

UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE – UNIVALE  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOLOGIA

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA COM PRAZIQUANTEL NA FIBROSE  
E NO PERFIL DE CITOCINAS ASSOCIADO À INFECÇÃO PELO  
*Schistosoma mansoni***

PAULINE MARTINS LEITE

**GOVERNADOR VALADARES  
FEVEREIRO DE 2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

PAULINE MARTINS LEITE

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA COM PRAZIQUANTEL NA FIBROSE  
E NO PERFIL DE CITOCINAS ASSOCIADO À INFECÇÃO PELO  
*Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Vale do Rio Doce, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Alda Maria Soares Silveira  
CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Lucia Alves de Oliveira Fraga**

**GOVERNADOR VALADARES  
FEVEREIRO DE 2008**

## **EXECUÇÃO DO TRABALHO:**

Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE),  
Governador Valadares, MG.

## **COLABORADORES:**

### **Universidade Vale do Rio Doce**

Drº Luiz Cosme Cotta Malaquias

Drª Elaine Speziali de Faria

Maria de Fátima da Silva

Marlucy Rodrigues Lima

Lilia Cardoso Pires

Ivanete dos Santos Nascimento

### **Escola de Enfermagem da UFMG**

Drª Andrea Gazzinelli

### **Centro de Pesquisas René Rachou**

Drº Giovanni Gazzinelli

Drº Rodrigo Corrêa de Oliveira

Drª Andréa Teixeira de Carvalho

## **ÓRGÃOS FINANCIADORES:**

Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR / FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –  
FIOCRUZ/CNPq (PAPES IV)

## **PUBLICAÇÕES:**

Alves-Oliveira, L.F., E. C. Moreno, G. Gazzinelli, O.A. Martins-Filho, A.M.S. Silveira, A. Gazzinelli, L.C.C. Malaquias, P. LoVerde, **P. Martins Leite**, and R. Correa-Oliveira. 2006. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis Mansoni in Humans. *Infection and Immunity*, 74: 1215-1221.

**P. Martins-Leite**, G. Gazzinelli, L.F. Alves-Oliveira, A. Gazzinelli, L.C.C. Malaquias, R. Correa-Oliveira, A. Teixeira-Carvalho, and A.M.S. Silveira. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with Schistosomiasis mansoni. Manuscrito submetido à revista *Infection and Immunity* em 23 de janeiro de 2008.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:**

**P. Martins-Leite**, A. Teixeira-Carvalho, A.M.S. Silveira, E.C. Moreno, E.F. Speziali, O.A. Martins-Filho, L.C.C. Malaquias, G. Gazzinelli, P. Loverde, R. Correa-Oliveira e L.F. Alves-Oliveira. Decrease in the levels of IL-10/IL-13 is associated with severe fibrosis during human Schistosomiasis mansoni. In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology. Búzios. October, 2006.

**P. Martins-Leite**, E.C. Moreno, A.M.S. Silveira, O.A. Martins-Filho, L.C.C. Malaquias, G. Gazzinelli, P. Loverde, R. Correa-Oliveira e L.F. Alves-Oliveira. Citocinas e grau de fibrose na esquistossomose crônica humana. In: I Seminário Estadual de Iniciação Científica. Belo Horizonte. 2006.

**P. Martins-Leite**, L.F. Alves-Oliveira, A. Teixeira-Carvalho, E.F. Speziali, O.A. Martins-Filho, L.C.C. Malaquias, A. Gazzinelli, P. Loverde, G. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira e A.M.S. Silveira. Specific treatment is able to alter the cytokine profile and periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. 13th International Congress of Immunology. Rio de Janeiro. August 21-25, 2007.

H.F. Dias, **P. Martins-Leite**, L.F. Alves-Oliveira, E.C. Moreno, E.F. Speziali, O.A. Martins-Filho, L.C.C. Malaquias, G. Gazzinelli, P. Loverde, R. Correa-Oliveira e A.M.S. Silveira.

Esquistossomose Mansonii: efeito da terapêutica com praziquantel no perfil de citocinas dos indivíduos residentes em área endêmica, com e sem fibrose periportal. 5º Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica da Univale. Governador Valadares. Setembro de 2007.

B.B. Gouvêa, M.M. Almeida, **P. Martins-Leite**, L.F. Alves-Oliveira, A. Teixeira-Carvalho, A. Gazzinelli, L.C.C. Malaquias, E.F. Speziali, G. Gazzinelli, e A.M.S. Silveira. Perfil epidemiológico de pacientes portadores de esquistossomose mansônica residentes na comunidade do Caju, no ano de 2004. 5º Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica da Univale. Governador Valadares. Setembro de 2007

“Foi o tempo que perdi com minha rosa que a fez tão importante”.

Antoine de Saint-Exupery

“Ler torna o homem completo, ensinar lhe dá preparo e escrever o torna consciente”.

Francis Bacon

Dedico este trabalho aos meus pais, minhas irmãs e ao Cristiano que sempre estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço por sonharem comigo os meus sonhos e por me concederem o amor e os ensinamentos que foram necessários para que eu os realizasse.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A minha orientadora Dra. Alda Maria Soares Silveira, que além de Mestre, foi para mim uma grande amiga, que com muito esforço, dedicação, competência e responsabilidade tornou possível a realização desse trabalho. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e pelos conselhos que me ajudaram a crescer e me tornar uma pessoa melhor.

A minha co-orientadora Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga, por me acolher como aluna de Iniciação Científica, e por me abrir as portas da ciência. Obrigada pela oportunidade de participação nesse projeto, pelo convívio com a cientista que é e pelos ensinamentos que muito me ajudaram nessa trajetória.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado a vida, por permitir realizar meus objetivos e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais e competentes.

A minha mãe Zita Maria Martins Leite, pelo grande amor. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo incentivo, pelo exemplo de honestidade, responsabilidade e perseverança. Obrigada por estar comigo em todos os momentos.

Ao meu pai José Paulinho Barbosa Leite, pela confiança que sempre depositou em mim, pelo exemplo de pessoa que é e por me fazer acreditar que vale a pena viver, com seu jeito simples e feliz de ser.

A minha irmã e melhor amiga Ellen, que com certeza foi um presente de Deus. Agradeço pela cumplicidade, pela convivência doce, por tantos momentos agradáveis e pela presença constante em minha vida.

A minha irmã e amiga Heloíne, que com seu jeito de ser, me ensina a cada dia que preciso ser uma pessoa melhor. Agradeço pelos bons momentos que passamos juntas e com certeza pelos que ainda virão.

Ao Cristiano pelo amor e carinho que tornam a minha vida muito mais feliz.

Ao Professor Giovanni pela oportunidade de aprendizado. Obrigada pela disponibilidade, atenção, sugestões e pelo apoio financeiro. Foi muito importante tê-lo como mentor científico.

Ao Dr. Rodrigo Correa Oliveira, coordenador do projeto em Virgem das Graças, pelo apoio financeiro, confiança e constante estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Andréa Gazzinelli por coordenar os trabalhos de campo.

A Lília, Fátima, Marlucy e Ivanete pela dedicação com a qual realizam suas funções, viabilizando este e muitos outros trabalhos. Agradeço por todos os ensinamentos dentro do laboratório.

Aos professores do curso de Mestrado em Ciências Biológicas da Univale pelos ensinamentos que contribuíram intensamente para minha formação.

Aos professores Luiz Cosme, Elaine Speziali e Olindo pela especial colaboração neste trabalho.

A Andréa Teixeira, pela confiança e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao Núcleo de Pesquisa em Imunologia da Univale e ao Instituto René Rachou pelo apoio incondicional durante toda esta trajetória.

A Carol, pela análise estatística dos dados. Sua disponibilidade e atenção foram essenciais.

Aos colegas do mestrado pela constante disponibilidade, ajuda e intercâmbio de idéias.

A Sânya, secretária do curso de Mestrado em Ciências Biológicas, pela disponibilidade e ajuda na resolução dos processos burocráticos.

Aos colegas do Instituto René Rachou pela incansável disposição e fundamental auxílio durante o desenvolvimento da dissertação.

As amigas de sempre, Marcela, Letícia, Camila, Raquel e Sabrina e ao meu cunhado Alenoir por todos os momentos de alegria e descontração e pela especial amizade.

A toda a minha família pelas orações, incentivo e confiança.

A Andréa e Stella Pina por terem me acolhido com tanta boa vontade, enriquecendo minha estadia em Belo Horizonte e transformando qualquer necessidade em ajuda desinteressada.

Aos pacientes estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Intensidade de infecção e prevalência por faixa etária da população em estudo, antes (AT) e depois do tratamento (DT). .....16
- Figura 2:** Grau de fibrose determinado por exame de ultra-sonografia realizado em 91 indivíduos, antes e um ano após o tratamento com praziquantel. ....17
- Figura 3:** Comparação dos níveis de citocinas de 144 hs determinados por ELISA, produzidas por PBMC de indivíduos agrupados pelo grau de fibrose periportal, após estímulo com SEA, antes e após tratamento .....23
- Figura 4:** Comparação dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 de 144 hs determinados por ELISA, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, dos indivíduos que não alteraram o grau de fibrose com o tratamento, agrupados pela presença de fibrose periportal. ....27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Idade, intensidade de infecção, prevalência e sexo da população em estudo, antes e após o tratamento.....	16
<b>Tabela 2:</b> Transições do grau de fibrose dos 91 indivíduos, um ano após o tratamento com praziquantel.....	18
<b>Tabela 3:</b> Perfil dos indivíduos que reverteram para um grau menor de fibrose periportal, um ano após o tratamento com praziquantel.....	19
<b>Tabela 4:</b> Idade, intensidade de infecção e contato com água dos indivíduos agrupados pela presença de fibrose periportal.....	20
<b>Tabela 5:</b> Níveis de citocinas produzidas por PBMC após estímulo com SEA de indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2) antes do tratamento.....	22
<b>Tabela 6:</b> Níveis de citocinas produzidas por PBMC após estímulo com SEA de indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada (G2) após tratamento.....	22
<b>Tabela 7:</b> Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2), antes do tratamento.....	24
<b>Tabela 8:</b> Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos com e sem fibrose, um ano após o tratamento.....	25
<b>Tabela 9:</b> Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2) antes (AT) e um ano depois do tratamento (DT).....	26
<b>Tabela 10:</b> Comparação das frequências de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas produzidos por PBMC após estímulo com SEA dentro dos grupos com e sem fibrose, antes (AT) e um ano depois do tratamento (DT).....	28
<b>Tabela 11:</b> Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos 91 indivíduos, antes e um ano depois do tratamento.....	30
<b>Tabela 12:</b> Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos indivíduos sem fibrose periportal, antes e um ano depois do tratamento.....	30
<b>Tabela 13:</b> Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos indivíduos com fibrose periportal, antes e um ano depois do tratamento.....	31

## RESUMO

Na esquistossomose humana, não existe uma associação clara entre morbidade e resposta imune Th1 e Th2. Atualmente, a estratégia de controle da esquistossomose é baseada na quimioterapia de indivíduos infectados. O objetivo do estudo foi testar a hipótese de que o tratamento com praziquantel altera a resposta imune e reverte o grau de fibrose. A coleta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o exame de ultra-som abdominal foram realizados em voluntários infectados pelo *Schistosoma mansoni*, residentes em área endêmica para a doença, antes e um ano após o tratamento com praziquantel. Os indivíduos foram classificados em grupos de acordo com a patologia (isto é, fibrose ausente, incipiente, moderada ou grave). PBMC foram estimuladas com antígenos solúveis de ovo (SEA) e a produção das citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento e transformação-beta (TGF- $\beta$ ), interleucina-4 (IL-4), IL-10, e IL-13 determinada. A quimioterapia foi eficiente na redução da morbidade, particularmente em indivíduos portadores de fibrose grave. Quando os níveis de citocinas em cultura de PBMC estimuladas por SEA, após o tratamento, foram categorizados em alto e baixo, a proporção de indivíduos produtores de altos níveis de IL-13 foi significativamente maior no grupo de indivíduos com fibrose quando comparado aos indivíduos sem fibrose. A comparação dos níveis de citocinas induzidas por SEA, antes e após o tratamento, em indivíduos que não tiveram seu grau de fibrose alterado pela quimioterapia, revelou que o tratamento induziu uma diminuição nos níveis de IL-10 nos dois grupos, sem fibrose e com fibrose e uma diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  somente no grupo de indivíduos com fibrose. Em conjunto, esses resultados sugerem que a quimioterapia é eficiente na redução da morbidade e que níveis elevados de IL-13 e diminuídos IFN- $\gamma$  podem ser indicadores de persistência de fibrose após o tratamento.

## ABSTRACT

In human schistosomiasis, the association between morbidity and the development of a Th1 or Th2 response is not clear. Currently, schistosomiasis control strategy is mainly based on chemotherapy of infected individuals. The objective of the present study was to test the hypothesis that treatment of schistosomiasis mansoni with praziquantel can alter significantly the immune response of patients and generate a reversal of the level of fibrosis. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were collected from, and abdominal ultrasound examinations conducted on, volunteers infected with *Schistosoma mansoni* and living in an area endemic for the disease, prior to and one year after treatment with praziquantel. Subjects were classified into groups according to the pathology presented (i.e. fibrosis absent, incipient, moderate or severe). PMBC were stimulated with soluble antigens from schistosome eggs (SEA) and the production of the cytokines gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukin-4 (IL-4), IL-10, and IL-13 determined. The chemotherapy was effective in reducing morbidity, particularly in individuals presenting severe fibrosis. When cytokine production in post-treatment PBMC cultures stimulated by SEA was categorized as low or high, significant differences in the distribution of IL-13 levels were established between groups presenting or not presenting fibrosis. Comparison of pre- and post-treatment SEA-induced cytokine levels in individuals that had experienced no change in the grade of fibrosis following chemotherapy, revealed that IFN- $\gamma$  decreased in subjects with fibrosis, whilst IL-10 decreased in individuals with and without fibrosis. The data suggest that chemotherapy is effective in reducing the morbidity of the disease, and that the level of IL-13 and IFN- $\gamma$  may be a useful indicator of the persistence of fibrosis following treatment.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni é a segunda doença tropical em importância no mundo e a terceira doença parasitária mais frequente. Cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se infectadas apenas na África, sendo que, 700 milhões estão expostas ao risco da infecção (Wilson et al. 2007). É uma doença prevalente em várias regiões do mundo e no Brasil, particularmente no estado de Minas Gerais e representa um dos principais problemas de saúde pública (Savioli et al. 1997, WHO 1998, FUNASA 1999, Chitsulo et al. 2000). No Estado de Minas Gerais a distribuição da esquistossomose é irregular, intercalando-se áreas de maior prevalência com outras onde a transmissão é baixa ou nula. A prevalência varia de 25 a 75% nas regiões Nordeste e Leste do Estado, que compreendem os vales do Mucuri, Rio Doce e da mata, o que mostra sua importância do ponto de vista epidemiológico. Nestas regiões está concentrada a maioria dos estudos (Pellon & Teixeira 1950, Katz et al. 1978, Lambertucci et al. 1987, Carvalho et al. 1989, Gazzinelli et al. 2001). A patologia resulta da infecção com o parasito *Schistosoma mansoni* e a gravidade da doença é consequência da fibrose causada pela resposta imune aos ovos que se encontram presos no sistema porta hepático, seqüestrados em lesões granulomatosas (Warren 1968, Chiaramonte et al. 2001).

Além do *Schistosoma mansoni*, única espécie encontrada no Brasil, outras espécies do gênero *Schistosoma* também podem infectar o homem como *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma mekongi* (Neves 2005).

Os esquistossomos têm um complexo ciclo de vida, envolvendo um hospedeiro mamífero no qual vermes adultos dos dois sexos se encontram e depositam ovos; um estágio aquático livre (miracídio) derivado dos ovos excretados no ambiente; um estágio no molusco (esporocisto) com ativa multiplicação assexuada, e outro estágio aquático livre (cercária) que é capaz de infectar o hospedeiro mamífero por rápida penetração na pele intacta. Após a penetração, a larva perde a cauda bifurcada e passa a se denominar esquistossômulo, que migra para sua localização final no sistema venoso do hospedeiro mamífero onde se diferencia em verme adulto (El-Ansary 2003).

No Brasil, três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* (*Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*) são encontradas como hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (Carvalho et al. 2001, Neves 2005).

A infecção ocorre através do contato com águas infestadas por cercárias liberadas pelo caramujo, o hospedeiro intermediário. A cercária penetra na pele do hospedeiro definitivo, e transforma-se em esquistossômulo, fase em que o parasito parece mais vulnerável ao ataque

do sistema imune. O esquistossômulo migra através da corrente sangüínea e/ou vasos linfáticos para os pulmões onde permanece cerca de 10 dias. Posteriormente, os vermes jovens migram para o sistema porta, onde se diferenciam em machos e fêmeas. Nas veias mesentéricas inferiores (*S. mansoni*, *S. japonicum*) ou plexo vesical e ureteres (*S. haematobium*), os vermes se acasalam e as fêmeas iniciam a postura dos ovos. Quando eliminados nas fezes ou urina e em contato com a água, eclodem liberando o miracídio que infecta o caramujo. Parte dos ovos fica retida nos tecidos, onde se tornam alvos da resposta imune do hospedeiro, induzindo uma reação granulomatosa típica em torno dos mesmos (Bogliolo 1959, Warren et al. 1967, Pearce & MacDonald 2002). A fibrose resultante da resolução da reação inflamatória pode levar a hipertensão portal, o que causa a morbidade e a mortalidade associada com a esquistossomose (Cheever & Andrade 1967).

As manifestações clínicas da esquistossomose variam, dependendo da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo a infecção ou do tratamento prescrito. A fase aguda afeta normalmente indivíduos não residentes em áreas endêmicas, ou seja, que não possuem exposição prévia aos antígenos do parasito. Surge entre a quarta e a décima semana após exposição às cercarias, e é caracterizada, em alguns casos, por manifestações toxêmicas durante a migração da larva e no período inicial de postura dos ovos. Alguns indivíduos após a exposição podem apresentar manifestações cutâneas do tipo urticária, além de hepatomegalia (Torres 1976, Boros 1989). Neste período, o doente, em geral, apresenta diarreia característica com presença de muco e sangue (Bogliolo 1959). A fase crônica apresenta variações clínicas dependendo dos órgãos atingidos. As principais formas são: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. A forma intestinal é a mais frequentemente encontrada em pacientes infectados. Nesta forma, os sintomas são geralmente brandos: com perda de apetite, dispepsia e desconforto abdominal. Embora não existam estudos detalhados relacionados à forma hepatointestinal, pacientes portadores dessa forma clínica apresentam uma hepatomegalia não associada à esplenomegalia. A forma hepatoesplênica é a forma mais grave da esquistossomose mansoni e caracteriza-se pelo aumento considerável do baço e do fígado em consequência da fibrose periportal, central e periférica, que pode levar a complicações significativas como hipertensão porta, hipertensão pulmonar e cor pulmonale (Lambertucci et al. 2000, Neves 2005). Esta manifestação acomete uma percentagem pequena da população infectada, variando de 1 a 10%, dependendo da área de estudo (Bina & Prata 2003).

Atualmente, a identificação dos pacientes com hepatoesplenomegalia se baseia no diagnóstico realizado por ultra-sonografia, só possível com o advento do ultra-som portátil

que permitiu determinar com maior precisão o estágio evolutivo da doença nas áreas endêmicas. Os indivíduos portadores da fase crônica passaram a ser agrupados de acordo com o grau de ecogenicidade, expressão da fibrose periportal. (Abdel-Wahab et al. 1992, Mohamed-Ali et al. 1999, Lambertucci et al. 2000, Richter et al. 2003, Magalhães et al. 2005). A ecogenicidade ultra-sonográfica correlacionou-se perfeitamente com os estudos patológicos de biópsia hepática (Homeida et al. 1988). O grau de fibrose periportal pode variar de indivíduo para indivíduo, sendo classificada em: grau 0 (< 3mm), grau 1 (3-5 mm), grau 2 (6- 7 mm), e grau 3 (> 7mm) (WHO, 1991).

Em geral, as reinfecções em áreas endêmicas são constantes e aumentam até os vinte anos de idade, diminuindo progressivamente a partir da segunda década de vida. Na literatura existe um consenso de que, embora ocorra uma pequena redução nos níveis de exposição dos indivíduos com a idade, ela é insuficiente para explicar a grande redução na intensidade de reinfecção, cuja causa foi atribuída ao desenvolvimento de uma resistência adquirida com a idade. Conseqüentemente, esforços têm sido realizados no sentido de elucidar os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ao *Schistosoma* (Butterworth et al. 1985, Wilkins et al. 1987, Gryseels 1994). Entre os indivíduos residentes de área endêmica, existe um pequeno grupo que apesar de apresentar história de contato permanente com águas contaminadas com cercárias, não se infecta e apresenta exames de fezes persistentemente negativos. Esses indivíduos são supostamente resistentes à infecção/reinfecção e foram denominados normais endêmicos (Bahia-Oliveira et al. 1992, Viana et al. 1994, 1995, Corrêa-Oliveira et al. 2000).

Dados da literatura evidenciam que a prevalência das formas clínicas graves da esquistossomose varia de forma considerável entre diferentes áreas endêmicas. Embora tenha sido sugerido que o maior risco de desenvolvimento da morbidade ocorra nos indivíduos com maior intensidade de infecção, comunidades bem definidas, com semelhantes níveis de exposição, apresentaram diferenças marcantes na prevalência dessas formas (Fulford et al. 1998). Em geral, o pico de intensidade de infecção ocorre em média cinco anos antes do pico de prevalência da fibrose periportal, e essa fibrose se manifesta de uma forma mais branda nos indivíduos mais jovens quando comparado aos indivíduos mais velhos. Isso sugere que uma minoria dos indivíduos infectados não controla a inflamação hepática inicial e desenvolvem a forma grave hepatoesplênica, mesmo que a intensidade de infecção desses indivíduos decline com a idade. Essas informações sugerem que outros fatores tais como idade, sexo, estado nutricional, aspectos genéticos, intensidade da resposta imune aos antígenos de ovo, poderiam influenciar a progressão da forma clínica assintomática para as

formas mais graves (Arap Siongok et al. 1976, Butterworth et al. 1985, Dessein et al. 1992, Gryseels 1994, Bethony et al. 1999, Naus et al. 2003, Booth et al. 2004). Na verdade, os fatores determinantes do desenvolvimento da fibrose periportal associada à forma hepatoesplênica são pouco entendidos. Colley et al. (1986a) apontou a intensidade da resposta aos antígenos solúveis do ovo como uma possível causa. De qualquer maneira, as células CD4+ estão envolvidas, quer induzindo um aumento de resposta aos antígenos de ovo nos pacientes susceptíveis ao desenvolvimento de hepatoesplenomegalia (Colley et al. 1986a), quer na produção de citocinas que regulam os níveis de isotipos associados a resistência à infecção (Hagan et al. 1991, Dunne et al. 1992). Investigações têm mostrado que as citocinas produzidas por essas células são importantes na formação do granuloma, modulação e desenvolvimento de fibrose hepática (Cheever et al. 1994, Wynn et al. 1995). Diversos estudos têm traçado um esboço da importância de citocinas na resposta imune à infecção esquistossomótica, e têm especulado sobre as evidências de uma dicotomia Th1/Th2 (Gryzch et al. 1991, Pearce et al. 1991, Sher et al. 1991). O papel das citocinas tem sido investigado na resposta imune a antígenos brutos e/ou fracionados de *S. mansoni*.

Na esquistossomose murina, a resposta do tipo Th1 está associada com proteção à infecção, enquanto que a resposta do tipo Th2 correlaciona-se com a morbidade induzida pelos ovos do parasito. Já na esquistossomose humana, a dicotomia Th1/Th2 não é tão evidente na resistência à infecção ou na morbidade. A resistência/susceptibilidade a reinfeção após quimioterapia foi associada ao balanço entre dois isotipos IgE/IgG4 (Hagan 1991), enquanto altos níveis de IgG4 anti-SEA (antígeno solúvel de ovo) foram associados à presença de fibrose periportal independente da intensidade de infecção (Silveira et al. 2002). Sabe-se, também, que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos normais endêmicos, supostamente resistentes, secretam níveis elevados de IFN- $\gamma$  após estímulo antigênico, sugerindo que a resistência natural à infecção é dependente, além de IgE, também de uma resposta do tipo Th1 (Viana et al. 1995, Correa-Oliveira et al. 2000). Portanto, a esquistossomose ilustra a complexidade e o limite do paradigma Th1/Th2, dependendo do modelo utilizado.

Existem evidências de que as citocinas do tipo Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 contribuem para a formação do granuloma (Chensue et al. 1992, Reiman et al. 2006), sendo a IL-13 o mediador chave da fibrose (Chiaramonte et al. 2001, Alves-Oliveira et al. 2006). Enquanto o IFN- $\gamma$ , uma citocina do tipo Th1, foi considerada antifibrogênica, pela sua capacidade de inibir a produção de proteínas de matriz extracelular, tais como colágeno e aumentar a síntese de metaloproteínas, responsáveis pela degradação do colágeno (Duncan & Berman 1985,

Mallat et al. 1995, Dessein et al. 2004). Por sua vez, o TNF- $\alpha$ , outra citocina Th1, foi associada com o risco aumentado de desenvolver fibrose grave em indivíduos infectados (Henri et al. 2002, Booth et al. 2004).

O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica produzida por células T reguladoras, e foi associado à fibrose em virtude de sua habilidade de induzir a deposição de colágeno, inibindo metaloproteinases de matriz (Letterio & Roberts 1998, Zhu et al. 2000, Farah et al. 2000). No entanto, na esquistossomose experimental, Mola et al. (1999), usando o modelo de reinfecção em babuínos, correlacionaram altos níveis de TGF- $\beta$  com a diminuição do granuloma, e na esquistossomose humana, Alves-Oliveira et al. (2006) encontraram uma associação inversa do TGF- $\beta$  com fibrose, avaliando grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose. Em concordância com esses autores, Kitani et al. (2003) sugerem que o TGF- $\beta$  pode controlar a progressão da fibrose induzindo a síntese de IL-10 pelas células T reguladoras.

O envolvimento da IL-10 na modulação da resposta proliferativa de PBMC de indivíduos portadores da fase crônica da esquistossomose foi descrito previamente por diversos autores (Araújo et al. 1996, King et al. 1996, Malaquias et al. 1997, Falcão et al. 1998, Montenegro et al. 1999), que relacionam a patogênese com deficiência de IL-10 nas formas graves da doença. Nesse contexto, existem evidências de que a IL-10 é um importante regulador das respostas Th1 e Th2, demonstrado na esquistossomose experimental, quando a ausência de IL-10 e IL-4 ou de IL-10 e IL-12 resultou em respostas diferentes, altamente polarizadas e igualmente deletérias (Hoffmann et al. 2000).

A quimioterapia tornou-se o método central de controle da esquistossomose humana (Mott 1982, World Health Organization 1985), diante das evidências que mostram a erradicação da infecção, a regressão das formas hepatoesplênicas (Bina 1977, Katz et al. 1977, Coura et al. 1980, Prata et al. 1980) e a regressão da fibrose confirmada pelo exame de ultra-som (Zwingenberger et al. 1988, Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992, Boisier et al. 1998, Singh et al. 2004, Homeida et al. 1991, Andrade et al. 2006, Cota et al. 2006).

Há quase um século, o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio) foi introduzido como primeiro agente terapêutico da esquistossomose (Christopherson 1918). Em seguida, vários sais de antimônio foram introduzidos para o uso clínico, administrados por via intramuscular ou intravenosa. Posteriormente, durante a Segunda Guerra Mundial, cientistas da indústria farmacêutica Bayer na Alemanha desenvolveram o lucanthone (miracil D), primeiro agente esquistossomicida conhecido de uso oral. Na década de 60, a hidrometilação do lucanthone (miracil D) deu origem a uma droga ativa tanto por via muscular como por via oral, em dose única, denominada hycantone (Archer & Yarinsky 1972). Infelizmente efeitos

tóxicos graves apareceram com uso do hycantone, causando óbitos por atrofia aguda do fígado (Andrade et al. 1974). Na década de 70, iniciam-se os estudos com a oxamniquina (Pfizer, Inglaterra), droga de tolerância boa e percentual de cura alto, especialmente no Brasil e em outros países do continente americano, mas sem os mesmos resultados terapêuticos bons no Egito e no lado Oriental e Central da África. No fim dessa mesma década, aparece o praziquantel (descoberta alemã da indústria Merck e desenvolvida em conjunto com a Bayer), que atualmente é considerada a droga de escolha para tratamento clínico e uso em saúde pública nas áreas endêmicas para esquistossomose (Cioli 1998).

O praziquantel, um derivado da pyrazinoisoquinolina, é atualmente a droga de escolha como método de controle da esquistossomose e sua eficiência em regredir a morbidade já foi demonstrada (Homeida et al. 1991, Boisier et al. 1998). A droga é segura e apresenta alta eficácia contra trematodas e cestodas (Cioli 1998, Botros et al. 2005). Algumas evidências mostram que a quimioterapia com praziquantel induz uma mudança na resposta imune humoral e celular de indivíduos infectados (Grogan et al. 1996, Mutapi et al. 1998, Reimert et al. 2006, Walter et al. 2006). Algumas dessas mudanças levaram a uma proteção parcial contra a infecção pelo *S. mansoni* envolvendo respostas do tipo Th2 (Reimert et al. 2006, Walter et al. 2006). De forma controversa, a persistência de fibrose após o tratamento, na infecção pelo *S. japonicum*, também, foi associada às citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Coutinho et al. 2007).

A resposta imune individual ao *Schistosoma* é altamente variável e as razões pelas quais alguns indivíduos infectados progridem para as formas clínicas mais graves da doença permanecem pouco entendidas. Muitos fatores podem contribuir para a heterogeneidade da resposta imune e para a manifestação da doença observada na esquistossomose. Seres humanos experimentam diferentes padrões de exposição e intensidade de infecção, além de se submeterem a tratamentos ocasionais, fatores estes que podem afetar a resposta imune e o desenvolvimento da doença.

Nesse estudo, nós avaliamos o efeito do tratamento com praziquantel na morbidade causada pelo *S. mansoni* e na produção de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos submetidos ao exame parasitológico de fezes e de ultra-som, visando à identificação da fibrose periportal.

## JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de trabalhos na literatura que avaliam aspectos específicos da resposta imune na esquistossomose mansoni humana, ainda não está claro quais são os mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento das várias formas clínicas da doença, inclusive quais seriam os eventos iniciais que poderiam influenciar o desenvolvimento de um quadro de fibrose moderada ou acentuada durante a evolução da doença. Embora constem da literatura alguns relatos sobre o impacto da quimioterapia na resposta imune dos indivíduos, não existem comparações detalhadas das possíveis mudanças na resposta imune em função do tratamento. O entendimento sobre a progressão/regressão da fibrose após o tratamento observada em alguns indivíduos ainda não foi devidamente explorado. Dessa forma, estudos adicionais precisam ser desenvolvidos para o esclarecimento dessas questões.

Como foi dito anteriormente a prevalência das formas clínicas mais graves da esquistossomose varia de forma considerável entre diferentes áreas endêmicas (Gryseels e Poldeman, 1987, Doehring-Schwerdtfeger et al. 1990, Barbosa et al. 1995, Martins et al. 1998, Bina e Prata, 2003, Naus et al. 2003) e o papel da resposta imune do tipo Th1 e Th2 durante a infecção permanece ainda controverso (Corrêa-Oliveira et al. 1998, Booth et al. 2004, De Jesus et al. 2004). Nesse contexto, o estudo da produção de citocinas, expressão de marcadores de superfície celular e outros elementos do sistema imune serão de grande valia para identificação de componentes imunes celulares envolvidos nos mecanismos imunopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

A descrição desses mecanismos imunes na esquistossomose é derivada, em sua maioria, de modelos murinos, porém existem diferenças marcantes das respostas imunológicas presentes na infecção humana. Para exemplificar, os mecanismos que determinam o desenvolvimento da fibrose periportal em seres humanos são desconhecidos, exceto pelo papel de alguns fatores genéticos e epidemiológicos (Dessein et al. 1999a,b, Mohamed-Ali et al 1999, Booth et al. 2004, Alves-Oliveira et al. 2006). Já a patologia induzida pelo ovo tem sido extensamente investigada em modelos experimentais, e a utilização de camundongos deficientes na produção de citocinas, mostrou que elas estão envolvidas na regulação do granuloma e da fibrose hepática (Kaplan et al. 1998, Wynn et al. 1997, Hoffmann et al. 2000). O quanto desses achados pode ser extrapolado para a doença em

seres humanos é desconhecido. Contudo, certas observações feitas no camundongo têm sido confirmadas em seres humanos.

Na esquistossomose humana, a análise do papel das citocinas na fibrose hepática é difícil por diversas razões: tais estudos devem ser conduzidos no campo com indivíduos apresentando níveis de exposição e hábitos de vida semelhantes; a investigação deve ser realizada em indivíduos com infecção ativa, e a influência das co-variáveis não imunológicas deve ser avaliada durante as análises. Além disso, por razões éticas, a maioria dos estudos imunológicos em indivíduos infectados se restringem ao estudo de proliferação de leucócitos do sangue periférico, embora outras células também sejam importantes no desenvolvimento de fibrose (Friedman 2004).

Nesse estudo nós avaliamos a morbidade e a resposta imune dos indivíduos infectados com o *S. mansoni* antes e após o tratamento quimioterápico específico. Esse trabalho se torna extremamente importante diante das evidências que sugerem a redução da fibrose após tratamento (Katz & Brener 1966, Boisier et al. 1998, Andrade et al. 2006, Ruiz-Guevara et al. 2007) e se constitui numa ferramenta importante para estabelecer proposições futuras, visando uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos no controle da morbidade, na sua progressão e regressão.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do tratamento com praziquantel na morbidade causada pelo *Schistosoma mansoni* e na produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos submetidos ao exame parasitológico de fezes e de ultra-som, visando à identificação do grau de fibrose periportal.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar a intensidade de infecção e a prevalência dos pacientes esquistossomóticos pelo método Kato-Katz antes e um ano após tratamento.
- Determinar o grau de fibrose periportal por ultra-sonografia antes e um ano após tratamento.
- Analisar o perfil de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL4, IL13, TGF- $\beta$  e IL10 presentes no sobrenadante de cultura das células mononucleares do sangue periférico de indivíduos portadores de esquistossomose residentes em área endêmica, antes e um ano após tratamento.
- Verificar a relação entre produção de citocinas e grau de fibrose antes e um ano após tratamento.

## **METODOLOGIA**

### **1.0 ESTUDO DA ÁREA E DA POPULAÇÃO**

O estudo da esquistossomose em áreas endêmicas vem sendo realizado desde 1990, pelo grupo de pesquisadores da Universidade Vale do Rio Doce juntamente com a equipe liderada pelo Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira e pelo Dr. Giovanni Gazzinelli, do Instituto René Rachou-Fiocruz em Belo Horizonte. Atualmente, estamos investigando, localidades definidas pela FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, como áreas rurais de alta prevalência para esquistossomose, no Vale do Rio Doce, Vale do Mucuri e Vale do Jequitinhonha. Dados demográficos sobre a população, mapa das casas, rios e córregos, além de coleta de caramujos para avaliação do percentual de infecção vêm sendo realizados, caracterizando a ocorrência de transmissão ativa nessas localidades (Bethony et al. 2001, 2004, Kloss et al. 2001, 2004). Todos os córregos das localidades foram considerados para observação de contato com águas, além de outras fontes de águas utilizadas pelas populações. A avaliação do contato é realizada durante um período determinado de tempo a fim de se compreender as variações de comportamento que podem ocorrer dependente das diferentes estações do ano (Gazzinelli et al. 2001).

Esta investigação foi realizada em Virgem das Graças, uma comunidade rural com cerca de 600 habitantes, que pertence ao município de Ponto dos Volantes, Vale do Jequitinhonha, Estado de Minas Gerais.

Todos os residentes na área que desejaram participar do estudo receberam um número de identificação e foram submetidos a repetidos exames de fezes usando o método Kato Katz (Katz et al. 1972). A infecção ativa pelo *S. mansoni* foi definida pela presença de ovos nas fezes. Trezentos e vinte oito voluntários submeteram-se ao exame de ultra-sonografia abdominal antes do tratamento, um ano após o tratamento cento e quatro retornaram para realizar o exame. Os exames ultra-sonográficos foram realizados por médicos especialistas que não tinham conhecimento prévio dos resultados dos exames de fezes. Foram coletados 20ml de sangue para os ensaios imunológicos antes e um ano após o tratamento. O praziquantel na dose de 50 mg/Kg foi administrado a todos os indivíduos que realizaram exame de fezes.

O consentimento livre e esclarecido assinado pelos pacientes, parentes ou responsáveis foi indispensável para que os mesmos participassem do estudo. O tratamento das parasitoses

era garantido aos moradores da vila independente da participação no programa. Esse projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética da Fundação Oswaldo Cruz e da UNIVALE.

## **2.0 EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES**

A presença e número de ovos do parasito por grama de fezes foram determinados através do exame de duas lâminas das amostras de fezes de cada paciente de acordo com o método Kato-Katz (Katz et al. 1972). Foram coletadas três amostras fecais por paciente. A contagem de ovos é resultado da média aritmética das três determinações e definida como opg (ovos por grama de fezes). Um ano após o tratamento os exames de fezes foram repetidos usando a mesma estratégia de análise descrita anteriormente. Os exames são rotineiramente realizados pelos técnicos do Núcleo de pesquisa em Imunologia da UNIVALE, em Governador Valadares.

## **3.0 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO**

Os pacientes foram submetidos à ultra-sonografia abdominal usando um aparelho portátil HITACHI EUB-200. Dos indivíduos que atenderam ao convite para o exame de ultrassom, foram excluídos os menores de 14 anos, pois é acima dessa faixa etária que as alterações periportais podem ser identificadas. O diâmetro das veias porta e mesentérica, tamanho do fígado e baço e espessamento da parede dos ramos portais central e periférico foram avaliados segundo Homeida et al. 1988, Abdel-Wahab et al. 1992, Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992. Nesse estudo adotou-se a classificação da Organização Mundial de Saúde (1991) para avaliar a morbidade pela infecção pelo *S. mansoni*: grau zero, espessamento da parede dos ramos periportais menor que 3 mm; grau 1, fibrose entre 3-5 mm; grau 2, fibrose entre 6-7 mm; e, grau 3, > 7 mm.

## **4.0 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS COM CERCARIAS (TBM)**

Para avaliarmos o comportamento em relação ao contato com água foi calculado o “índice” TBM (Tempo Total de Exposição do Corpo, em minutos). O TBM foi calculado através dos dados obtidos da observação direta de contato com água e questionários.

Os autores determinaram as atividades de contato com água mais frequente, quantificaram a média da duração de exposição em minutos e o percentual da área do corpo

exposta à água, e combinaram esses três elementos em um único índice denominado TBM, como descrito por Gazzinelli et al. 2001.

## **5.0 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS**

Os antígenos solúveis de ovo do parasito foram preparados segundo método descrito por Gazzinelli et al. (1983). Os ovos foram coletados de camundongos albinos swiss infectados com cercárias da cepa LE do *S. mansoni* após seis semanas de infecção e triturados em salina 1,7% utilizando-se um homogeneizador com pistão de teflon (Potter). O homogenato resultante foi centrifugado a 100.000g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado em salina fisiológica (0,85%) por um período de 48 horas a 4°C, e em seguida, esterilizado utilizando-se filtro de 0,45µm (filter millex -HA- Millipore Products Division, Bedford, MA). Finalmente, a concentração de proteínas dos antígenos solúveis de ovo (SEA) foi determinada usando-se kit de BCA (Pierce, IL). As soluções antigênicas foram aliqüotadas e conservadas à -70°C, para uso posterior nos ensaios de estimulação antigênica.

## **6.0 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO**

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano foram separadas segundo procedimento descrito por Gazzinelli et al. (1983). Para obtenção dessas células, 20 ml de sangue periférico coletados em anticoagulante (Heparin, Sigma; 300 U de heparina/20 ml de sangue) foram adicionados lentamente pelas paredes dos tubos (Falcon), que já continham pelo menos 9,0 ml de LSM (Lymphocyte Separation Medium, Litton Biometrics, Kensington, MD). Em seguida, esses tubos foram centrifugados a 400 x g, durante 45 minutos, à 18°C (Model j-6b Centrifuge, Beckman). Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e plasma. O anel de células mononucleares foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur (Thomas Laboratory Specialities, Philadelphia, PA) e transferido para tubos cônicos (Falcon). As células foram, então, lavadas 3 vezes com RPMI (RPMI-medium 1640, GIBCO) utilizando-se diferentes volumes de meio de cultura. Na primeira lavagem foi usado cerca de 30 ml, e nas outras duas vezes apenas 15 ml de meio. A cada lavagem as células foram centrifugadas a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. Na última etapa, o meio foi desprezado por inversão e as células ressuspendidas em 2,0 ml de RPMI acrescido de 5% de soro humano AB+, 3% de antibiótico-

antimicótico e 1,6% de L-glutamina (CMBLAST). O número de células foi obtido pela contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico, a partir de uma alíquota de células diluída em solução de Turck's (1:20). A concentração final foi ajustada com CMBLAST para  $10 \times 10^6$  células por mililitro. Toda a manipulação foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (BBL-Biological Cabinet, model 60474, Cocheysville, MD).

## **7.0 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMC**

$1,0 \times 10^6$  células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ressuspendidas em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO) contendo 1,6% de L-glutamina (Solução estoque: 200Mm, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 3% de antibiótico-antimicótico (Solução de estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000  $\mu\text{g}$  de estreptomicina e 25 $\mu\text{g}$  de fungizona por mililitro, GIBCO BRL) e 5% de soro humano normal AB+ inativado (SIGMA Lote:116H4661) (CMBLAST), foram cultivadas em placas de 24 poços (Falcon, BD) durante 144 hs, para SEA na concentração final de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 3 dias para o mitógeno PHA (SIGMA) em incubadora contendo 5% de  $\text{CO}_2$  (Forma Scientific, Marietta, OH, USA), em atmosfera úmida. As culturas controle foram cultivadas nas mesmas condições descritas acima sem estímulo antigênico ou mitogênico.

## **8.0 ENSAIO DE CITOCINAS**

Os níveis de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de PBMC, foram determinados através do ensaio de ELISA. As placas de ELISA foram sensibilizadas com alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  de anticorpo monoclonal anti-citocina humana, diluído em tampão Carbonato Bicarbonato 0,1 M, PH 9,5 e incubadas durante 18 h a 4° C. As placas foram então lavadas 3X com PBS-T (PBS 0,15M contendo KCl Ph 7,0 com 0,05% TWEEN 20). Após um bloqueio por 12 minutos à temperatura ambiente, com 200 $\mu\text{l}$  de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T. Alíquotas de 50 $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultura foram então adicionadas às placas, ao mesmo tempo, em que foi adicionada diferentes concentrações de citocina humana recombinante nos poços selecionados para construção da curva padrão. As placas foram incubadas por 18 horas, a 4°C. Após lavagens sucessivas das placas com PBS-T, alíquotas de

50 µl de um anticorpo de detecção (preparação contendo um anticorpo policlonal anti-citocina humano biotilado diluído em PBS contendo 10% de soro fetal bovino, e o conjugado avidina-peroxidase) foram adicionadas, e as placas foram reincubadas à temperatura ambiente por 1 h. Na etapa final da reação, e após lavagens sucessivas das placas, 50µl do substrato *O*-Phenyldiamino (OPD) (Sigma, ST. Louis, MO) contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio foram adicionadas em cada poço na concentração de 1mg/ml. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N, e a densidade ótica medida a 450 nm em leitor automático de ELISA. Nas dosagens das citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram utilizados kits da Pharmingen.

## 9.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados usando o EpiInfo (CDC) software versão 6.04d e analisados pelo programa SPSS software versão 11.5 e software GraphPad PRISM versão 4. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de  $\alpha$  0,05. A análise de variância seguida do teste de Tukey foi usada para comparação entre os grupos quando os dados atendiam às suposições de normalidade e variância constante entre os resíduos. Testes não paramétricos foram utilizados para análises de variáveis contínuas quando os dados não se ajustavam às suposições da análise de variância. Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e na comparação entre três ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pela análise de comparações múltiplas pelo teste de Dunns. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para análises de variáveis categóricas. A comparação das citocinas antes e depois do tratamento considerando grupos pareados foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

A relação entre as citocinas e entre elas e intensidade de infecção, fibrose ou idade foi examinada pelo teste de correlação de Spearman.

Para comparar as diferenças na intensidade de infecção antes e após o tratamento dentro da faixa-etária na população total, foi utilizado o teste de Mann-Whitney devido a ocorrência de variações no número de indivíduos dentro de cada faixa-etária.

## RESULTADOS

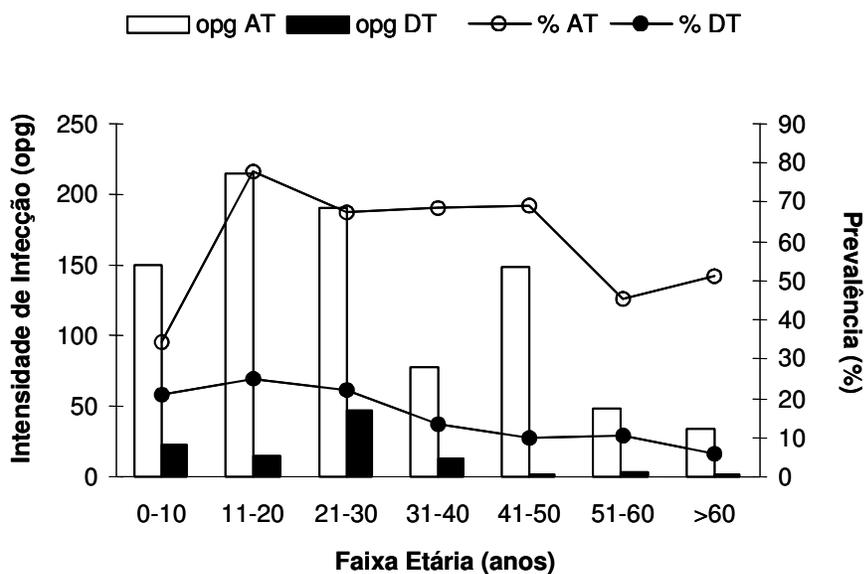
### 1.0 INTENSIDADE DE INFECÇÃO E PREVALÊNCIA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL

A nossa proposta foi avaliar o grau de infecção dos pacientes esquistossomóticos pelo método Kato-Katz, determinar o perfil de fibrose periportal por ultra-sonografia e associar esses parâmetros ao perfil de citocinas após estímulo antigênico específico, antes e um ano após o tratamento. A população de Virgem das Graças é constituída de aproximadamente 600 indivíduos, desses 588 realizaram exame de fezes antes do tratamento. A prevalência para esquistossomose foi de 56% e a média de intensidade de infecção de  $135 \pm 446$  ovos/g de fezes. Dos indivíduos que realizaram o exame parasitológico 282 (48%) eram do sexo masculino e 306 (52%) do sexo feminino. Um ano após o tratamento, 478 indivíduos repetiram o exame de fezes, a prevalência para esquistossomose foi três vezes menor (17%) e a intensidade de infecção reduziu para  $16 \pm 94$  ovos/g de fezes. A proporção de homens e mulheres permaneceu semelhante com 221 (46%) indivíduos do sexo masculino e 257 (54%) do sexo feminino (Tabela 1). Como observado na maioria das áreas endêmicas, os resultados do levantamento coproparasitológico, antes do tratamento, mostram uma maior percentagem e intensidade de infecção nos indivíduos mais jovens. A prevalência alcançou um pico máximo de 78% na faixa etária entre 11 a 20 anos e permaneceu alta nos demais grupos etários, variando 34% a 69%. A intensidade de infecção foi, também, mais alta na faixa etária entre 11 e 20 anos, com uma média aritmética de 215 ovos/grama de fezes, que variou entre 34 a 190 ovos/grama nos demais grupos etários. O tratamento levou a uma diminuição significativa da intensidade de infecção e da prevalência em todas as faixas etárias (Figura 1). Em relação ao sexo, antes do tratamento, os homens apresentaram uma média de intensidade de infecção de  $137 \pm 434$  ovos/g e as mulheres  $133 \pm 457$  ovos/g de fezes. Após tratamento a intensidade de infecção para os homens reduziu para  $9 \pm 44$  ovos/g e para  $22 \pm 121$  ovos/g de fezes para as mulheres.

**Tabela 1:** Idade, intensidade de infecção, prevalência e sexo da população em estudo, antes e após o tratamento.

Tratamento	N	Idade*	opg*	Pos (n)	Neg (n)	Prev (%)	Sexo	
							Masc	Fem
Antes	588	30 ± 23	135 ± 446	339	249	56	282 (48%)	306 (52%)
Após	478	30 ± 23	16 ± 94	80	398	17	221(46%)	257 (54%)

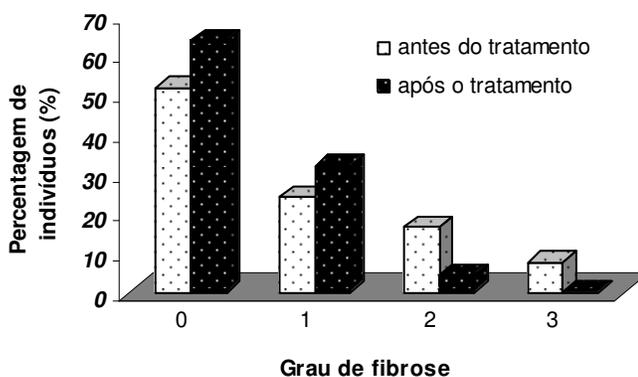
\*média aritmética ± desvio padrão; (opg) número de ovos por grama de fezes; (n) número de indivíduos; (pos) positivo; (neg) negativo; (prev) prevalência; (%) percentagem; (Masc) masculino e (Fem) feminino.



**Figura 1:** Intensidade de infecção e prevalência por faixa etária da população em estudo, antes (AT) e depois do tratamento (DT). (opg) média aritmética do número de ovos por grama de fezes. (%) prevalência de infecção.

## 2.0 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL

O impacto da quimioterapia sobre a fibrose periportal foi avaliado um ano após o tratamento, através do exame de ultra-sonografia realizado em 91 indivíduos. Podemos observar na Figura 2, uma total reversão da morbidade grave ou grau 3 (0/7, 100%), uma considerável redução da fibrose moderada ou grau 2 (4/15, 27%), e conseqüentemente, um aumento no número de indivíduos sem fibrose (58/47, 19%) ou com fibrose incipiente (29/22, 24%). As alterações no grau de fibrose estão mostradas na Tabela 3 e podem ser resumidas como se segue: dos sete indivíduos que apresentavam fibrose do grau 3 antes do tratamento, um reverteu a fibrose para o grau 0, cinco para grau 1 e um para grau 2; dos quinze indivíduos com fibrose grau 2, sete reverteram a fibrose para grau 0, seis para grau 1 e dois mantiveram o mesmo grau de fibrose após o tratamento; dos vinte e dois indivíduos com fibrose grau 1, seis reverteram para grau 0, quinze permaneceram com o mesmo grau de fibrose e um aumentou para o grau 2; dos quarenta e sete indivíduos com fibrose grau 0, quarenta e quatro permaneceram com o mesmo grau de fibrose e três aumentaram para grau 1. Em resumo, um ano após o tratamento 26 (29%) indivíduos diminuíram o grau de fibrose, 61(67%) mantiveram o mesmo grau de fibrose e 4(4%) tiveram o grau de fibrose aumentado. A proporção de indivíduos com patologia (grau 2 e 3) diminuiu de 24% antes do tratamento para 4% após tratamento ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2:** Grau de fibrose determinado por exame de ultra-sonografia realizado em 91 indivíduos, antes e um ano após o tratamento com praziquantel.

**Tabela 2:** Transições do grau de fibrose dos 91 indivíduos, um ano após o tratamento com praziquantel.

		ECO 2				TOTAL
		0	1	2	3	
ECO 1	0	44	3	0	0	47
	1	6	15	1	0	22
	2	7	6	2	0	15
	3	1	5	1	0	7
	TOTAL	58	29	4	0	91

eco 1 = ecogenicidade periportal antes do tratamento;  
eco 2 = ecogenicidade periportal um ano após tratamento.

As transições observadas na Tabela 2 levantam a seguinte questão: qual o perfil demográfico dos indivíduos que experimentaram uma mudança com o tratamento para um grau menor de fibrose? A Tabela 3 compara o perfil dos 26 indivíduos que reverteram o grau de fibrose com o perfil dos 17 indivíduos que não tiveram seu grau de fibrose alterado um ano após o tratamento. Desses dados podemos observar que a reversão da fibrose ocorreu predominantemente nos indivíduos que apresentavam fibrose moderada ou grave (20/26), enquanto a maioria dos indivíduos sem alteração do grau de fibrose eram portadores de fibrose incipiente (15/17) ( $p < 0,001$ ).

A comparação entre os dois grupos mostra que os indivíduos que reverteram a fibrose apresentavam uma média de idade maior ( $p = 0,010$ ), e uma intensidade de infecção menor ( $p = 0,037$ ), não sendo observada diferenças quanto a prevalência da infecção ( $p = 0,151$ ) ou do sexo ( $p = 0,350$ ). Comparando-se o sexo feminino entre os dois grupos observa-se que o grupo que não reverteu a fibrose apresentava uma média de intensidade de infecção maior ( $p = 0,057$ ), porém essa intensidade de infecção não diferia entre os indivíduos do sexo masculino ( $p = 0,452$ ). A análise dentro do grupo entre os sexos mostra que as mulheres possuíam uma intensidade de infecção treze vezes menor que a dos homens no grupo que reverteu o grau de fibrose e quatro vezes maior no grupo que não teve a fibrose alterada pelo tratamento.

**Tabela 3:** Perfil dos indivíduos que reverteram para um grau menor de fibrose periportal, um ano após o tratamento com praziquantel.

	Reverteram	Não reverteram	<i>p</i> <sup>a</sup>
Número	26	17	
Idade <sup>b</sup>	57 ± 13	43 ± 17	0.010
opg <sup>b</sup>	40 ± 89	213 ± 345	0.037
Prevalência (%)	42%	65%	0.151
Nº de mulheres	10 (38%)	9 (53%)	0.350
Nº de homens	16 (62%)	8 (47%)	
opg de mulheres <sup>b</sup>	5 ± 9	322 ± 450	0.057
opg de homens <sup>b</sup>	63 ± 109	90 ± 88	0.452

<sup>a</sup> Níveis de significância baseados no teste de  $\chi^2$  (variáveis categóricas) ou no teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas): valor significativo quando  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Os valores estão descritos como média ± desvio padrão. (opg) número de ovos por grama de fezes.

### 3.0 RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DE INFECÇÃO E IDADE NA AMOSTRA DE PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO DE IMUNOLOGIA CELULAR

A relação entre intensidade de infecção e idade foi analisada na amostra de pacientes incluídos no estudo de imunologia celular, restringida a 91 indivíduos, que por razões técnicas continham, em suas amostras de sangue, o número de células suficientes para os ensaios de avaliação da produção de citocinas. Esses indivíduos foram distribuídos em três grupos de acordo com as alterações visíveis aos exames da veia porta. O grupo 0 continha quarenta e sete indivíduos que não mostraram evidências de fibrose hepática e não apresentaram qualquer alteração visível no fígado ou baço. A medida da espessura da veia porta desses pacientes foi menor que 3 mm, portanto classificada como grau 0. O grupo 1 reuniu vinte e dois indivíduos que apresentaram medidas de espessamento da veia porta entre 3-5 mm, fibrose considerada incipiente, grau 1. O grupo 2 foi composto de vinte e dois indivíduos, entre os quais quinze tinham fibrose moderada apresentando espessura da veia porta entre 6-7 mm, e sete apresentavam fibrose grave, com espessura da veia porta maior que 7 mm. Após o tratamento, em função da regressão da fibrose, o grupo 0 reuniu cinquenta e oito indivíduos, o grupo 1 ficou constituído de vinte e nove indivíduos e o grupo 2 com somente quatro, todos apresentando fibrose moderada. Após o tratamento não foram identificados indivíduos com fibrose grave.

Informações referentes à idade, intensidade de infecção e índice de contato com água, antes e após tratamento relacionadas aos três grupos são apresentadas na Tabela 4. Nossos resultados demonstram que antes do tratamento, os indivíduos com fibrose moderada-grave, reunidos no grupo 2, mostraram uma média de idade superior aos indivíduos sem fibrose periportal ( $p < 0,05$ ) e com fibrose incipiente ( $p < 0,01$ ); e uma intensidade de infecção significativamente menor que a dos outros dois grupos (G0,  $p < 0,05$  e G1,  $p < 0,01$ ). Em relação ao contato com água, não encontramos diferença significativa entre os índices quando comparamos os três grupos ( $p = 0,159$ ). Após tratamento, nenhuma diferença entre os três grupos foi observada no que se refere a idade ( $p = 0,525$ ), intensidade de infecção ( $p = 0,241$ ) e contato com água ( $p = 0,917$ ). A diferença do número de indivíduos (N) entre os grupos, antes e após tratamento, foi devida a migração de uns indivíduos de um grupo para outro em consequência da alteração do grau de fibrose com o tratamento.

**Tabela 4:** Idade, intensidade de infecção e contato com água dos indivíduos agrupados pela presença de fibrose periportal.

Antes do tratamento (n = 91)							
Grupo	eco*	N	Idade † (anos)	opg †	ovos +	ovos -	TBM(n)
0	< 3	47	49 ± 19	71 ± 163	29(62%)	18(38%)	129(44)
1	3-5	22	44 ± 15	188 ± 310	15(68%)	7(32%)	135(22)
2	> 5	22	59 ± 13 ‡	24 ± 69 ‡‡	7(32%)	15(68%)	114(21)
Após tratamento (n = 91)							
0	< 3	58	50 ± 18	8 ± 31	8(14%)	50(86%)	153(57)
1	3-5	29	48 ± 17	0 ± 2	1(3%)	28(97%)	154(29)
2	> 5	4	59 ± 4	0 ± 0	0	4 (100%)	138(4)

\* Fibrose periportal (mm); † média aritmética ± desvio padrão; (opg) ovos por grama de fezes; (TBM) média aritmética do índice de contato com água; (n) número de indivíduos; (+) positivo; (-) negativo; ‡ diferenças significativas entre os grupos G2 e G0 ( $p < 0,05$ ) e G1 ( $p < 0,01$ ) baseadas no teste de análise de variância seguido pelo teste de Tukey; ‡‡ diferenças significativas entre os grupos G2 e G0 ( $p < 0,05$ ) e G1 ( $p < 0,01$ ) baseadas no teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns. Valor significativo quando  $p < 0,05$ .

#### **4.0 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL**

Essas análises foram direcionadas para investigar os fatores imunológicos associados à patogênese da esquistossomose, bem como o efeito da quimioterapia na produção de citocinas pelos indivíduos portadores de fibrose periportal. Para tanto, conduzimos as análises agrupando os indivíduos de duas formas diferentes. Inicialmente os 91 indivíduos foram distribuídos nos três grupos G0, G1 e G2 conforme descrito no item anterior. Os níveis de citocinas foram comparados entre e dentro dos grupos, antes e um ano após o tratamento. Avaliamos, ainda, nesses grupos a frequência de indivíduos alto ( $>$  mediana) ou baixo ( $\leq$  mediana) produtores de citocinas. Esses indivíduos foram categorizados tendo como referência o valor da mediana calculada na amostra de 91 indivíduos. Posteriormente, os indivíduos foram agrupados de acordo com a presença ou ausência da fibrose. Nessas análises consideramos somente 61 indivíduos, excluindo da amostra os que tiveram o seu grau de fibrose alterado pelo tratamento. Comparamos os níveis de citocinas do mesmo indivíduo, antes e após o tratamento e a frequência de alto ou baixo produtores de citocinas, neste caso utilizando como valor de referência a mediana dos níveis de citocinas dos 61 indivíduos antes do tratamento.

##### **4.1 Comparação dos níveis de citocinas entre os grupos antes do tratamento**

A Tabela 5 mostra a mediana dos níveis de citocinas produzidas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas por SEA, pelos indivíduos agrupados de acordo com o grau de fibrose periportal antes do tratamento. Os valores dos níveis de citocinas após estímulo antigênico foram subtraídos dos valores sem estímulo, e estão expressos em pg/ml. As citocinas avaliadas foram IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$ . Nessa análise observamos diferença significativa apenas para os níveis de IL-10 que estavam diminuídos no grupo de indivíduos que apresentavam uma fibrose moderada-grave (G2) quando comparado ao grupo de indivíduos sem fibrose (G0) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Níveis de citocinas produzidas por PBMC após estímulo com SEA de indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2) antes do tratamento.

Citocinas	G0	G1	G2	$p^a$
IFN- $\gamma$	213	478	563	0,882
TNF- $\alpha$	78	41	123	0,435
IL-4	19	17	16	0,907
IL-13	196	377	628	0,127
<b>IL-10</b>	162	138	63	<b>0,020*</b>
TGF- $\beta$	0	0	0	0,740

Os resultados estão expressos em mediana para valores em pg/ml (experimental – controle). <sup>a</sup> Níveis de significância baseados no teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns. \* Diferença significativa entre os grupos G0 e G2 ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Comparação dos níveis de citocinas entre os grupos após o tratamento

A avaliação dos níveis de citocinas entre os grupos após o tratamento foi realizada no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas por SEA dos indivíduos agrupados pelo grau de fibrose. Nenhuma diferença significativa nos níveis de citocinas foi encontrada entre os grupos avaliados (Tabela 6).

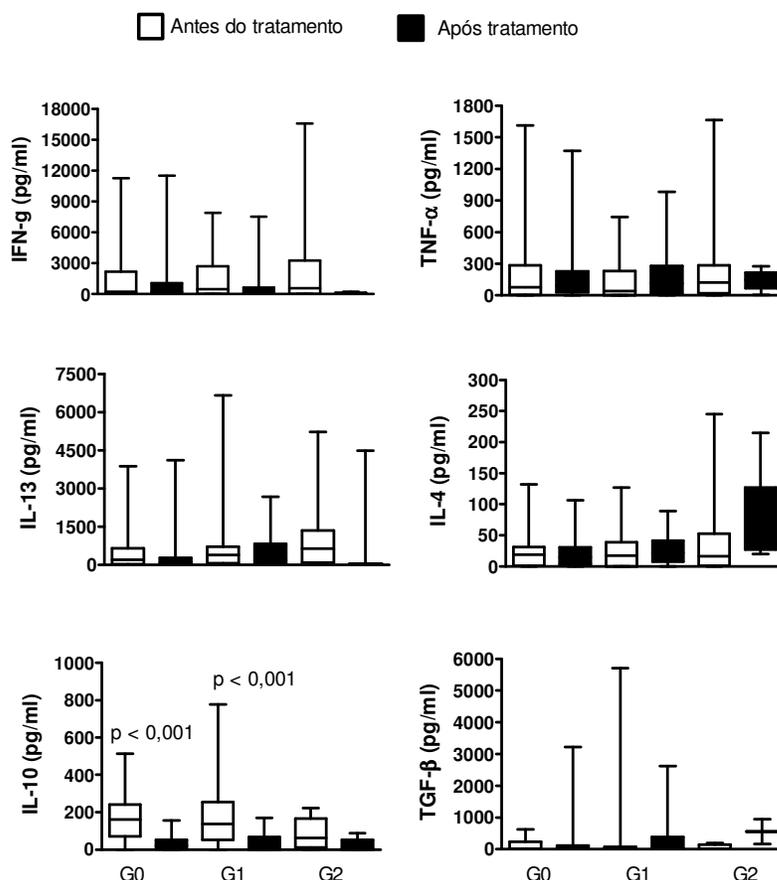
**Tabela 6:** Níveis de citocinas produzidas por PBMC após estímulo com SEA de indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada (G2) após tratamento.

Citocinas	G0	G1	G2	$p^a$
IFN- $\gamma$	230	83	63	0,236
TNF- $\alpha$	94	111	146	0,923
IL-4	15	22	37	0,116
IL-13	102	175	32	0,361
IL-10	21	30	7	0,655
TGF- $\beta$	5	31	551	0,113

Os resultados estão expressos em mediana para valores em pg/ml (experimental – controle). <sup>a</sup> Níveis de significância baseados no teste de Kruskal-Wallis .

### 4.3 Comparação dos níveis de citocinas dentro dos grupos, antes e após tratamento

A Figura 3 mostra a mediana, os valores máximos e mínimos, dos níveis de citocinas produzidas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas por SEA, pelos indivíduos agrupados de acordo com o grau de fibrose, antes e um ano após o tratamento. Pode-se observar que o tratamento levou a uma diminuição significativa nos níveis de IL-10 nos grupos sem fibrose (G0) ( $p < 0,001$ ) e com fibrose incipiente (G1) ( $p < 0,001$ ). Não encontramos diferenças significativas nos níveis das demais citocinas avaliadas.



**Figura 3:** Comparação dos níveis de citocinas de 144 hs determinados por ELISA, produzidas por PBMC de indivíduos agrupados pelo grau de fibrose periportal, após estímulo com SEA, antes e após tratamento. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann-Whitney. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados estão representados através dos Boxplots para valores em pg/ml (experimental – controle). As caixas representam, através das linhas horizontais os percentis 25, 50 e 75 e as linhas verticais os valores máximo e mínimo observados.

#### 4.4 Comparação, entre os grupos, da frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas antes do tratamento.

A Tabela 7 compara a frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, determinada pela mediana dos 91 pacientes antes do tratamento, entre os grupos definidos pelo grau de fibrose (G0, G1 e G2). Nenhuma diferença foi observada na frequência de indivíduos alto e baixo produtores das citocinas avaliadas. No entanto, existe uma tendência no aumento de produção de IL-13 e diminuição na produção de IL-10 pelos indivíduos portadores de fibrose moderada-grave,  $p = 0,069$  e  $p = 0,056$ , respectivamente.

**Tabela 7:** Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2), antes do tratamento.

Citocinas		G0 (%/N)	G1 (%/N)	G2 (%/N)	$p^a$
IFN- $\gamma$	Baixo	55/26	45/10	45/10	0,643
	Alto	45/21	55/12	55/12	
TNF- $\alpha$	Baixo	51/24	59/13	41/9	0,481
	Alto	49/23	41/9	59/13	
IL-4	Baixo	45/21	55/12	59/13	0,489
	Alto	55/26	45/10	41/9	
IL-13	Baixo	61/26	45/9	27/4	0,069
	Alto	39/17	55/11	73/11	
IL-10	Baixo	43/20	45/10	73/16	0,056
	Alto	57/27	55/12	27/6	
TGF- $\beta$	Baixo	61/20	69/11	70/7	0,788
	Alto	39/13	31/5	30/3	

<sup>a</sup> Níveis de significância baseados no teste de  $\chi^2$ ; valor significativo quando  $p < 0,05$ . Os indivíduos foram categorizados em alto e baixo produtores através da mediana dos níveis de citocinas dos 91 indivíduos antes do tratamento.

#### 4.5 Comparação, entre os grupos, da frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas após o tratamento.

A Tabela 8 compara a frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas produzidas por PBMC após estímulo com SEA, entre os grupos definidos pela presença de fibrose, um ano após o tratamento. Nessa análise o grupo de indivíduos com fibrose reuniu os portadores de fibrose incipiente (29) e moderada (4). Os indivíduos foram categorizados em alto e baixo produtores através da mediana dos níveis de citocinas dos 91 indivíduos após tratamento. Os dados mostram que a proporção de indivíduos produtores de altos níveis de IL-13 foi significativamente maior no grupo de indivíduos com fibrose quando comparado aos indivíduos sem fibrose ( $p = 0,035$ ).

**Tabela 8:** Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos com e sem fibrose, um ano após o tratamento.

Citocinas	Sem fibrose		Com fibrose		$p^a$	
	n	%	n	%		
IFN- $\gamma$	Baixo	26	45	20	61	0,148
	Alto	32	55	13	39	
TNF- $\alpha$	Baixo	31	53	15	45	0,463
	Alto	27	47	18	55	
IL-4	Baixo	33	57	13	39	0,108
	Alto	25	43	20	61	
<b>IL-13</b>	Baixo	29	59	10	35	<b>0,035</b>
	Alto	20	41	19	66	
IL-10	Baixo	31	53	15	46	0,463
	Alto	27	47	18	55	
TGF- $\beta$	Baixo	22	56	8	40	0,233
	Alto	17	44	12	60	

<sup>a</sup> Níveis de significância baseados no teste de  $\chi^2$ ; valor significativo quando  $p < 0,05$ . Os indivíduos foram categorizados em alto e baixo produtores através da mediana global dos níveis de citocinas dos 91 indivíduos após tratamento.

#### 4.6 Comparação da frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas dentro dos grupos, antes e após o tratamento.

A Tabela 9 compara a frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas dentro dos grupos definidos pelo grau de fibrose, antes e após o tratamento. Usou-se como valor de referência para categorizar os 91 indivíduos a mediana dos níveis de citocinas antes do tratamento. Observa-se uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IFN- $\gamma$  nos grupos G1 ( $p = 0,051$ ) e G2 ( $p = 0,044$ ) e uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IL-10 nos grupos G0 ( $p < 0,001$ ) e G1 ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, o tratamento parece induzir um aumento na produção de IL-4 pelos indivíduos portadores de fibrose periportal, evidenciado pelo aumento na frequência de indivíduos alto produtores de IL-4 no grupo G2 ( $p = 0,030$ ).

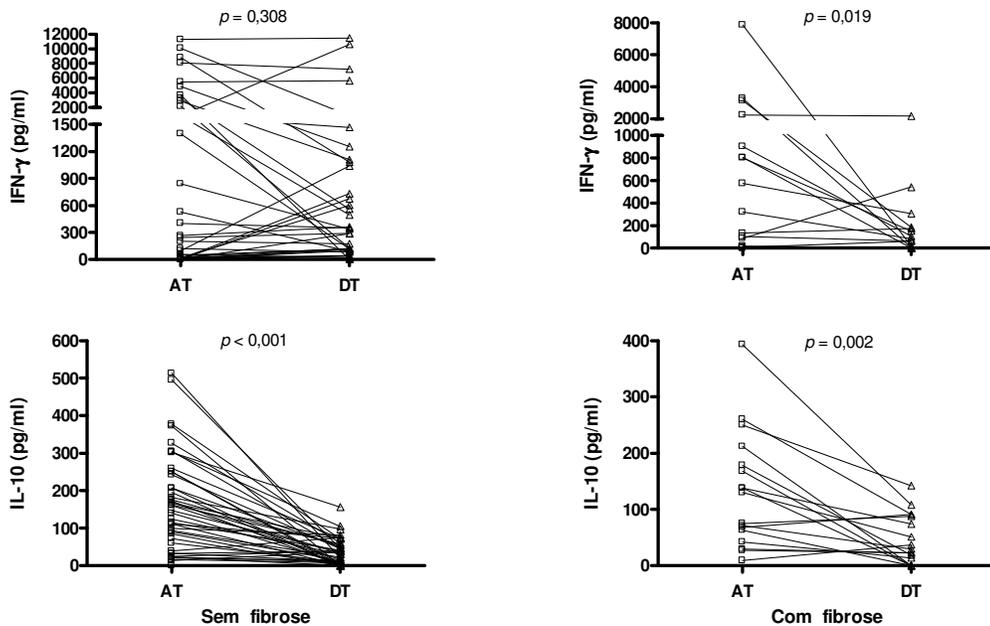
**Tabela 9:** Percentagens de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, derivadas dos indivíduos sem fibrose (G0), com fibrose incipiente (G1) e com fibrose moderada-grave (G2) antes (AT) e um ano depois do tratamento (DT).

Citocinas		G0 (% / N)		G1 (% / N)		G2 (% / N)	
		AT	DT	AT	DT	AT	DT
IFN- $\gamma$	Baixo	55/26	53/31	45/10	72/21	45/10	100/4
	Alto	45/21	47/27	55/12	28/8 *	55/12	0/0 *
TNF- $\alpha$	Baixo	51/24	47/27	59/13	48/14	40/9	25/1
	Alto	49/23	53/31	41/9	52/15	59/13	75/3
IL-4	Baixo	45/21	60/35	55/12	45/13	59/13	0/0
	Alto	55/26	40/23	45/10	55/16	41/9	100/4 *
IL-13	Baixo	60/26	78/38	45/9	54/14	27/4	67/2
	Alto	40/17	22/11	55/11	46/12	73/11	33/1
IL-10	Baixo	43/20	98/57	45/10	93/27	73/16	100/4
	Alto	57/27	2/1 *	55/12	7/2 *	27/6	0/0
TGF- $\beta$	Baixo	61/20	49/19	69/11	39/7	70/7	0/0
	Alto	39/13	51/20	31/5	61/11	30/3	100/2

\* Níveis de significância baseados no teste de  $\chi^2$ ; valor significativo quando  $p < 0,05$ . IFN- $\gamma$ , G1 ( $p = 0,051$ ) e G2 ( $p = 0,044$ ); IL-4, G2 ( $p = 0,030$ ); IL-10, G0 ( $p < 0,001$ ) e G1 ( $p < 0,001$ ). Os indivíduos foram categorizados em alto e baixo produtores através da mediana dos níveis de citocinas dos 91 indivíduos antes do tratamento.

#### 4.7 Comparação dos níveis de citocinas, antes e após tratamento, produzidas pelos mesmos indivíduos dentro dos grupos categorizados pela presença de fibrose periportal.

Para essa análise consideramos 61 indivíduos que permaneceram sem alteração do grau de fibrose um ano após o tratamento. Esses indivíduos foram categorizados em dois grupos, 44 foram reunidos no grupo sem fibrose e 17 no grupo com fibrose, sendo quinze deles portadores de fibrose incipiente e dois de fibrose moderada. A Figura 4 mostra que o tratamento induziu uma diminuição nos níveis de IL-10 nos dois grupos, sem fibrose ( $p < 0,001$ ) e com fibrose ( $p = 0,002$ ) e uma diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  somente no grupo de indivíduos com fibrose ( $p = 0,019$ ).



**Figura 4:** Comparação dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 de 144 hs determinados por ELISA, produzidas por PBMC, após estímulo com SEA, dos indivíduos que não alteraram o grau de fibrose com o tratamento, agrupados pela presença de fibrose periportal. Antes do tratamento (AT) e um ano depois do tratamento (DT). Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados estão expressos em pg/ml (experimental – controle).

#### 4.8 Comparação da frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas, antes e após tratamento, produzidas pelos mesmos indivíduos dentro dos grupos categorizados pela presença de fibrose periportal.

A Tabela 10 compara a frequência de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas dentro dos grupos definidos pela presença de fibrose, antes e após o tratamento. Usou-se como valor de referência para categorizar os 61 indivíduos a mediana dos níveis de citocinas antes do tratamento. Os resultados mostram que o tratamento induziu uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IL-10 nos dois grupos, sem fibrose ( $p < 0,001$ ) e com fibrose ( $p = 0,034$ ), uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IL-13 no grupo sem fibrose ( $p = 0,036$ ) e uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IFN- $\gamma$ , somente no grupo de indivíduos com fibrose ( $p = 0,031$ ).

**Tabela 10:** Comparação das frequências de indivíduos alto e baixo produtores de citocinas produzidos por PBMC após estímulo com SEA dentro dos grupos com e sem fibrose, antes (AT) e um ano depois do tratamento (DT).

Citocinas		Sem fibrose (% / N)		Com fibrose (% / N)	
		AT	DT	AT	DT
IFN- $\gamma$	Baixo	57/25	54/24	53/9	88/15
	Alto	43/19	45/20	47/8	12/2*
TNF- $\alpha$	Baixo	50/22	50/22	53/9	41/7
	Alto	50/22	50/22	47/8	59/10
IL-4	Baixo	45/20	64/28	59/10	53/9
	Alto	55/24	36/16	41/7	47/8
IL-13	Baixo	60/24	78/31	47/7	60/9
	Alto	40/16	22/9*	53/8	40/6
IL-10	Baixo	45/20	98/43	53/9	94/16
	Alto	55/24	2/1*	47/8	6/1*
TGF- $\beta$	Baixo	61/19	52/16	64/7	36/4
	Alto	39/12	48/15	36/4	64/7

\* Níveis de significância baseados no teste de  $\chi^2$ ; valor significativo quando  $p < 0,05$ . IFN- $\gamma$ , com fibrose ( $p = 0,031$ ); IL-13, sem fibrose ( $p = 0,036$ ); IL-10, sem fibrose ( $p < 0,001$ ) e com fibrose ( $p = 0,034$ ). Os indivíduos foram categorizados em alto e baixo produtores através da mediana dos níveis de citocinas dos 61 indivíduos antes do tratamento.

#### 4.9 Correlação entre citocinas induzidas por SEA, antes e depois do tratamento

As tabelas 11, 12 e 13 mostram os coeficientes de correlação entre as citocinas para os 91 indivíduos que compunham a amostra em estudo, e para esses mesmos indivíduos agrupados pela presença de fibrose, antes e depois do tratamento. Com relação as citocinas antes do tratamento, três correlações fortes e positivas foram observadas entre IFN- $\gamma$  e IL-13 ou TNF- $\alpha$  e entre IL-13 e TNF- $\gamma$ ; além de três correlações fracas e inversas entre IL-10 e IFN- $\gamma$  ou IL-13 ou TNF- $\alpha$  (Tabela 11). Associações semelhantes foram observadas nos dois grupos de indivíduos com e sem fibrose (Tabela 12 e Tabela 13). De forma semelhante, após o tratamento, os resultados das associações nos dois grupos eram semelhantes às encontradas na amostra total. As diferenças se restringiram ao efeito do tratamento, visível na inversão da relação entre IL-10 e IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  que mudaram de uma associação negativa e fraca antes do tratamento, para uma associação positiva e forte após o tratamento. Na investigação das citocinas com outras variáveis como idade, intensidade de infecção e fibrose periportal foi interessante observar que, antes do tratamento, associações positivas e negativas foram encontradas principalmente com intensidade de infecção. Enquanto a IL-10 mostrava uma correlação positiva ( $r = 0,317, p = 0,002$ ), com a intensidade de infecção, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13 mostraram uma correlação negativa,  $r = - 0,387, p < 0,001$ ;  $r = - 0,332, p = 0,001$ ,  $r = - 0,221, p = 0,036$ ;  $r = - 0,276, p = 0,014$ , respectivamente. Com o tratamento, essas relações desapareceram e uma associação negativa apareceu somente entre intensidade de infecção e TGF- $\beta$  ( $r = - 0,340, p = 0,008$ ) sugerindo que os indivíduos que se reinfectam produzem pouco TGF- $\beta$ . Uma associação negativa entre fibrose periportal e IL-10 foi observada antes do tratamento ( $r = - 0,249, p = 0,018$ ) reforçando o possível papel modulador da IL-10.

**Tabela 11:** Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos 91 indivíduos, antes e um ano depois do tratamento.

Tratamento		Antes		
	Citocinas	IFN- $\gamma$	IL-13	TNF- $\alpha$
Antes	IL-10	- 0,249 *	- 0,271 *	- 0,289 *
	IFN- $\gamma$		0,587 ‡	0,696 ‡
	IL-13			0,689 ‡
		Depois		
		IFN- $\gamma$	IL-13	TNF- $\alpha$
Depois	IL-10	0,451 ‡	0,149	0,432 ‡
	IFN- $\gamma$		0,444 ‡	0,679 ‡
	IL-13			0,497 ‡

Níveis de significância baseados no teste de correlação de Spearman. \*  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,005$ ; ‡  $p < 0,0001$ .

**Tabela 12:** Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos indivíduos sem fibrose periportal, antes e um ano depois do tratamento.

Tratamento		Antes (n = 47)		
	Citocinas	IFN- $\gamma$	IL-13	TNF- $\alpha$
Antes	IL-10	-0,261	-0,214	- 0,404 †
	IFN- $\gamma$		0,688 ‡	0,706 ‡
	IL-13			0,678 ‡
		Depois (n = 58)		
		IFN- $\gamma$	IL-13	TNF- $\alpha$
Depois	IL-10	0,405 †	0,083	0,208
	IFN- $\gamma$		0,525 ‡	0,643 ‡
	IL-13			0,489 †

Níveis de significância baseados no teste de correlação de Spearman. \*  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,005$ ; ‡  $p < 0,0001$ .

**Tabela 13:** Coeficientes de correlação entre as citocinas induzidas por SEA, produzidas por PBMC dos indivíduos com fibrose periportal, antes e um ano depois do tratamento.

Tratamento		Antes (n = 44)		
		Citocinas	IFN- $\gamma$	IL-13
Antes	IL-10	-0,278	-0,311	-0,198
	IFN- $\gamma$		0,451*	0,662 ‡
	IL-13			0,718 ‡
		Depois (n = 33)		
		IFN- $\gamma$	IL-13	TNF- $\alpha$
Depois	IL-10	0,545 †	0,171	0,696 ‡
	IFN- $\gamma$		0,352	0,759 ‡
	IL-13			0,455 *

Níveis de significância baseados no teste de correlação de Spearman. \*  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,005$ ; ‡  $p < 0,0001$ .

## DISCUSSÃO

A redução na prevalência da fibrose periportal é fundamental para o controle da morbidade e mortalidade na esquistossomose. Os exames de ultra-som definem com precisão os indivíduos portadores de diferentes graus de fibrose, permitindo investigar os fatores envolvidos no seu desenvolvimento. Relatos na literatura mostram que o praziquantel é uma droga eficaz no controle da infecção pelo *S. mansoni*, promovendo uma redução na excreção de ovos e na regressão da fibrose em camundongos e seres humanos (Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992, Cota et al. 2006, Andrade et al. 2006, Kihara et al. 2007). O praziquantel tem dois efeitos principais sobre os vermes adultos, paralisia e dano do tegumento, e a liberação de antígenos em consequência da morte ou destruição do parasito pode levar a uma alteração da resposta imune (Mutapi et al. 1998, Reimert et al. 2006). Entretanto, não existem ainda comparações detalhadas dessas alterações imunológicas após a quimioterapia. Neste contexto, o presente estudo avalia a resposta imune celular e a morbidade um ano após o tratamento com praziquantel. Essa avaliação descreve a resposta imune de indivíduos portadores de fibrose periportal e esclarece alguns aspectos sobre o tipo de resposta desenvolvida após a quimioterapia, numa tentativa de correlacionar a susceptibilidade à doença com uma produção anormal de citocinas que regulam o granuloma e/ou a fibrose em seres humanos. A produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10 foi avaliada nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após estímulo com antígenos solúveis de ovos (SEA).

Esse estudo mostra que a esquistossomose é prevalente em Virgem das Graças, distrito rural no Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. Os níveis de intensidade de infecção e prevalência da doença, antes do tratamento, eram maiores nos indivíduos com idade inferior a vinte anos, demonstrando uma curva de infecção típica com um declínio gradativo da intensidade com a idade, que não pode ser completamente explicado pela diminuição da exposição à água (Figura 1). A susceptibilidade dos indivíduos mais jovens à infecção é melhor evidenciada em estudos de reinfeção (Butterworth et al. 1985, Colley et al. 1986b, Walter et al. 2006). Esse padrão de resposta tem sido explicado como um fenômeno multifatorial, que em parte resulta em mudanças no padrão de contato com água com uma diminuição pelos indivíduos mais velhos (Dalton & Pole 1978, Kabatereine et al. 1999), no desenvolvimento de imunidade adquirida (Butterworth et al. 1985), na influência de fatores genéticos (Marquet et al. 1996, Dessein et al. 1999a, 1999b) e nas diferenças a nível hormonal

ou características fisiológicas, tais como espessamento da pele observado com o envelhecimento (Fulford et al. 1998).

Nossos resultados mostram que o tratamento levou a uma diminuição da intensidade de infecção (Tabela 1 e Figura 1) e reversão da fibrose hepática, já observada por outros autores na esquistossomose humana e experimental (Homeida et al. 1991, Boisier et al. 1998, Andrade et al. 2006, Cota et al. 2006). É interessante notar que essa reversão foi mais evidente entre os indivíduos portadores de fibrose moderada-grave, com o desaparecimento da fibrose do grau 3 (0/7) e uma diminuição expressiva no grau 2 (2/15) após um ano de tratamento (Figura 2, Tabela 2). Encontramos ainda 77% dos indivíduos apresentando fibrose moderada-grave no grupo que reverteu a fibrose, enquanto 88% apresentava fibrose incipiente no grupo que não teve o grau de fibrose alterado com o tratamento (Tabela 3). A mesma observação foi feita por Homeida et al. (1991) que verificaram, três anos após o tratamento com praziquantel, uma diminuição no número de indivíduos portadores de fibrose moderada-grave (8/19), com pouca alteração do número de indivíduos portadores de fibrose incipiente (28/29). Nesse mesmo estudo, foi observado que entre os 20 indivíduos que não alteraram o grau de fibrose após tratamento, 17 eram portadores de fibrose incipiente e apenas 3 portadores de uma fibrose moderada-grave, confirmando os nossos achados de que o tratamento é mais eficiente em regredir a fibrose em um grau mais avançado (grau 2 e 3).

A ausência da reversão completa da fibrose, após quimioterapia tem sido descrita em seres humanos (Homeida et al. 1991, Li et al. 2002, Cota et al. 2006) e em camundongos (Andrade and Grimaud, 1986, Andrade et al. 2006). As razões que explicam a falta de reversão da fibrose ainda não estão claras, no entanto, algumas possibilidades podem ser sugeridas, como a genética do indivíduo, a inabilidade em desenvolver um mecanismo imune adequado que pode levar ao controle da fibrose após tratamento, a exposição a novos antígenos em consequência da destruição dos vermes com o tratamento, a dificuldade do exame de ultra-sonografia em fazer o diagnóstico diferencial entre indivíduos normais daqueles portadores de fibrose incipiente (grau 1), ou ainda o tempo de avaliação da regressão da fibrose após o tratamento. Nesse estudo, os indivíduos foram avaliados com um ano, no entanto, alguns autores afirmam que a reversão da fibrose é mais evidente quando avaliada dois anos após o tratamento específico (Homeida et al. 1991, Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992, Boisier et al. 1998, Richter 2003). Nossos resultados sugerem ainda que a intensidade de infecção pode ser um fator que predispõe a falta de reversão da fibrose, pois encontramos no grupo que não alterou a fibrose uma intensidade de infecção significativamente maior (Tabela 3). A falta de um padrão de características que determine a reversão da fibrose indica

a necessidade de maiores investigações na identificação de fatores associados com essa reversão.

Nossos dados mostram ainda que a morbidade hepática aumentou em poucos indivíduos (4%) apesar do tratamento com praziquantel, fato também observado por outros autores (Doehring-Schwerdtfeger et al. 1992, Boisier et al. 1998, Ruiz-Guevara et al. 2007). As razões que explicam esse aumento não estão claras. Não existe um motivo para acreditar que o tratamento foi responsável por esse aumento, no entanto, foi observada uma exacerbação da morbidade após um ano do tratamento em indivíduos infectados pelo *S. japonicum*, nesse estudo, entre os indivíduos que não tinham fibrose antes do tratamento, 86% adquiriram fibrose um ano depois. Os autores acreditam que esse resultado seja consequência de uma associação adversa do tratamento com uma rápida reinfeção (Coutinho et al. 2007). Diante desses fatos, faz-se necessário investigar riscos particulares envolvidos com a progressão da fibrose após tratamento com praziquantel.

A heterogeneidade da manifestação da doença observada na esquistossomose indica que diferentes padrões de exposição, intensidade de infecção, a resposta individual e tratamentos ocasionais experimentados pelos seres humanos, são fatores que podem afetar a resposta imune e o desenvolvimento da doença.

A forma grave da esquistossomose crônica em seres humanos é caracterizada pela presença da fibrose periportal (Cheever & Andrade 1967), e estudos em animais experimentais tem demonstrado a participação de citocinas do tipo 2 no desenvolvimento da fibrose (Kaplan et al. 1998, Fallon et al. 2000, Farah et al. 2000, Chiamonte et al. 2001, Kaviratne et al. 2004, Reiman et al. 2006). Alguns poucos relatos na esquistossomose humana sugerem a participação de citocinas do tipo 1 na patogênese da fibrose, com o TNF- $\alpha$  desempenhando um papel de destaque (Mwatha et al. 1999, Henri et al. 2002, Booth et al. 2004). Considerando a participação das citocinas tipo 2 com a proteção nos estágios iniciais de infecção, acredita-se que a expressão persistente desses mediadores pode eventualmente causar fibrose e hipertensão portal (Cheever et al. 2000). Diante dessas evidências tem sido sugerido que respostas polarizadas em Th1 ou Th2 são prejudiciais e necessitam de regulação para garantir uma melhor proteção à patologia induzida pelo ovo (Hoffmann et al. 2000).

Examinando alguns relatos anteriores sobre a resposta imune em seres humanos antes e após o tratamento, foi observado uma relação dessas respostas com a resistência dos indivíduos à reinfeção. As evidências apontam para uma associação com a resposta imune tipo 2. Baixos níveis de reinfeção foram associados a eosinofilia (Hagan et al. 1985), IgE

específica para verme adulto (Webster et al. 1997, Walter et al. 2006) e produção de IL-4 e IL-5 por PBMC induzidas por antígenos do parasita (Roberts et al. 1993, De Jesus et al. 2000).

Numa tentativa de entender o papel das citocinas no desenvolvimento de fibrose periportal em indivíduos residentes em áreas endêmicas, e o impacto da quimioterapia na resposta celular, avaliamos a produção de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), do tipo Th2 (IL-4 e IL-13) e as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$  por PBMC de indivíduos portadores de diferentes graus de fibrose periportal, induzidas por antígenos solúveis de ovo (SEA), antes e um ano após o tratamento com praziquantel.

Nossos dados parecem confirmar o papel fibrogênico da IL-13. Antes do tratamento, foi encontrada uma associação da IL-13 com a fibrose moderada-grave (Alves-Oliveira et al. 2006), e após o tratamento, observamos uma frequência maior de indivíduos produtores de altos níveis da IL-13 no grupo com fibrose (Tabela 8). Em concordância com esses achados, De Jesus et al (2004) mostraram que indivíduos com fibrose do grau III produziam mais IL-13, quando comparado aos indivíduos portadores de fibrose do grau I e II. Em um estudo recente de infecção pelo *S. japonicum*, foi sugerido o envolvimento das citocinas Th2 na persistência da fibrose hepática, os autores encontraram um aumento na frequência de indivíduos alto produtores de IL-13, IL-4 e IL-5 nos indivíduos que permaneceram com fibrose um ano após o tratamento (Coutinho et al. 2007). O envolvimento da IL-13 na indução de fibrose já está bem definido em modelos experimentais (Fallon et al. 2000, Chiaramonte et al. 2001, Kaviratne et al. 2004). Utilizando animais deficientes de IL-13, Fallon et al. (2000), mostraram uma redução da fibrose hepática, com conseqüente aumento no tempo de vida dos camundongos após a infecção. O bloqueio dessa citocina foi altamente eficiente na regressão da fibrose, mesmo depois de estabelecida, sugerindo o papel central da IL-13 na fibrogênese (Chiaramonte et al. 2001, Kaviratne et al 2004).

O camundongo tem sido usado como modelo ideal para responder questões acerca da indução e regulação das respostas dos tipos Th1 e Th2 na esquistossomose. Nesses animais há uma alteração da resposta de um perfil de citocinas do tipo Th1 para um perfil do tipo Th2 com a ovoposição e, subsequentemente, uma regulação dessa resposta, evitando possíveis conseqüências deletérias associadas à produção contínua e elevada de mediadores inflamatórios (Grzych et al. 1991, Pearce et al. 1991, Sher et al. 1991). Nesse contexto, a IL-10 é sem dúvida a molécula chave. Na esquistossomose humana, o bloqueio da IL-10 por anticorpos, induziu um aumento na proliferação celular de PBMC de pacientes portadores da forma crônica intestinal, efeito não observado quando as células eram obtidas de indivíduos portadores da forma clínica aguda ou hepatoesplênica (Malaquias et al. 1997). Os autores

sugerem que a IL-10 seria um fator importante no controle da morbidade, e que a deficiência dessa citocina nos indivíduos portadores da forma grave da doença estaria correlacionada com a patogênese da esquistossomose. Ainda na esquistossomose humana alguns estudos sugerem a existência de uma regulação cruzada mensurável entre a resposta do tipo Th1 e Th2, primariamente entre IFN- $\gamma$  e IL-10 (King et al. 1996, Montenegro et al. 1999, Brito et al. 2000). Na esquistossomose experimental, evidências apontam para a regulação das respostas Th1 e Th2 pela IL-10. Camundongos knockout para IL-10 infectados pelo *S. mansoni* desenvolvem respostas Th1 e Th2 mistas e elevadas, com grande proliferação de linfócitos, maior número de células produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 e grande ampliação do quadro inflamatório. Quando há polarização extrema Th1 (deficiência de IL-4 e IL-10), os animais têm excessiva produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  com formação de granulomas não fibróticos. Em contraste, quando a resposta está polarizada em Th2 (deficiência de IL-12 e IL-10) os granulomas são mais ricos em eosinófilos, há grande produção de IL-4 e IL-13 com a exarcebação da fibrose hepática. Neste cenário, a IL-10 se mostra fundamental para o controle da polarização excessiva tanto das respostas Th1 quanto Th2, o que limita de forma significativa os danos causados pela intensa inflamação decorrente destas polarizações (Hoffmann et al. 2000).

Nesse estudo, antes do tratamento, encontramos os níveis de IL-10 significativamente diminuídos no grupo de indivíduos com fibrose moderada-grave (63 pg/ml) em comparação aos indivíduos sem fibrose (162 pg/ml) (Tabela 5), sugerindo a participação da IL-10 no controle da morbidade. Compatível com essa hipótese, encontramos uma correlação inversa entre IL-10 e fibrose antes do tratamento ( $r = -0,249$ ,  $p = 0,017$ ), também descrita por Talaat et al. (2007). Em concordância com os nossos achados, outros autores encontraram os níveis de IL-10 diminuídos em crianças portadoras de fibrose periportal (Booth et al. 2004), e em indivíduos portadores de fibrose grau 3 (Talaat et al. 2007). De forma controversa, os níveis de IL-10 estavam aumentados no grupo de indivíduos com fibrose grau III quando comparado com indivíduos portadores de fibrose grau I e II (De Jesus et al. 2004). Ainda, uma associação positiva entre fibrose e a IL-10 induzida por SEA ou SWAP foi observada na esquistossomose japonesa, antes do tratamento (Coutinho et al. 2007).

Analisados juntos, esses resultados contraditórios poderiam estar refletindo diferenças entre as espécies investigadas, nos antígenos utilizados, na avaliação das formas clínicas, ou mesmo na história de infecção dos diversos grupos epidemiológicos. Além disso, essas

diferenças mostram ainda a complexidade da relação entre as citocinas e a intensidade de infecção que se estende além de uma dicotomia Th1/Th2.

Depois do tratamento, não encontramos uma associação clara entre a IL-10 e fibrose, já que seus níveis estavam diminuídos no grupo sem fibrose (G0) e no grupo com fibrose incipiente (G1) (Figura 3). O mesmo resultado foi observado quando os níveis de citocinas foram dicotomizados em altos e baixos, e comparados antes e após tratamento. A tabela 9 mostra uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IL-10 no grupo G0, que variou de 57% antes do tratamento para 2% após o tratamento, e no grupo G1 cuja variação foi de 55% para 7%. Essa diminuição dos níveis de IL-10 também foi evidenciada entre os indivíduos que permaneceram com o mesmo grau de fibrose um ano após o tratamento (Figura 4) e foi confirmada na avaliação do impacto da quimioterapia, após a categorização das citocinas em altos e baixos níveis, com uma diminuição na frequência de indivíduos alto produtores de IL-10 nos grupos com e sem fibrose (Tabela 10).

A positiva associação encontrada entre níveis de IL-10 e intensidade de infecção ( $r = 0,317$ ,  $p = 0,002$ ), antes do tratamento, estaria contribuindo para mascarar a associação da IL-10 com fibrose, já que o tratamento levou a uma redução drástica na intensidade de infecção nos três grupos avaliados (Tabela 4) e conseqüentemente afetou os níveis de IL-10. Essa relação entre IL-10 e intensidade de infecção já foi descrita anteriormente pelo nosso grupo (Silveira et al. 2004) e por outros autores na infecção pelo *S. mansoni* (Reimert et al. 2006) e pelo *S. haematobium* (Mutapi et al. 2007). Duas possíveis hipóteses explicam o efeito da intensidade de infecção na produção de IL-10, ou os níveis de IL-10 refletem simplesmente a exposição aos antígenos do parasito ou altos níveis de infecção estimulariam a produção de altos níveis de IL-10 com o objetivo de evitar a exacerbação da patologia mediada pelas respostas Th2 e Th1 (Pearce & MacDonald 2002, Taylor et al. 2006, Mutapi et al. 2007).

Nesse estudo, encontramos ainda uma correlação inversa entre IL-10 e IFN- $\gamma$  ( $r = -0,249$ ,  $p = 0,017$ ), também relatada por outros autores (Silveira et al. 2004), sugerindo uma possível regulação cruzada entre elas. Estudos de bloqueio da IL-10 com anticorpo confirmam essa hipótese na infecção pelo *S. mansoni* (Montenegro et al. 1999, Brito et al. 2000) e pelo *S. haematobium* (King et al. 1996). Além da relação com o IFN- $\gamma$ , correlações inversas foram observadas entre a IL-10 e TNF- $\alpha$  ou IL-13 no grupo de 91 indivíduos (Tabela 11), porém quando os indivíduos foram separados pela presença de fibrose, a única relação que permaneceu inversa e significativa foi entre a IL-10 e TNF- $\alpha$  no grupo sem fibrose (Tabela 12). Foi interessante observar que o tratamento com praziquantel alterou a relação entre IL-10 e IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , e uma forte correlação positiva foi encontrada entre elas (Tabela 11). Essa

mesma relação positiva da IL-10 com as duas citocinas se manteve no grupo com fibrose (Tabela 13). Porém, no grupo sem fibrose permaneceu somente a relação entre a IL-10 e IFN- $\gamma$  (Tabela 12). Alterações na resposta imune em consequência do tratamento foram descritas por outros autores (Mduluzi et al. 2003, Reimert et al. 2006), que sugerem como responsáveis pelas mudanças os antígenos liberados com a destruição dos parasitos. Em resumo, nossos dados apontam um papel modulador para a IL-10, que seria produzida por várias populações celulares, entre elas as células reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ que estariam controlando as células CD4+ efectoras na esquistossomose (Taylor et al. 2006, Baumgart et al. 2006).

Com relação ao IFN- $\gamma$ , comparando os dados antes e após o tratamento, na amostra de 91 indivíduos, encontramos uma diminuição na frequência dos alto produtores de IFN- $\gamma$  nos grupos com fibrose G1 e G2 (Tabela 9). De uma forma semelhante e considerando os 61 indivíduos que permaneceram com fibrose após o tratamento, foi observado uma diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  e na frequência de indivíduos alto produtores de IFN- $\gamma$  no grupo com fibrose, Tabela 10 e Figura 4, respectivamente.

Na esquistossomose mansônica, a associação entre baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  com risco aumentado de desenvolver fibrose foi encontrada por Henri et al. (2002), que nesse mesmo estudo mostraram uma associação positiva entre altos níveis de TNF- $\alpha$  e fibrose moderada-grave. Em concordância com esses achados, Booth et al. (2004) observaram baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de TNF- $\alpha$  associados ao desenvolvimento de fibrose periportal e sugerem ainda que seus efeitos são dependentes do sexo e da idade. Num trabalho recente, Talaat et al. (2007) descreveram que PBMC dos indivíduos portadores de fibrose grau 2 e 3 produziam níveis menores de IFN- $\gamma$  induzidos por SEA e SWAP quando comparados aos pacientes portadores de infecção ativa. De forma semelhante, na esquistossomose japonesa, essa mesma associação inversa entre IFN- $\gamma$  e fibrose foi encontrada no grupo de indivíduos que permaneceu com fibrose um ano após o tratamento (Coutinho et al. 2007). Em outro estudo, nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de IFN- $\gamma$  entre os grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose (De Jesus et al. 2004).

A associação entre baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  com susceptibilidade ao desenvolvimento de fibrose deve ser analisada à luz de um corpo de evidências mostrando que o IFN- $\gamma$  é certamente a citocina anti-fibrogênica mais ativa no granuloma em torno dos ovos na esquistossomose experimental, e em muitas outras doenças em que a fibrose hepática induz injúria (Czaja et al. 1989, Tiggelman et al. 1995, Henri et al. 2002, Dessein et al. 2004). A fibrose periportal grave na esquistossomose resulta de uma deposição anormal de proteínas de matriz extracelular nos espaços periportais hepáticos devido à inflamação crônica induzida

pelos antígenos dos ovos do *Schistosoma*. A produção dessa matriz é regulada por várias citocinas, incluindo o IFN- $\gamma$ , que atua na inibição da síntese de colágeno nos tecidos e na degradação de proteínas de matriz extracelular (Rockey & Chung 1994, Mallat et al. 1995). O papel chave do IFN- $\gamma$  na fibrose periportal em seres humanos foi também sugerido pela existência de um locus principal de susceptibilidade para fibrose periportal ligado ao gene que codifica a cadeia  $\alpha$  do receptor para IFN- $\gamma$  (Dessein et al. 1999a, Chevillard et al. 2003).

Em resumo, a atividade pró-inflamatória que envolve a secreção de IFN- $\gamma$  parece ser um fator importante na esquistossomose humana. Em nossos resultados a diminuição observada, com o tratamento, nos níveis de IFN- $\gamma$  no grupo de indivíduos com fibrose, parece indicar que o mecanismo que regula esta citocina está ativo, ou que os efeitos do tratamento, que levam a eliminação do parasito e consequentemente da ovoposição, são suficientes para alterar a resposta imune.

Nesse estudo, encontramos ainda uma correlação inversa entre níveis de IFN- $\gamma$  e intensidade de infecção no grupo com fibrose, antes do tratamento ( $r = -0,485$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 44$ ), sugerindo que altos níveis de infecção podem contribuir para a progressão da fibrose periportal, através da inibição da síntese de IFN- $\gamma$ . Essa mesma associação inversa foi descrita por Henri et al. (2002).

Alguns estudos têm mostrado a participação do TNF- $\alpha$ , e das citocinas Th2, IL-4 e IL-13, na progressão da fibrose na esquistossomose experimental. A maioria dos autores concorda com a hipótese de que apesar do compartilhamento de funções entre a IL-4 e a IL-13, o papel da IL-4 no desenvolvimento da fibrose é controverso, enquanto a IL-13 é apontada como o agente fibrogênico (Chensue et al. 1992, Cheever et al. 1994, Pearce et al. 1996, Fallon et al. 2000). Na esquistossomose humana, uma associação da IL-4 com morbidade não está clara, com poucos relatos controversos. No estudo de infecção pelo *S. japonicum*, Coutinho et al. (2007) relataram uma associação de altos níveis de IL-4 induzidas por SWAP com a persistência de fibrose um ano após o tratamento, e Silva-Teixeira et al. (2004) mostraram níveis elevados de IL-4 no soro de indivíduos portadores de fibrose hepática grave, na esquistossomose mansoni. No entanto, Tallat et al. (2007) não encontraram diferenças nos níveis de IL-4 ao comparar indivíduos com diferentes graus de fibrose e nem entre eles e os indivíduos portadores da forma clínica intestinal. Também não diferiu os níveis de IL-4 induzida por SEA ou SWAP entre os indivíduos controle e os indivíduos portadores da forma clínica aguda e crônica (Morais et al. 2002). Em nosso estudo, analisando os dados antes e após o tratamento, observamos um aumento na frequência de indivíduos alto produtores de IL-4 no grupo G2 (Tabela 9), sugerindo um papel para essa citocina no mecanismo de

desenvolvimento da fibrose. Joseph et al. (2004), avaliando também o efeito do tratamento na resposta imune celular, encontraram níveis aumentados de IL-4 induzida por SWAP sete semanas após o tratamento. Porém, nesse estudo os níveis de citocinas foram avaliados num grupo de indivíduos infectados, com uma variação de 0 a 8100 ovos/g de fezes.

O TGF- $\beta$  é considerado uma citocina pró-fibrótica, porque induz um aumento na deposição de colágeno inibindo metaloproteinases de matriz (Letterio & Roberts 1998). No presente estudo, analisando os níveis de TGF- $\beta$  antes e após o tratamento, não encontramos diferenças significativas entre os indivíduos com e sem fibrose, no entanto, usando uma análise de regressão logística, foi possível observar uma associação negativa entre TGF- $\beta$  e fibrose, sugerindo um papel protetor para essa citocina (Alves-Oliveira et al. 2006). Em um estudo recente, usando a mesma estratégia experimental nenhuma diferença foi observada nos níveis de TGF- $\beta$  entre os grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose hepática (De Jesus et al. 2004). Na esquistossomose experimental, o papel do TGF- $\beta$  ainda é controverso, usando modelo de reinfecção, Farah et al. (2000) observaram uma associação do TGF- $\beta$  com progressão da fibrose, mostrando que exposições repetidas de babuínos à cercárias é um fator de risco para o desenvolvimento de fibrose, sugerindo como mecanismo, a ativação de linfócitos que produzem níveis elevados de citocinas pró-fibrótica entre elas TGF- $\beta$  e IL-4. Por outro lado, Mola et al. (1999) usando esse mesmo modelo de reinfecção de babuínos mostraram que os níveis de TGF- $\beta$  permaneceram elevados quando a infecção se tornou crônica e estavam correlacionados com a diminuição do granuloma hepático, após o tratamento com praziquantel.

Em relação ao TNF- $\alpha$  não encontramos associação com fibrose. Tal fato não significa que em outras condições esta associação poderia ser encontrada, considerando que já foi observado níveis elevados de TNF- $\alpha$  no soro de indivíduos portadores de fibrose do grau 3 quando comparado aos indivíduos sem fibrose (Silva-Teixeira et al. 2004). Além disso, outros autores associaram altos níveis de TNF- $\alpha$  com um risco maior de desenvolver a fibrose periportal (Henri et al. 2002, Booth et al. 2004). A ausência dessa associação observada no estudo proposto, pode estar refletindo o poder analítico de detecção dessas interações, limitado pelo tamanho da amostra.

Em resumo, nossos dados mostram que o tratamento com praziquantel dos indivíduos portadores de fibrose foi eficiente em reduzir a morbidade, e alterar a produção das citocinas, em consequência da liberação de antígenos pela morte ou destruição dos parasitos ou pela remoção do estímulo através da redução dos ovos. As diferenças observadas na produção de citocinas entre os indivíduos com e sem fibrose ilustram ainda a complexidade da resposta

imune na manifestação da forma grave da doença. Finalmente, o padrão de citocinas associado à fibrose periportal, mostrado nesse trabalho, pode levar ao melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da morbidade, na esquistossomose e outras doenças crônicas.

## CONCLUSÃO

O estudo proposto fornece evidências para a reversibilidade da fibrose periportal, um ano após o tratamento com praziquantel, e sugere que a produção elevada de IL-13 e diminuída de IFN- $\gamma$  podem ser indicadores de persistência da fibrose após o tratamento, na infecção pelo *S. mansoni*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahab, M. F., G. Esmat, A. Farrag, Y. A. el-Boraey, and G. T. Strickland. 1992. Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 403.
- Alves-Oliveira, L.F., E. C. Moreno, G. Gazzinelli, O.A. Martins-Filho, A.M.S. Silveira, A. Gazzinelli, L.C.C. Malaquias, P. LoVerde, P. Martins Leite, and R. Correa-Oliveira. 2006. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* in Humans. *Infection and Immunity* 74: 1215.
- Andrade, Z.A., H.A. Santos, B. Borojovic, J. Grimaud. 1974. Lesões hepáticas produzidas por hycanthone. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 16: 160.
- Andrade, Z.A., A. Baptista, T. S. Santana. 2006. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 267.
- Andrade, Z.A., J. A. Grimaud. 1986. Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. *Am. J. Pathol.* 124(1): 59.
- Arap Siongok, T. K., A. A. Mahmoud, J. H. Ouma, K. S. Warren, A. S. Muller, A. K. Handa, and H. B. Houser. 1976. Morbidity in schistosomiasis *mansoni* in relation to intensity of infection: study of a community in Machacos, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 273.
- Araújo, M.I., A.R. de Jesus, O. Barcelar, E. Sabin, E.M. Carvalho. 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 25:1399.
- Archer, S., A. Yarinsky. 1972. Recent developments in the chemotherapy of schistosomiasis. *Progress in Drug Research*: 11. Jucker, E (ed) Birhauser Verlag Basel.
- Bahia-Oliveira, L.M.G., G. Gazzinelli, S.M. Eloi-Santos, J.R. Cunha-Melo, L.F. Alves-Oliveira, A.M.S. Silveira, I.R.C. Viana, J. Carmo, A. Souza, R. Correa-Oliveira. 1992. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis *mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 86: 57.
- Barbosa, F.S., J.F. Gonçalves, M.C. Melo. 1995. Hepatosplenic forms of schistosomiasis *mansoni* in the interior of Northeastern Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 11 (2): 325. Epub 2003 Sep 29.
- Baumgart, M., F. Tompkins, J. Leng, M. Hesse. 2006. Naturally occurring CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *The Journal of Immunology* 176: 5374.
- Bethony, J., A.M.S. Silveira, L.F. Alves-Oliveira, A. Thakur, G. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira, P.T. LoVerde. 1999. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic área in Brazil. *J.Infect. Dis* 173: 1665.

- Bethony J., J.T. Williams, H. Kloos, J. Blangero, L. Alves-Fraga, G. Buck, A. Michalek, S. Williams-Blangero, P.T. LoVerde, R. Correa-Oliveira, A. Gazzinelli. 2001. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. II: Household risk factors. *Trop Med Int Health* 6: 136.
- Bethony, J., J.T. Williams, S. Brooker, A. Gazzinelli, M.F. Gazzinelli, P.T. LoVerde, R. Correa-Oliveira, H. Kloos. 2004. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. Part III: household aggregation of water-contact behaviour. *Trop. Med. Int. Health* 9 (3): 381.
- Bina, J.C. 1977. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. Tese, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Bina, J.C. & A. Prata. 2003. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-*Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (2): 211.
- Bogliolo, L. 1959. Patologia. *Rev. Brasil. Malariol. Doen. Trop.* 9 (2-3): 359.
- Boisier, P., C.E. Ramarokoto, V.E. Ravaoalimalala, L. Rabarijaona, J. Serieye, J. Roux and P. Esterre. 1998. Reversibility of *Schistosoma mansoni*-associated morbidity after yearly mass praziquantel therapy: ultrasonographic assessment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 451.
- Booth, M., J. K. Mwatha, S. Joseph, F. M. Jones, H. Kadso, E. Ileri, F. Kazibwe, J. Kemijumbi, C. Kariuki, G. Kimani, J. H. Ouma, N. B. Kabatereine, B. J. Vennervald, and D. W. Dunne. 2004. 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.* 172: 1295.
- Boros, D.L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. 1989. *Clinical Microbiology Reviews* 2(3): 250.
- Botros, S., H. Sayed, H. El-Dusoki, H. Sabry, I. Rabie, M. El- Ghannam, M. Hassanein, Y. A. El- Wahab, and D. Engels. 2005. Efficacy of Mirazid in comparison with praziquantel in Egyptian schistosoma mansoni-infected school children and households. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(2): 119.
- Brito, C.F.A., I.R. Caldas, P. Coura Filho, R. Corrêa-Oliveira, S.C. Oliveira. 2000. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to the recombinant 14kDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Scand. J. Immunol.* 51:595.
- Butterworth A.E., M. Capron, J.S. Cordingley, P.R. Dalton, D.W. Dunne, H.C. Kariuki, G. Kimani, D. Koech, M. Mugambi, J.H Ouma, M.A Prentice, B.A Richardson, T.K. Arap Siongok, D.W. Taylor. 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 393.
- Carvalho, O.S., C.L. Massara, R.S. Rocha, N. Katz. 1989. Esquistossomose mansoni no Sudoeste do Estado de Minas Gerais (Brasil). *Revista de Saúde Pública de São Paulo* 23: 341.

- Carvalho, O.S., R.L. Caldeira, A.J.G. Simpson, H.D.A. Vidigal. 2001. Genetic variability and molecular identification of Brazilian Biomphalaria species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology* 123: 197.
- Cheever, A.W. & Z.A. Andrade. 1967. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61(5):626.
- Cheever, A.W., M.E. Williams, T.A. Wynn, F.D. Finkelman, R.A. Seder, T.M. Cox, S. Hieny, P. Caspar, A. Sher. 1994. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.* 153: 753.
- Cheever, A.W., K.F. Hoffmann, T.A. Wynn. 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today* 21: 465.
- Chensue, S.W., P.D. Terebuh, K.S. Warmington, S.D. Hershey, H.L. Evanoff, S.L. Kunkel, G.I. Higashi. 1992. Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *J. Immunol* 148: 900.
- Chevillard, C., C.E. Moukoko, N.E.M.A. Elwali, J.H. Bream, B. Kouriba, L. Argiro, S. Rahoud, A. Mergani, S. Henri, J. Gaudart, Q. Mohamed-Ali, H.A. Young, A.J. Dessein. 2003. IFN- $\gamma$  Polymorphisms (IFN- $\gamma$  +2109 and IFN- $\gamma$  +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). *The Journal of Immunology* 171: 5596.
- Chiaramonte, M.G., A.W. Cheever, J.D. Malley, D.D. Donaldson, T.A. Wynn. 2001. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 34: 273.
- Christopherson, J.B. 1918. The successful use of antimony in bilharziosis administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). *Lancet* ii: 325.
- Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor, L. Savioli. 2000. The global status of schistosomiasis its control. *Acta Tropica* 77: 41.
- Cioli, D. 1998. Chemotherapy of schistosomiasis an update. *Parasitol Today*, 14: 418.
- Colley, D.G., A.A. Garcia, J.R. Lambertucci, J.C. Parra, N. Katz, R.S. Rocha, G. Gazzinelli. 1986a. Immune response during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 793.
- Colley, D.G., et al. 1986b. Immune responses and immunoregulation in relation to human schistosomiasis in Egypt. III. Immunity and longitudinal studies of in vitro responsiveness after treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 952.
- Corrêa-Oliveira, R., L.C.C. Malaquias, P. L. Falcão, I.R.C. Viana, L.M.B.G. Oliveira, A.M.S. Silveira, L.A.O. Fraga, A. Prata, R. L. Coffman, J.R. Lambertucci, J.R. Cunha-Melo, O.A. Martins-Filho, A.R. Wilson, G. Gazzinelli. 1998. Cytokines As Determinants Of Resistance And Pathology In Human *Schistosomiasis Mansoni* Infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Brasil* 31: 171.

- Corrêa-Oliveira R., I.R. Caldas, G. Gazzinelli. 2000. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today* 16: 397.
- Cota, G. F., R. A. Pinto-Silva, C. M. F. Antunes, and J. R. Lambertucci. 2006. Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. *Am. J. Trop. Hyg.* 74(1): 103.
- Coura, J.R., C.A. Argento, M.J. Conceição, E.M. Lewis, M.L. Santos, P. Magalhães. 1980. Experiências de campo com oxamniquine oral no tratamento da esquistossomose mansoni. *Inst. Med. Trop. São Paulo* 22(Supl 4): 195.
- Coutinho, H.M., L.P. Acosta, H.W. Wu, S.T. McGarvey, L. Su, G.C. Langdon, M.A. Jiz, B. Jarilla, R.M. Olveda, J.F. Friedman, J.D. Kurtis. 2007. Th2 cytokines are associated with persistent hepatic fibrosis in human *Schistosoma japonicum* infection. *The Journal of Infectious Diseases* 195: 288.
- Czaja, M.J., F.R. Weiner, S. Takahashi, M.A. Giambrone, P.H. van der Meide, H. Schellekens, L. Biempica and M.A. Zern. 1989.  $\gamma$ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology* 10: 795.
- Dalton, P.R. & D. Pole. 1978. Water contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. *Bull WHO* 56: 417.
- De Jesus, A.R., I. Araújo, O. Bacellar, A. Magalhães, E. Pearce, D. Harn, M. Strand, E.M. Carvalho. 2000. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infection and Immunity* 68: 2797.
- De Jesus, A. R., A. Magalhães, D. G. Miranda, R. G. Miranda, M. I. Araújo, A. A. De Jesus, A. Silva, L. B. Santana, E. Pearce, E. M. Carvalho. 2004. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. *Infection and Immunity*. 72: 3391.
- Dessein, A.J., P. Couissinier, C. Demeure, P. Rihet, S. Kohlstaedt, D. Carneiro-Carvalho, M. Ouattara, V. Goudot-Crozel, H. Dessein, A. Bourgois. 1992. Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Invest.* 21: 423.
- Dessein, A.J., D. Hillaire, N.E.M.A. Elwali, S. Marquet, Q. Mahamed-Ali, A. Mirghani, S. Henri, A.A. Abdelhameed, O.K. Saeed, M.M.A. Magzoub and L. Abel. 1999a. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *American Journal of Human Genetics* 65(3): 699.
- Dessein, A.J., S. Marquet, S. Henri, N.E. El Wali, D. Hillaire, V. Rodrigues, A. Prata, Q.M. Ali, B. Gharib, M. De Reggi, M.M. Magzoub, O.K. Saeed, A.A. Abdelhameed, L. Abel. 1999b. Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. *Microbes and Infection* 1: 561.
- Dessein, A., B. Kouriba, C. Eboumbou, H. Dessein, L. Argiro, S. Marquet, N.E.M.A. Elwali, V. Rodrigues, Y. Li, O. Doumbo, C. Chevillard. 2004. Interleukin-13 in the skin and

interferon-g in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunological Reviews* 201: 180.

Doehring-Schwerdtfeger, E., I.M. Abdel-Rahim, Q. Mohamed-Ali, M. Elsheikh, J. Schlake, R. Kardorff, D. Franke, C. Kaiser, J.H.H. Ehrich. 1990. Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: evaluation of morbidity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 581.

Doehring-Schwerdtfeger, E., I. M. Abdel-Rahim, R. Kardorff, et al. 1992. Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: reversibility of morbidity twenty-three months after treatment with praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 409.

Duncan, M.R. & Berman, B. 1985.  $\gamma$  Interferon is the lymphokine and  $\beta$  Interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *Journal of Experimental Medicine* 162: 516.

Dunne, D.W., A.E. Butterworth, A.J. Fulford, H.C. Kariuki, J.G. Langley, J.H. Ouma, A. Capron, R.J. Pierce, R.F. Sturrock. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22: 1483.

El-Ansary, A. 2003. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 136 (2): 227.

Falcão, P.L., L.C.C. Malaquias, O.A. Martins-Filho, A.M.S. Silveira, V.M.A. Passos, A. Prata, G. Gazzinelli, R.L. Coffman, R. Correa-Oliveira. 1998. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunology* 20: 447.

Fallon, P.G., E.J. Richardson, G.J. McKenzie and A.N.J. McKenzie. 2000. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *The Journal of Immunology* 164: 2585.

Farah, I.O., P.W. Mola, T.M. Kariuki, M. Nyindo, R.E. Blanton and C.L. King. 2000. Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of TGF- $\beta$  and IL-4. *The Journal of Immunology* 164: 5337.

Friedman, S.L. 2004. Stellate cells: A moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 40 (5): 1041.

Fulford A.J.C., M. Webster, J.H. Ouma, D.W. Dunne. 1998. Puberty and age-related changes in susceptibility to schistosoma infection. *Parasitol. Today* 14: 23.

FUNASA.1999. Epidemiologia e Controle da Esquistossomose, Brasil.

Gazzinelli, A., J. Bethony, L.A. Fraga, P. LoVerde, R. Correa-Oliveira, H. Kloos. 2001. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil: water contact. *Trop. Med. Int. Health* 6: 126.

- Gazzinelli, G., N. Katz, R.S. Rocha, and D. G. Colley. 1983. Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J. Immunol.* 130:2891.
- Grogan, J.L., P.G. Kremsner, G.J. Vandam, et al. 1996. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. *J Infect Dis* 173:1242.
- Gryseels, B., A.M. Polderman.1987. The morbidity of *Schistosomiasis mansoni* in Maniema (Zaire). *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 202.
- Gryseels, B. 1994. Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience? *Parasitol. Today* 10:380.
- Gryzch, J.M., E.J. Pearce, A.W. Cheever, Z.A. Caulada, P. Caspar, S. Hieny, A. Lewis, A. Sher. 1991. Egg deposition is a major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol* 146: 1322.
- Hagan, P., H.A. Wilkins, U.J. Blumenthal, R.J. Hayes, B.M. Greenwood. 1985. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.* 7(6):625.
- Hagan P., U.J. Blumenthal, D. Dunn, A.J. Simpson, H.A. Wilkins. 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 17: 243.
- Henri, S., C. Chevillard, A. Mergani, P. Paris, J. Gaudart, C. Camilla, H. Desein, F. Montero, N.E.M.A. Elwali, O.K. Saeed, M. Magzoub and A.J. Desein. 2002. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. *The Journal of Immunology* 169: 929.
- Hoffmann, K.F., A.W. Cheever, T.A. Wynn. 2000. 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* 164: 6406.
- Homeida, M.A, A.F Abdel-Gadir, AW Cheever, JL Bennett, BM Arbab, S.Z Ibrahim, I.M Abdel-Salam, A.A Dafalla, T.E Nash. 1988. Diagnosis of pathologically confirmed symmers'periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 38: 86.
- Homeida, M.A., I. E. Tom, T. Nash, J. L. Bennett. 1991. Association of the therapeutic activity of praziquantel with the reversal of Symmers' fibrosis induced by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45 (3): 360.
- Joseph, S., F.M. Jones, K. Walter, A.J. Fulford, G. Kimani, J.K. Mwatha, T. Kamau, H.C. Kariuki, F. Kazibwe, E. Tukahebwa, N.B. Kabatereine, J.H. Ouma, B.J. Vennervald, D.W. Dunne. 2004. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *The Journal of Infectious Diseases* 190:835.

- Kabatereine, N.B., B.J. Vennervald, J.H. Ouma, J. Kemijumbi, A.E. Butterworth, D.W. Dunne, A.J.C. Fulford. 1999. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitology* 118: 101.
- Kaplan, M.H., J.R. Whitfield, D.L. Boros, M.J. Grusby. 1998. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J. Immunol.* 160: 1850.
- Katz, N. & Z. Brener. 1966. Clinical course of 112 cases of Schistosomiasis mansoni observed after 10 years of living in endemic foci in Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 8(3): 139.
- Katz, N.A. Chaves and J. Pellegrino. 1972. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 14: 397.
- Katz, N. 1977. Chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv Pharmacol Chemother* 14: 1.
- Katz, N., F. Zicker, R.S. Rocha, V.B. Oliveira. 1978. Re-infection of patients in schistosomiasis mansoni endemic areas after specific treatment. I--influence of age and worm burden. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 20: 273.
- Kaviratne, M., M. Hesse, M. Leusink, A.W. Cheever, S.J. Davies, J.H. McKerrow, L.M. Wakefield, J.J. Letterio and T.A. Wynn. 2004. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- $\beta$  independent. *The Journal of Immunology* 173:4020.
- Kihara, J.H., N. Muhoho, D. Njomo, I.K. Mwobobia, K. Josyline, Y. Mitsui, T. Awazawa, T. Amano, C. Mwandawiro. 2007. Drug efficacy of praziquantel and albendazole in school children in Mwea Divison, Central Province, Kenya. *Acta Tropica* 102: 165.
- King, C.L., A. Medhat, I. Malhotra, M. Nafeh, A. Helmy, J. Khaudary, S. Ibrahim, M. El-Sherbiny, S. Zaky, R.J. Stupi, K. Brustoski, M. Shehata, M.T. Shata. 1996. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J.Immunol* 156: 4715.
- Kitani, A., I. Fuss, K. Nakamura, F. Kumaki, T. Usui, W. Strober. 2003. 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. *The Journal of Experimental Medicine* 198 (8): 1179.
- Kloos, H., C. De Souza, A. Gazzinelli, B.S. Soares-Filho, T. Da Costa, J. Bethony, K. PAGE, C. Grzywacz, S F. Lewi,; D. Minchella, P. LoVerde, R.C. Oliveira. 2001. The distribution of *Biomphalaria spp.* in different habitats in relation to physical, biological, water contact and cognitive factors in a rural area in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 57.
- Kloos, H., J.K.L. Passos, P. LoVerde, R. Correa-Oliveira, A. Gazzinelli. 2004. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: *environmental and epidemiological aspects*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 99: 673.

- Lambertucci, J.R., R.S. Rocha, O.S. Carvalho, N. Katz. 1987. A esquistossomose mansoni em Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20: 47.
- Lambertucci, J. R., J. Carlos Serufo, R. Gerspacher-Lara, A. A. M. Rayes, R. Teixeira, V. Nobre, C. M. F. Antunes. 2000. *Schistosoma mansoni*: assesment of morbidity before and after control. *Acta Tropica*. 77: 101.
- Letterio, J.J. & A.B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137.
- Li, Y.S., A.C. Sleight, Y. Li, M. Tanner, A. Dessein, G. M. Williams and D. P. Mcmanus. 2002. Five-year impact of repeated praziquantel treatment on subclinical morbidity due to *Schistosoma japonicum* in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 438.
- Magalhães, T.V., G. Gazzinelli, M. C. Alvarez, F. C. Lima e Silva, L. A. Fraga, A. M. Silveira, A. Gazzinelli, J. Bethony, P. Loverde, I. R. Caldas, R. Correa-Oliveira, and A. Prata. 2005. Comparative clinical and ultrasound study of egg-negative and egg-positive individuals from *Schistosoma mansoni* low morbidity endemic areas, and hospitalized patients with hepatosplenic disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38: 33.
- Malaquias, L.C.C., P.L. Falcão, A.M.S. Silveira, G. Gazzinelli, A. Prata, R.L. Coffman, V. Pizziolo, C.P. Souza, D.G. Colley and R. Correa-Oliveira. 1997. 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.* 46: 393.
- Mallat, A., A.M. Preaux, S. Blazejewski, J. Rosenbaum, D. Dhumeaux, P. Mavier. 1995. Interferon  $\alpha$  and  $\gamma$  inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology* 21: 1003
- Martins, M.J., R.A. Pinto-Silva, J.C. Serufo, A.A. Rayes, M.P. Damasceno, M.L. Martins, A.P. Santos, S.C. Drummond, M.A. Bezerra, J.R. Lambertucci. 1998. Morbidity of schistosomiasis in an endemic area of the northeast of the state of Minas Gerais in Brazil: a clinical and sonographic study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl 1): 243.
- Marquet, S., L. Abel, D. Hillaire, H. Dessein, J. Kalil, J. Feingold, J. Weissenbach, A.J. Dessein. 1996. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat. Genet.* 14: 181.
- Mduluza, T., P.D. Ndhlovu, N. Midzi, J.T. Scott, F. Mutapi, C. Mary, P. Couissinier-Paris, C.M.R. Turner, S.K. Chandiwana, M.E.J. Woolhouse, A.J. Dessein, P. Hagan. 2003. Contrasting cellular responses in *Schistosoma haematobium* infected and exposed individuals from areas of high and low transmission in Zimbabwe. *Immunology Letters* 88: 249.
- Mohamed-Ali, Q., N. E. M. A. Elwali, A. A. Abdelhameed, A. Mergani, S. Rahoud, K. E. Elagib, O. K. Saeed, L. Abel, M. M. A. Magzoub, and A. J. Dessein. 1999. 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. *The Journal of infectious Diseases.* 180: 1298.

- Mola, P.W., I.O. Farah, T.M.Kariuki, M. Nyindo, R.E.Blanton and C.L. King. 1999. Cytokine control of the granulomatous response in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of exposure and treatment. *Infection and Immunity* 67: 6565.
- Montenegro, S.M., P. Miranda, S. Mahanty, F.G. Abath, K.M. Teixeira, E.M. Coutinho, J. Brinkman, I. Gonçalves, L.A. Domingues, A. Sher, T.A. Wynn. 1999. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J.Infect Dis* 179(6): 1502.
- Morais, C.N.L., J.R. de Souza, W.G. de Melo, M.L. Aroucha, A.L.C. Domingues, T. Wynn, F.G.C. Abath, S.M.L. Montenegro. 2002. Studies on the production and regulation of Interleukin, IL-13, IL-4 and Interferon- $\gamma$  in human schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (Suppl.I): 113.
- Mott, K.E. 1982. Control of schistosomiasis: morbidity-reduction and chemotherapy. *Acta Leiden* 49: 101.
- Mutapi, F., P.D. Ndhlovu, P. Hagan, J.T. Spicer, T. Mduluz, C. M.R. Turner, S. K. Chandiwana, and M.E.J. Woolhouse. 1998. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. *The Journal of Infectious Diseases* 178: 289.
- Mutapi, F., G. Winborn, N. Midzi, M. Taylor, T. Mduluz, R.M. Maizels. 2007. Cytokine responses to *Schistosoma haematobium* in a Zimbabwean population: contrasting profiles for IFN-gamma, IL-4, IL-5 and IL-10 with age. *BMC Infectious Diseases* 7:139.
- Mwatha, J.K., G. Kimani, T. Kamau, G.G. Mbugua, J.H. Ouma, J. Mumo, A.J.C. Fulford, F.M. Jones, A.E. Butterworth, M.B. Roberts, D.W. Dunne. 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-I, and INF-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 160: 1992.
- Naus, C.W., M. Booth, F.M. Jones, J. Kemijumbi, B.J. Vennervald, C.H. Kariuki, J.H. Ouma, N.B. Kabatereine, D.W. Dunne. 2003. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. *Tropical Medicine International Health* 8 (6): 561.
- Neves, D.P., A.L. De Melo, P.M. Linardi, R.W.A. Vitor. 2005. *Parasitologia Humana*. 11 ed. Editora Atheneu. São Paulo. Cap.22 p. 193 (A.L. De Melo, P.M.Z. Coelho).
- Pearce, E.J., P. Caspar, J.M. Gryzch, F.A. Lewis, A. Sher. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 response by a parasitic helminth, *Schistosoma Mansoni*. *J. Exp. Med* 173: 159.
- Pearce, E.J., J.P. Vasconcelos, L.R. Brunet, E.A. Sabin. 1996. IL-4 in schistosomiasis. *Experimental Parasitology* 84: 295.
- Pearce, E.J., A.S. MacDonald. 2002. The Immunobiology of Schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* 2: 499.

- Pellon, A.B., I. Teixeira. 1950. Distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil. Divisão de Organização sanitária, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, p 24.
- Prata, A., J.C. Bina, A.C. Barreto, M.G. Alecrim. 1980. Ensaio de controle da transmissão da esquistossomose pela oxaminiquine, em uma localidade hiperendêmica. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 22 (supl 4): 182.
- Reiman, R.M., R.W. Thompson, C.G. Feng, D. Hari, R. Knight, A.W. Cheever, H.F. Rosenberg and T.A.Wynn. 2006. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. Infection and Immunity 74: 1471.
- Reimert, C.L., C.M. Fitzsimmons, S. Joseph, J.K. Mwatha, F.M. Jones, G. Kimani, K.F. Hoffmann, M. Booth, N.B. Kabatereine, D.W. Dunne and B.J. Vennervald. 2006. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre-and posttreatment with praziquantel. Clinical and Vaccine Immunology 13: 584.
- Richter, J. 2003. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. Acta Tropica 86: 161.
- Roberts, M., A.E. Butterworth, G. Kimani, T. Kamau, A.J. Fulford, D.W. Dunne, J.H. Ouma, R.F. Sturrock. 1993. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. Infection and Immunity 61: 4984.
- Rockey, D.C. & J.J. Chung. 1994. Interferon  $\gamma$  inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. J. Invest. Med. 42: 660.
- Ruiz-Guevara, R., B.A. de Noya, S.K. Valero, P. Lecuna, M. Garassini, O. Noya. 2007. Clinical and ultrasound findings before and after praziquantel treatment among Venezuelan schistosomiasis patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40 (5): 505.
- Savioli, L., E. Renganathan, A. Montresor, A. Davis A, K. Behbehani. 1997. Control of Schistosomiasis – A Global Picture. Parasitol. Today 13: 444.
- Sher, A., D. Fiorentino, P. Caspar, E. Pearce, T. Mosmann. 1991. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with downregulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J. Immunol 147: 2713.
- Silva-Teixeira, D.N., C. Contigli, J.R. Lambertucci, J.C. Serufo, V.R. Jr. 2004. Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11(3): 627.
- Silveira, A.M.S., J. Bethony, L.F. Alves-Oliveira, A. Gazzinelli, H. Kloos, M.C.B. Alvares, A. Prata, H.L. Guerra, P.T. LoVerde, R. Corrêa-Oliveira, G. Gazzinelli. 2002. High levels of IgG4 to *S. mansoni* egg antigens are observed in individuals with periportal fibrosis. Am.J. Trop. Med. Hyg 66 (5): 542.
- Silveira, A.M.S., G. Gazzinelli, L.F. Alves-Oliveira, J. Bethony, A. Gazzinelli, C. Carvalho-Queiroz, M.C.B. Alvarez, F.C. Lima-Silva, A. Prata, P.T. LoVerde, R. Correa-Oliveira. 2004. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of

- interleukin-10, interferon- $\gamma$  and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98: 514.
- Singh, K. P., H. C. Gerard, A. P. Hudson & D. L. Boros. 2004. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. *Immunology.* 111: 343.
- Talaat, M.R., A.I. El-Bassiouny, A.M. Osman, M. Yossif, R. Charmy, M.M. Al-Sherbiny. 2007. Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S. mansoni*-infected Egyptian patients. *Parasitol Res* 101: 289.
- Taylor, J.J., M. Mohrs, E.J. Pearce. 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *The Journal of Immunology* 176(10):5839.
- Tiggelman, A. M., W. Boers, C. Linthorst, M. Sala, R. A. Chamuleau. 1995. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL1 $\beta$ , IL-4, TGF- $\beta$  and INF- $\gamma$ . *J. Hepatol.* 23:307.
- Torres, V.M. 1976. Dermatologic manifestations of Schistosomiasis Mansoni. *Archives of Dermatology* 112: 1539.
- Viana I.R.C., A. Sher, O.S. Carvalho, C.L. Massara, S.M. Eloi-Santos, E.J. Pearce, D.G. Colley, G. Gazzinelli, R. Corrêa-Oliveira. 1994. Interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 88: 466.
- Viana I.R.C., R. Corrêa-Oliveira, O.S. Carvalho, C.L. Massara, E. Colosimo, D.G. Colley, G. Gazzinelli. 1995. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol* 17: 297.
- Walter, K., A.J.C. Fulford, R. McBeath, S. Joseph, F.M. Jones, H.C. Kariuki, J.K. Mwata, G. Kimani, N.B. Kabatereine, B.J. Vennervald, J.H. Ouma, D.W. Dunne. 2006. Increase human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. *The Journal of Immunology* 177: 5490.
- Warren, K.S., E.O. Domingos, & R.B.T. Cowan. 1967. Granuloma Formation Around Schistosome Eggs As A Manifestation Of Delayed Hypersensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 735.
- Warren, K.S. 1968. Pathophysiology and pathogenesis of hepatoesplenic schistosomiasis mansoni. *Bull NY Acad. Med.* 44: 280.
- Webster, M., P.G. Fallon, A.J. Fulford, A.E. Butterworth, J.H. Ouma, G. Kimani, D.W. Dunne. 1997. Effect of praziquantel and oxamniquine treatment on human isotype responses to *Schistosoma mansoni*: elevated IgE to adult worm. *Parasite Immunol.* 19: 333.
- Wilkins M.A., P. Blumenthal, P. Hagan, R.J Hayes, S. Tulloch. 1987. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 81: 29.

- Wilson, M.S., M.M. Mentink-Kane, J.T. Pesce, T. Ramalingam, R. Thompson, T.A. Wynn. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and Cell Biology* 0: 1.
- Wynn, T.A., A.W. Cheever, D. Jankovic, R.W. Poindexter, P. Gaspar, F.A. Lewis, A. Sher A. 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 376: 594.
- Wynn, T.A., R. Morawetz, T. Scharon-Kersten, S. Hieny, H.C. Morse III, R. Kuhn, W. Muller, A.W. Cheever, A. Sher. 1997. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2- type cytokine responses in vivo. *J. Immunol.* 159: 5014.
- World Health Organization. 1985. Schistosomiasis Control. Tech Report Ser 728.
- World Health Organization. 1991. Meeting on ultrasonography in schistosomiasis. Proposal for a practical guide to the standardized use of ultrasound in the assessment of pathological changes.
- World Health Organization. 1998. Schistosomiasis Control. WHO/Ctd.
- Zhu, H., I. Zeng, D. Zhu, Y. Yuan. 2000. The role of TGF-beta 1 in mice hepatic fibrosis by schistosomiasis japonica. *J. Tongji Med. Univ.* 20:320.
- Zwingenberger, K., G. Harma, H. Feldmeier, O. Muller, A. Steiner, U. Bienzle. 1988. Liver involvement in human schistosomiasis mansoni. Regression of immunological and biochemical disease markers after specific treatment. *Acta Tropica.* 45: 263.

**ANEXO**

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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