6. Outro achado interessante foi a redução das citocinas IL-12 e IL-10 em monócitos de indivíduos do grupo INF em relação ao grupo CT, sob estimulação pela Sm22.6. Cabe ressaltar que, a Sm22.6 foi capaz de aumentar os níveis de TGF- $\beta$  do grupo >100 em relação ao meio. A

estimulação com Sm22.6 parece promover a regulação da resposta inflamatória inata independente do status de infecção do paciente, sendo mais evidente seu efeito regulador nos indivíduos com maior carga parasitária, onde não só diminui o percentual de monócitos produtores de citocinas inflamatórias, como a IL-1 $\alpha$ , mas também aumenta o percentual de produtores de citocinas reguladoras como TGF- $\beta$ . Além disso, essa imunomodulação está associada à indução de uma resposta do Tipo 2, independentemente do status de infecção do paciente, fundamental na proteção contra helmintos (Pearce et al., 2004).

Curiosamente, no presente estudo, observou-se que as proteínas de SEA, de SWAP e a Sm22.6 induziram uma menor síntese de IL-8 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos pacientes do grupo >100 em relação ao grupo <100. De acordo com Skov et al. (2008), a expressão de IL-8 está presente em inúmeras doenças inflamatórias, caracterizadas pelo acúmulo de neutrófilos ativados em áreas lesionadas. Em diversas doenças inflamatórias envolvendo modelos animais, a neutralização de IL-8 inibiu a função dos neutrófilos, diminuindo a resposta inflamatória (Sekido et al., 1993; Broaddus et al., 1994). Dessa forma, a manutenção da atividade da IL-8, seria um fator importante associado à mecanismos de resistência à infecção deve ser considerada durante uma possível imunização contra esquistossomose.

A proteína Sm29, outra candidata promissora para o desenvolvimento de uma vacina, em estudos realizados por Cardoso et al. (2006) induziu elevada expressão de anticorpos IgG1 e IgG3 em soro de indivíduos resistentes à infecção e reinfeção, uma vez que estas subclasses de anticorpos estão relacionadas com a morte do parasito. A partir destes estudos, foi avaliada a expressão de citocinas em leucócitos do sangue periférico estimulados *in vitro* com Sm29. No presente estudo foi verificada redução na produção de IL-1 $\alpha$  por monócitos no grupo INF e >100 em relação ao meio. Além disso, houve uma redução da produção de TGF- $\beta$  no grupo >100 estimulado com Sm29 em relação à estimulação com Sm22.6 no mesmo grupo. Ao avaliar a produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi verificada redução na produção de IFN- $\gamma$  no grupo INF estimulado com Sm29 em relação à estimulação com SEA; a produção de IL-5 também foi menor no grupo >100 estimulado com Sm29 em relação à estimulação com SEA no mesmo grupo. Estes resultados sugerem que a Sm29 induz uma menor síntese de citocinas responsáveis pelos processos fibróticos em indivíduos infectados. A redução do IFN- $\gamma$  está de acordo com observações realizadas por Zwingenberger et al.

(1989) que associou uma redução generalizada desta citocina em pacientes portadores da infecção esquistossomótica, que após cura quimioterápica retornava aos níveis normais.

## **7 CONCLUSÃO**



Após a realização desse trabalho, pode-se concluir que indivíduos portadores da fase crônica e residentes em área endêmica para a doença apresentam forte expressão de moléculas co-estimuladoras, de adesão e de ativação celular em monócitos, linfócitos B, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, sugerindo que estes indivíduos possuam intensa atividade das células envolvidas na resposta imune contra a infecção pelo *S. mansoni*.

De uma maneira geral, os indivíduos infectados apresentaram, após estimulação antigênica com antígenos recombinantes, redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias e aumento da síntese de citocinas reguladoras tanto para monócitos quanto para linfócitos, mostrando a capacidade que esses antígenos possuem em induzir modulação da resposta imune relacionada à resistência à infecção e menor gravidade da doença. Além disso, a Sm22.6 mostrou-se promissora quanto ao desenvolvimento de uma vacina por induzir um perfil de resposta relacionado a resistência à infecção, principalmente contra os estágios iniciais de vida do parasito. A categorização da população estudada, segundo intensidades de infecção distintas, definiu a contribuição dessa variável para os mecanismos de resistência e susceptibilidade durante a infecção esquistossomótica.

## **8 ANEXOS**

## 8.1 Questionário demográfico e socioeconômico

1. Data da entrevista: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

2. Entrevistador: \_\_\_\_\_

3. Número de cadastro da casa: \_\_\_\_\_

4. Número de identificação da pessoa entrevistada: \_\_\_\_\_

5. Preencher os dados relacionados a:

ID	Nome	Sexo	Relação de parentesco com o chefe da família	Data de nascimento	Local de nascimento	Escolaridade	Ocupação	Tempo de moradia no local	Data do último tratamento para esquistossomose

6. Número de pessoas que residem na casa: \_\_\_\_\_

7. Renda mensal: \_\_\_\_\_

8. Auxílio financeiro do governo federal, estadual ou municipal:

- |                  |     |               |     |
|------------------|-----|---------------|-----|
| 1) Bolsa Família | ( ) | 4) PETI       | ( ) |
| 2) Fome Zero     | ( ) | 5) Vale gás   | ( ) |
| 3) Escola        | ( ) | 6) Não recebe | ( ) |

**9. Você possui:**

- |                                      |   |   |
|--------------------------------------|---|---|
| <input type="checkbox"/> Rádio       | <input type="checkbox"/> Geladeira              | <input type="checkbox"/> Carro                |
| <input type="checkbox"/> Som         | <input type="checkbox"/> Batedeira              | <input type="checkbox"/> Motocicleta          |
| <input type="checkbox"/> TV          | <input type="checkbox"/> Liquidificador         | <input type="checkbox"/> Bicicleta            |
| <input type="checkbox"/> Vídeo (VCR) | <input type="checkbox"/> Máquina de lavar roupa | <input type="checkbox"/> Outros (especificar) |
- 

**10. Tipo de parede da casa:**

- 1) Madeira ( )
- 2) Adobe ( )
- 3) Tijolo ( )
- 4) Taipa ( )
- 5) Outros ( )

**11. Tipo de telhado da casa:**

- 1) palha ( )
- 2) amianto ( )
- 3) telha ( )
- 4) lage ( )
- 5) outros ( )

**12. Tipo de piso da casa:**

- 1) cimento ( )
- 2) cerâmica ( )
- 3) terra batida ( )
- 4) outros ( )

**13. Energia elétrica:**

- Sim       Não

**13.1 Se não, como é feita a iluminação da casa:**

- 1) Lâmpada a óleo diesel ( )
- 2) Lâmpada a querosene ( )
- 3) Lâmpada a gás de cozinha ou aladim ( )
- 4) Vela ( )

**14. Origem da água que vocês utilizam na casa:**

- 1) Rio ( )
- 2) Córrego ( )
- 3) Cisterna ( )
- 4) Poço artesiano ( )
- 5) Outros ( )

---

**15. Destino das eliminações:**

- 1) Mato ( )
- 2) Fossa seca (casinha) ( )
- 3) Vaso com descarga para fossa ( )
- 4) Vaso com descarga canalizada para o rio ou córrego ( )

**16. Número de cômodos na casa:** \_\_\_\_\_

**17. Tipo de fogão:**

- 1) Fogão a gás ( )
- 2) Fogão a lenha ( )
- 3) Ambos ( )

**18. Vende produtos agrícolas:** \_\_\_\_\_

**18.1 Valor em R\$ que recebe com a venda de produtos agrícolas por ano:** \_\_\_\_\_

**O ENTREVISTADOR DEVE AVALIAR A CASA QUANTO A:**

**19. Qualidade:**

(1) ruim \_\_\_\_ (2) média \_\_\_\_ (3) boa \_\_\_\_ (4) muito boa \_\_\_\_ (5) excelente \_\_\_\_

**20. Limpeza interna:**

(1) Muito suja \_\_\_\_ (2) Suja \_\_\_\_ (3) Média \_\_\_\_ (4) Limpa \_\_\_\_ (5) Muito limpa \_\_\_\_

**21. Limpeza externa:**

(1) Muito suja \_\_\_\_ (2) Suja \_\_\_\_ (3) Média \_\_\_\_ (4) Limpa \_\_\_\_ (5) Muito limpa \_\_\_\_



## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdul-Ghani RA, Loutfy N, Hassan A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res* 2009; 105(4): 899–906.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol* 2004; 4, 499–511.

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

Amorim MN. Epidemiological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection rural and urban endemic areas of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92 (5):577-580.

Andrade ZA, Warren KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans. R. Soc. Med. Hyg* 1964; 58, 53–57.

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.

Anwar ARE, Smithers SR, Kay AB. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leukocytes *in vitro*: requirements for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol* 1979; 122, 628–637.

Appleton CC. Schistosome dermatitis: an unrecognized problem in South Africa? *S Afr Med J* 1984; 65: 467–69.

Arap-Siongok TK, Mahmoud AAF, Ouma JH, Warren KE, Muller AE, Handa AK, Houser HB. Morbidity in schistosomiasis mansoni in relation to intensity of infection: study of a community in Machakos, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1976. 25, 273–284.



Araujo JD. A pesquisa em esquistossomose no Brasil. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. 1st ed. Biblioteca Academia Mineira de Medicina; 1986. P. 9-18.

Araújo MI et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. Eur J Immunology 1996; 26: 1399-1403.

Araújo N, Mattos CA, Coelho PMZ, Katz N. Association of oxamniquine, praziquantel and clonazepam in experimental Schistosomiasis mansoni.. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; v. 103, p. 781-785.

Arrunategui-Correa V, and HS Kim. The role of CD1d in the immune response against Listeria infection. Cell Immunol 2004; 227:109–120.

Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. Nature 1993; 366:76.

Banchereau J, and Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392:245–252.

Barbosa CS, Montenegro SML, Abath FG, Domingues AL 2001a. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96 (Suppl. 5): 169-172.

Barbosa FAS. Morbidade na esquistossomose. Thesis, Faculdade de Medicina da Universidade de Recife. 180p, 1965.

Baron JL, Gardiner L, Nishimura S, Shinkai K, Locksley R, Ganem D. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. Immunity 2002; 16:583–594.

Barreto ML, Smith DH & Sleight AC. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. T R S trop Med Hyg 1990; 84: 554-555.

Bell DR. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference therapeutical trials. B WHO 1963; 29: 525-530.

Benarroch LK, Noya O, Noya B, Bianco NE, Blanca I. Immunopathology of human schistosomiasis mansoni II. Rev Inst Med Trop São Paulo 1988; 30: 400- 405.

Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90 221–227.

Bergquist R, Utzinger J, Cholett J, Xiao SH, Weiss NA, Tanner. Triggering of high-level resistance against *Schistosoma mansoni* reinfection by artemether in the mouse model. Am J Trop Med Hyg 2004; 71:774–777.

Bernardini OJ, Machado MM. Esquistossomose mansoni em Santa Catarina: isolamento do *Schistosoma mansoni* primeiro foco de transmissão ativa em São Francisco do Sul. Arq. Catarin. Med 1981; 10:213.

Bethony J, Silveira AMS, Alves-Oliveira LF, Thakur A, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, LoVerde PT. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic area in Brazil. J. Infect. Dis, 1999; 173, 1665–1673.

Bina JC, Prata A. A evolução natural da Esquistossomose Mansonii em uma área endêmica. In: Aspectos Peculiares da Infecção por *S. mansoni*. (Centro de Estudos de Doenças Regionais – Cedre, org.) Salvador: Centro Editorial da UFBA; 1984. P.13-33.

Birkland TP, Cheavens MD, Pincus SH. Human eosinophils stimulate DNA synthesis and matrix production in dermal fibroblasts. Arch. Dermatol. Res 1994; 286, 312–318.

Blagg W, Schoegel EL, Mansour NS, & Khalat GI. a new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J. Trop. Med Hyg 1955; 4: 23-28.

Bogliolo L. Subsídios para o estudo da anatomia patológica da forma aguda toxêmica da esquistossomose mansônica. Gen 1964; 19: 157-236.

Bogliolo L. *Patologia*. Rev Bra Mal e Doenças Tropicais 1959; XI(2-3): 359-423.

Bonecchi R, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J of Exp Med 1998; 187: 129-134.

Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, Kazibwe F, Kemijumbi J, Kariuki C, Kimani G, Ouma JH, Kabatereine NB, Birgitte J, Vennervald BJ, Dunne DW. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- $\gamma$ , high TNF- $\alpha$ , or low RANTES, depending on age and gender. *J. Immunol* 2004; 172, 1295–1303.

Borkow G, Leng Q, Weisman Z et al. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest* 2000; 106:1053–60.

Bottieau E, Clerinx J, De Vega MR, et al. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect* 2006; 52: 339–45.

Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, Tedder TF. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104, 20882–20887.

Bout D, Santoro F, & Capron A. détection des immunocomplexes dans la bilharziose. *Méd mal infectieuses* 1975; 5: 631-636.

Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol* 1987; 139:215–220.

Brito CF, et al. CD4+ T cells os schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14 KDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Scan J. of Immunology* 1994; 51: 119-125.

Broaddus VC, Boylan AM, Hoeffel JM, Kim KJ, Sadick M, Chuntharapai A, Hebert CA. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. *J. Immunol* 1994; 152:2960–2967.

Butterworth AE, Vadas MA, Wassom DL, Desein A, Hogan M, Sherry B, Gleich GJ, and David JR. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. The mechanism of irreversible adherence. *J. Exp. Med* 1979; 150:1456.

Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David JR. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol* 1979; 122, 221–229.

Butterworth, A.E., Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol* 1984; 23, 143–235.

Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, Prentice MA, Richardson BA, Arap-Siongok TK, Taylor DW. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1985; 79, 393–408.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 2008; 108: 109–117.

Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e308.

Cardoso FC, Pacífico RNA, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 382–391.

Cardoso LS, Oliveira SC, Goes AM, et al. “*Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation,” *Clin and Exp Immunology* 2010; vol. 160, no. 2, pp. 266–274.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068- 101.

Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol* 1999; 163:4647–4650.

Carvalho OS, Nunes IZ, Caldeira RL. First report of *Biomphalaria glabrata* in state of Rio Grande do South, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998; 93:39-40.

Chaves, Adelú et al. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. Rev. Saúde Pública 1979; vol.13, no.4, p.348-352. ISSN 0034-8910, Dez.

Cheever, AW & Andrade ZA. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. Trans S of Trop Med and Hyg 1967; 61: 629-639.

Chen DJ, Fu LF, Shao PP, Wu FZ, Fan CZ, Shu H, Ren CS, Sheng XL. Studies on antischistosomal activity of qinghaosu in experimental therapy. Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi, 1980 80:422–428.

Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to *Schistosoma mansoni* infection. Trop. Dis. Bull 1988; 85, R1–R56.

Cheng YL, Song WJ, Liu WQ, et al. The effects of T cell deficiency on the development of worms and granuloma formation in mice infected with *Schistosoma japonicum*. Parasitol Res 2008; 102: 1129–1134.

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: 920-930.

Chiu B & Chensue SW. Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granulomas formation. Parasite Immunology 2002; 24: 285-294.

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present and future. Pharmacol Ther 1995; 68:35–85.

Colley DG. et al. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. III. Regulatory effect of patient sera on human lymphocytes blastogenic responses to schistosomal antigen preparations. Am J Trop Med Hyg 1977; 26: 917-925.

Colley DG. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma Mansoni*. Journal of Immunology 1975; 115:150-156.

Colley DG. *Schistosoma mansoni*: eosinophilia and the development of lymphocyte blastogenesis in response to soluble egg antigen in inbred mice. Exp.Parasitol 1972; 32, 520–526.

Cone RE, Li X, Sharafieh R, O’rourke J, Vella AT, The suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8 regulatory T cells requires interferon gamma. Immunology 2007; 120, 112–119.

Constant S, Schweitzer N, West J, Ranney P, Bottomly KB. Lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. J. Immunol 1995; 155, 3734–3741.

Contigli, C. et al. Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms. Clin Immunology 1999; 91(3): 338-344.

Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, Carvalho OS, Gazzinelli G, and Sher A. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1989; 83:798–804.

Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga, LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA, Gazzinelli G. Cytokines is a determinant of the susceptibility and resistance in human *Schistosomiasis mansoni*. Braz. Med. Biol. Res 1998. 31, 127–131.

Coulson PS. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for human vaccine? Adv Parasitol 1997; 39: 271-336.

Coura JR & Amaral RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Ins Oswaldo Cruz 2004; 99 Suppl. I: 13-19.

Coutinho EM, et al. Factors involved in *Schistosoma mansoni* infection in rural areas of Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997a; 92: 707-715.

Coutinho HM, McGarvey ST, Acosta LP, et al. Nutritional status and serum cytokine profiles in children, adolescents, and young adults with *Schistosoma japonicum*-associated hepatic fibrosis, in Leyte, Philippines. J Infect Dis 2005; 192: 528–536.

Coutinho JO. Nota sobre modificações do “M.I.F.C” na conservação de fezes para pesquisa de cistos e protozoários. Arq. Fac. Hig. Saúde Públ. Uni. S. Paulo 1956; 10: 65-70.

Cox F. Immune effectors mechanisms in parasitic infections. Parasitol Today 1998; 14, 504.

Czaja MJ, Weiner FR, Takahashi S, Giambrone MA, Van der Meide PH, Schellekem H, Biempica L, Zern MA. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. Hepatology 1989; 10: 795–800.

David JR, Butterworth AE, Vadas MA. Mechanism of interaction mediating killing of *Schistosoma mansoni* by human eosinophils. Am. J. Trop. Med. Hyg 1980; 29, 842–848.

de Jesus AM, et al. The human liver contains multiple populations of MK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. J Immunology, 163(4): 2314-2321, 1999.

de Jesus AR, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, Jesus AA, Silva A, Santana LB, Pearce E, Carvalho EM, Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. Infect. Immunol 2004; 72, 3391–3397.

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

de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh, and M. L. Kapsenberg. Microbial compounds selectively

induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J. Immunol* 2002; 168: 1704–1709.

de Krömer MT, Medina-De-la-Garza CE, Brattig NW. Differences in eosinophil and neutrophil chemotactic responses in sowda and generalized form of onchocerciasis. *Acta Trop* 1995; 60:21-33.

De Vlas SJ, et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology* 1997; 114: 113-121.

Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Cardaba B, Fernandez JC, Gallardo S, et al. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 1992; 22:1919-25.

Dessein AJ, Couissinier P, Demeure C, Rihet P, Kohlstaedt S, Carneiro-Carvalho D, Ouattara M, Goudot-Crozel V, Dessein H, Bourgois A. Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Invest* 1992; 21, 423–453.

Dessein AJ, et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon- $\gamma$  receptor gene. *Am. J. Hum. Genet* 1999; 65, 709–721.

Diedrichs-Mohring M, Epplen JT, Schendel DJ. Enhanced expression of HLA-class II molecules on activated human T lymphocytes following treatment with tumor necrosis factor alpha. *Hum Immunol* 1991; 31:286–92.

d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med* 2000; 191:1661–1674.

Doenhoff MJ, Modha J, Lambertucci JR. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. *Immunol* 1988; 65:507–510.



Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int. Immunol* 1998; 10, 1421–1433.

Doughty BL et al. Anti-idiotypic T cells in human Schistosomiasis. *Immunology Investigation* 1989; 18: 373-388.

Doughty BL, & Philips SM. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. II. Regulatory T cell subsets. *Journal of Immunology* 1982; 133: 933-940.

Drumond SC. Programa de controle de esquistossomose no Estado de Minas Gerais. Resumo de avaliação das atividades do Projeto de Controle das Doenças Endêmicas do Estado de Minas Gerais (1989-1994). Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Regional de Minas Gerais; 1994 P. 78-90.

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 1992; 22, 1483–1494.

Dunne DW, Webster M, Smith P, Langley JG, Richardson BA, Fulford AJ, Butterworth AE, Sturrock RF, Kariuki HC, Ouma JH. The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection. *Parasite Immunol* 1997; 19: 79-89.

Duraes FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF- $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett* 2009; 125:72–77.

Duthie MS, Kahn M, White M, Kapur RP, Kahn SJ. Critical proinflammatory and antiinflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun* 2005; 73:181–192.

Duthie MS, Wleklinski-Lee M, Smith S, Nakayama T, Taniguchi M, Kahn SJ. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment

the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infect. Immun* 2002; 70:36–48.

Eberl G, Brawand P, MacDonald HR. Selective bystander proliferation of memory CD4 and CD8 T cells upon NK T or T cell activation. *J. Immunol* 2000; 165:4305–4311.

Eberl G, MacDonald HR. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol* 2000; 30: 985–992

Ellner JJ, Mahmoud AAP, Killing of schistosomula of *Schistosoma* by normal human monocytes, *J Immunol* 1979; 123:949 51

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: 139–46.

Engels D. et al. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg*, 57: 571-577, 1997.

Failace R. Hemograma – Manual de Interpretação, 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003.

Falcão PL. et al. Human schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. *Parasite Immunol* 1998; 20(10): 447-454.

Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immunedependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* 1992; 105: S41–S48.

Faust EC, & Meleney HE. Studies on schistosomiasis japonica. *Am. J. Hyg* 1924; 3: 331-339.

Faust EC, Ingalls JW, & See JK. The diagnosis of schistosomiasis japonica II. Technics for recovery of the eggs of *Schistosoma japonicum*. *Am. J. Trop. Med* 1946; 26: 559-584.

Ferrari TC. Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 Suppl 1: 59-62.

Foster R, Mesmer ET, Cheetham BL, King DF. The control of immature *Schistosoma mansoni* in mice by UK 3883, a novel 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative. *Ann Trop Med Parasitol* 1971; 65:221–232.

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Lombard GS, Nadler LM. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262:909.

Freud AG, Mao HC, Yu J, Blaser BW, Leong JW, Vandeusen JB, Dorrance A, Zhang J, Mackall CL, ... Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation *in vivo*. *J Exp Med* Apr 2006; 203(4):1033-1043.

Fuji S. Katayama disease, Katayamaki. *Chugai Iji Shimpo* 1847; 691: 55-56.

Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells *in vivo* and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J. Exp. Med* 2003; 198:267–279.

Fulleborn F. Ober den Nachweis der *Schistosoma mansoni*- Ei rim Stuhl. *Archiv fur Schiffs und Trepenhygiene* 1921; 25: 334-340.

Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 2003; 197:1051–1057.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol* 2001; 13, 114–119.

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 A, Bethony J, Alves-Oliveira LF, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil Part I: Water contact. Trop. Med. Int. Health 2001; 6: 126–135.

Gleich GJ, & Loegering DA. Immunobiology of eosinophils. Annu Rev Immunol 1984; 2:429–59.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? Nat. Rev. Immunol 2004; 4:231–237.

Goes AM. et al. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. IV. A role for prostaglandin-induced inhibition of *in vitro* granuloma formation. Parasite Immunol 1994; 16(1):11-18.

Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinin. Int J Parasitol 2006; 36:1427–1441.

Gönnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. Z Parasitenkd 1977; 52:129–150.

Gonzalez-Aseguinolaza GL, Van Kaer CC, Bergmann JM, Wilson J, Schmiege M, Kronenberg T, Nakayama M, Taniguchi Y, Koezuka, and Tsuji M. Natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. J Exp Med 2002; 195: 617–624.

Gordon RM & Griffiths RB- Observation 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.

Graeff-Teixeira C, et al. The Initial epidemiological studies in the low endemicity Schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99 (suppl. I):73-78.

Greenberg RM. Are  $Ca^{2+}$  channels targets of praziquantel action? Int J Parasitol 2005; 35:1–9.

Gryseels B. Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience Parasitol. Today 1994; 10, 380–384.

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

Grzych J, Peace E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis. *J. Immunol* 1991; *146*:1322.

Hagan P, & Abath FGC. recent advances in immunity to human schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; *87*: 95-98.

Hagan P, Blumenthal UR, Dunne DW. et al. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 1991; *349*, 243–245.

Hansen DS, and L Schofield. Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int. Parasitol* 2004; *34*:15–25.

Harnett, W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitol* 1986; *93*:401–405.

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

Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 2000; *1*, 475–482.

Hernandez HJ, Wang Y, & Stadecker MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type-2 cell responses but not for granuloma formation. *J Immunol* 1997; *158*, 4832–4837.

Hernandez MGH, Hafalla JCR, Acosta LP, Aligui FF, Aligui GD, Ramirez BL, Dunne DW, Santiago ML. Paramyosin is a major target of the human IgA response against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1999; *21*: 641–647.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink 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.

Hesse M. et al. 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.

Hiatt RA, Ottesen EA, Sotomayor ZR, Lawley TJ. Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. *J Infect Dis.* 1980; 142: 665-670.

Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J. Immunol* 2000; 164: 6406-6416.

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

Hoshimo-Shimizu S. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da esquistossomose mansônica. *S A Acad Bras Med* 1986; 14: 67-89.

Hu W, Brindley PJ, McManus DP, Feng Z, Han ZG. Schistosome transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. *Trends Mol Me* 2004; 10, 217–225.

Hurst MH, Willingham AL, 3rd & Lindberg R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low- or high-dose infections. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 45–56.

Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, James S, Cheever AW, and Sher A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- $\gamma$  dependent effectormechanisms. *J Immunol* 1999; 162: 345–351.

Jassim A, Catty D & Hassan K. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni in Sudan. *Parasite Immunol*; 1987 9: 651-665.

Jeziorski MC, Greenberg RM. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. *Int J Parasitol* 2006; 36:625–632.

Kalinkovich A, Weisman Z, Greenberg Z et al. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:414–21.

Kallestrup P, Zinyama R, Gomo E, Butterworth AE, van Dam GJ, Gerstoff J, Erikstrup C, Ullum, H. Schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwe: efficacy of treatment of schistosomiasis in individuals with HIV coinfection. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1781–1789.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol*; 2003. 3, 984–993.

Karanja DM, Boyer AE, Strand M, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE. Studies on schistosomiasis in western Kenya: II. Efficacy of praziquantel for treatment of schistosomiasis in persons coinfecting with human immunodeficiency virus-1. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:307–311.

Kasprowicz DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe AH, Sanders, VM. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7–2), and the  $\alpha$ -2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 produced per B cell. *J Immunol* 2000. 165: 680–690.

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, et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 1972; 14:397-400.

Katz N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 33-35.

Kaye B, Woolhouse NM. The metabolism of oxamniquine-a new schistosomicide. *Ann Trop Med Parasitol* 1976; 70:323–328.

King CL, Medhat A, Malhotra I, Nafeh M, Helmy A, Khaudary J, Ibrahim S, El-Sherbiny M, Zaky S, Stupi RJ, Brustoski K, Shehata M, Shata MT. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J Immunol* 1996; 156, 4715–4721.

Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 889–92.

Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki T, Usui T, Strober W. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -1-producing regulatory T cells induce Smad mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of (TGF)- $\beta$ -1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 2003; 198, 1179–1188.

Klion AD, and Nutman TB. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 30–37.

Ko AI, Drager UC, Harn DA. A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4159.

Kokwaro GO, Taylor G. Oxamniquine pharmacokinetics in healthy Kenyan African volunteers. *East Afr Med* 1991; J 68:359–364.

Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development scar tissue. *Immunol Today* 1991; 12, 17–23.

Kronenberg M, Gajin L. The unconventional lifestyle of NK T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:557–568.

Lacy P & Moqbel R. Eosinophil cytokines. *Chem Immunol* 2000; 76:134–55.

Lambertucci JR, Modha J, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: the therapeutic efficacy of oxamniquine is enhanced by immune serum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 362–363.

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

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



Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995; 154:97.

Le WJ, You JQ, Mei JY. Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin* 1983; 18:619–621.

Le WJ, You JQ, Yang YQ, Mei JY, Guo HF, Yang HZ, Zhang CW. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin* 1982; 17:187–193.

Leiper RT. Report on the results of the Bilharzia Mission in Egypt. *Journal of the Royal Army Medical Corps* 1915; XXV, n. 1.

Leopold G, Ungethum W, Groll E, Diekmann HW, Nowak H, Wegner DH. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1978; 14:281–91.

Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, Reich R, Pickholtz D, Gillery P. Humaneosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties *in vitro*: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9660–9665.

Li Z, King CL, Ogundipe JO, et al. Preferential recognition by human IgE and IgG4 of a species-specific *S. haematobium* serine protease inhibitor. *J Inf Dis* 1995; 171, 416–422.

Lima MS et al. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. *J Clin Invest* 1986; 78: 983-988.

Lins RAB, Cavalcanti CBDL, Araújo-Filho JLS, Melo-Júnior MRd & Chaves MEC. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 173–178.

Linton PJ, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, Padrick RC, Bradley LM. Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med* 2003; 197, 875–883.

Liu X, Kohyama T, Wang H. Th2 cytokine regulation of type I collagen gel contraction mediated by human lung mesenchymal cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 L1049–L1056.

Long EO. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* 2007; 26, 385–387.

Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997; 158:4398.

MacDonald AS, et al. Impaired TH2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. *J Immunol* (2002.168, 4643–4649).

Mahmoud MR, Botros SS. Artemether as adjuvant therapy to praziquantel in murine Egyptian schistosomiasis mansoni. *J Parasitol* 2005; 91:175–178.

Malaquias LCC et al. 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(4): 393-398.

Mallevaey T, Zanetta JP, Faveeuw C. et al. Activation of invariant NKTcells by the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 2006; 176:2476.

Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2001;13:195-201.

Martin KL, & Beaver PC. Evaluation of Kato Thick-Smear Technique for Quantitative Diagnosis of Helminth Infections *Am J Trop Med Hyg* 1968; 17:382-391.

Martin LK. Randomness of Particle Distribution in Human Feces and the Resulting Influence on Helminth Egg Counting. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14:747-759.

Martins AV. Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni [Thesis]. Belo Horizonte (MG). Faculdade de Medicina da Universidade federal de Minas Gerais., 1949.

Martins-Filho AO, et al. Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell-subsets and costimulatory molecules. Dig Des Sciences 1999; 44(3): 570-577.

Martins-Filho OA, Dutra WO, Freeman GL et al. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. Scand J Immunol 1997; 46:304–11.

Martins-Filho OA, et al. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. Scand J Immunol 1997; 46(3): 304-311.

Mellman, I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001; 106, 255–258.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity 2002;16:219-30.

Modha J, Lambertucci JR, Doenhoff MJ, McLaren DJ. Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum in vivo. Parasite Immunol 1990; 12:321–334.

Mohamed-Ali Q, et al. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: evidence that intensity and duration of infection, gender and inherited factors are critical in disease progression. J Infect Dis 1999; 180, 1298–1306.

Montenegro SML. Immunodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 333-335.

Montenegro SM, et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: The cross-regulatory role of interferon-gamma and

interleukin-10 in the responses of the peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis* 1999; 179(6): 1502-1514.

Montesano MA, Colley DG, Eloi-Santos S, Freenan GL, Secor WE. Neonatal idiotypic exposure alters subsequent cytokine, pathology and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Exp Med* 1999; 189, 637–645.

Moore DL, Grove DI, Warren KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol* 1977; 121, 41–50.

Moore T, and Nutman, T Eosinophils in the returning traveler. *Infect Dis Clin N Am* 1998; 12:503–521.

Moser B, et al. Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control . *T Immunol* 2004; 25(2): 75-84.

Mott DE & Dixon H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *WHO* 1982; 60: 729-753.

Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: “new” roles for “old” cells. *Allergy* 2004; 59, 268–275.

Murdoch CC R & Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95 10: 3032-3043.

Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *A Rev immunol* 1994; 12: 593-633.

Mutapi F, Ndhlovu PD, Hagan P, Spicer JT, Mduluza 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.

Mwinzi PN, Ganley-Leal L, Black CL, Secor WE, Karanja DM, Colley DG. Circulating CD23+ B cell subset correlates with the development of resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection in occupationally exposed adults who have undergone multiple treatments. *J Infect Dis* 2009; 199: 272-279.

Willems F, et al Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem* 2005; 280, 277–283.

Ndhlovu P, Cadman H, Vennervald B.J. *et al.* Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community in Zimbabwe. *P Immunol* 1996; 18, 181–191.

Novato-Silva E, Gazzinelli G, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scand J* 1992; 35, 429–437.

Nunn JF, Tapp E. Tropical diseases in ancient Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 147-153.

Nutman TR, Miller KD, Mulligan M, et al. Loa loa infection in temporarily residents of endemic regions: recognition of a hyperresponsive syndrome with clinical manifestations. *J Infect Dis* 1986; 154:10-18

Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn Jr, D.A. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 1999; 163, 6712–6717.

Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn Jr, DA. Lacto-Nfucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 2001; 167, 442–450.

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

Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP, Leite LC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop* 2008; 108: 256-262.

Oliveira C, et al. Membrane Protein Sm29 of *Schistosoma mansoni* uses therefore treating and diagnosing schistosomiasis. US patent: 20100074924. 2010 march.

Oloris SC, Mesnil M, Reis VN, Sakai M, Matsuzaki P, Fonseca Ede S, da Silva TC, Avanzo JL, Sinhorini IL, Guerra JL, Costa-Pinto FA, Maiorka PC, Dagli ML. Hepatic granulomas induced by *Schistosoma mansoni* in mice deficient for connexin 43 present lower cell proliferation and higher collagen content. *Life Sci* 2007; 80: 1228-35.

Organização Mundial da Saúde. *O controle da esquistossomose*. Genebra: WHO 1994. (Relatório Técnico, 830).

Ottesen EA. Modulation of the host response in human schistosomiasis. I. Adherent suppressor cells that inhibit lymphocyte proliferation to parasite antigens. *J Immunol* 1979; 123: 1639-1644.

Ovington KS, Behm CA. The enigmatic eosinophil: investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92 Suppl 2: 93-104.

Pacífico LGG, Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiol* 2006; 211: 97-104

Paraense WL. *Biomphalaria amazonica* and *B. cousini*; two new species of Neotropical planorbid mollusc. *Rev Bras Biol* 1966; 26: 115-126.

Paraense WL. *Biomphalaria occidentalis* n. sp. from South América. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981; 76: 199-21.

Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In *Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansonica no Brasil*. Acad Min Medicina 1986; 14: 117-128.

Parra JC et al. Granulomatous hypersensitivity to *S. mansoni* eggs antigens in human schistosomiasis. II *In vitro* granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. *J Immunol* 1991; 147:3949-3954.

Passos ADC, Amaral RS. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. *Soc Bras Med Trop* 1998; 61-74.

Pearce EJ & Macdonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev* 2002; 2:499-511.

Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L. 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.* 201:117–126.

Pellegrino J, Lima-Costa FF, Carlos MA, Mello RT. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and Cebus monkeys. *Z Parasitenkd* 1977; 52:151–168.

Pessoa SB. Contribuição para o estudo da correlação entre a carência alimentar e os fatores parasitários na anemia da esquistossomose. *Anais da Faculdade de Medicina da Paraíba*, 1:52-60, 1956.

Pica-Mattoccia L, Cioli D, Archer S. Binding of oxamniquine to the DNA of schistosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:373–376.

Pica-Mattoccia L, Dias LCD, Moroni R, Cioli D. *Schistosoma mansoni*: genetic complementation analysis shows that two independent hycanthon/oxamniquine-resistant strains are mutated in the same gene. *Exp Parasitol* 1993; 77:445–449.

Pica-Mattoccia L, Valle C, Basso A, Troiani AR, Vigorosi F, Liberti P, Festucci A, Cioli D. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. *Exp Parasitol* 2007; 115:344–351.

Pontes LA et al. Comparison of a PCR assay and the Kato-Katz technique for diagnosing *Schistosoma Mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 652656.

Pontes LA, Dias Neto E, & Rabello A. Detection by polimerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and faeces. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:157-162.

Prakash S, and Wyler DJ. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. XII. Identification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes within schistosomal egg granulomas as a source of an apparently novel fibroblast growth factor (FsF-1). *J. Immunol* 1992; 148:3583-3587.

Prata A. Fatores determinantes das formas anátomo-clínicas e evolução da esquistossomose. *In: Castro FP et al (eds)Tópicos em Gastroenterologia*. Rio de Janeiro, MEDSI - Editora Médica e Científica Ltda; 1991.P. 3-12.

Rabello A. Diagnosing Schistosomiasis. *Mems Inst Oswaldo Cruz*1997; 92(5): 669-676.

Rabello ALT. O exame de Fezes, a biópsia retal e o teste imunoenzimático no diagnóstico da esquistossomose mansoni humana [Thesis]. Belo Horizonte (MG): UFMG.; 1990.

Rabello ALT. Parasitological diagnosis of schistosomiasis mansoni: fecal examination and rectal biopsy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1992; 4: 325-331.

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.

Raso P. Esquistossomose mansônica. In: Bogliolo, L. (Ed.) *Patologia*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

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.

Rezende AS, Lambertucci JR & Goes AM. Role of immune complexes from patients with different clinical forms of schistosomiasis in the modulation of *in vitro* granuloma research. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1997; 92: 683-687.

Rezende SA *et al.* IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs induced by immune complexes. Scand J Immunol 1997; 46: 96-102.

Ribeiro F, Coelho PM, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. Parasitol 1998; 116:229–236.



Ribeiro F, Mello RT, Tavares CA, Kusel JR, Coelho PM. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2004; 46:231–233.

Richards HC, Foster R. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. Nature 1969; 222:581–582.

Rihet P, Demeure CE, Bourgois A, *et al.* Evidence for an association between human resistance to *S. mansoni* and high antilarval IgE levels. Eur J Immunol 1991; 21, 2679–2686.

Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull U S Army Med De 1958; 8:326.

Rocha MO, Rocha RL, Pedroso ER, *et al.* Pulmonary manifestations in the initial phase of schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1995; 37: 311–18.

Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, Miyake ST, Yamamura JA, Louis LH, Kasper, Buzoni-Gatel D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. J Immunol 2005; 175:899–908.

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

Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat SA, El Refaei M, Perrin PJ & Phillips SM. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. J Immunol 1999; 162: 1003–1009.

Sallusto F, Lanzavecchia A, & Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2 mediated responses. Immunol Today 1998; 12: 568-574.

Sallusto F, *et al.* Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 Lymphocytes. J Exp Med 1998; 187: 875-883.

Santiago ML, Hafalla JC, Kurtis JD, Aligui GL, Wiest PM, Olveda RM, Olds GR, Dunne DW, Ramirez BL. Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides. Allergy Immunol 1998; 117: 94-104.

Sapero JJ, & Lawless DK. The “M.I.F” stain-preservation technic for identification of intestinal protozoa. *Am J Trop Med* 1953; 2: 613-619.

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993; 365: 654–657.

Sher A, Butterworth AE, Colley DG, Cook AJ, Freeman GLR, Jordan P. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. II. Occurrence of eosinophil-dependent cytotoxic antibodies in relation to intensity and duration of infection. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26, 909–916.

Shi HZ, Xiao CQ, Li CQ, Mo XY, Yang QL, Leng J, et al. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. *Allergy* 2004; 59:428-35.

Shock A, Rabe KF, Dent G. Eosinophils adhere to and stimulate replication of lung fibroblasts *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 185–190.

Silva-Teixeira DN, Contigli C, Lambertucci JR, Serufo JC, Rodrigues VJr. Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; v.11(3), p.627-30.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira LF, Corrêa-Oliveira R. High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 Suppl 1: 345-51.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Alves Oliveira LF, Costa-Silva MF, Matoso LF, de Souza LJ, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop* 2008; 10 : 150-159.

Simpson AJ. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. *Parasitol Today* 1990; 6:40–5.

Skold M, Behar SM. Role of CD1d-restricted NK T cells in microbial immunity. *Infect Immunol* 2003; 71:5447–5455.

Skov L, Beurskens FJ, Zachariae CO, Reitamo S, Teeling J, Satijn D, Knudsen KM, Boot EP, Hudson D, Baadsgaard O, Parren PW, van de Winkel JG. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *J Immunol* 2008; 181:669-79.

Smithers SR, Doenhoff MJ. Schistosomiasis. In: Cohen, S. & Warren, K. S. *Immunol Par inf.* Londres: Year Book medical Pub; 1982.

Smithers SR, Hackett F, Braga V, Simpson AJ. Immunoblotting identifies additional antigens recognised by mice protectively vaccinated with adult *Schistosoma mansoni* tegumental membranes. *Parasitol Res* 1990; 76:454-6.

Stadecker MJ, Flores-Villanueva PO. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. *Immunol Today* 1994;v.15, p.571-574.

Stein LD, David JR. Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 20: 253-264.

Steiner K, Garbe A, Diekmann HW, Novak H. The fate of praziquantel in the organism. I: Pharmacokinetics in animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1976; 1:85-95.

Stoll NR & Hausheer WC. Concerning two options in dilution egg counting: small drop and displacement. *Amer J Hyg* 1926. 6(Suppl.): 134-45.

Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 2006; 108: 2420-2427.

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.

Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Martins-Filho OA, et al. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop* 2008.

Teixeira-Carvalho T. Estudo de Aspectos Imunocitoquímicos Associados às formas Clínicas da Esquistossomose Mansônica Humana [thesis]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.; 2004.

Tera LM, Mochizuki M, Bartels J. Th1 and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20, 777–786.

Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da’Dara AA, Piskorska D, McGuire E, Harn DA. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 2003. 171: 5837–5841.

Tibiriçá SHC, Guimarães FB, Teixeira MTB. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. *Ciênc. saúde coletiva*. 2011; 16: 1375-1381 .

Titulaer HA, Zuidema J, Kager PA, Wetsteyn JC, Lugt CB, Merkus FW. The pharmacokinetics of artemisinin after oral, intramuscular and rectal administration to volunteers. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42:810–813.

Torrinhas RS, Jacintho T, Goto H, Gidlund M, Sales MM, Oliveira PA, Waitzberg DL. Cell activation state influences the modulation of HLA-DR surface expression on human monocytes/macrophages by parenteral fish oil lipid emulsion . *Med School USP. São Paulo. Brazil.*; 2011.

Utzinger J, Keiser J, Xiao SH, Tanner M, Singer BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1487–1495.

Utzinger J, Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 263–85.

Utzinger J, Xiao S, Keiser J, Chen M, Zheng J, Tanner M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. *Curr Med Chem* 2001b; 8:1841–1860.

Utzinger J, Xiao SH, N’Goran EK, Bergquist R, Tanner M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Int J Parasitol* 31:1549–1562, 2001c.

van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002; 277: 48122–48129.

Van Die I, van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CM, Appelmelk B, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 2003; 13, 471–478.

van Liempt E, et al. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 2007; 44:2605–2615.

van Lieshout L, Stelma FF, Guisse F, Falcao Ferreira ST, Polman K, van Dam GJ, Diakhate M, Sow S, Deelder A, Gryseels B. The contribution of host-related factors to low cure rates of praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:760–765.

Vankayalapati R et al. The Nkp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 2002; 168: 3451-3457.

Vasu C, Wang A, Gorla SR, Kaithamana S, Prabhakar BS, Holterman MJ. CD80 and CD86 C domains play an important role in receptor binding and co-stimulatory properties. *Int Immunol* 2003; 15:167–175.

Velupillai, P., W. E. Secor, A. M. Horauf, and D. A. Harn. B-1 cell (CD51B2201) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. *J Immunol* 1997; 158:338.

Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama Jr MY, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton, PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, SaRG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet* 2003; 35: 148-157.

Verjovski-Almeida S, Leite LC, Dias-Neto E, Menck CF, Wilson RA, Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends Parasitol* 2004; 20, 304–308.

Viana IR et al. Interferon-gama production by peripheral blood mononuclear cells from resident of an endemic area for *Schistosoma mansoni*. *Trans R S Trop Med Hyg* 1994; 88:466-470.

Walker ARP. Studies bearing on parasitism and nutritional state. In: African Conference on Bilharziasis. WHO 1956.

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L. & Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 2005; 106: 2252–2258.

Warmington KS et al. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granulomas formation: analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *Am J Pathol* 1999; 154(5): 1407-1416.

Webbe G, James CA. comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S.mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. *Z Parasitenkd* 1977; 52:169–177.

Webster M, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G, et al. Factors affecting high and low human IgE responses to schistosome worm antigens in an area of Brazil endemic for *Schistosoma mansoni* and hookworm. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57, 487–494.

Webster M, Ramirez BDL, Aligui GD, et al. The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines. *Parasitol* 1997; 114, 383–393.

Weinstock JV & Blum AM. Modulation of granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni* by enteryic exposure to schistosome ova: *in vitro* characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. *Cell Immunol* 1987; 108: 452-459.

Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:85–90.

Wells SM, Kantor AB, and Stall. AMCD43 (S7) expression identifies peripheral B cell subsets. *J Immunol* 1994; 153: 5503–5515.

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. Epidemiology and control of schistosomiasis. Technical Report series 728, Geneva, P. 126, 1985.

World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO, 2008.

World Health Organization- WHO: Informal Consultation on Expanding Schistosomiasis Control in Africa. Geneva: WHO, 2010.

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

Xiao S, Yang Y, You Q, Utzinger J, Guo H, Peiying J, Mei J, Guo J, Bergquist R, Tanner M. Potential long-term toxicity of repeated orally administered doses of artemether in rats. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:30–34.

Xiao SH, Catto BA. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1557–1562.

Xiu Y, Wong CP, Hamaguchi Y, Wang Y, Pop S, Tisch RM, Tedder TF. B lymphocytes depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in NOD mice despite isotype-specific differences in FcγR effector functions. *J Immunol* 2008; 180, 2863–2875.

Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. In press. 2008

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhnag M, Acad. Sci. USA 94, 14614–14619. Goddard A, Wood WI, Gurney, AL, and Godowski PJ. 1998 Medzhitov R, and Janeway CA, Jr. (1997). Innate immunity: the Toll-like receptor-2 mediated

lipopolysaccharide-induced cellular virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–298. signaling. *Nature* 395, 284–288.

Ziegler-Heitbrock HWL. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14CD16subpopulation. *Immunol Today* 1996; 17:424.

Zlotnik A, & Yoshie O. Chemokines: anew classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12(2): 121-127.

Zouain CS, Gustavson S, Oliveira SC, Azevedo V, Alves JB, Goes AM. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. *Vaccine* 2001; 19: 1218-1224.

Zwingenberger K, et al. Release of interleukin-2 and interferon-gamma by peripheral blood cells in human *S. mansoni* infection normalizes after chemotherapy. *Scand J Immunol* 1989; 30: 463-471.