



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

MÔNICA MARIA DE ALMEIDA

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA COM PRAZIQUANTEL NO PERFIL  
DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *S. mansoni*  
PORTADORES DE FIBROSE PERIportal**

**GOVERNADOR VALADARES**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



MÔNICA MARIA DE ALMEIDA

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA COM PRAZIQUANTEL NO PERFIL  
DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *S. mansoni*  
PORTADORES DE FIBROSE PERIportal**

**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**

**GOVERNADOR VALADARES**

**2009**



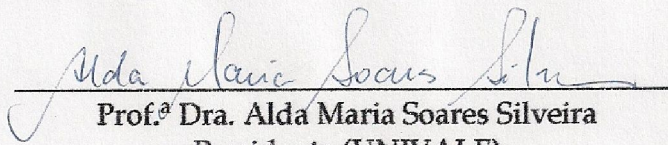
Reconhecida pelo Parecer nº 18/92 CFE Portaria 1037/92 MEC  
Mantenedora: FUNDAÇÃO PERCIVAL FARQUHAR

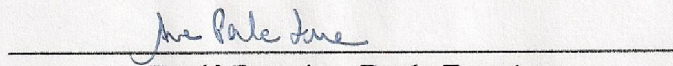
**Ata da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado Intitulada:**

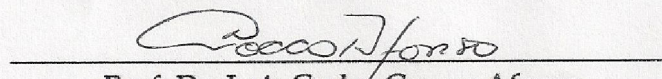
**“EFEITO DA TERAPÊUTICA ESPECÍFICA NO PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *S. MANSONI* PORTADORES DE FIBROSE PERIportal APÓS QUIMIOTERAPIA COM PRAZIQUANTEL”**

Aos onze dias do mês de setembro de 2009, às 09:00hs, na sala 01 do edifício Pioneiros no *campus* Antônio Rodrigues Coelho da Universidade Vale do Rio Doce, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado da aluna Mônica Maria de Almeida. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por  
.....  
APROVAR A CANDIDATO

**Membros da Banca Examinadora:**

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria Soares Silveira  
Presidente (UNIVALE)

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Ferreira  
Examinadora (UFJF)

  
Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso  
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 11/09/2009

## **EXECUÇÃO DO TRABALHO:**

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

## **COLABORADORES:**

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

Dr<sup>a</sup> Lúcia Alves Oliveira Fraga

Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Dr<sup>a</sup> Elaine Speziali

Maria de Fátima da Silva

Marlucy Rodrigues Lima

Lilia Cardoso Pires

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

Dr<sup>a</sup> Andrea Gazzinelli

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

Dr. Andréa Teixeira de Carvalho

Dr Rodrigo Corrêa de Oliveira

Dr Olindo Assis Martins Filho

Dr<sup>a</sup> Denise Silveira Lemos

Helena Barbosa Ferraz

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

Dr Giovanni Gazzinelli

## **ÓRGÃOS FINANCIADORES:**

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)

Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

**Almeida, M. M.** ; Giovanni Gazzinelli ; Lucia Alves de Oliveira fraga ; Luiz Cosme Cotta Malaquias ; Pauline Martins Leite ; Elaine Speziali de Faria ; Helena Barbosa Ferraz ; Denise Silveira Lemos ; Olindo Assis Martins-Filho ; Rodrigo Correa Oliveira ; Andréa Gazzinelli ; Andrea Teixeira de Carvalho ; Alda Maria Soares Silveira. Especific treatment lead to a reduction of periportal fibrosis during human schistosomiasis mansoni and is associated with a distinct intracellular cytokine profile. XXXI Congress of the Brazilian Society for Immunology. 19-22 de outubro de 2008 Ribeirão Preto, SP.

**Almeida, M.M.;** Oliveira-Fraga, L.A.; Malaquias, L.C.C; Martins-Leite, P.; Faria, E.S.; Teixeira-Carvalho, A.; Ferraz, H.B.; Lemos, D.S.; Martins-Filho, O.A.; Correa-Oliveira, R.; Gazzinelli, G.; Gazzinelli, A. and Alda Maria Soares Silveira. Tratamento específico induz uma redução da fibrose periportal durante esquistossomose mansônica associando-se com um distinto perfil de citocinas intracelulares. In: IX Encontro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas IV Encontro Anual de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia, 2008, Belo Horizonte.

Bhárbara Bramusse Gouveia ; **Almeida, M. M.**; Lucia Alves de Oliveira fraga; Luiz Cosme Cotta Malaquias; Pauline Martins Leite; Elaine Speziali de Faria; Andrea Teixeira de Carvalho; Helena Barbosa Ferraz; Denise Silveira Lemos; Olindo Assis Martins-Filho; Rodrigo Correa Oliveira; Giovanni Gazzinelli; Andréa Gazzinelli; Alda Maria Soares Silveira. Esquistossomose mansônica humana: resposta imune durante fase crônica da infecção. In: 6 Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica, 2008, Governador Valadares. .

Maria Emília de Souza Costa; **Almeida, M. M.**; Giovanni Gazzinelli; Lucia Alves de Oliveira fraga; Luiz Cosme Cotta Malaquias; Pauline Martins Leite; Elaine Speziali de Faria; Helena Barbosa Ferraz; Denise Silveira Lemos; Olindo Assis Martins-Filho; Rodrigo Correa Oliveira; Andréa Gazzinelli; Andrea Teixeira de Carvalho e Alda Maria Soares Silveira . Tratamento específico induz uma redução na fibrose periportal de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, residentes em áreas endêmicas. In: 6 Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica, 2008, Governador Valadares.

Dedico este trabalho ao meu marido e grande companheiro, meu filhinho e minha mãe que sempre estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço por me ajudarem, cada um a seu modo, a ter incentivo e forças para seguir em frente e conquistar uma das mais importantes vitórias da minha vida.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A minha orientadora Dra. Alda Maria Soares Silveira, que não foi somente minha orientadora, e sim, uma grande amiga. Obrigada pelas conversas, que me ajudaram nos momentos mais difíceis, difíceis mesmo. Obrigada pela imensa compreensão sobre minhas particularidades cotidianas, e, principalmente, pelos conselhos. Saiba que serei eternamente grata.



## **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.

Ao Evandro, pelo amor e incentivo que tornou possível a realização deste sonho. Agradeço a compreensão pela minha ausência, a confiança em mim depositada, que me fez ir longe, num momento em que acreditava que já tinha realizado tudo o que devia. Por me mostrar que quando a gente quer, sempre é possível ir mais longe. Esta vitória é nossa.

A minha mãe Jacinta, pelo grande amor. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo incentivo, pelo exemplo de honestidade, responsabilidade e perseverança. Sempre batalhadora e com bom humor contagiante. Obrigada por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

A meu filhinho Henrique, um presente de Deus em minha vida, que me renova a cada manhã com seu sorriso aberto e cativante. Agradeço por você existir. Desculpa a mamãe por todas as vezes que você não pode ter toda a minha atenção. Tudo que fiz, foi pela nossa família.

A minha amiga Sandra, que com seu trabalho impecável, me ajudou a cuidar de minha casa durante este período, e anteriores. Obrigada pela sua lealdade, pelo amor que você tem pelo meu filho, e por você ser tão especial pra nós.

A Luíza, que entrou na minha vida num momento de aperto, e com sua paz e carinho, me ajudou imensamente a cuidar do meu bem mais precioso.

A toda a minha família, que sempre acreditou em mim. Obrigada pela imensa torcida, pelas orações, incentivo e confiança.

A minha amiga Gabriella Freitas, uma amizade que começou com o Mestrado e espero que dure por muito tempo.

A professora Lúcia, pela inestimável ajuda neste trabalho.

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

A Marlucy, Lília, Fátima 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 Luiz Carlos e Olindo pela especial colaboração neste trabalho.

A Andréa Teixeira, Denise Lemos e Helena Ferraz, pela disponibilidade em ajudar, principalmente, com meus resultados.

Aos pacientes estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

“ A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável.”

Mahatma Gandhi

## RESUMO

A patologia associada à infecção pelo *S. mansoni* em seres humanos tem identificado as citocinas como um importante fator associado com o desenvolvimento da fibrose periportal, principal consequência deste processo. Neste estudo nós avaliamos a expressão de citocinas pelos linfócitos de pacientes com fibrose periportal antes e dois anos após o tratamento com praziquantel. Amostras de sangue periférico de 19 voluntários, residentes em áreas endêmicas, infectados com *S. mansoni* foram coletadas antes e após quimioterapia específica. Pacientes foram examinados através de ultra-som abdominal e classificados em grupos de acordo com a presença ou ausência de fibrose. Células brancas do sangue foram analisadas por citometria de fluxo após 5 horas de estimulação *in vitro* com antígenos solúveis de ovos (SEA) ou de vermes adultos (SWAP), e foram marcadas com anticorpos monoclonais para interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 e IL-12. O tratamento específico diminuiu significativamente o número absoluto de linfócitos IL-12<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-8<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> produzidos nas culturas controle e SWAP. Em resposta ao SEA, somente o número de linfócitos IL-8<sup>+</sup> (p=0,0017) e IL-4<sup>+</sup> (p=0,0294) diminuiu significativamente. Considerando o impacto da estimulação específica SEA/C na expressão das citocinas, nossos resultados demonstram que, nos pacientes com fibrose, houve um significativo aumento dos linfócitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (p=0,0409), IL-8<sup>+</sup> (p=0,0253) e IL-5<sup>+</sup> (p=0,0097) após o tratamento. Observamos ainda, neste mesmo grupo, uma razão diminuída de linfócitos IL-10<sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> e de IL-10<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, antes e após o tratamento. Em resumo, nossos dados estão de acordo com a hipótese de que indivíduos portadores de fibrose periportal perderam a capacidade de modular a resposta imune aos antígenos do ovo do *Schistosoma*. Esse indivíduos produzem citocinas Th1 e Th2, com um predomínio da resposta Th2, representada por um aumento do número de linfócitos IL-5<sup>+</sup> e por uma razão TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> diminuída, no contexto de uma baixa produção de IL-10, o que poderia explicar a manutenção da fibrose periportal após a quimioterapia com praziquantel.

Palavras-chave: esquistossomose, fibrose periportal, citocinas intracelulares, IL-5, resposta celular

## ABSTRACT

Pathology associated with schistosome infection in humans has identified cytokine response as an important factor in developing the disease being periportal fibrosis the major consequence of this process. In the present study we evaluated the expression of intracellular cytokine profile of schistosomiasis patients with periportal fibrosis, before and two year after treatment with praziquantel. Peripheral blood samples were collected from nineteen volunteers infected with *Schistosoma mansoni* and living in an area endemic for the disease, prior to and two years after treatment with praziquantel. Subjects were examined by abdominal ultrasound and classified into groups according to the presence or absence pathology. White blood cells (WBC) were analyzed by flow cytometric after short *in vitro* stimulation with soluble antigens from schistosome eggs (SEA) and adult worm (SWAP) and were stained with monoclonal antibodies against interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin(IL)-4, IL-5, IL-8, IL-10, and IL-12. Treatment with praziquantel decreased significantly the absolute number of lymphocytes IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-8<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup>, e IL-10<sup>+</sup> produced in culture in the absence of Ag stimulation and in response to SWAP. Concerning the SEA, the number of lymphocytes IL-8<sup>+</sup> ( $p=0,0017$ ) and IL-4<sup>+</sup> ( $p=0,0294$ ) decreased significantly in the study population. Considering the impact of the specific stimulation (SEA/C or SWAP/C), before and after treatment, on the intracitoplasmic cytokines expression in lymphocytes, our results demonstrated that in patients with persistent fibrosis the specific treatment led to a significant increase in the number of lymphocytes TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p=0,0409$ ), IL-8<sup>+</sup> ( $p=0,0253$ ) and IL-5<sup>+</sup> ( $p=0,0097$ ) in the presence of SEA. The lower IL-10<sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell ratio was selectively observed in individuals with fibrosis persistent when compared to patients without fibrosis, before and after treatment. Taken together, our data are consistent with the hypothesis that individuals with fibrosis lost the ability to modulate the immune response to egg antigens of *Schistosoma*. Such individuals display a mixed Th1/ Th2 cytokines pattern, with a predominance of Type-2 response, that is highlighted by an increase in the number of lymphocytes IL-5<sup>+</sup> and lower TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> T-cell ratio, besides impaired levels of IL-10 synthesis, which could explain the maintenance of fibrosis after chemotherapy with praziquantel.

Key-words: schistosomiasis, periportal fibrosis, intracellular cytokine, IL-5, cellular response

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Caracterização da amostra estudada em relação à idade, intensidade da infecção pelo *S. mansoni*, fibrose e sexo, antes e dois anos após o tratamento com praziquantel.....30
- Tabela 2:** Transições do grau de fibrose dos 19 indivíduos residentes em Caju, dois anos após o tratamento com praziquantel.....31
- Tabela 3:** Anticorpos utilizados para detecção de citocinas em linfócitos do sangue periférico.....33
- Tabela 4:** Idade, intensidade de infecção e sexo dos indivíduos agrupados pela presença de fibrose periportal, antes e dois anos após o tratamento.....35
- Tabela 5:** Perfil hematológico de leucócitos do sangue periférico dos 19 indivíduos antes e dois anos após tratamento com praziquantel.....36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise de linfócitos do sangue periférico de um indivíduo por citometria de fluxo.....34
- Figura 2:** Impacto do tratamento na expressão de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), antes do tratamento (barras brancas) e após o tratamento (barras pretas).....38
- Figura 3:** Expressão das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), antes do tratamento (barras brancas) e após o tratamento (barras pretas).....38
- Figura 4:** Expressão das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), após estimulação específica por SEA (barras brancas) ou SWAP (barras pretas), antes (AT) e depois do tratamento (DT).....39
- Figura 5:** Expressão de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com baixa (n=12) intensidade de infecção (opg<100 - barras brancas), e de indivíduos (n=06) com alta intensidade de infecção (opg 100 - barras pretas) antes do tratamento.....40
- Figura 6:** Expressão de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com baixa (n=12) intensidade de infecção (opg<100 - barras brancas), e de indivíduos (n=06) com alta intensidade de infecção (opg 100 - barras pretas), avaliando estimulação específica, antes do tratamento.....40
- Figura 7:** Expressão de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose, antes do tratamento.....41
- Figura 8:** Expressão de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose, após o tratamento.....42
- Figura 9:** Impacto da estimulação antígeno-específica sobre o perfil de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose antes (AT) e após (DT) o tratamento.....43
- Figura 10:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose.....44
- Figura 11:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-5 e IL-8 por linfócitos do sangue periférico dos mesmos indivíduos sem fibrose (n=06) e aqueles que persistiram com fibrose (n=06) após estímulo com SEA.....45

**Figura 12:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-5 e IL-8 por linfócitos do sangue periférico dos mesmos indivíduos sem fibrose(n=06) e aqueles que persistiram com fibrose (n=06) após estímulo com SWAP..... 46

**Figura 13:** Razão entre número de linfócitos IFN-<sup>+</sup>, TNF-<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> estimulados por SEA, dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose..... 47

**Figura 14:** Razão entre número de linfócitos IFN-<sup>+</sup>, TNF-<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> estimulados por SWAP, dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose..... 48



## LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

<b>AT</b>	Antes do tratamento
<b>BD</b>	Becton Dickinson
<b>CC</b>	Cultura controle
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array, método para detecção de citocinas por citometria de fluxo
<b>DT</b>	Depois do tratamento
<b><i>et al</i></b>	do latim, significa colaboradores
<b>eco</b>	ecogenicidade periportal
<b>Facs</b>	do inglês, “Fluorescence Activated Cell Sorte”
<b>FIB +</b>	Pacientes portadores de fibrose periportal
<b>FIB -</b>	Pacientes sem fibrose periportal
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FL2</b>	Canal de detecção da fluorescência laranja, classificada como fluorescência do tipo 2 nos ensaios de citometria de fluxo
<b>FSC</b>	Sigla para parâmetro de tamanho celular em ensaios de citometria
<b>KO</b>	Knockout
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MFF</b>	Max Facs Fix, solução fixadora de células para ensaios de citometria
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Neg</b>	Indivíduos com exame parasitológico negativo para <i>S. mansoni</i>
<b>opg</b>	Ovos por grama de fezes
<b>PBMC</b>	do inglês, “Peripheral Blood Monocuclear Cells”, ou seja, células mononucleadas do sangue periférico
<b>PBS</b>	do inglês, “Phosphated Buffer Solution”, ou seja, solução tampão salínico fosfatado
<b>PBS-P</b>	Solução tampão salínico fosfatado permeabilizadora
<b>PBS-Wash</b>	Solução tampão salínico fosfatado para lavagem de células
<b>PE</b>	Ficoeritrina, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro laranja da luz visível
<b>pg/mL</b>	Picogramas ( $10^{-9}$ grama) por mililitro

<b>PMA</b>	Acetato mirístico de forbol
<b>Pos</b>	Indivíduos com exame parasitológico positivo para <i>S. mansoni</i>
<b>RPMI 1640</b>	Solução nutritiva para cultivo
<b><i>r</i></b>	Coefficiente de correlação
<b>Q2</b>	Quadrante duplo positivo
<b>SEA</b>	Antígeno solúvel de ovos de <i>S. mansoni</i>
<b>SSC</b>	Sigla para parâmetro de complexidade ou granulosidade intracelular em ensaios de citometria de fluxo
<b>SWAP</b>	Antígeno solúvel de vermes adultos totais de <i>S. mansoni</i>
<b>T.A.</b>	Temperatura ambiente
<b>Th<sub>1</sub></b>	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 1
<b>Th<sub>2</sub></b>	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 2
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>x g</b>	Aceleração da gravidade(giros por minuto)
<b>WHO</b>	do inglês, Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
4.1 Caracterização da população .....	29
4.2 Exame parasitológico de fezes.....	30
4.3 Exame ultrassonográfico .....	30
4.4 Preparação de antígenos .....	31
4.5 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico, após estimulação breve in vitro .....	32
4.6 Aquisição e análise de citocinas intracelulares de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo .....	33
4.7 Análise estatística.....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1 Relação entre idade, intensidade de infecção e sexo com fibrose periportal.....	35
5.2 Avaliação do perfil leucocitário dos indivíduos incluídos no estudo, antes e dois anos após o tratamento .....	36
5.3 Avaliação da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos após breve incubação in vitro com antígenos derivados do <i>S. mansoni</i> .....	36
5.3.1 Efeito do tratamento na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos incluídos na amostra.....	37
5.3.2 Comparação entre a expressão de citocinas pelos linfócitos estimulados por diferentes antígenos de <i>S. mansoni</i> , antes e dois anos após o tratamento.....	39
5.3.3 Análise da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela intensidade de infecção antes do tratamento. ....	39
5.3.4 Análise da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados de acordo com a presença de fibrose antes e dois anos depois do tratamento.....	41
5.3.5 Efeito da estimulação antígeno-específica na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela presença de fibrose, antes e dois anos após o tratamento. 43	
5.3.6 Efeito do tratamento na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela presença de fibrose.....	44
5.3.7 Comparação da expressão de citocinas em linfócitos, antes e após tratamento, dos mesmos indivíduos, dentro dos grupos categorizados pela presença de fibrose periportal. .....	45
5.3.8 Razão entre o número de linfócitos, expressando diferentes citocinas, de indivíduos agrupados pela presença de fibrose antes e dois anos após o tratamento.....	46
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma endemia parasitária típica das Américas, Ásia e África. Chegou ao Brasil com os escravos africanos trazidos pela Colônia Portuguesa, mas há referências da doença muito antes dessa época. Ovos do esquistossomo — helminto do gênero *Schistosoma* que causa essa endemia — foram encontrados em múmias chinesas de mais de dois mil anos. No século XXI, a doença ainda é um problema grave de saúde pública (Katz & Almeida, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a esquistossomose acometa 200 milhões de pessoas em 74 países. No Brasil, acredita-se que são cerca de seis milhões de infectados, encontrados, principalmente, nos estados do Nordeste e em Minas Gerais, que concentram mais de 70 % dos casos no país (WHO 2002, FUNASA 1999 e Drummond *et al.*, 2006). A aplicação de medidas técnico-políticas, nos campos de saneamento básico, saúde e educação, seria fundamental para o controle e erradicação desta parasitose (Gazzinelli *et al.*, 2006).

Aproximadamente 4 milhões de pessoas infectadas e não tratadas desenvolvem a forma clínica hepatoesplênica. Uma patologia resultante da inflamação induzida pelo ovo no sistema porta. A fibrose periportal resulta de um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular no espaço porta, que leva a uma hipertensão portal grave e esplenomegalia. A morbidade crônica é o impacto principal da esquistossomíase na saúde do paciente; e pode ser resultado de repetidas infecções e desenvolvimento de seqüelas não-fatais, porém, debilitantes. Embora a doença esteja em expansão, houve uma redução da mortalidade causada pela forma hepatoesplênica da esquistossomose, provavelmente devido a implantação do Programa de Controle a Esquistossomose na década de 70 (PCE), todavia, a morbidade ainda é considerada elevada (Cota *et al.*, 2006; Lapa *et al.*, 2006; de Farias *et al.*, 2007). A quimioterapia exerce o papel principal no controle e redução da morbidade nas áreas endêmicas (WHO, 1993). Na África e nas Américas as únicas drogas usadas no controle da doença são: Oxamniquine e Praziquantel. Este último é hoje o tratamento adotado para a esquistossomíase, preferência esta que se explica pelo preço razoável e pela própria atividade do medicamento contra todas as espécies do parasito. Uma única dose oral de 40 mg/kg, geralmente, é suficiente para alcançar taxas de cura entre 60-90% e redução de 90-95% no número médio de ovos excretados (WHO, 1998).

O homem adquire a infecção quando entra em contato com águas contaminadas pelas cercárias liberadas pelos caramujos. Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação

lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva. Nesse processo, que pode durar até 15 minutos, a cercária perde sua cauda. Depois de atravessar a pele, ela passa a ser chamada de esquistossômulo. Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e penetram em seus vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Muitos deles são eliminados pelo sistema imune, os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões e, posteriormente, migram para o sistema porta, onde tornam-se adultos. O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram contra corrente circulatória para as veias mesentéricas do hospedeiro, principalmente, a mesentérica inferior e iniciam a postura de ovos no nível da submucosa. Desta, após seis dias, os ovos chegam à luz intestinal e são liberados para o exterior (Pearce & MacDonald, 2002), os que não alcançam o lúmen intestinal são levados pela circulação porta e ficam presos na parede intestinal e no fígado, e são circundados por uma resposta granulomatosa do hospedeiro. A deposição contínua de ovos induz uma resposta inflamatória crônica, que pode variar de acordo com a intensidade de infecção (Boros, 1989).

A patogenia da esquistossomose mansoni depende de uma série de fatores: a linhagem do parasito, a idade, o estado nutricional e a imunidade do hospedeiro e, principalmente, a carga parasitária, ou seja, a quantidade de parasitos que infectou o indivíduo (Boros, 1989; Butterworth, 1998). A intensidade de infecção, avaliada pelo número de ovos excretados por grama de fezes (opg), depende de vários fatores epidemiológicos tais como a prevalência da infecção, a frequência e intensidade de contato com a água (Gazzinelli *et al.*, 2001). As reinfecções em áreas endêmicas são constantes e aumentam até os vinte anos de idade diminuindo progressivamente a partir da segunda década de vida. Estas observações têm sugerido o desenvolvimento de imunidade contra reinfecções, uma vez que tal fato não poderia ser explicado apenas por uma diminuição de exposição ao parasita, que também pode ocorrer com a idade (Butterworth *et al.*, 1985; Wilkins *et al.*, 1987; Gryseels, 1994). Também é possível identificar um pequeno grupo de indivíduos de área endêmica 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 putativamente resistentes à infecção/reinfecção e foram denominados normais endêmicos (Bahia-Oliveira *et al.*, 1992; Viana *et al.*, 1994, 1995; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000).

A esquistossomose mansônica produz quatro condições clínicas: doença aguda e três formas crônicas (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica). A forma aguda é uma doença febril debilitante (*Katayama fever*) que pode ocorrer antes do aparecimento dos ovos nas fezes, o que acontece de 4 a 6 semanas após a infecção, e é caracterizada por manifestações

toxêmicas durante a migração da larva e no período inicial de postura de ovos. Alguns indivíduos após a exposição podem apresentar manifestações cutâneas do tipo urticária, além de hepatomegalia (Boros, 1989). Nos indivíduos residentes em áreas endêmicas a fase aguda é, geralmente, assintomática, porém, essa síndrome febril, acompanhada de fraqueza, náusea, vômitos, diarreia, perda de peso e marcante eosinofilia é vista em pessoas que não têm história de contato prévio, e se infectam após viagem para áreas endêmicas (Lambertucci *et al.*, 2000; Pearce & MacDonald 2002; Meltzer, 2006). Durante a fase aguda, bem menos estudada que a doença crônica, níveis elevados de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) foram detectados no plasma, além da liberação espontânea de grandes quantidades de interleucina (IL)-1 e IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (de Jesus *et al.*, 2002).

Após as manifestações da fase aguda, quando estas ocorrem, a infecção progride para a fase crônica. A forma clínica 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 conhecida da doença crônica, que acomete uma porcentagem pequena da população infectada, variando de 1 a 10%, dependendo da área de estudo (Bina & Prata, 2003). Esta forma caracteriza-se pelo aumento considerável do baço e do fígado devido à fibrose periportal central e periférica, que pode levar a complicações significativas como hipertensão porta, mielite, hipertensão pulmonar e cor pulmonale (Lambertucci *et al.*, 2000). A intensidade de infecção é um fator que pode afetar a gravidade da doença, particularmente em crianças; entretanto, esse fator parece importante quando existe uma predisposição genética do indivíduo infectado (Mohamed-Ali *et al.*, 1999; Dessein *et al.*, 1999a). Embora, tenha sido sugerido que o maior risco de desenvolvimento de formas mais graves seja nos indivíduos que apresentam maior intensidade de infecção, comunidades bem definidas, com semelhantes níveis de exposição, apresentam diferenças marcantes na prevalência dessas formas (Fulford *et al.*, 1991, 1998). Essas informações sugerem que outros fatores poderiam estar influenciando a progressão da forma clínica assintomática para as formas mais graves.

Na década de 80, tornou-se possível identificar e avaliar nos trabalhos de campo a fibrose hepática utilizando-se o ultra-som portátil. Tornou-se claro então que o exame físico não refletia o estágio da doença. Alguns pacientes que ao exame ultrasonográfico apresentavam diferentes graus de ecogenicidade, expressão da fibrose periportal, não eram diagnosticados no exame clínico devido a ausência de hepato- e esplenomegalia. Abdel-

Wahab e colaboradores, 1989, foram os primeiros a determinar o grau de hipertensão portal utilizando a medida da espessura da veia porta (Abdel-Wahab *et al.*, 1989). Outro estudo conclusivo mostrou que ultrassonografia era tão sensível quanto as biópsias do fígado para diagnosticar a doença, e diferenciá-la de outras patologias hepáticas não relacionadas à infecção pelo parasito *Schistosoma*. Com isto, tornou-se claro que a utilização deste aparelho forneceria um método mais sensível e de menor custo para avaliar a fibrose de *Symmers* nas populações endêmicas (Homeida *et al.*, 1988). Ao longo dos anos, vários pesquisadores desenvolveram critérios para gradação da fibrose hepática através deste exame, sendo classificada em: grau 0 (< 3 mm), grau 1 (3 - 5 mm), grau 2 (>5 - 7 mm), e grau 3 (> 7 mm). Portanto, o diagnóstico por imagem realizado através do exame de ultra-som é um método seguro, de menor custo, facilmente aplicado, reproduzível e padronizado para comparações da gravidade da doença no mesmo paciente em diferentes épocas ou, em diferentes pacientes durante um estudo da população. (Homeida *et al.*, 1988; Doehring-Schwerdtfeger *et al.*, 1989; WHO, 1991; Abdel-Wahab *et al.*, 1992; De Jesus *et al.*, 2000; Alves-Oliveira *et al.*, 2006). Na verdade, os fatores que levam algumas pessoas a desenvolver fibrose periportal associada à forma hepatoesplênica são pouco entendidos.

Uma possível associação entre o desenvolvimento da resistência ou susceptibilidade à infecção ou morbidade pelo *S. mansoni* e a presença de subpopulações T CD4+ Th1 e Th2 vem sendo intensamente investigada. 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 parasita. Já na esquistossomose humana, a dicotomia Th1/Th2 na resistência a infecção e morbidade não é tão evidente. A proteção a reinfeção após quimioterapia, está associada a produção de IgE, portanto Th2, mas os eventos que levam à morbidade ainda são uma incógnita (Hagan *et al.*, 1991; Butterworth, 1998). Há indícios de que deficiências nos mecanismos de imunorregulação, com predominância da resposta Th1, estariam envolvidos na patogenia da esquistossomose levando ao desenvolvimento da fibrose hepática (Henri *et al.*, 2002). Entretanto, indivíduos normais endêmicos, putativamente 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). Além disso, existe evidência de que altos níveis de IgG4 anti-SEA estão associados à presença de fibrose periportal (Silveira *et al.*, 2002). Portanto, a esquistossomose ilustra a complexidade e o limite do paradigma Th1/Th2, dependendo do modelo utilizado.

Com relação às citocinas do tipo 1, o IFN- $\gamma$  é uma citocina considerada antifibrogênica, que regula a produção de proteínas de matriz extracelular (ECMP) no local da inflamação e aumenta a atividade da colagenase no fígado estimulando a síntese de metaloproteases (Duncan & Berman, 1985; Kovacs *et al.*, 1991; Mallat *et al.*, 1995; Poli, 2000; Henri *et al.*, 2002; Dessein *et al.*, 2004). Também foi demonstrado, *in vitro*, que o IFN- $\gamma$ , através de um mecanismo pós-transcricional, causa uma marcante diminuição nos níveis de RNAm de pró-colágeno I e III (Czaja *et al.*, 1987). Estudos demonstraram que a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico é muito baixa em indivíduos com a forma intestinal da doença (Viana *et al.*, 1994; Zwingenberger *et al.*, 1991). Por outro lado, culturas PBMC de indivíduos não-infectados residentes em áreas endêmicas produziram grande quantidade de IFN- $\gamma$  (Viana *et al.*, 1994).

A produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um evento chave na inflamação que ocorre nas doenças infecciosas em seres humanos (Raziuddin *et al.*, 1993; Marguerite *et al.*, 1999). Na esquistossomose humana, o TNF- $\alpha$  tem efeitos pleiotrópicos na resposta imune contra o parasito, ele pode tanto atuar no desenvolvimento da fibrose contrabalaneando os efeitos protetores do IFN- $\gamma$  (Henri *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004), como pode estar negativamente associado à fibrose periportal (Talaat *et al.*, 2007).

As citocinas tipo 2, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 têm um importante papel no desenvolvimento da fibrose hepática, predominando como padrão na resposta imune dos seres humanos e murinos apresentando infecção crônica pelo *S. mansoni* (Magalhães *et al.*, 2004; de Jesus *et al.*, 2000). A IL-5, uma citocina Th2, reguladora de eosinófilos, está associada com resistência à reinfeção em seres humanos por *S. haematobium* (Hagan *et al.*, 1985) e por *S. mansoni* (Roberts *et al.*, 1993; Medhat *et al.*, 1998). Em camundongos, a IL-13 e a IL-4 estão envolvidas com a formação do granuloma, enquanto a IL-13 é o mediador chave da fibrose (Chiaramonte *et al.*, 1999, 2001), enquanto em seres humanos altos níveis de IL-13 foram associados com a presença de fibrose moderada/grave (Alves-Oliveira *et al.*, 2006; Martins-Leite *et al.*, 2008).

O envolvimento da IL-10 na modulação da resposta proliferativa de PBMC de pacientes com esquistossomose crônica foi descrita previamente por diversos autores (Araújo *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2002) e esses autores sugerem que a deficiência de IL-10 nas formas graves da doença pode estar relacionada com a patogênese da esquistossomose. De forma controversa, alguns autores encontraram uma associação positiva entre IL-10 e a presença de



fibrose, na infecção pelo *S. mansoni* (de Jesus *et al.*, 2004) e pelo *S. japonicum* (Coutinho *et al.*, 2007).

A interleucina-12 (IL-12), uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células dendríticas (DC) e macrófagos, induz a produção de IFN-g, favorece a diferenciação de células T *naïve* em células Th1 e faz uma ligação entre imunidade inata e a imunidade adaptativa, sendo produzida durante o início das reações da imunidade inata contra microrganismos intracelulares e estimulando respostas de imunidade adaptativa que protegem o hospedeiro contra estes microrganismos (Ma & Trinchieri, 2001; Trinchieri, 2003). Não está claro, na esquistossomose, como os ovos do parasito induzem uma resposta Th2, mas algumas evidências apontam para a sua habilidade de inibir a maturação de células dendríticas e produção de IL-12 (Pearce & MacDonald, 2002). Durante o período patente da doença esquistossomótica, as células dendríticas sofrem um processo de maturação, mediado pela ligação do CD40, que é essencial para a iniciação da resposta Th2 (MacDonald *et al.*, 2002).

A ativação de linfócitos T e a produção de citocinas por células imunes não podem ser avaliadas de forma isolada durante a infecção. A resposta imune é um somatório de eventos que envolvem o recrutamento de células para o foco da lesão, a produção de fatores quimiotáticos, estabelecimento de fatores imunoreguladores (supressores) e a expressão de receptores de superfície capazes de direcionar populações celulares específicas e fundamentais no estabelecimento de um microambiente necessário a uma resposta imune eficiente. A formação de granulomas, especialmente a migração e ativação inicial dos diversos tipos celulares para o sítio de reação ao redor dos ovos do *S. mansoni* retidos no tecido do hospedeiro, depende da produção local de quimiocinas produzidas por células do sistema imune. As quimiocinas são pequenas citocinas com atividade quimiotática para células com natureza diversa, sobretudo as do sistema imune, mas também atuam na ativação celular e regulação da resposta imune (Murphy, 1994; Mackay, 2001; Zlotnik & Yoshie 2000).

Alguns estudos têm mostrado o papel das quimiocinas na esquistossomose. Dados obtidos de modelos murinos sugerem que as quimiocinas determinam o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório durante a resposta granulomatosa contra antígenos do ovo (Qiu *et al.*, 2001). Falcão e colaboradores (2002), avaliando a expressão e possíveis funções das quimiocinas, MIP-1, IL-8 (CXCL8) e RANTES, durante infecção por *Schistosoma mansoni* em seres humanos, sugerem que elevadas concentrações de MIP-1 no plasma podem caracterizar um subgrupo de pacientes com grande risco de desenvolver a forma mais grave da doença.

Existem muitas evidências na literatura de que a erradicação da infecção pela quimioterapia leva a uma diminuição da carga parasitária, bem como à regressão da fibrose confirmada pelo exame de ultrassom (Homeida *et al.*, 1991; Doehring-Schwerdtfeger *et al.*, 1992; de Jesus *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2006), bem como das formas hepatoesplênicas (Katz *et al.*, 1977; Prata *et al.*, 1980; Bina & Prata, 1983; de Jesus *et al.*, 2004; Cota *et al.*, 2006). A partir destas evidências a quimioterapia tem se tornado o método central de controle da esquistossomose humana e foram decisivas para que a Organização Mundial de Saúde, em 1985, passasse a indicar o controle da morbidade através do tratamento em massa, em um documento intitulado: “Lutte contre la schistosomiasis” (WHO, 1985).

Durante muito tempo, apenas drogas antimoniais eram confiáveis para a quimioterapia contra esquistossomose. A descoberta do tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio) em 1918 representou um avanço para o tratamento da doença e foi o ponto de partida para a busca de novos compostos sintéticos contra o parasito. Uma grande variedade de diferentes compostos com diversos mecanismos de ação foram descobertos durante o século passado. As três drogas: metrifonato, oxamniquine e praziquantel podem ser usadas para tratamento em massa em diferentes partes do mundo (Cioli *et al.*, 1995). Estudos comparativos da eficácia terapêutica entre praziquantel e oxamniquine mostrou que o primeiro medicamento foi mais eficiente (Ferrari *et al.*, 2003). Contudo, no momento, o praziquantel é a droga de escolha para o tratamento, pois entre as três drogas citadas acima, somente ele é efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma*, outro motivo é que o custo do medicamento baixou devido ao aumento de consumo e competição no mercado, hoje sendo fabricado por muitos laboratórios, inclusive nas formas genéricas. E, o mais importante, o praziquantel é uma droga segura, com efeitos colaterais leves e transitórios, desaparecendo dentro de 24 horas. A dose recomendada varia de 40 - 60mg/Kg peso corporal, a menor é geralmente usada contra *S. mansoni* e *S. haematobium*, enquanto a maior é especialmente recomendada para *S. japonicum* e *S. mekongi*. Algumas vezes foi mostrado que a frequência e a gravidade dos efeitos colaterais pode ser correlacionado com a intensidade de infecção, medida pelo número de ovos nas fezes antes do tratamento, sugerindo que a reação pode ser em função dos vermes mortos e dos produtos por eles liberados. Resistência ao medicamento observada em Senegal e no Egito e em testes laboratoriais foi descrita na literatura, porém, o grau de tal resistência é invariavelmente pequeno; por isso é muito difícil que esta falta de sensibilidade ao praziquantel possa ter qualquer significado clínico substancial, mas deve servir como um sinal de alerta e ajudar no monitoramento das áreas endêmicas, onde o medicamento é usado em massa (Cioli, 2000; Doenhoff *et al.*, 2002; Cioli & Pica-Mattocchia, 2003). Estudos realizados

com camundongos, para testar a susceptibilidade dos estágios larvais do *S. mansoni* aos esquistossomicidas praziquantel e oxamniquine, sugeriram que a falha terapêutica pode resultar quando o tratamento é feito em hospedeiros reinfetados recentemente, em virtude dos mesmos apresentarem formas migrantes e imaturas do parasito, as quais são particularmente resistentes aos esquistossomicidas (Silva *et al.*, 2003; Grandiere-Perez *et al.*, 2006).

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 pobremente entendidas. Muitos fatores podem contribuir para a heterogeneidade da resposta imune e da manifestação da doença observada na esquistossomose humana. 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 nos seres humanos.

Nesse estudo, nós avaliamos o efeito do tratamento com praziquantel na morbidade causada pelo *Schistosoma mansoni* e na produção de citocinas intracitoplasmáticas em células do sangue periférico de indivíduos submetidos ao exame parasitológico de fezes e de ultrassom, visando à identificação da fibrose periportal.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de alguns 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. Dessa forma, estudos adicionais precisam ser desenvolvidos para o esclarecimento dessas questões.

O tipo de abordagem utilizada durante o estudo, empregando-se leucócitos de sangue periférico, permite traçar um perfil da resposta imune dos indivíduos infectados, possibilitando identificar as populações celulares produtoras das citocinas a serem pesquisadas. Essa possibilidade é muito interessante, uma vez que, em sua maioria, as técnicas de estimulação *in vitro* convencionais, acabam não permitindo este tipo de avaliação. É relevante considerar ainda que, tendo em vista a participação de citocinas na regulação da resposta imune, a habilidade de se detectar a expressão de citocinas por um determinado tipo celular é fundamental para que se obtenha simultaneamente informações precisas sobre a frequência e as características fenotípicas de uma célula respondedora a um estímulo específico. A avaliação de citocinas produzidas por diferentes populações celulares contribuirá para o conhecimento da participação dos componentes do sistema imune em mecanismos patológicos na esquistossomose.

Já se demonstrou que a prevalência das formas clínicas mais graves da esquistossomose varia de forma considerável entre diferentes áreas endêmicas (Doehring-Schwerdtfeger *et al.*, 1990; Gryseels & Poldeman, 1987; Barbosa *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 1998; Bina & Prata, 2003; Naus *et al.*, 2003). Embora dados da literatura evidenciem que o risco de desenvolvimento de formas mais graves da patologia seja maior naqueles indivíduos expostos a uma maior intensidade de infecção (Siongok *et al.*, 1976), comunidades distintas bem caracterizadas, apresentam diferenças marcantes na prevalência dessas formas, apesar da intensidade semelhante de infecção (Fulford *et al.*, 1991). Essas informações sugerem que, além da intensidade de infecção, outros fatores como idade, estado nutricional, aspectos genéticos e tipo de resposta imune desencadeada durante a doença, poderiam estar influenciando a progressão para formas mais graves da esquistossomose (Malaquias *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997; Martins-Filho *et al.*, 1997; Degu *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2002;

Caldas *et al.*, 2000; Naus *et al.*, 2003). É importante considerar ainda que na esquistossomose mansoni humana, o papel da resposta imune do tipo 1 e 2 durante a infecção permanece ainda controverso (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998; Booth *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2004). Nesse contexto, o estudo da expressão de marcadores de superfície celular, citocinas intracitoplasmáticas e outros elementos do sistema imune serão de grande valia para identificação de componentes imunes celulares envolvidos no desenvolvimento dos mecanismos imunopatológicos evidenciados durante a doença.

Além disso, as informações disponíveis sobre os complexos mecanismos imunes que participam do desencadeamento de fenômenos imunopatológicos na esquistossomose, incluindo-se tipo de resposta celular, citocinas, fatores quimiotáticos e de adesão celular são derivados, em sua maioria, de modelos murinos. Embora uma parte considerável do conhecimento atual das bases imunológicas de muitos processos infecciosos tenha sido elucidada, inicialmente, através de modelos murinos, têm-se observado diferenças marcantes nos fenômenos imunológicos presentes durante a infecção esquistossomótica em modelos animais e no homem (Fallon, 2000). Ainda é escassa a literatura sobre os mecanismos imunes humanos, relacionados ao desenvolvimento da patologia esquistossomótica.

Além disso, o estudo aqui proposto, no qual se pretende analisar a resposta imune antes e após o tratamento quimioterápico específico, o torna extremamente importante diante de evidências que sugerem a redução da fibrose após tratamento. O tipo de abordagem proposta certamente contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no desencadeamento da doença, na sua progressão e regressão. Além disso, considerando-se a necessidade de se ampliar a compreensão dos fenômenos imunopatológicos na esquistossomose mansoni humana, este trabalho constitui ferramenta importante para estabelecer proposições futuras, visando o controle da patologia em indivíduos infectados.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Associar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos com o grau de fibrose e intensidade de infecção (carga parasitária) antes e dois anos após tratamento com praziquantel.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Ø Avaliar a intensidade de infecção dos indivíduos portadores de esquistossomose residentes em área endêmica pelo método Kato-Katz
- Ø Determinar o grau de fibrose periportal por ultra-sonografia.
- Ø Analisar o perfil de citocinas IFN-gama, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 e IL-12 produzidos por linfócitos em resposta aos antígenos solúveis de ovo (SEA) e de verme adulto (SWAP).
- Ø Verificar a relação entre a produção de citocinas e grau de fibrose.

## 4 METODOLOGIA

O estudo descrito neste trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (Instituto René Rachou) e da UNIVALE. O consentimento escrito dos pacientes, parentes ou responsáveis foi indispensável para que os mesmos participassem do estudo. Todos os indivíduos podiam se retirar do estudo quando desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico e tratamento terapêutico.

### 4.1 Caracterização da população

Oitenta e três indivíduos foram selecionados entre os residentes de Caju (município de Ponto dos Volantes, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais). A esquistossomose é endêmica nesta área e outros parasitas intestinais, tais como: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, e espécies de *Ancylostoma* e *Entamoeba* foram encontrados na população. Cada indivíduo foi submetido a repetidos exames de fezes usando o método Kato Katz (Katz et al. 1972) e teve seu grau de fibrose determinado por ultrassom. Os exames ultrassonográficos 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. O praziquantel na dose de 50 mg/Kg foi administrado a todos os indivíduos cujo exame revelou a presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes. Todos os procedimentos foram repetidos dois anos após o tratamento. As análises de fenotipagem das células do sangue periférico foram realizadas numa amostra de 19 voluntários, que puderam ser acompanhados em um estudo longitudinal. A tabela 1 mostra a caracterização destes indivíduos segundo idade, intensidade de infecção, presença de fibrose e sexo antes e dois anos após o tratamento. Os critérios de inclusão foram: idade compreendida entre 10 e 65 anos, residência na área durante 48 meses, sem histórico de uso de anti-helmíntico nos últimos dois anos, conclusão dos exames propostos. Os critérios de exclusão foram: gravidez definida por exames laboratoriais; qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos; anemia significativa, definida como hemoglobina menor que 10g/dl (Stolzfus & Dreyfuss, 1998).

**Tabela 1:** Caracterização da amostra estudada em relação à idade, intensidade da infecção pelo *S. mansoni*, fibrose e sexo, antes e dois anos após o tratamento com praziquantel.

Tratamento	N	Idade*	OPG*	Pos	Neg	FIB	Sexo	
				(n)	(n)	(+)	Masc	Fem
<b>Antes</b>	19	37 ± 16	99,6 ± 109,8	18	01	13	08	11
<b>Após</b>	19	39 ± 16	36,0 ± 8,49	02	17	10		

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

#### 4.2 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). Os exames são rotineiramente realizados pelos técnicos do Núcleo de pesquisa em Imunologia da UNIVALE, em Governador Valadares.

#### 4.3 Exame ultrassonográfico

Os pacientes foram submetidos à ultrassonografia abdominal usando um aparelho portátil HITACHI EUB-200. Dos indivíduos que atenderam ao convite para o exame de ultrassom, foram excluídos os menores de 06 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.

O impacto da quimioterapia sobre a fibrose periportal foi avaliado dois anos após o tratamento. As alterações no grau de fibrose são mostradas na tabela 2, e podem ser resumidas como se segue: dos três indivíduos com fibrose grau 2, todos reverteram a fibrose para grau 1; dos dez indivíduos com fibrose grau 1, três reverteram para grau 0 e sete permaneceram com



grau 1; dos seis indivíduos com fibrose grau 0, todos permaneceram com o mesmo grau de fibrose. Pode-se observar uma total reversão da fibrose moderada ou grau 2 (0/3, 100%), uma leve redução da fibrose incipiente (3/10, 30%) e conseqüentemente, um pequeno aumento no número de indivíduos sem fibrose (6/9, 37,5%).

**Tabela 2:** Transições do grau de fibrose dos 19 indivíduos residentes em Caju, dois anos após o tratamento com praziquantel.

		eco 2			
		0	1	2	Total
eco 1	0	6	0	0	6
	1	3	7	0	10
	2	0	3	0	3
	Total	9	10	0	19

eco 1 = ecogenicidade periportal antes do tratamento;  
eco 2 = ecogenicidade periportal dois anos após tratamento

#### 4.4 Preparação de antígenos

Os antígenos solúveis do parasito foram preparados segundo método descrito por Gazzinelli *et al.* (1983). Os vermes adultos e ovos foram coletados de camundongos albinos swiss infectados com cercárias da cepa LE do *S. mansoni* após seis semanas de infecção. Vermes adultos ou ovos foram triturados em salina 1,7% utilizando-se um homogeneizador com pistão de teflon (Potter). O homogenato resultante foi centrifugado a 50.000g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra 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) e de vermes adultos (SWAP) foi determinada usando-se kit de BCA (Pierce, IL). As soluções antigênicas foram alíquotadas e conservadas à -70°C, para uso posterior nos ensaios de estimulação antigênica.

#### **4.5 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico, após estimulação breve in vitro**

Alíquotas de 500 µl de sangue periférico coletados à vácuo em tubos de 10mL contendo Heparina sódica (Vacutainer – BD, E.U.A.), foram adicionadas à quatro tubos de polipropileno de 5mL (Falcon – BD, E.U.A.), contendo 500µL de RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A.). Ao tubo 1 foi adicionado apenas meio de cultura, recebendo a denominação de cultura controle (CC). Ao tubo 2 foi adicionado SEA, apresentando uma concentração final de 25 µg/mL. Ao terceiro tubo foi adicionado SWAP, apresentando uma concentração final de 25 µg/mL. Ao quarto tubo foi adicionado 25 µL do éster de forbol PMA (acetato mirístico de forbol – SIGMA, E.U.A.), a partir de uma solução estoque de 1mg/mL diluída 1/1000 em RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A.), concentração final de 25 ng/mL. O PMA sendo um estimulador inespecífico da resposta imune foi utilizado como controle de produção potencial de citocinas pelas células. A esse tubo foi adicionado também 1µL de Ionomicina (SIGMA, E.U.A.), 1mg/mL (concentração final de 1 µg/mL). A ionomicina mantém os níveis de cálcio intracelular altos, possibilitando um aumento na sensibilidade de detecção das citocinas. Os tubos de culturas 2 e 3 foram previamente incubados durante uma hora com SEA e SWAP, respectivamente, em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific E.U.A.). Em seguida, foi adicionado aos quatro tubos de cultura 10µL de Brefeldina A (SIGMA, E.U.A.), 1mg/mL (concentração final de 10 µg/mL). A utilização da Brefeldina A permite a retenção das citocinas no complexo de Golgi. As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C em ambiente úmido. Após a incubação, 100µL de EDTA (SIGMA, E.U.A.) 20mM, obtidos de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM) foram adicionados diretamente às culturas. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Em seguida, as hemácias foram lisadas e os leucócitos fixados em 4mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – BD, E.U.A.) por dez minutos à temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 400g por dez minutos a 18 °C, posteriormente, lavadas com 4 mL de tampão fosfato salino (PBS-W 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de albumina sérica bovina-BSA e 0,1% de azida sódica - SIGMA, E.U.A.) e permeabilizadas com 6mL de tampão fosfato salino contendo saponina (PBS-P 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina - SIGMA, E.U.A.) por dez minutos à temperatura ambiente. A suspensão celular foi

centrifugada à 400g, por dez minutos à 18 °C, quando novamente foi lavada com PBS-W. Posteriormente, 25µL das células permeabilizadas foram incubadas com 20µL do anticorpo anti-citocina (Tabela 3) marcado com PE, previamente diluído em PBS-P. As amostras foram incubadas durante trinta minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. A reação foi conduzida em placas de 96 poços de fundo U (Falcon – BD, E.U.A.). Todo o protocolo foi realizado em condições estéreis, em capelo de fluxo laminar. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 150µL de PBS-P e, em seguida, com 200µL de PBS-W. No final, foram adicionados 200µL de solução fixadora MFF (Max Facs Fix). As amostras contendo a suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos de 500µL (Thomas Laboratory Specialities, E.U.A.) e, posteriormente, utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACScan - BD, E.U.A.).

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados para detecção de citocinas em linfócitos do sangue periférico.

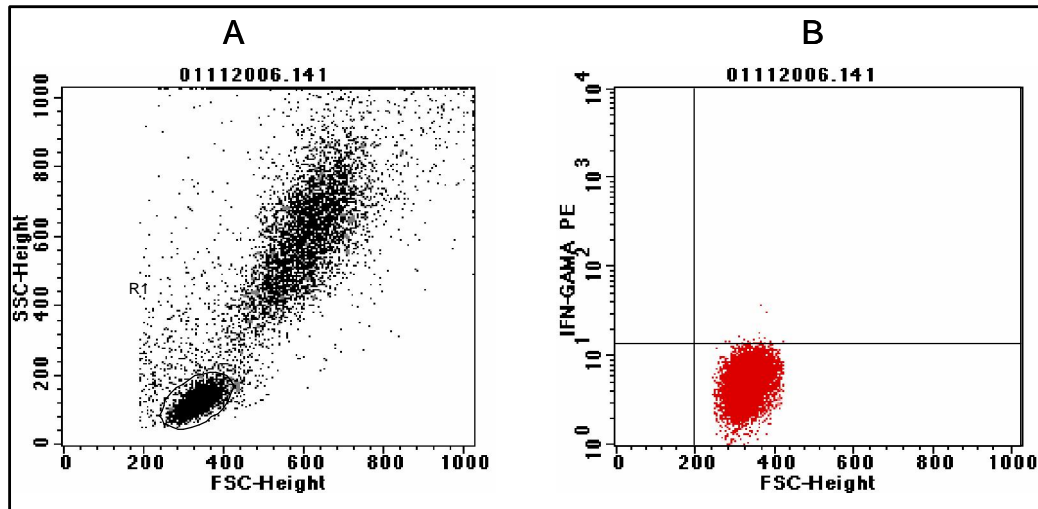
<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Concentração</b>
Anti- IL-12 - PE	C11.5.14	0,25 µg
Anti- IL- IFN-gama - PE	B27	0,25 µg
Anti- IL-TNF-alfa - PE	Mab11	0,25 µg
Anti- IL-8 - PE	AS14	0,25 µg
Anti- IL-4 - PE	MP4-25D2	0,25 µg
Anti- IL-5 - PE	TRFK5	0,25 µg
Anti- IL-10 - PE	JES3-9D7	0,25 µg

#### **4.6 Aquisição e análise de citocinas intracelulares de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo**

A imunofenotipagem celular foi avaliada em citômetro de fluxo (FACScan – Benton Dickinson, E.U.A.). Para aquisição e análise dos resultados foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest. Foram coletados 30.000 eventos para a análise após estimulação breve *in vitro*.

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor do porcentual de citocinas intracitoplasmáticas foi realizada através de um sistema de computador acoplado ao citômetro. A Figura 1 representa de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. O primeiro passo (Figura 1A) consistiu na identificação da população de linfócitos (E) selecionada por uma janela – “gate” (R1), através da construção de gráficos de distribuição pontual de autofluorescência, onde foi construído

um gráfico de tamanho celular (Fowar Scatter –FSC) versus granulosidade (Side Scatter – SSC). A figura 1B ilustra a detecção da citocina INF- na população de linfócitos no quadrante duplo positivo (Q2), em gráfico de tamanho (FSC) versus FL2 (INF- – PE).



**Figura 1:** Análise de linfócitos do sangue periférico de um indivíduo por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos, selecionada no “gate” R1 em gráfico de tamanho (FSC) em função de granulosidade (SSC), após cultivo celular. (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos positivos para INF- no quadrante duplo positivo (Q2), em gráfico de tamanho (FSC) versus FL2 (INF- – PE).

#### 4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados e analisados pelo programa GraphPad PRISM versão 5. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de  $p < 0,05$ . Os resultados foram analisados através dos testes não paramétricos de Wilcoxon e de Mann-Whitney, para grupos pareados e não-pareados, respectivamente. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para análises de variáveis categóricas. As correlações entre as variáveis foram realizadas através da correlação de Spearman.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Relação entre idade, intensidade de infecção e sexo com fibrose periportal

A relação entre intensidade de infecção e idade foi analisada na amostra de 19 indivíduos antes e dois anos após o tratamento. Esses indivíduos foram distribuídos em dois grupos de acordo com as alterações visíveis aos exames da veia porta. Antes do tratamento, o grupo sem fibrose continha seis 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 com fibrose reuniu treze indivíduos, dos quais, dez apresentaram medidas de espessamento da veia porta entre 3-5 mm, fibrose considerada incipiente, grau 1 e três indivíduos tinham fibrose moderada apresentando espessura da veia porta entre 6-7 mm, grau 2. Dois anos após o tratamento, usando os parâmetros descritos acima, a amostra compreendia: 09 indivíduos sem fibrose e 10 indivíduos com fibrose incipiente, grau 1.

Informações referentes à idade, intensidade de infecção e sexo, antes e após tratamento, relacionadas aos dois grupos são apresentadas na Tabela 4. Nossos resultados demonstram que, não houve diferença significativa no que se refere à idade entre os grupos antes e após o tratamento, contudo, a intensidade de infecção estava inversamente correlacionada com a idade ( $n=19$ ,  $r=-0,473$ ,  $p=0,041$ ). Com relação à intensidade de infecção não houve diferença entre os grupos com e sem fibrose antes e após o tratamento. Comparando-se a intensidade de infecção entre os grupos com fibrose antes e após o tratamento observa-se uma redução significativa no número de ovos ( $p=0,0008$ ).

**Tabela 4:** Idade, intensidade de infecção e sexo dos indivíduos agrupados pela presença de fibrose periportal, antes e dois anos após o tratamento.

	ANTES		DEPOIS	
	SF	CF	SF	CF
Número de pacientes	06	13	09	10
Idade (média ± DP)	30 ± 12	38 ± 17	33 ± 15	44 ± 15
Variação de idade	15 - 45	15 - 62	16 - 56	18 - 63
opg* (média ± DP)	66,0 ± 66,9	112,6 ± 122,2	0	36,0 ± 8,5
Variação opg*	0-180	8 - 360	0	30-42
ovos+/ovos-	5/1	13/0	0/9	2/8
masculino/feminino	1/5	7/6	3/6	5/5

\*opg = média aritmética do número de ovos por grama de fezes ± desvio padrão; diferença entre os grupos ( $p=0,0008$ ). \*Nível de significância baseado no teste de Mann-Whitney.

## 5.2 Avaliação do perfil leucocitário dos indivíduos incluídos no estudo, antes e dois anos após o tratamento

A população leucocitária do sangue periférico dos dezenove indivíduos foi caracterizada por meio da realização do hemograma, antes e após o tratamento. A Tabela 5 mostra que somente os monócitos diminuíram significativamente após o tratamento ( $p=0,0313$ ) em comparação aos valores referentes ao período anterior ao tratamento.

**Tabela 5:** Perfil hematológico de leucócitos do sangue periférico dos 19 indivíduos antes e dois anos após tratamento com praziquantel.

	Antes do tratamento	Depois do tratamento
Global leucocitária ( $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ )	$7,89 \pm 3,01$	$7,00 \pm 1,94$
Linfócito absoluto ( $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ )	$2,62 \pm 0,92$	$2,68 \pm 0,62$
Monócito absoluto ( $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ )	$208 \pm 136,2^a$	$149 \pm 94,6^a$
Neutrófilo absoluto ( $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ )	$4,63 \pm 2,04$	$3,79 \pm 1,28$
Eosinófilo absoluto ( $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ )	$372,2 \pm 476,2$	$368,3 \pm 274,9$

Os valores estão expressos em média  $\pm$  SD dos grupos de indivíduos. A letra a representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois períodos, baseada no teste de Wilcoxon.

## 5.3 Avaliação da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos após breve incubação in vitro com antígenos derivados do *S. mansoni*

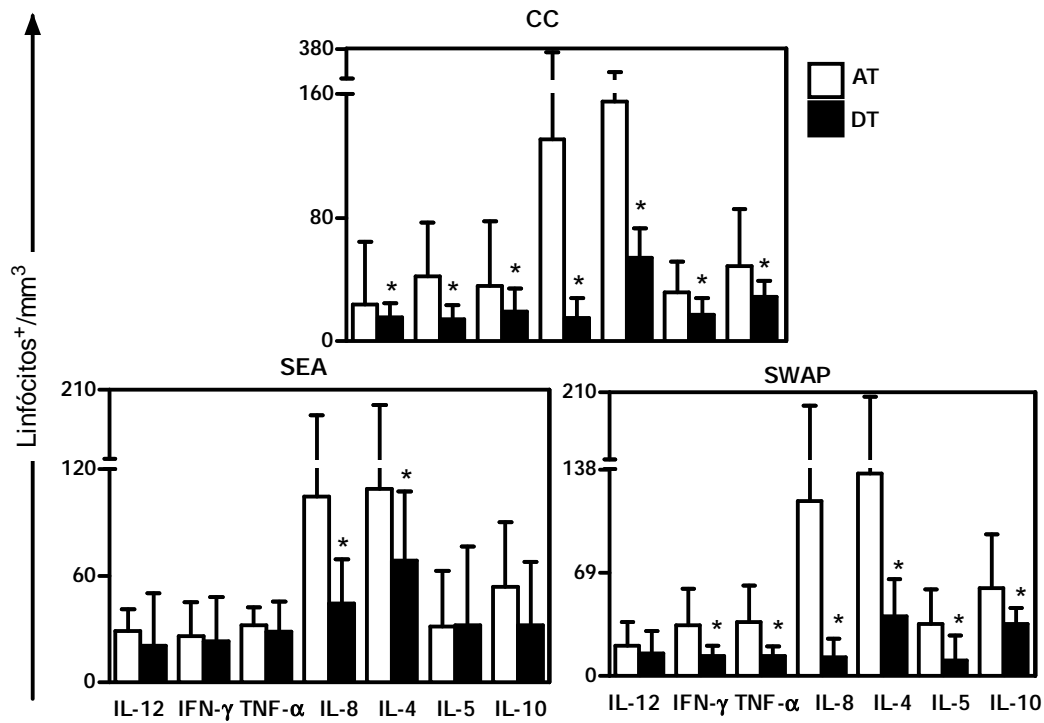
Essas análises foram direcionadas para investigar os fatores imunológicos associados à patogênese da esquistossomose, bem como o efeito da quimioterapia na produção de citocinas dos dezenove indivíduos da amostra em estudo. Numa primeira abordagem, avaliou-se o impacto do tratamento em todo o grupo, independente da intensidade de infecção e da presença de fibrose. Num segundo momento, os indivíduos foram distribuídos de acordo com a intensidade de infecção, um grupo formado pelos indivíduos com número de ovos inferior a 100 ovos por grama de fezes ( $\text{opg} < 100$ ), e outro, com número de ovos maior ou igual a 100 ( $\text{opg} \geq 100$ ). Finalmente, os indivíduos foram agrupados pela presença (CF) ou ausência (SF) de fibrose. A expressão das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 em linfócitos do sangue periférico foi comparada entre os grupos antes e após o tratamento. Essa abordagem foi realizada considerando o valor médio absoluto de linfócitos/ $\text{mm}^3$  para as

moléculas avaliadas, após incubação durante cinco horas, na ausência (CC = Controle) ou presença de antígenos solúveis de ovo (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP). Avaliamos ainda o impacto da estimulação antígeno-específica na expressão das citocinas através da razão entre os diferentes estímulos antigênicos (SEA ou SWAP) e as culturas controle (CC).

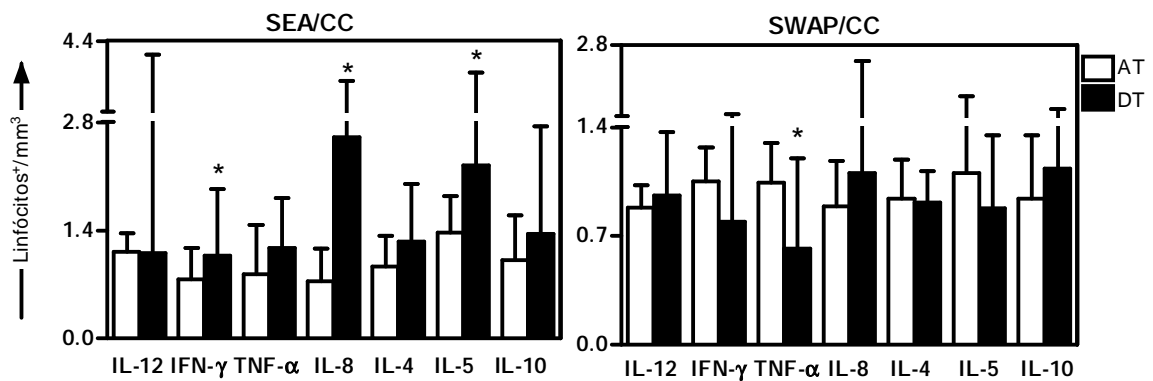
### **5.3.1 Efeito do tratamento na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos incluídos na amostra.**

A figura 2 mostra o impacto do tratamento no grupo de 19 indivíduos que realizaram exame de sangue. De uma forma geral observa-se que o tratamento diminuiu a produção de todas as citocinas avaliadas nas culturas sem estímulo e estimuladas com SWAP. Por outro lado, nas culturas estimuladas com SEA, a expressão das citocinas foi pouco afetada pelo tratamento. Nas culturas controle (CC) observa-se a diminuição do número de linfócitos IL-12+ ( $p=0,0187$ ), IFN- + ( $p=0,0121$ ), TNF- + ( $p=0,0115$ ), IL-8+ ( $p=0,0002$ ), IL-4+ ( $p=0,0017$ ), IL-5+ ( $p=0,0451$ ) e IL-10+ ( $p=0,0035$ ). Nas culturas estimuladas por SEA, apenas os linfócitos IL-8+ ( $p=0,0017$ ) e os IL-4+ ( $p=0,0294$ ) diminuíram significativamente dois anos após o tratamento. Já nas culturas estimuladas com SWAP, somente a produção de IL-12 ( $p=0,1387$ ) não foi afetada, observando-se uma redução do número de linfócitos IFN- + ( $p=0,0031$ ), TNF- + ( $p=0,0009$ ), IL-8+ ( $p=0,0002$ ), IL-4+ ( $p=0,0026$ ), IL-5+ ( $p=0,0084$ ) e IL-10+ ( $p=0,0162$ ).

O efeito da estimulação antígeno-específica na expressão intracitoplasmática das citocinas IL-12, IFN- , TNF- , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos do sangue periférico dos indivíduos, antes (AT) e depois do tratamento (DT), foi analisado através da razão entre os diferentes estímulos antigênicos (SEA e SWAP) e as culturas controle (CC). A figura 3 mostra um aumento na expressão de linfócitos IFN- + ( $p=0,0280$ ), IL-8+ ( $p=0,0009$ ) e IL-5+ ( $p=0,0214$ ) nas culturas estimuladas por SEA após o tratamento. Enquanto nas culturas estimuladas por SWAP observa-se uma diminuição no número de linfócitos TNF- + ( $p=0,0468$ ).



**Figura 2:** Impacto do tratamento na expressão de citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), antes do tratamento (barras brancas) e após o tratamento (barras pretas). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) e na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados das citocinas avaliadas nos linfócitos estão expressos como medianas do valor absoluto de linfócitos +/mm<sup>3</sup>. Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando p < 0,05.

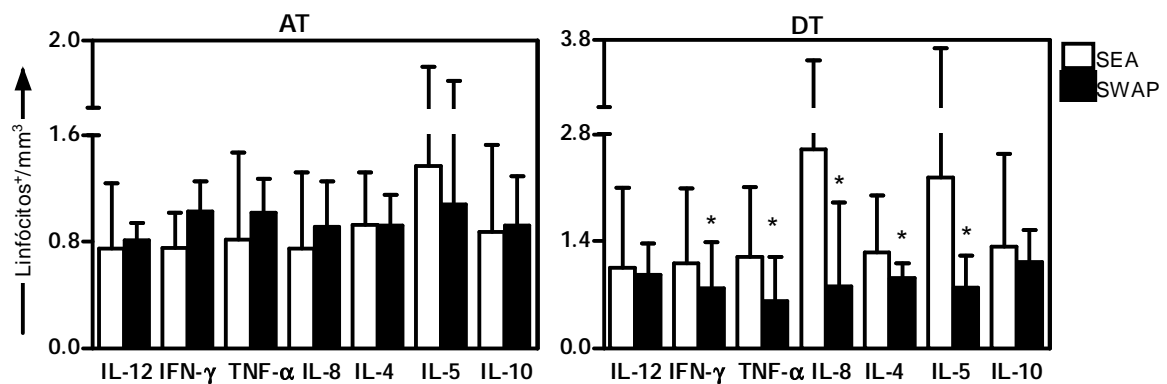


**Figura 3:** Expressão das citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), antes do tratamento (barras brancas) e após o tratamento (barras pretas). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) e na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando p < 0,05.



### 5.3.2 Comparação entre a expressão de citocinas pelos linfócitos estimulados por diferentes antígenos de *S. mansoni*, antes e dois anos após o tratamento.

Embora antes do tratamento não tenha sido observada diferença significativa na expressão de citocinas pelos linfócitos entre os estímulos específicos SEA/CC e SWAP/CC (Fig. 4); após o tratamento, encontrou-se um aumento no número de linfócitos IFN- $\gamma$  + ( $p=0,0015$ ), TNF- $\alpha$  + ( $p=0,0105$ ), IL-8+ ( $p=0,0043$ ), IL-4+ ( $p=0,0105$ ), IL-5+ ( $p=0,0004$ ) nas culturas estimuladas por SEA, quando comparadas às culturas SWAP.



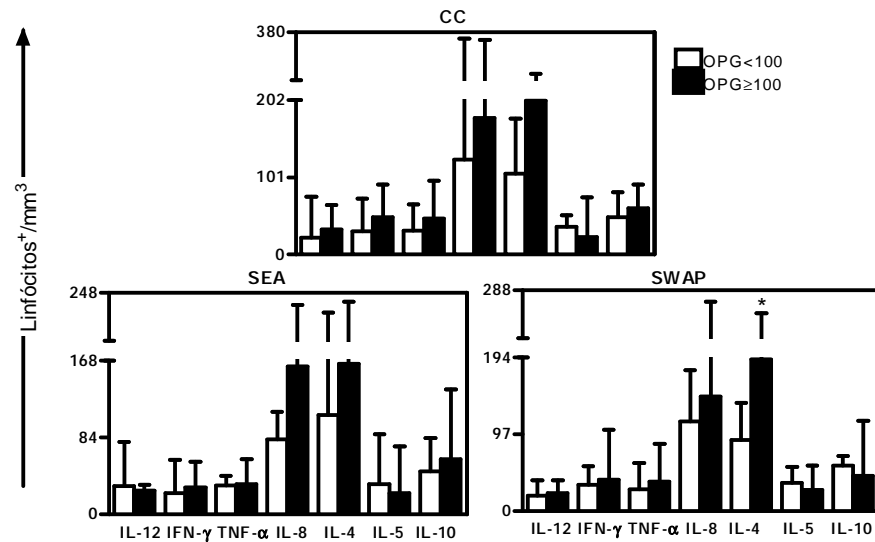
**Figura 4:** Comparação da expressão das citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-8, IL-4, IL-5, IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos (n=19), após estimulação específica por SEA (barras brancas) ou SWAP (barras pretas) antes (AT) e depois do tratamento (DT). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) e na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados das citocinas avaliadas nos linfócitos estão expressos como medianas do valor absoluto de linfócitos +/mm<sup>3</sup>. Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .

### 5.3.3 Análise da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela intensidade de infecção antes do tratamento.

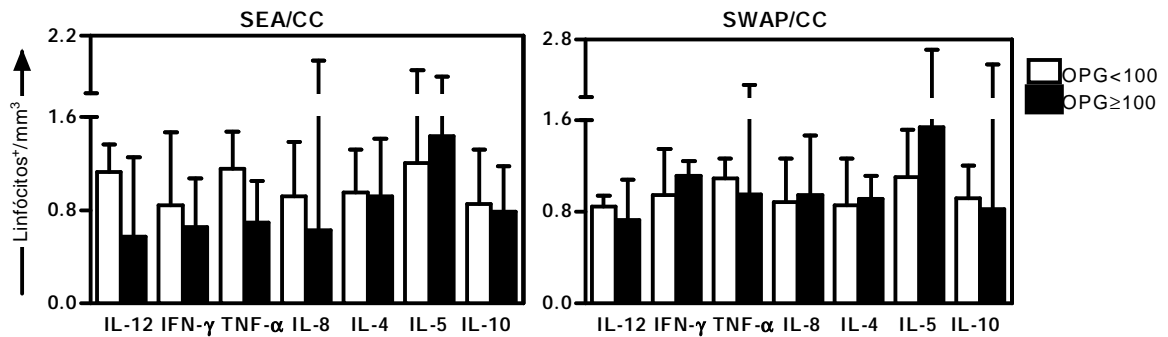
Considerando que a presença de vermes produzindo ovos pode modular a produção de citocinas tipo 1 e tipo 2, avaliamos a resposta celular dos indivíduos categorizados em  $opg < 100$  (indivíduos com número de ovos inferior a 100 ovos por grama de fezes) e  $opg \geq 100$  (indivíduos com número de ovos maior ou igual a 100) antes do tratamento. A figura 5 mostra que no grupo com alta intensidade de infecção ( $opg \geq 100$ ) houve uma maior expressão de linfócitos IL-4+ ( $p=0,0190$ ) nas culturas estimuladas com SWAP quando comparado com o grupo com baixa intensidade de infecção. Na comparação entre os grupos, avaliando agora a

estimulação específica (SEA/CC ou SWAP/CC) não foi encontrada nenhuma diferença significativa na expressão de citocinas pelos linfócitos estimulados por SEA ou SWAP (Figura 6).

Após o tratamento, não foi possível agrupar os indivíduos pela intensidade de infecção porque, entre os dezoito, somente dois deles estavam infectados .



**Figura 5:** Expressão de citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com baixa (n=12) intensidade de infecção (opg<100 - barras brancas), e de indivíduos (n=06) com alta intensidade de infecção (opg ≥ 100 - barras pretas) antes do tratamento. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados das citocinas avaliadas nos linfócitos estão expressos como medianas do valor absoluto de linfócitos +/mm<sup>3</sup>. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando p < 0,05.

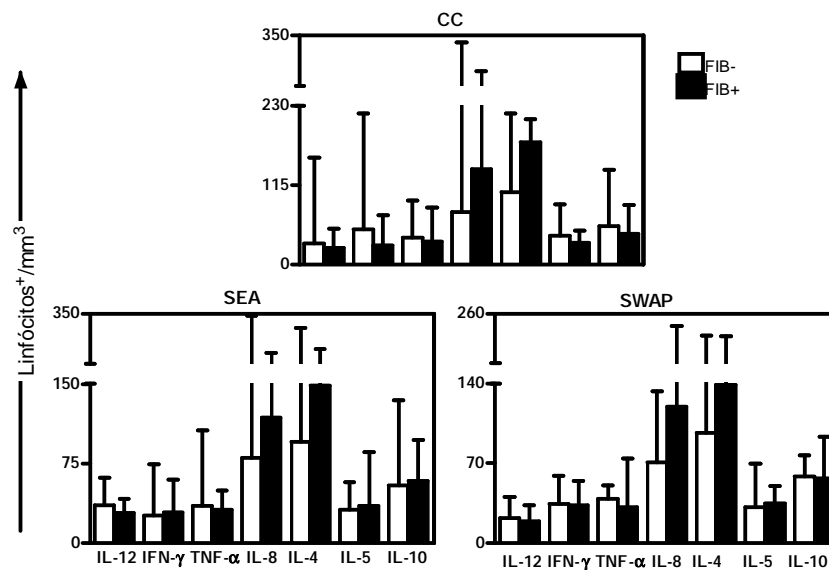


**Figura 6:** Expressão de citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com baixa (n=12) intensidade de infecção (opg<100 - barras brancas), e de indivíduos (n=06) com alta intensidade de infecção (opg ≥ 100 - barras pretas), avaliando estimulação específica, antes do tratamento. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando p < 0,05.

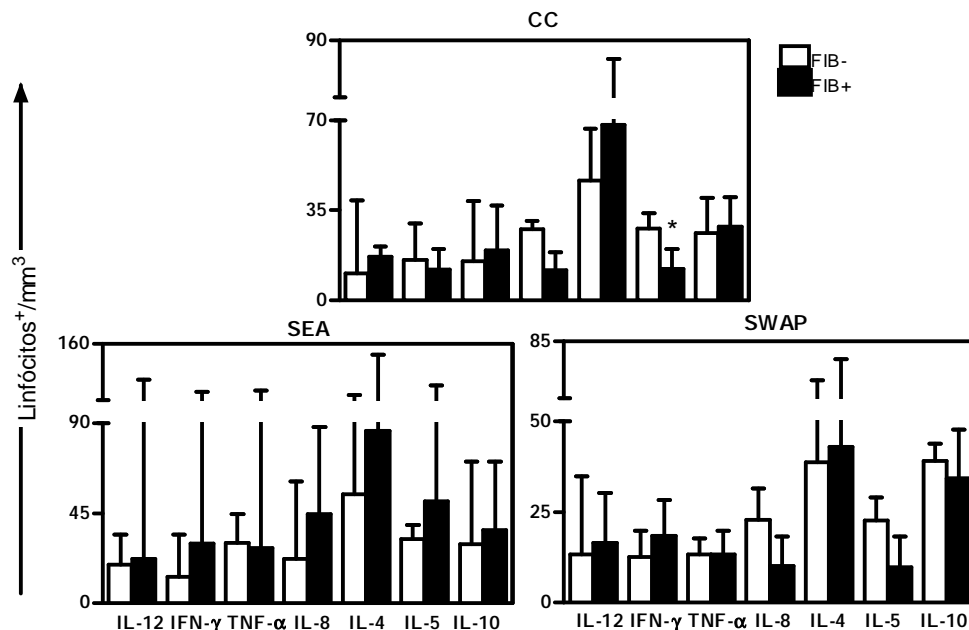
### 5.3.4 Análise da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados de acordo com a presença de fibrose antes e dois anos depois do tratamento.

Dados da literatura mostram que a fibrose periportal, que afeta de 5 a 10% de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, tem como causa o granuloma dependente de células T que se desenvolve ao redor dos ovos. Modelos experimentais de infecção tem mostrado que o granuloma e a fibrose são regulados por citocinas. Na avaliação da expressão de citocinas por linfócitos, antes e dois anos após o tratamento, os indivíduos foram categorizados pela presença de fibrose. Antes do tratamento, o grupo sem fibrose era formado por seis indivíduos e o grupo com fibrose continha 13 indivíduos, dez deles portadores de fibrose incipiente e três de fibrose moderada. Após o tratamento, nove indivíduos compunham o grupo sem fibrose, e dez, o grupo com fibrose, todos eles com fibrose incipiente ou do grau 1.

Antes do tratamento não foi observada nenhuma diferença significativa na produção das citocinas Th1 ou Th2 pelos indivíduos com e sem fibrose (Figura 7). No entanto, após o tratamento, os indivíduos com fibrose mostraram um número significativamente menor de linfócitos expressando IL-5 ( $p=0,0315$ ) na cultura controle (Figura 8).



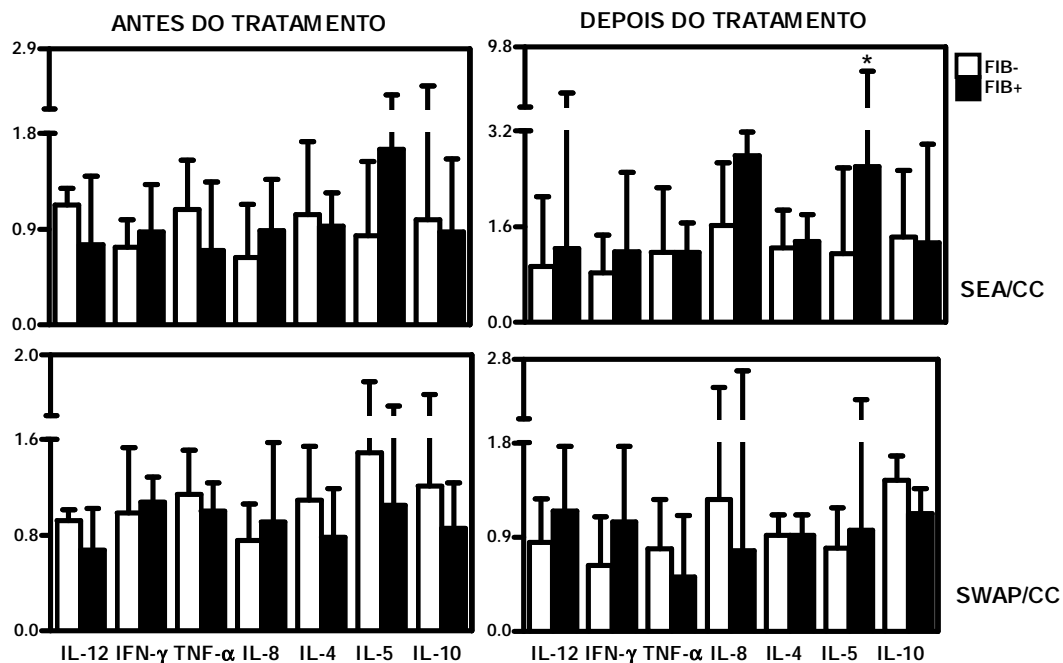
**Figura 7:** Expressão de citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose, antes do tratamento. A produção das citocinas por linfócitos está expressa como mediana do valor absoluto de linfócitos  $+/\text{mm}^3$  de seis indivíduos sem fibrose (barras brancas) e de treze indivíduos com fibrose (barras pretas). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .



**Figura 8:** Expressão de citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose após o tratamento. A produção das citocinas por linfócitos está expressa como mediana do valor absoluto de linfócitos  $+/\text{mm}^3$  de nove indivíduos sem fibrose (barras brancas) e de dez indivíduos com fibrose (barras pretas). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .

### 5.3.5 Efeito da estimulação antígeno-específica na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela presença de fibrose, antes e dois anos após o tratamento.

O efeito da estimulação antígeno-específica na expressão intracitoplasmática das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos do sangue periférico dos grupos com e sem fibrose, antes (AT) e depois do tratamento (DT), foi analisado através da razão entre os diferentes estímulos antigênicos (SEA e SWAP) e as culturas controle (CC). A análise da produção de citocinas estimuladas por SWAP, antes ou após o tratamento, não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos. Entretanto, nas culturas estimuladas por SEA, observamos um aumento no número de linfócitos IL-5+ ( $p=0,0244$ ) no grupo que persistiu com fibrose dois anos após o tratamento (Figura 9).

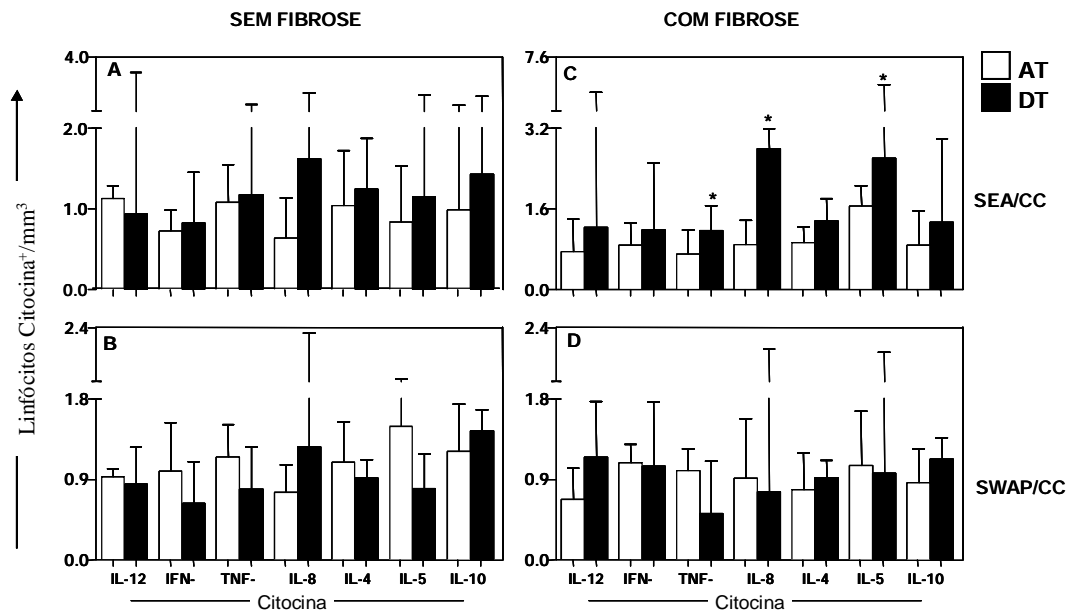


**Figura 9:** Impacto da estimulação antígeno-específica sobre o perfil de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-5 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose antes (AT) e após (DT) o tratamento. As barras brancas mostram indivíduos sem fibrose (AT=06 e DT=09) e as barras pretas mostram indivíduos com fibrose (AT=13 e DT=10). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados das citocinas/quimiocina avaliadas nos linfócitos estão expressos como medianas do valor absoluto de linfócitos +/mm<sup>3</sup>. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os períodos AT e DT estão representadas por asteriscos. "Mann Whitney test"

### 5.3.6 Efeito do tratamento na expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos agrupados pela presença de fibrose.

O efeito do tratamento na expressão intracitoplasmática das citocinas após a estimulação específica foi investigado comparando-se os indivíduos que não tinham fibrose antes do tratamento com os indivíduos que permaneceram sem fibrose ou tiveram sua fibrose regredida para grau zero após o tratamento. Após o tratamento, nenhuma alteração foi observada no perfil de citocinas induzidas por SEA ou por SWAP entre os indivíduos sem fibrose (Figura 10 A e B).

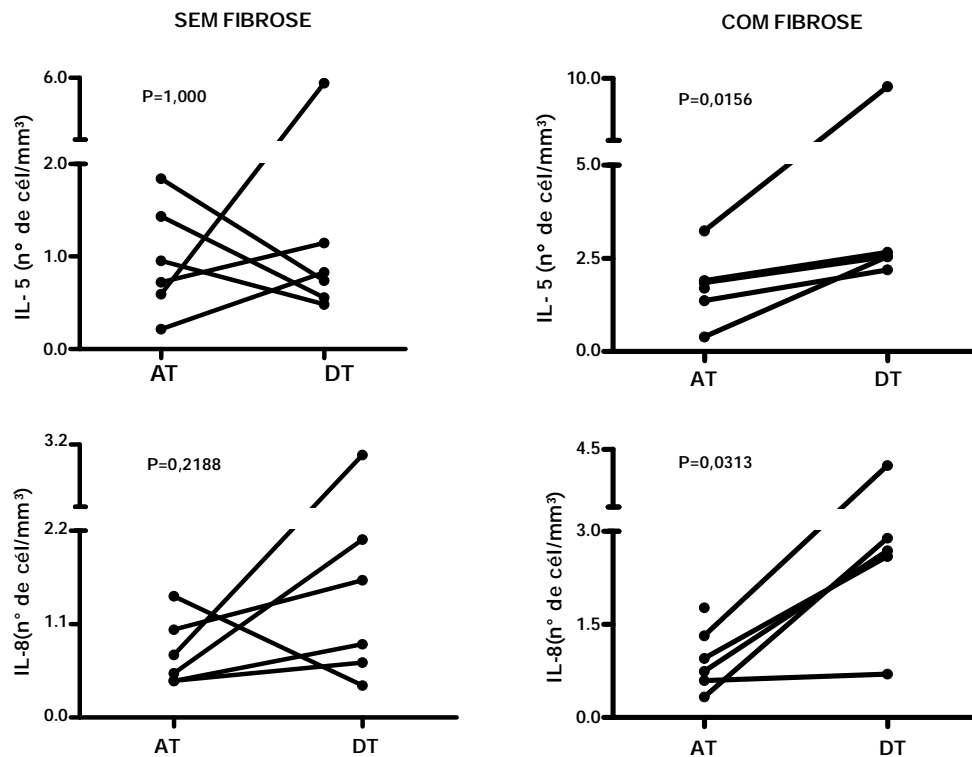
No entanto, a comparação da expressão de citocinas entre os indivíduos que tinham fibrose e persistiram com fibrose dois anos após o tratamento evidenciou um aumento significativo no número de linfócitos TNF- $\alpha$  (+ (p= 0,0409), IL-8+ (p= 0,0253), IL-5+ (p= 0,0097) para SEA (Figura 10 C).



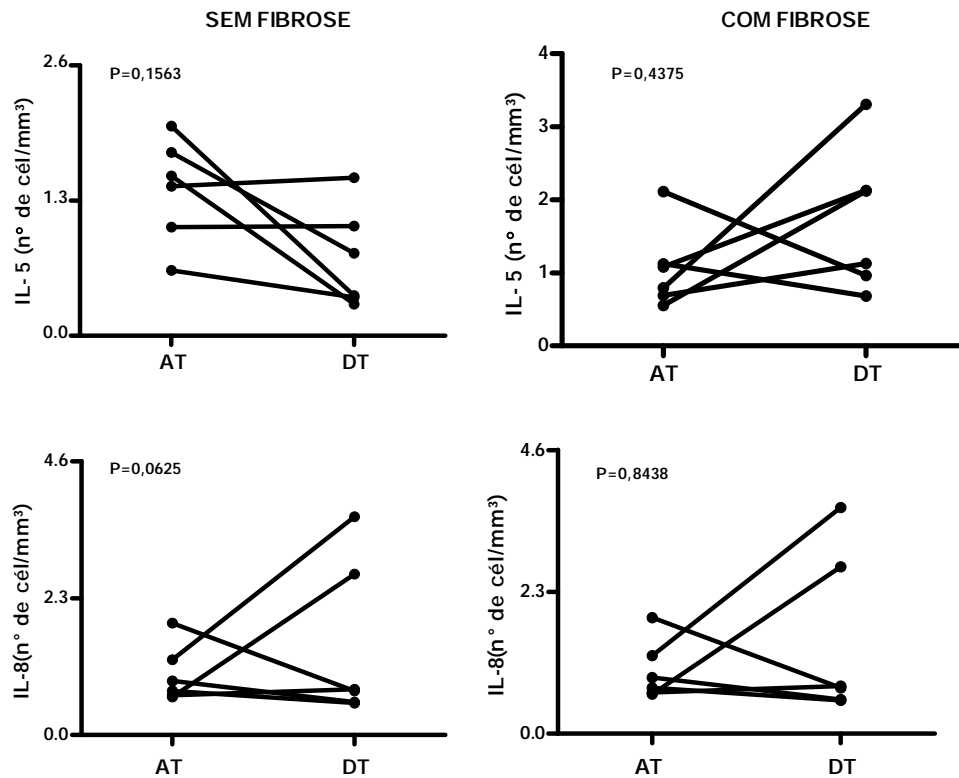
**Figura 10:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-12, IFN-g, TNF-a, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 por linfócitos do sangue periférico dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose. As barras brancas representam a mediana do valor absoluto de linfócitos  $\pm/\text{mm}^3$  antes do tratamento (AT) e as barras pretas, dois anos após o tratamento (DT). Os painéis A e B mostram os resultados do grupo sem fibrose (n=06 AT e n=09 DT) e, os painéis C e D do grupo com fibrose (n=13 AT e n=10 DT). Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .

### 5.3.7 Comparação da expressão de citocinas em linfócitos, antes e após tratamento, dos mesmos indivíduos, dentro dos grupos categorizados pela presença de fibrose periportal.

Para essa análise consideramos 12 indivíduos que permaneceram sem alteração do grau de fibrose dois anos após o tratamento. Esses indivíduos foram categorizados em dois grupos, seis foram reunidos no grupo sem fibrose e seis no grupo com fibrose. A figura 11 mostra que, somente nas culturas estimuladas por SEA, o tratamento induziu um aumento significativo no número de linfócitos IL-8+ ( $p=0,0313$ ) e IL-5+ ( $p=0,0156$ ) no grupo de indivíduos com fibrose persistente. A figura 12 mostra que, nas culturas estimuladas por SWAP, o tratamento não alterou a expressão das citocinas IL-5 e IL-8 pelos linfócitos dos indivíduos sem e com fibrose periportal.



**Figura 11:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-5 e IL-8 por linfócitos do sangue periférico dos mesmos indivíduos sem fibrose ( $n=06$ ) e aqueles que persistiram com fibrose ( $n=06$ ) após estímulo com SEA. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .



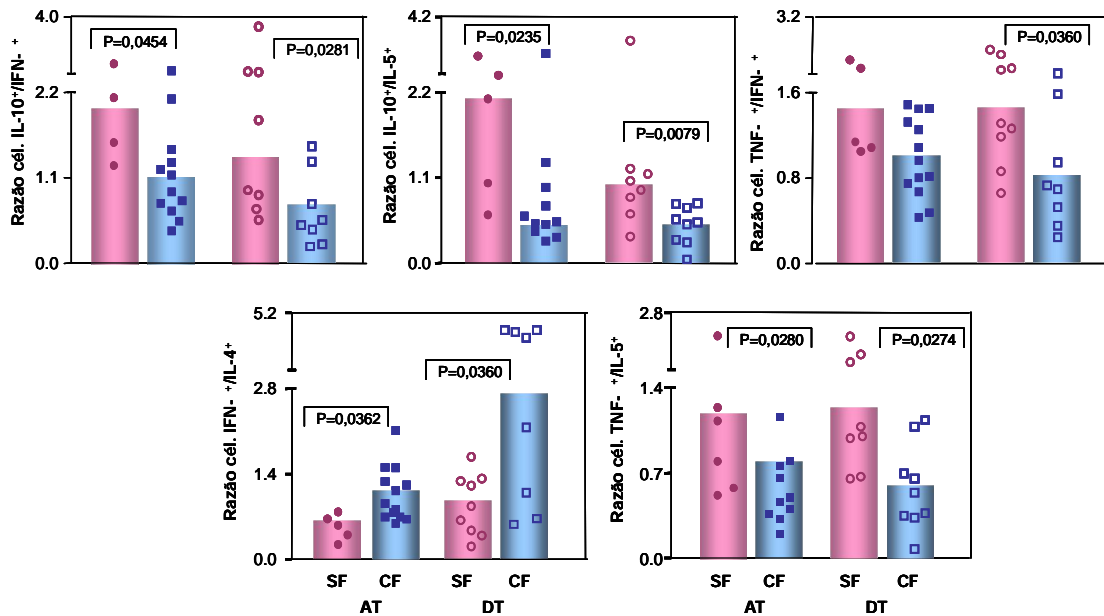
**Figura 12:** Efeito do tratamento na expressão das citocinas IL-5 e IL-8 por linfócitos do sangue periférico dos mesmos indivíduos sem fibrose (n=06) e aqueles que persistiram com fibrose (n=06) após estímulo com SWAP. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). Os resultados estão expressos pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Wilcoxon. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .

### 5.3.8 Razão entre o número de linfócitos, expressando diferentes citocinas, de indivíduos agrupados pela presença de fibrose antes e dois anos após o tratamento.

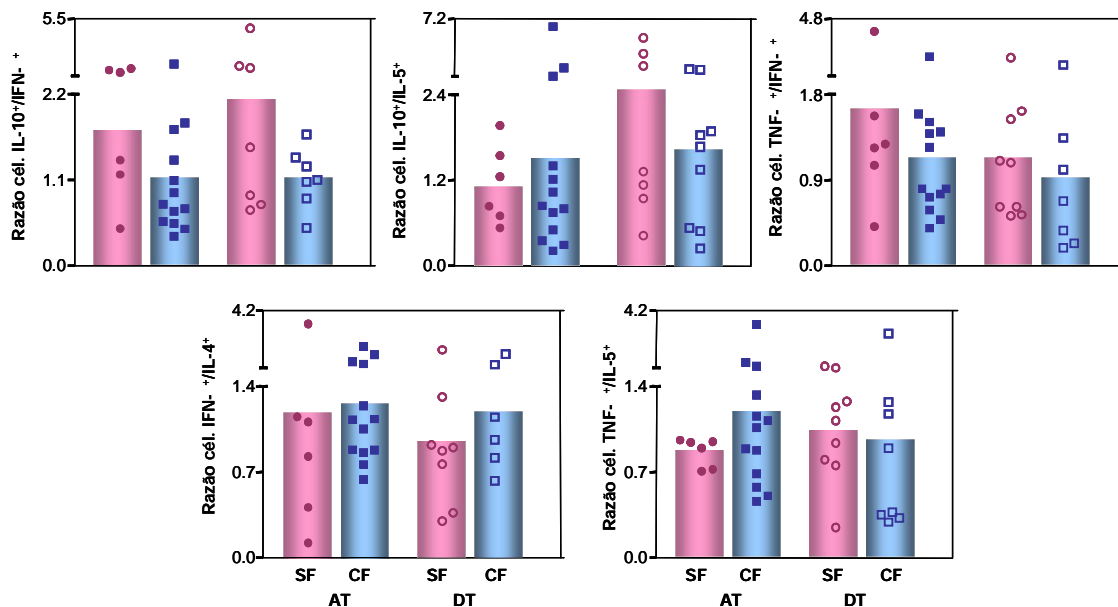
Parece haver um consenso na literatura mostrando que o desenvolvimento da morbidade durante a infecção resulta do desequilíbrio na expressão de citocinas tipo 1 ou tipo 2. Com o intuito de testar esta hipótese, nós avaliamos a razão entre o número de linfócitos  $IFN-^+$ ,  $TNF-^+$ ,  $IL-4^+$ ,  $IL-5^+$  e  $IL-10^+$  nos indivíduos agrupados pela presença de fibrose. Nesta análise, a expressão das citocinas após estímulo específico dos linfócitos foi calculada pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas por SEA ou SWAP e as culturas controle (Figuras 13 e 14, respectivamente). Comparando-se indivíduos com e sem fibrose, e avaliando o perfil modulatório observamos que no grupo com fibrose a razão entre o número de células  $IL-10^+$  e  $IFN-^+$  encontrava-se diminuída antes ( $p=0,0454$ ) e depois ( $p=0,0281$ ) do tratamento, apenas nas culturas estimuladas com SEA. Da mesma maneira,



nesse grupo a relação entre os linfócitos  $IL-10^+$  e  $IL-5^+$  estimulados por SEA estava diminuída antes ( $p=0,0235$ ) e após ( $p=0,0079$ ) a quimioterapia. A razão entre o número de linfócitos  $TNF^-$  e linfócitos  $IFN^-$  também foi investigada, considerando evidências experimentais sugerindo que na produção de fibrose o  $TNF^-$  estaria contrabalanceando um efeito protetor do  $IFN^-$ . Nossos dados mostram que esta razão estava diminuída no grupo com fibrose após o tratamento ( $p=0,0360$ ). A contribuição das citocinas Th1 e Th2 como fator determinante da fibrose periportal foi analisada através da razão entre o número de células  $IFN^-$  e  $IL-4^+$ , e os resultados mostraram um aumento nesta relação no grupo com fibrose, antes ( $p=0,0362$ ) e após ( $p=0,0464$ ) o tratamento, somente nas culturas estimuladas por SEA, sugerindo uma polarização para um perfil Th1. Investigamos ainda a razão entre o número de linfócitos  $TNF^+$  e  $IL-5^+$  numa tentativa de estabelecer a contribuição delas como citocinas pró-fibróticas, e encontramos esta razão diminuída no grupo com fibrose antes ( $p=0,0280$ ) e após ( $p=0,0274$ ) o tratamento, nas culturas estimuladas por SEA. A figura 12 compara a razão entre o número de linfócitos  $IFN^-$ ,  $TNF^-$ ,  $IL-4^+$ ,  $IL-5^+$  e  $IL-10^+$  entre os grupos com e sem fibrose após estímulo específico por SWAP, e nenhuma diferença significativa foi encontrada antes ou após o tratamento.



**Figura 13:** Razão entre número de linfócitos  $IFN^-$ ,  $TNF^-$ ,  $IL-4^+$ ,  $IL-5^+$  e  $IL-10^+$  estimulados por SEA, dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose. As barras representam a média da razão entre o número de linfócitos+/ $mm^3$  de indivíduos do grupo sem fibrose (barras laranjas) e do grupo com fibrose (barras verdes), antes (AT) e dois anos após (DT) o tratamento. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). O número de linfócitos+/ $mm^3$  para cada citocina foi calculado pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando  $p < 0,05$ .



**Figura 14:** Razão entre número de linfócitos IFN-<sup>+</sup>, TNF-<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> estimulados por SWAP, dos indivíduos categorizados pela presença de fibrose. As barras representam a média da razão entre o número de linfócitos+/mm<sup>3</sup> de indivíduos do grupo sem fibrose (barras laranjas) e do grupo com fibrose (barras verdes), antes (AT) e dois anos após (DT) o tratamento. Amostras de sangue total foram incubadas *in vitro* por 5 horas na ausência (CC) ou presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) ou antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) na presença de brefeldina A (BFA). O número de linfócitos+/mm<sup>3</sup> para cada citocina foi calculado pela razão entre os valores encontrados nas culturas estimuladas e as culturas controle. Os níveis de significância são baseados no teste de Mann Whitney. Valores significativos quando p < 0,05.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a quimioterapia contra a esquistossomose altera o padrão de citocinas produzidas por indivíduos residentes em área endêmica para a doença. 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; Mduluzza *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2006; Kihara *et al.*, 2007, Touré *et al.*, 2008). Não existe um claro consenso sobre o padrão de produção de citocinas e de regulação responsáveis pelo desenvolvimento da hepatoespleomegalia, caracterizada pela fibrose periportal e hipertensão portal, numa minoria de indivíduos expostos a focos de infecção. Alguns autores associaram a progressão da fibrose hepática com a produção persistente de citocinas tipo 2 (Cheever *et al.*, 2000), já que existem relatos da participação delas na proteção durante os estágios iniciais de infecção (de Jesus *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007; Talaat *et al.*, 2007). No entanto, de forma controversa outros estudos sugerem que a progressão da fibrose é caracterizada por um predominante perfil do tipo 1 (Henri *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004). 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).

A fibrose periportal detectada por ultrassonografia tem sido considerada o indicador-diagnóstico mais importante relacionado com a morbidade na esquistossomose humana (Doehring-Schwerdtfeger & Kardoff, 1995). A heterogeneidade na manifestação da doença observada na esquistossomose humana indica diferentes padrões de exposição e intensidade de infecção experimentados pelos seres humanos, além de tratamentos ocasionais, fatores estes que podem afetar a resposta imune e o desenvolvimento da doença. Portanto, os eventos responsáveis pela patogênese da esquistossomose são multifatoriais envolvendo a participação da intensidade e duração da infecção, fatores genéticos, fatores relacionados ao sexo, à idade e à resposta imune (Gazzinelli *et al.*, 1985; Colley *et al.*, 1987; Hammad *et al.*, 1997; Dessein *et al.*, 1999a; Mohamed-Ali *et al.*, 1999).

Sabe-se que os macrófagos podem induzir a ativação e a proliferação de linfócitos T, levando a uma diferenciação em células Th1, Th2 ou T reguladoras (Kapsenberg, 2003). No entanto, somente células dendríticas maduras podem ativar células T *naïve* (Mellman & Steinman, 2001), cujo processo de maturação é dependente de sinais intrínsecos ao

organismo, tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CD40L (Gallucci & Matzinger, 2001) ou de sinais derivados de patógenos (Akira & Takeda, 2004). Já foi descrito que antígenos de SEA ligados às moléculas de MHC classe II podem ser rapidamente internalizados nos compartimentos lisossomais dos monócitos, entretanto, estas células apresentam menos moléculas co-estimuladoras na superfície (van Liempt *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, apresentam deficiência na interação com os linfócitos (Kapsenberg, 2003).

Foi descrito na literatura que indivíduos com a forma clínica intestinal da esquistossomose apresentavam um maior número de monócitos quando comparados com indivíduos não infectados e portadores da forma hepatoesplênica. Os autores sugerem que o aumento de monócitos circulantes no sangue periférico desses pacientes reflete uma maior apresentação de antígenos por estas células, conseqüência do contato contínuo dos moradores de área endêmica com os antígenos de *S. mansoni* (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2002; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008). Esse aumento de monócitos poderia funcionar como mecanismo de compensação devido à deficiência de maturação destas células frente aos antígenos de ovo do *S. mansoni* (van Liempt *et al.*, 2007). A comparação do perfil hematológico realizado neste estudo mostra uma diminuição do número de monócitos dois anos após o tratamento (Tabela 5), provavelmente, um reflexo da menor exposição aos antígenos do parasita, em função da eliminação dos vermes adultos e queda na intensidade de infecção, uma vez que 90% (17/19) dos pacientes não apresentavam ovos detectáveis nas fezes após o tratamento (Tabela 1).

Nossos resultados mostram que o tratamento levou a uma diminuição da intensidade de infecção (Tabela 1) e reversão da fibrose hepática (Tabela 2), 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; Martins-Leite *et al.* 2008). Avaliamos ainda o impacto do tratamento no perfil de citocinas de pacientes portadores de esquistossomose que desenvolveram fibrose hepática, bem como o efeito da quimioterapia na resposta celular dos pacientes portadores de diferentes intensidades de infecção pelo *S. mansoni*. Utilizamos a citometria de fluxo para a detecção de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos, pois esta metodologia além de permitir selecionar a população de células desejada, evita interferências do meio extracelular. As citocinas avaliadas foram escolhidas pelo conhecimento de relatos que descrevem um papel importante delas na interação entre hospedeiro e parasito. A IL-4 é mediadora central na polarização de uma resposta Th2, para a regulação da produção de IgE (Metwali *et al.*, 1996; De Vries *et al.*, 1999) e também para inibição das respostas Th1. A IL-5 é uma citocina Th2, que está aumentada durante a infecção

na esquistossomose murina e humana (Grzych *et al.*, 1991 e Roberts *et al.*, 1993). Esta citocina regula a ativação e quimiotaxia de eosinófilos e seus níveis estão correlacionados com resistência à reinfeção em seres humanos (Hagan *et al.*, 1985). O IFN- regula e amplifica as respostas Th1 e seu papel na esquistossomose permanece controverso, ora níveis elevados desta citocina foram associados com hepatoesplenomegalia em crianças infectadas com *S. mansoni* (Mwatha *et al.*, 1998), ora baixos níveis de produção são relacionados com a susceptibilidade de desenvolvimento de fibrose periportal (Henri *et al.*, 2002; Martins-Leite *et al.*, 2008). O TNF- tem sido associado com morbidade na esquistossomose humana (King *et al.*, 2001) e murina (Hoffmann *et al.*, 1998). A IL-10 pode regular negativamente respostas imunes nocivas, específicas para o parasita, em seres humanos (King *et al.*, 1996 e Malaquias *et al.*, 1997) e em camundongos (Wynn *et al.*, 1995). A IL-12 é uma citocina reguladora chave, que dirige a imunidade mediada por células pela indução de subgrupos de linfócitos produtores de IFN- (Gately *et al.*, 1998). A IL-8 é um dos principais mediadores da inflamação devido à sua habilidade de ativar e atrair neutrófilos e eosinófilos (Bagiolini *et al.*, 1993; Erger & Casale, 1995). Infelizmente, por problemas técnicos, não nos foi possível avaliar a marcação das células com a IL-13. Esta citocina tem um papel na regulação de IgE (De France *et al.*, 1994) e tem sido mostrada ser a principal citocina fibrogênica em camundongos (Chiaramonte, *et al.*, 1993) e seus níveis elevados foram associados à fibrose periportal em seres humanos infectados pelo *S. mansoni* (Alves-Oliveira *et al.*, 2006, Martins-Leite *et al.*, 2008).

Ao avaliarmos o impacto do tratamento na expressão das citocinas pelos linfócitos sem agrupar os indivíduos pela intensidade de infecção ou pela presença de fibrose observamos que a quimioterapia diminuiu significativamente a expressão de todas as citocinas avaliadas nas culturas sem estímulo (CC) ou estimuladas pelo verme adulto (SWAP), no entanto, diminuiu apenas a expressão das citocinas IL-8 e IL-4 (Figura 2) após o estímulo com antígenos do ovo (SEA). Uma possível explicação seria que o medicamento elimina o verme adulto, mas os ovos continuam retidos nos tecidos, sendo degradados ao longo do tempo. A exposição contínua aos antígenos do ovo explica a pouca alteração das citocinas avaliadas após o tratamento. Foi interessante observar que, na estimulação específica, obtida através da razão entre o número de células das culturas estimuladas pelas não-estimuladas (Figura 3), que houve um aumento do número linfócitos IFN-<sup>+</sup>, IL-8<sup>+</sup> e IL-5<sup>+</sup> mostrando um perfil misto Th1-Th2 em resposta ao SEA após o tratamento. Na esquistossomose experimental, uma produção aumentada de IFN- por esplenócitos estimulados por SEA, foi

observada em animais tratados 3 e 6 meses, quando comparados aos controles não tratados (Singh *et al.*, 2004). Na esquistossomose humana, num estudo em que os autores tentam investigar se repetidos tratamentos com praziquantel podiam induzir uma imunidade protetora em resposta ao SWAP, nenhuma diferença foi observada nos níveis de IFN- $\gamma$  24 meses após o tratamento dos indivíduos, no entanto, esses níveis estavam elevados nos indivíduos não-infectados quando comparados aos indivíduos infectados (van den Biggelaar, *et al.*, 2002). Em um estudo com *S. japonicum*, nenhuma alteração nos níveis de IFN- $\gamma$ , estimulados por SEA ou SWAP foram observados quatro semanas após o tratamento (Coutinho *et al.*, 2007). Em relação a IL-5 estimulada por SEA, o aumento encontrado após o tratamento neste estudo, foi também observado por alguns autores, mesmo ocorrendo diferenças experimentais tais como, período de tempo avaliado após o tratamento, presença de uma reinfecção marcante, infecção por *S. japonicum* e por *S. haematobium*, e em estudos com seres humanos e animais experimentais como camundongos e macacos (Grogan *et al.*, 1998; Mola *et al.*, 1999; Coutinho *et al.*, 2007; van den Biggelaar, *et al.*, 2002; Fitzsimmons *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Reimert *et al.*, 2006). No trabalho do Fitzsimmons e colaboradores (2004), foi observado um aumento na produção de IL-5 em cultura de sangue total, estimulada por SEA e SWAP, 21 dias após o tratamento, além disso, os autores encontraram 20 meses após o tratamento, uma correlação positiva entre a intensidade de reinfecção e os níveis de IL-5 dosados no plasma 1 dia após o tratamento. Os autores sugerem que aqueles indivíduos que responderam ao tratamento, com uma maior liberação de IL-5 e uma eosinopenia foram mais susceptíveis à reinfecção. Observações confirmadas por Reimert e colaboradores (2006) que encontraram uma associação entre tratamento, intensidade de infecção, produção de IL-5 e ativação de eosinófilos, num estudo em que ele trata os indivíduos e avalia a resposta de eosinófilos, antes, 24 horas e três semanas após o tratamento.

Na figura 4 comparamos o número de linfócitos expressando as diferentes citocinas após estímulos específicos SEA/CC e SWAP/CC, e não encontramos diferenças significativas entre as duas culturas antes do tratamento. Entretanto, dois anos após a quimioterapia e em concordância com os dados mostrados na figura 3, observamos um número aumentado de linfócitos positivos para citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) e Th2 (IL-5<sup>+</sup>) estimuladas por SEA. Estes dados estão de acordo com a literatura em que um único tratamento não leva à polarização da resposta imune, e sim à produção de um perfil misto Th1-Th2 (Williams *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2002; Mduluzza *et al.*; 2003; Joseph *et al.*, 2004a) e que tratamentos repetidos amplificam as respostas do tipo Th2 (Mola *et al.*, 1999; van den Biggelaar, *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004).

Além dos fatores idade e sexo, alguns estudos mostram que a produção de citocinas pode ser afetada pela intensidade de infecção, contudo, ainda permanece controverso e difícil de demonstrar um padrão coerente de associação (de Jesus *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 1994; Grogan *et al.*, 1998; Maguerite *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2004b; Walter *et al.*, 2006). Neste estudo, em concordância com Silveira e colaboradores (2004) não encontramos diferença na produção de citocinas após estímulo com SEA, quando os indivíduos foram agrupados pela intensidade de infecção em OPG<100 e OPG>100. Diferente do trabalho mencionado, onde as principais diferenças na produção de citocinas foram observadas entre indivíduos infectados e não infectados, não nos foi possível fazer esta comparação porque, antes do tratamento, somente um indivíduo não possuía ovos nas fezes (Figuras 5 e 6) e, depois do tratamento somente dois indivíduos se reinfectaram. Nas culturas estimuladas por SWAP observamos um maior número de linfócitos IL-4<sup>+</sup> nos indivíduos que tinham intensidade de infecção igual ou superior a 100 ovos por grama de fezes (Figura 5), uma diferença que não se manteve (Figura 6) quando a produção de citocinas foi expressa através do índice de estimulação (SWAP/CC). Dados da literatura tem mostrado um aumento dos níveis de IL-4 estimulada por SWAP ou mitógenos, até dois meses após o tratamento; nesses trabalhos, investiga-se o papel desta citocina com imunidade à reinfeção, fazendo uma associação com os níveis de IgE específica para antígenos do verme adulto presentes no soro (Finkelman *et al.*, 1988; Zwingenberger *et al.*, 1991; Medhat *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2001; Mduluzza *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2004b; Walter *et al.*, 2006).

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; Chiaramonte *et al.*, 2001; Kaviratne *et al.*, 2004; Reiman *et al.*, 2006). O camundongo tem se tornado o modelo padrão para estudos de infecção pelo *S. mansoni* desde 1915. Nesses animais há uma alteração da resposta de um perfil de citocinas do tipo Th1 para um perfil do tipo Th2 com o início da ovoposição, seguida de uma regulação dessa resposta, evitando possíveis conseqüências deletérias que estão associadas à produção contínua e elevada de mediadores inflamatórios (Grzych *et al.*, 1991, Pearce *et al.*, 1991, Sher *et al.*, 1991).

Nesse estudo, a questão endereçada era como a produção de citocinas era afetada pela presença de fibrose e pelo tratamento. Nossos dados parecem confirmar um papel fibrogênico para IL-5. Após a quimioterapia, observamos uma elevação no número de linfócitos IL-5<sup>+</sup>, em resposta ao SEA, nos pacientes com fibrose quando comparados aos pacientes sem fibrose

(Figura 9). Dentro do grupo com fibrose, a produção de IL-5 foi significativamente maior após o tratamento (Figura 10), mesmo quando na análise foram incluídos apenas os indivíduos cuja grau de fibrose não se alterou com a quimioterapia (Figura 11). Uma forte associação desta citocina com fibrose grave antes do tratamento foi relatada por de Jesus e colaboradores (2004), neste estudo, os níveis de IL-5 estavam elevados nas culturas PBMC de indivíduos portadores de fibrose do grau 3 comparados aos de grau 1 e 2, e nos pacientes que permaneceram sem tratamento durante um ano e evoluíram o grau de fibrose. 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 alto produtores de IL-5, IL-13 e IL-4 nos indivíduos que permaneceram com fibrose um ano após o tratamento (Coutinho *et al.*, 2007). Em concordância com estes achados, Silva-Teixeira e colaboradores (2004) encontraram maiores níveis de IL-5 no soro de pacientes portadores de fibrose do grau 3 comparados com indivíduos sem fibrose; além disso, o número de eosinófilos IL-5<sup>+</sup> nos indivíduos com fibrose foi maior do que dos indivíduos portadores da forma clínica intestinal (Silveira-Lemos *et al.*, 2008). Algumas evidências apontam que, além do SEA, o SWAP pode induzir a produção de IL-5 nos indivíduos portadores de fibrose (van der Biggelaar *et al.*, 2003; de Jesus *et al.*, 2004; Talaat *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2007). Por outro lado, usando diferentes metodologias para detecção de IL-5, tais como: ELISA, níveis de RNAm e citocinas intracitoplasmáticas, mostrou-se que nos pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica, a produção de IL-5 estava diminuída quando comparada aos indivíduos da forma clínica intestinal (Williams *et al.*, 1994; Mwatha *et al.*, 2004; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008). No modelo experimental, pela primeira vez foi demonstrado o papel da IL-5 na indução da morbidade. Os animais KO para IL-5 tiveram a fibrose hepática significativamente diminuída na fase crônica da infecção quando comparados com animais selvagens (Reiman *et al.*, 2006).

Tem sido proposto que a IL-5 atua na patogênese da esquistossomose através da ativação e recrutamento de eosinófilos, células predominantes nos granulomas (Pearce & MacDonald, 2002, Phillips & Lammie, 1986). O maior número de linfócitos IL-8<sup>+</sup> nos pacientes com fibrose (Figuras 10 e 11) favorece a hipótese da participação destas células na patologia, baseada na evidência de que a IL-8 faz quimiotaxia para eosinófilos (Smart *et al.*, 1993; Erger & Casale *et al.*, 1995; Bittleman *et al.*, 1996), e induz sua ativação e migração “*in vitro*” (Ulfman *et al.*, 2001). Alguns estudos tem mostrado que os eosinófilos são uma importante fonte de citocinas Th2, entre elas, a IL-13, chegando a secretar níveis comparáveis aos dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Portanto, tem sido sugerido que a IL-5 agrava a fibrose regulando



a atividade da IL-13 (Rumbley *et al.*, 1999; Hesse *et al.*, 2001; Reiman *et al.*, 2006). O mecanismo sugerido para participação das citocinas Th2 na indução de fibrose seria através de uma via de ativação alternativa de macrófagos, levando a um aumento da atividade da arginase tipo 1, e conseqüentemente, uma maior produção de colágeno (Hesse *et al.*, 2001; Pearce & MacDonald, 2002). Uma hipótese que está sendo contestada recentemente, que propõe a arginase-1 como mediador que suprime a via de ativação alternativa de macrófagos, e desta forma, a inflamação e a fibrose (Pesce *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, além da IL-5, o TNF- $\alpha$ , em resposta ao SEA, estava aumentado no grupo com fibrose após o tratamento (Fig. 10), levantando a possibilidade de que esta citocina está contribuindo para a manutenção da fibrose nestes indivíduos. Uma associação do TNF- $\alpha$  com fibrose já foi mostrado na esquistossomose experimental (Joseph & Boros, 1993; Adewusi *et al.*, 1996; Leptak *et al.*, 1997) e na doença em seres humanos infectados por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Zwimngenberger *et al.*, 1990; Mwatha *et al.*, 1998; King *et al.*, 2001; Henri *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2004; Silva-Teixeira *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007). Porém, existem relatos na literatura cujos autores não encontram esta associação (Moukoko *et al.*, 2003; de Jesus *et al.*, 2004), ou sugerem uma associação negativa (Talaat *et al.*, 2007).

Estes resultados conflitantes podem ser explicados considerando que o TNF- $\alpha$  tem efeitos pleiotrópicos na resposta imune contra esquistossomose. Tem sido sugerido que um desequilíbrio entre TNF- $\alpha$  e outras citocinas reguladoras, por exemplo IFN- $\gamma$ , pode causar dano tecidual (Henri *et al.*, 2002). Um possível mecanismo envolve uma produção elevada de espécies reativas do oxigênio no granuloma (Poli, 2000), como observado na esquistossomose experimental (Gharib *et al.*, 1999). Além disso, existem evidências de um papel protetor para o TNF- $\alpha$  na doença: pode restaurar a capacidade de camundongos deficientes em células T de formar granuloma ao redor dos ovos (Amiri *et al.*, 1992), protege camundongos vacinados com IL-12 contra efeitos deletérios do granuloma (Hoffmann *et al.*, 1998), estimula a expressão de genes de metaloproteinases, o que favorece a degradação de colágeno (Poulos *et al.*, 1997).

Em relação à IL-4 não encontramos nenhuma associação com fibrose. Tal fato não significa que em outras condições esta associação poderia ser encontrada, considerando que já foi observado níveis elevados IL-4 no soro de indivíduos portadores de fibrose hepática grave, na esquistossomose mansônica (Silva-Teixeira *et al.*, 2004). Além disso, em um estudo de infecção pelo *S. japonicum*, Coutinho e colaboradores (2007) relataram uma associação de altos níveis de IL-4 induzidas por SWAP com a persistência de fibrose um ano após o

tratamento. De forma controversa, Tallat e colaboradores (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). O papel das citocinas Th2 na indução de fibrose tem sido investigado, e no mecanismo proposto, IL-4 induz a síntese de arginase-1, levando à uma produção de colágeno, particularmente em situações em que as citocinas Th2 são dominantes, uma hipótese testada no modelo de granuloma pulmonar na esquistossomose murina (Hesse *et al.*, 2001; Varin & Gordon, 2009).

A IL-10 é uma molécula chave na regulação da resposta Th2 na fase crônica da esquistossomose. Muitos autores sugerem que a deficiência de IL-10 nas formas graves da doença pode estar relacionada com a patogênese da esquistossomose, contribuindo para uma deficiência da resposta celular (Araújo *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 1999; Booth *et al.*, 2004; Abath *et al.*, 2006; Talaat *et al.*, 2007). Na esquistossomose humana, o bloqueio da IL-10 por anticorpos, aumentou a resposta proliferativa “*in vitro*” de PBMC de pacientes portadores da forma crônica intestinal, em resposta ao SEA e SWAP, mas não alterou as respostas de pacientes portadores da forma clínica aguda ou hepatoesplênica (Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998). Além disso, 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 (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 com respostas polarizadas Th1 (deficiência na produção de IL-10 e IL-4) tem súbita perda de peso e alta taxa de mortalidade em poucas semanas após a infecção, este efeito foi associado a uma elevada produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; já aqueles animais com respostas polarizadas Th2 (deficiência na produção IL-10 e IL-12) desenvolvem uma doença grave, associada com o aumento de fibrose hepática, com granulomas ricos em eosinófilos e alta taxa de mortalidade na fase crônica da infecção. Os autores observaram ainda que a deficiência de IL-10 levava a uma patologia que tinha características dos dois extremos. Juntos, estes achados revelam a importância da produção de IL-10 para o controle da morbidade, e ilustram que respostas polarizadas tipo 1 ou tipo 2 são igualmente prejudiciais ao hospedeiro (Hoffmann *et al.*, 2000).

Nesse estudo, não encontramos alteração na expressão de IL-10 pelos linfócitos, estimulados por SEA ou SWAP, dos indivíduos com fibrose quando comparados aos indivíduos sem fibrose, antes ou após o tratamento (Figuras 9 e 10). De forma semelhante,

comparando-se os níveis de IL-10 no soro de indivíduos sem fibrose e com fibrose do grau 3 nenhuma diferença foi encontrada (Silva-Teixeira *et al.*, 2004); da mesma maneira que níveis semelhantes de IL-10 após estímulo com SWAP foi produzido por PBMC de pacientes com fibrose do grau 1, 2 ou 3 (Magalhães *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns autores confirmam a importância da IL-10 na regulação da fibrose hepática em seres humanos. Booth e colaboradores (2004) mostraram que, uma produção diminuída de IL-10, independente do estímulo antigênico, era um fator de risco em crianças portadoras de fibrose. Talaat e colaboradores (2007) encontraram uma correlação negativa entre a produção desta citocina em resposta ao SEA ou SWAP com fibrose periportal, neste mesmo trabalho, os níveis de IL-10 estavam significativamente diminuídos em culturas de PBMC, estimuladas com SWAP, de indivíduos portadores de fibrose grau 1, 2 ou 3, comparados aos indivíduos portadores da forma clínica intestinal. Em concordância com estes autores, foi observado um número significativamente menor de linfócitos IL-10<sup>+</sup>, após breve estimulação com SEA, nos grupos com fibrose e hepatoesplênico comparados aos indivíduos da forma clínica intestinal (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008). Outro estudo recente, mostrou que a progressão para a fibrose central grave estava fortemente associada com baixos níveis de IL-10 (<50 pg/mL) em indivíduos infectados pelo *S. japonicum* (Arnaud *et al.*, 2008). Contudo, uma hipótese contrária foi sugerida quando uma associação positiva entre a presença de fibrose e a produção de IL-10, induzida por SEA ou SWAP, foi observada em estudos envolvendo infecção por *S. mansoni* e *S. japonicum* (Magalhães *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007). Analisados juntos, esses resultados conflitantes parecem refletir diferenças entre as espécies do *Schistosoma* investigadas, nos antígenos utilizados, na avaliação das formas clínicas, nos métodos de avaliação da fibrose, na história de infecção dos diversos grupos epidemiológicos, no ensaio de citocinas ou mesmo no poder analítico de detecção dessas interações, limitado pelo tamanho da amostra.

Evidências obtidas de modelos animais sugerem que as citocinas Th1 e Th2 estão presentes nos diferentes estágios de infecção pelo *Schistosoma*. Analisar as citocinas individualmente pode simplificar o fenômeno imunológico celular em parte devido ao potencial antagonista entre as citocinas Th1 e Th2 (Malope *et al.*, 2001; Wynn *et al.*, 2004). As evidências apontam para um desequilíbrio de citocinas tipo 1 ou tipo 2 na manutenção/erradicação da fibrose (Correa-Oliveira *et al.*, 1998) com a IL-10 desempenhando um papel central na patogênese da esquistossomose (King *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Falcão *et al.*, 1998; Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008; Arnaud *et al.*, 2008). Numa tentativa de

testar esta hipótese, nós avaliamos as razões entre a IL-10 e as demais citocinas nos grupos com e sem fibrose.

Nossos resultados sugerem que a persistência de uma resposta Th2, paralelamente a uma menor produção de IL-10, dois anos após o tratamento, favorece a manutenção da fibrose periportal. Encontramos a razão entre linfócitos IL-10<sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> diminuída nos portadores de fibrose, antes e após o tratamento (Fig. 13). Estudos em modelos experimentais (Mola *et al.*, 1999; Farah *et al.*, 2000; Fallon *et al.*, 2000; Reiman *et al.*, 2006) e em seres humanos (van der Biggelaar *et al.*, 2002; Silva-Teixeira *et al.*, 2004; de Jesus *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007; Talaat *et al.*, 2007; Silveira-Lemos *et al.*, 2008) confirmam a hipótese que o desenvolvimento da fibrose está associado com uma elevada produção de citocinas Th2. A diminuição da produção de IL-10 nos pacientes com fibrose, evidenciada por uma razão significativamente diminuída entre IL-10<sup>+</sup>/IFN-<sup>+</sup> neste grupo em relação aos pacientes sem fibrose (Figura 13), junto com relatos semelhantes na infecção humana pelo *S. mansoni* (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008) e pelo *S. japonicum* (Arnaud *et al.*, 2008), fortalecem a hipótese de que a IL-10 é crítica na proteção contra o desenvolvimento de uma fibrose grave. Além disso, o fato de que a razão IL-10<sup>+</sup>/IFN-<sup>+</sup> no grupo sem fibrose tende para um perfil imunomodulatório são consistentes com resultados recentes que demonstram que a supressão da hipersensibilidade tardia requer a síntese de IFN-<sup>+</sup> para uma função das células T reguladoras (Cone *et al.*, 2007) e também que o IFN-<sup>+</sup> pode contribuir para uma imunidade protetora durante a esquistossomose crônica (Zwingenberger *et al.*, 1989; Bahia-Oliveira *et al.*, 1996; Contigli *et al.*, 1999).

Apesar de ter observado, após o tratamento, um maior número de linfócitos TNF-<sup>+</sup> nos indivíduos com fibrose (Figura 10), a razão TNF-<sup>+</sup>/IFN-<sup>+</sup> diminuída neste grupo, e a razão TNF-<sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> aumentada nos pacientes sem fibrose (Figura 13) não favorece a hipótese de que o TNF-<sup>+</sup> estaria contribuindo para a patologia, conforme sugerido por King e colaboradores (2001) na infecção pelo *S. haematobium*, onde uma maior razão entre TNF-<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> foi associada com patologia, e na infecção pelo *S. mansoni* onde altos níveis de TNF-<sup>+</sup> foram associados com a presença de fibrose do grau 2 e 3 (Henri *et al.*, 2002) e com a presença de hepatoesplenomegalia (Mwatha *et al.*, 1998). A ausência dessa associação, observada no estudo proposto, pode estar refletindo diferenças no grau de fibrose, que ao contrário dos trabalhos mencionados, todos os pacientes eram portadores de fibrose do grau 1, e não regrediram a fibrose com o tratamento.

Quando os resultados de IL-4 e IFN-<sup>+</sup> foram analisados juntos para criar uma medida aproximada do balanço entre a ativação Th1 e Th2, a razão entre o número de células IFN-<sup>+</sup>

e IL-4<sup>+</sup> foi significativamente menor nos indivíduos sem fibrose quando comparados com os indivíduos com fibrose. É razoável sugerir que os indivíduos que não desenvolveram fibrose mostraram um perfil Th2 dominante em resposta aos antígenos do ovo do *S. mansoni*, comum na maioria dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas, e que desenvolvem uma resposta anti-inflamatória e não-patológica durante a fase crônica da doença (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000; Alves-Oliveira *et al.*, 2006). Este perfil Th2, ao lado de uma produção elevada de IL-10, tem uma função protetora primária devido a seu papel anti-inflamatório. Esta hipótese é fortalecida pelas observações de Teixeira e colaboradores (2008) que encontraram número de células IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> diminuídos nos indivíduos hepatoesplênicos.

Em resumo, apesar das limitações do estudo, relativas ao pequeno tamanho da amostra, nossos dados estão de acordo com a hipótese de que indivíduos portadores de fibrose periportal perderam a capacidade de modular a resposta imune aos antígenos do ovo do *Schistosoma*. Esse indivíduos produzem citocinas Th1 e Th2, com um predomínio da resposta Th2, representada por um aumento do número de linfócitos IL-5<sup>+</sup> e por uma razão TNF-<sup>+</sup>/IL-5<sup>+</sup> diminuída, no contexto de uma baixa produção de IL-10, o que poderia explicar a manutenção da fibrose periportal após a quimioterapia com praziquantel.

## 7 CONCLUSÃO

O estudo proposto fornece evidências de que indivíduos portadores de fibrose produzem citocinas Tipo 1 e Tipo 2, com predomínio da resposta Th2, aqui representada por um aumento do número de linfócitos IL-5<sup>+</sup>. Nossos resultados reforçam a hipótese que a produção elevada de IL-5, concomitante, à uma produção diminuída de IL-10, em resposta aos antígenos do ovo, contribuiria para a persistência da fibrose dois anos após o tratamento, na infecção crônica pelo *S. mansoni*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F.G.; MORAIS, C.N.; MONTENEGRO, C.E.; WYNN, T.A. and MONTENEGRO, S.M. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol.**, v.22(2), p.85-91, Feb, 2006.
- ABDEL-WAHAB, M.F.; ESMAT, G., MILAD M., ABDEL-RAZEK, S. and STRICKLAND, G.T. Characteristic sonographic pattern of schistosomal hepatic fibrosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.40, p.72, 1989.
- ABDEL-WAHAB, M.F.; ESMAT, G., FARRAG, A.; EL-BORAHEY, Y.A. and STRICKLAND, G.T. Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.46, p.403, 1992.
- ADEWUSI, O.I.; NIX, N.A.; LU, X.; COLLEY, D.G. and SECOR, W.E. Schistosoma mansoni: relationship of tumor necrosis factor-alpha to morbidity and collagen deposition in chronic experimental infection. **Exp Parasitol.**, v.84(2), p.115-123, Nov, 1996.
- AKIRA S. and TAKEDA K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, v.4: p.499–511, 2004.
- ALVES-OLIVEIRA, L.F.; MORENO, E.M.; GAZZINELLI G.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVEIRA, A.M.S.; GAZZINELLI, A.; MALAQUIAS, L.C.C.; LOVERDE, P.; MARTINS LEITE, P. and CORREA-OLIVEIRA, R. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infection and Immunity**, v.74, p.1215, 2006.
- AMIRI, P.; LOCKSLEY, R.M.; PARSLow, T.G.; SADICK, M.; RECTOR, E.; RITTER, D. and MCKERROW, J.H. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v.16, n.356(6370), p.604-607, Apr, 1992.
- ANDRADE, Z.A.; BAPTISTA, A. and SANTANA, T.S. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101 (Suppl. I), p.267, 2006.
- ARAP SIONGOK, T.K.; MAHMOUD, A.A.; OUMA, J. H.; WARREN, K.S.; MULLER, A.S.; HANDA, A.K. and HOUSER, H.B. Morbidity in schistosomiasis mansoni in relation to intensity of infection: study of a community in Machacos, Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.25, p.273, 1976.
- ARAÚJO, M.I.; BACELLAR, O.; RIBEIRO-DE-JESUS, A. and CARVALHO, E.M. The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. **Braz J Med Biol Res.**, v.27(7), p.1619-1625, Jul, 1994.
- ARAÚJO, M.I.; DE JESUS, A.R.; BARCELAR, O.; SABIN, E. and CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, v.25, p.1399, 1996.

ARNAUD, V.; LI, J.; WANG, Y.; FU, X.; MENGZHI, S.; LUO, X.; HOU, X.; DESSEIN, H.; JIE, Z.; XIN-LING, Y.; HE, H.; McMANUS, D.P.; LI, Y. and DESSEIN, A. Regulatory role of interleukin-10 and interferon-gamma in severe hepatic central and peripheral fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. **J Infect Dis.** v.198(3), p.418-426, 2008.

BAGGIOLINI M.; DEWALD B. and MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, v.55, p.97-179,1993.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GAZZINELLI, G.; ELOI-SANTOS, S.M.; CUNHA-MELO, J.R.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; SILVEIRA, A.M.S.; VIANA, I.R.C.; CARMO, J.; SOUZA, A. and CORREA-OLIVEIRA, R. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.86, p.57-61, 1992.

BAHIA-OLIVEIRA L.M.; SIMPSON A.J.; ALVES-OLIVEIRA L.F.; CARVALHO-QUEIROZ C.; SILVEIRA A.M.S.; VIANA I.R.C.; CUNHA-MELO J.R.; HAGAN P.; GAZZINELLI G. and CORREA-OLIVEIRA R. Evidence that cellular immune responses to soluble and membrane associated antigens are independently regulated during human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol.**, v.18(2), p.53-63, 1996.

BARBOSA, F.S.; GONÇALVES, J.F.; MELO, M.C. Hepatosplenic forms of schistosomiasis mansoni in the interior of Northeastern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.11 (2), p. 325, 1995. Epub Sep 29, 2003.

BETHONY J.; WILLIAMS, J.T.; KLOOS, H.; BLANGERO, J.; ALVES-FRAGA, L.; BUCK, G.; MICHALEK, A.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; LOVERDE, P.T.; CORREA-OLIVIERA, R. and GAZZINELLI, A. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. Part II: Household risk factors. **Trop Med Int Health**, v.6, p.136, 2001.

BETHONY, J.; WILLIAMS, J.T.; BROOKER, S.; GAZZINELLI, A.; GAZZINELLI, M.F.; LOVERDE, P.T.; CORREA-OLIVEIRA, R. and KLOOS H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. Part III: household aggregation of water-contact behaviour. **Trop. Med. Int. Health**, v.9 (3), p. 381, 2004.

BINA, José Carlos and PRATA, Aloísio Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36 (2), p.211, 2003.

BITTLEMAN, D.B.; ERGER, R.A. and CASALE, T.B. Cytokines induce selective granulocyte chemotactic responses. **Inflamm Res.**, v.45, p.89-95, 1996.

BOISIER, P.; RAMAROKOTO, C.E.; RAVAOALIMALALA, V.E.; RABARIJAONA, L.; SERIEYE, J.; ROUX J. and ESTERRE, P. Reversibility of *Schistosoma mansoni*-associated morbidity after yearly mass praziquantel therapy: ultrasonographic assessment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.92, p.451, 1998.

BOOTH, M.; MWATHA, J.K.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KADSO, H.; IRERI, E.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KARIUKI, C.; KIMANI, G.; OUMA, J.H.; KABATEREINE, N.B.; VENNERVALD, B.J. and DUNNE, D.W. 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.**, v.172, p.1295, 2004.

BOROS, Dov L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2(3), p.250, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. FUNASA. Centro Nacional de Epidemiologia. Informe epidemiológico do SUS, v.8, n.3, jul/set, 1999. Disponível em:[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/inf\\_epi\\_1999\\_3completo.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/inf_epi_1999_3completo.pdf). Acesso em 20 abr. 2008.

BRITO, C.F.; CALDAS, I.R.; COURA-FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R. and OLIVEIRA, S.C. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scand J Immunol.**, v.51(6), p.595-601, Jun, 2000.

BUTTERWORTH, A.E.; CAPRON, M.; CORDINGLEY, J.S.; DALTON, P.R.; DUNNE, D.; KARIUKI, H.C.; KIMANI, G.; KOECH, D.; MUGAMBI, M.; OUMA, J.H.; PRENTICE, M.A.; RICHARDSON, B.A.; ARAP SIONGOK, T.K. and TAYLOR, D.W. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, p.393-408, 1985.

BUTTERWORTH, A.E.; DUNNE, D.W.; FULFORD, A.J.C; THORNE, K.J.I; GACHUCHI, K.; OUMA, J.M. and STURROCK, R.F. Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms and implications for control. **Immunological Investigations**, v.21, p.391-407, 1992.

BUTTERWORTH, A.E. Immunological aspects of human schistosomiasis. **British Medical Bulletin**, v.54, n.2, p.357-368, 1998.

CALDAS, I.R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; COLOSIMO, E.; CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; COLLEY, D.G. and GAZZINELLI, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, n.1, p.57-64, Jan, 2000.

CHEEVER, A.W. & ANDRADE, Z.A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.626-639, 1967.

CHEEVER, A.W.; HOFFMANN, K.F. and WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol. Today**, v.21, p.465-466, 2000.

CHIARAMONTE, M.G.; SCHOPF, L.R.; NEBEN, T.Y.; CHEEVER, A.W.; DONALDSON, D.D. and WYNN, T.A. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Immunol.**, v.162, p.920-930, 1999.

CHIARAMONTE, M.G.; CHEEVER, A.W.; MALLEY, J.D.; DONALDSON, D.D. and WYNN, T.A. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v.34, p. 273-282, 2001.

CIOLI D.; PICA-MATTOCCIA, L. and ARCHER S. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? **Pharmacol Ther.**, v.68,v.1, p.35-85, 1995.

CIOLI, Donato. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in Infectious Diseases** v.13, p.659–663, 2000.

CIOLI, Donato and PICA-MATTOCCIA, Livia. Praziquantel **Parasitol Res** v.90, p.S3-S9, 2003.

COLLEY, D.G.; GARCIA, A.A.; LAMBERTUCCI, J.R.; PARRA, J.C.; KATZ, N.; ROCHA, R.S. and GAZZINELLI, G. Immune response during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.35, p. 793-802, 1986a.

COLLEY, D.G.; BARSOUM, I.S.; DAHAWI, H.S.; GAMIL, F.; HABIB, M. and el ALAMY, M.A. 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.**, v.80, p. 952-957, 1986b.

COLLEY, D.G. Dynamics of the human immune response to schistosomes. **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases**, v.2, p.315, 1987.

CONE, R.E.; LI, X.; SHARAFIEH, R.; O'ROURKE, J. and VELLA, A.T. The suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8 regulatory T cells requires interferon-gamma. **Immunology**, v.120, p.112–119, 2007.

CONTIGLI, C.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; DEL PRETE, G.; D'ELIOS, M.M.; De CARLI, M.; MANGHETTI, M.; AMEDEI, A.; ALMERIGOGNA, F.; LAMBERTUCCI, J.R. and GOES, A.M. Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms. **Clin. Immunol.**, v.91, p.338–344, 1999.

CORRÊA-OLIVEIRA, R., MALAQUIAS, L.C.C.; FALCÃO, P.L.; VIANA, I.R.C.; OLIVEIRA, L.M.B.G.; SILVEIRA, A.M.S.; FRAGA, L.A.O.; PRATA, A.; COFFMAN, R.L.; LAMBERTUCCI, J.R.; CUNHA-MELO, J.R.; MARTINS-FILHO, O.A.; WILSON, A.R. and GAZZINELLI, G. Cytokines As Determinants Of Resistance And Pathology In Human *Schistosomiasis Mansoni* Infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.171-177, 1998.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I.R. and GAZZINELLI, G. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol. Today**, v.16, p.397-399, 2000a.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, C.I.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARVALHO, Q.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; CUNHA-MELO, J.; SOARES, S.A.; PRATA, A.; WILSON, A. and GAZZINELLI, G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. **Acta Trop.**, v. 77, v.1, p.141-146, Oct 23, 2000b.

COTA, G.F.; PINTO-SILVA, R.A.; ANTUNES, C.M.F. and LAMBERTUCCI, J.R. Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. **Am. J. Trop. Hyg.**, n.74, v.1, p.103-107, 2006.

COUTINHO, H.M.; ACOSTA, L.P.; WU, H.W.; MCGARVEY, S.T.; SU L.; LANGDON, G.C.; JIZ, M.A.; JARILLA, B.; OLVEDA, R.M.; FRIEDMAN, J.F. and KURTIS J.D. Th2 Cytokines Are Associated with Persistent Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma japonicum* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.288–295, 2007.

CZAJAS, M.J.; WEINERS, F.R.; EGHBALI, M.; GIAMBRONE, M.A.; EGHBALI, M. and ZERNLL, M.A. Differential Effects of - Interferon on Collagen and Fibronectin Gene Expression. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.262, n. 27, p.13348-13351, 1987.

DE FRANCE, T.; CARAYON, P.; BILLIAN, G.; GUILLEMOT, J.C.; MINTY, A.; CAPUT, D. and FERRARA, P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v.179, p.135–145,1994.

DE JESUS, A.M., ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; ARAUJO, M.I.; DEMEURE, C.; BINA, J.C.; DESSEIN, A.J. and CARVALHO, E.M. Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. **Eur J Immunol.**, v.23(1), p.152-158, Jan, 1993.

DE JESUS, A.R.; MIRANDA, D.G.; MIRANDA, R.G.; ARAÚJO, I.; MAGALHÃES, A.; BACELLAR, M. and CARVALHO, E.M. Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in endemic area of Brazil, Caatinga do Moura. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.63, n.1,2, p.1-4, 2000.

DE JESUS, A.R.; SILVA, A; SANTANA, L.B.; MAGALHÃES, A.; DE JESUS, A.A.; ALMEIDA, R.P.; REGO, M.A.V.; BURATTINI, M.N.; PEARCE, E.J. and CARVALHO, E.M. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.98–105, 2002.

DE JESUS, A.R.; MAGALHÃES, A.; MIRANDA, D.G.; MIRANDA, R.G.; ARAÚJO, M.I.; DE JESUS, A.A.; SILVA, A.; SANTANA, L.B.; PEARCE, E. and CARVALHO E.M. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v.72, p.3391-3397, 2004.

DE VRIES, J.E.; CARBADILLO, J.M. and AVERSA, G. Receptors and cytokines involved in allergic Th2 cell responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.103, p.S492–496, 1999.

DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R. and ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J Immunol.**, v.150, n.2, p.353-360, Jan 15, 1993.

DEL PRETE 1998 INT.rEv.Immunol th1h2

DEGU, G.; MENGISTU, G. and JONES, J. Some factors affecting prevalence of and immune responses to *Schistosoma mansoni* in schoolchildren in Gorgora, northwest Ethiopia. **Eth Med J**, v.4,n.40, p.345-352, 2002.

DESSEIN, A.J.; HILLAIRES, D.; ELWALI, N.E.M.A.; MARQUET, S.; MAHAMED-ALI, Q.; MIRGHANI, A.; HENRI, S.; ABDELHAMEED, A.A.; SAEED, O.K.; MAGZOUB, M.M.A. and ABEL, L. 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**, v.65, n.3, p.709-721, 1999a.

DESSEIN, A.J.; MARQUET, S.; HENRI, S.; EL WALI, N.E.; HILLAIRES, D.; RODRIGUES, V.; PRATA, A.; ALI, Q.M.; GHARIB, B.; DE REGGI, M.; MAGZOUB, M.M.; SAEED, O.K.; ABDELHAMEED, A.A. and ABEL, L. Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. **Microbes and Infection**, v.1(7), p.561-567, 1999b.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, E.; MOHAMED-ALI, G. and ABDEL-RAHIM, I.M. Sonomorphological abnormalities in Sudanese children with *Schistosoma mansoni* infection: a proposed staging system for field diagnosis of periportal fibrosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, p.63-69, 1989.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, E.; ABDEL-RAHIM, I.M.; MOHAMED-ALI, Q.; ELSHEIKH, M.; SCHLAKE, J.; KARDORFF, R.; FRANKE, D.; KAISER, C. and EHRICH, J.H.H. Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: evaluation of morbidity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p.581-586, 1990.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, E.; ABDEL-RAHIM, I.M.; KARDORFF, R.; KAISER, C.; FRANKE, D.; SCHLAKE, J.; RICHTER, J.; ELSHEIKH, M.; MOHAMED-ALI, Q. and EHRICH, J.H. 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.**, v.46, p. 409-415, 1992.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, I.E. and KARDORFF, R. Ultrasonography in schistosomiasis in Africa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.141-145, 1995.

DOENHOEFF, M.J.; KUSEL, J.R.; COLES, G.C. and CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, p.465-469, 2002.

DOETZE, A.; SATOGUINA, J.; BURCHARD, G.; RAU, T.; LÖLIGER, C.; FLEISCHER, B. and HOERAUF, A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. **Int Immunol.**, v.12(5), p.623-630, May, 2000.

DRUMMOND, S.C.; SILVA, L.C.S; AMARAL, R.S.; SOUSA-PEREIRA, S.R.; ANTUNES, C.M. and LAMBERTUCCI, J.R. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, Suppl. I, p.37-44, 2006.

DUNCAN, M.R. and BERMAN, B. Interferon- $\gamma$  is the lymphokine and interferon- $\beta$  the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **Journal of Experimental Medicine**, v.162, p.516-527, 1985.

ERGER, R.A. and CASALE, T.B. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. **Am J Physiol.**, v.268(12), p.L117-L122, 1995.

FALCÃO, P.L.; MALAQUIAS, L.C.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; SILVEIRA, A.M.S.; PASSOS, V.M.A.; PRATA, A.; GAZZINELLI, G.; COFFMAN, R.L. and CORREA-OLIVEIRA, R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasite Immunology**, v.20, p.447-454, 1998.

FALCÃO, P.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FRAGA, L.A.O.; TALVANI, A.; PROUDFOOT, A.E.I.; WELLS, T.N.C.; WILLIAMS, T.J.; JOSE, P.J. and TEIXEIRA, M.M. Plasma Concentrations and Role of Macrophage Inflammatory Protein-1 during Chronic Schistosoma mansoni Infection in Humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1696-1700, 2002.

FALLON, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v.21, n.1, p.29-35, 2000.

FALLON, P.G.; RICHARDSON, E.J.; MCKENZIE, G.J. and MCKENZIE, A.N. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol.**, 164, p.2585-2591, 2000.

FARAH, I.O.; MOLA, P.W.; KARIUKI, T.M.; NYINDO, M.; BLANTON, R.E. and KING, C.L. Repeated exposure induces periportal fibrosis in Schistosoma mansoni-infected baboons: role of TGF- $\beta$  and IL-4. **J Immunol.**, v.164, p.5337-5343, 2000.

FARIAS, L.M.M.; RESENDES, A.P.C.; SABORZA, P.C. and SOUZA-SANTOS, R. Preliminary analysis of the Information System in the Brazilian Schistosomiasis Control Program, 1999-2003. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23(1), p.235-239, jan, 2007.

FERRARI, M.L.A., COELHO, P.M.Z.; ANTUNES, C.M.F., TAVARES; C.A.P. and CUNHA, A.S. Efficacy of Oxamniquine and Praziquantel in Schistosomiasis Mansoni Treatment: a Controlled Trial. **Bulletin of the World Health Organization** v.81(3), 2003.

FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; URBAN, J.F. Jr.; HOLMES, J.; OHARA, J.; TUNG, A.S.; SAMPLE, J.V. and PAUL, W.E. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. **J Immunol.**, v.141(7), p.2335-2341, Oct, 1988.

FITZSIMMONS, C.M.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; REIMERT, C.M.; HOFFMANN, K.F.; KAZIBWE, F.; KIMANI, G.; MWATHA, J.K.; OUMA, J.H.; TUKAHEBWA, E.M.; KARIUKI, H.C.; VENNERVALD, B.J.; KABATEREINE, N.B. and DUNNE, D.W. Chemotherapy for schistosomiasis in Ugandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm-specific immunoglobulin E. **Infect Immun.**, v.72(7), p.4023-4030, Jul, 2004.

FLORES-VILLANUEVA, P.O.; ZHENG, X.X.; STROM, T.B. and STADECKER, M.J. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed

hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. **J Immunol.** v.156(9), p.3315-3320, May, 1996.

FULFORD, A.J.C.; MBUGUA, G.G.; OUMA, J.H.; KARIUKI, H.C.; STURROCK, R.F. and BUTTERWORTH, A.E. Differences in the rate of hepatosplenomegaly due to *Schistosoma mansoni* infection between two areas in Machakos district, Kenya. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.85, p.481-488, 1991.

FULFORD, A.J.C.; BUTTERWORTH, A.E., OUMA, J.H. and STURROCK, R.F. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. **Parasitology.** v.110, Pt 3, p.307- 316, Apr, 1995.

FULFORD, A.J.C.; WEBSTER, M.; OUMA, J.H. and DUNNE, D. Puberty and age-related changes in susceptibility to schistosoma infection. **Parasitol. Today**, v.14, p.23-26, 1998.

GALLUCCI, S. and MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol.**, v.13, p.114-119, 2001.

GATELY, M.K.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; STERN, A.S.; ADORINI, L.; GUBLER, U. and PRESKY, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol.**, v.16, p.495-521, 1998.

GAZZINELLI, A.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; CRAWFORD, S.B.; LOVERDE, P.T.; CORREA-OLIVEIRA, R. and KLOOS, H. Socioeconomic determinants of Schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. **Acta Trop.**, v. 99(2-3), p.260-271, October, 2006.

GAZZINELLI, G.; KATZ, N.; ROCHA, R.S. and COLLEY, D.G. 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.**, v.130, p.2891-2895, 1983.

GAZZINELLI, G.; LAMBERTUCCI, J.R.; KATZ, N.; ROCHA, R.S.; LIMA, M.S. and COLLEY, D.G. Immune response during human schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. **J. Immunol.**, v.135, p.2121-2127, 1985.

GHARIB, B.; ABDALLAHI, O.M.; DESSEIN, H. and De REGGI, M. Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **J Hepatol.**, v.30(4), p.594-602, Apr, 1999.

GRANDIÈRE-PÉREZ, L.; ANSART, S.; PARIS, L.; FAUSSART, A.; JAUREGUIBERRY, S.; GRIVOIS, J.P.; KLEMENT, E.; BRICAIRE, F.; DANIS, M. and CAUMES, E. Efficacy of Praziquantel During the Incubation and Invasive Phase Of *Schistosoma Haematobium* Schistosomiasis In 18 Travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.74(5), p. 814-818, 2006.

GROGAN, J.L.; KREMSNER, P.G.; VANDAM, G.J.; METZGER, W.; MORDMÜLLER, B.; DEELDER, A.M. and YAZDANBAKHSI, M. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. **J Infect Dis.**, v.173:1242-1247, 1996.

GROGAN, J.L.; KREMSNER, P.G.; DEELDER, A.M. and YAZDANBAKHSI, M. Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. **J Infect Dis.**, v.177(5), p.1433-1437, May, 1998.

GRYSEELS, B. and POLDERMAN, A.M. The morbidity of *Schistosomiasis mansoni* in Maniema (Zaire). **The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.202-209, 1987.

GRYSEELS, B. Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience? **Parasitol. Today** v.10, p.380-384, 1994.

GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F. and SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, v.146, p.1322-1327, 1991.

HAGAN, P.; WILKINS, H.A.; BLUMENTHAL, U.J.; HAYES, R.J. and GREENWOOD, J. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immunol.**, v.7, p.625-632, 1985.

HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U.J.; DUNN, D.; SIMPSON, A.J. and WILKINS, H.A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, v.17, v.349(6306), p.243-5, Jan, 1991.

HAMMAD, T.A.; GABR., N.S.; HUSSEIN, M.H.; ORIEBY, A.; SHAWKY, E. and STRICKLAND, G.T. Determinants of infection with schistosomiasis haematobia using logistic regression. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, p.464-468, 1997.

HENRI, S.; CHEVILLARD, C.; MERGANI, A.; PARIS, P.; GAUDART, J.; CAMILLA, C.; DESSEIN, H.; MONTERO, F.; ELWALI, N.E.M.A.; SAEED, O.K.; MAGZOUB, M. and DESSEIN, A.J. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*. IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- with aggravation of disease. **The Journal of Immunology**, v.169, p.929-936, 2002.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A.C.; SCHITO, M.; FUENTES, J.M.; CHEEVER, A.W.; PEARCE, E.J. and WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol.**, v.167(11), p.6533-6544, Dec, 2001.

HOFFMANN, K.F.; CASPAR, P.; CHEEVER, A.W. and WYNN, T.A. IFN-gamma, IL-12 and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. **J. Immunol.**, v.161, p.4201-4210, 1998.

HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W. and WYNN, T.A. 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.**, v.164(12), p.6406-6416, 2000.

HOFFMANN, K.F.; WYNN, T.A. and DUNNE, D.W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Adv Parasitol.**, v.52, p.265-307, 2002.

HOMEIDA, M.A.; ABDEL-GADIR, A.F.; CHEEVER, A.W.; BENNETT, J.L.; ARBAB, B.M.; IBRAHIUM, S.Z.; ABDEL-SALAM, I.M.; DAFALLA, A.A. and NASH, T.E. Diagnosis of pathologically confirmed Symmers' periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.38, p.86-91, 1988.

HOMEIDA, M.A.; TOM, I.E.; NASH, T. and BENNETT, J.L. Association of the therapeutic activity of praziquantel with the reversal of Symmers' fibrosis induced by *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n.45(3), v. 360-365, 1991.

JOSEPH, A.L. & BOROS, D.L. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 151, p.5461-5471, 1993.

JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KIMANI, G.; MWATHA, J.K.; KAMAU, T.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KABATEREINE, N.B.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; OUMA, J.H.; VENNERVALD, B.J. and DUNNE, D.W. Cytokine production in whole blood cultures from a fishing community in an area of high endemicity for *Schistosoma mansoni* in Uganda: the differential effect of parasite worm and egg antigens. **Infect Immun.**, v.72, p.728-734, 2004a.

JOSEPH, S.; JONES, F.M.; WALTER, K.; FULFORD, A.J.; KIMANI, G.; MWATHA, J.K.; KAMAU, T.; KARIUKI, H.C.; KAZIBWE, F.; TUKAHEBWA, E.; KABATEREINE, N.B.; OUMA, J.H.; VENNERVALD, B.J. and DUNNE, D.W. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. **J Infect Dis.**, v.190(4), p.835-842, Aug, 2004b.

KAPSENBERG, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol.**, v.173, p.7454-7461, 2003.

KATZ, N.; CHAVES, A. and PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.14, p.397-400, 1972.

KATZ, N. Chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Adv Pharmacol Chemother.**, v.14, p. 1-70, 1977.

KATZ, N. e ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, v.55, n.1, p.38-41, Jan-Mar, 2003.

KIHARA, J.H.; MUHOHO, N.; NJOMO, D.; MWOBODIA, I.K.; JOSYLINE, K.; MITSUI, Y.; AWAZAWA, T.; AMANO, T. and MWANDAWIRO, C. Drug efficacy of praziquantel and albendazole in school children in Mwea Division, Central Province, Kenya. **Acta Trop.** v.102(3), p.165-171, Jun, 2007.

KING, C.L.; MEDHAT, A.; MALHOTRA, I.; NAFEH, M.; HELMY, A.; KHAUDARY, J.; IBRAHIM, S.; EL-SHERBINY, M.; ZAKY, S.; STUPI, R.J.; BRUSTOSKI, K.; SHEHATA, M. and SHATA, M.T. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary



schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. **J.Immunol.**, v.156, p. 4715-4721, 1996.

KING, C.L.; MALHOTRA, I.; MUNGAI, P.; WAMACHI, A.; KIOKO, J.; MUCHIRI, E. and OUMA, J.H. Schistosoma haematobium-induced urinary tract morbidity correlates with increased tumor necrosis factor-alpha and diminished interleukin-10 production. **J. Infect. Dis.**, v.184, p.1176-1182, 2001.

KLOOS, H., De SOUZA, C.; GAZZINELLI, A.; SOARES-FILHO, B.S.; Da COSTA, T.; BETHONY, J.; PAGE, K.; GRZYWACZ, C.; LEWI, S.F.; MINCHELLA, D.; LOVERDE, P. and OLIVEIRA, R.C. 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**, v.96, p.57-66, 2001.

KLOOS, H., PASSOS, J.K.L.; LOVERDE, P.; CORREA-OLIVEIRA, R. and GAZZINELLI, A. 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**, v.99, p.673-681, 2004.

KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunol Today**, v.12(1), p.17-23, Jan, 1991.

LAPA, M.S.; FERREIRA, E.V.; JARDIM, C.; MARTINS, C.; ARAKAKI, J.S. and SOUZA, R. Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo. **Rev Assoc Med Bras.**, v.52, p.139-143, 2006.

LAMBERTUCCI, J.R.; CARLOS-SERUFO, J.; GERSPACHER-LARA, R.; RAYES, A.A.M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V. and ANTUNES, C.M.F. Schistosoma mansoni: assesment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v.77, p 101-109, 2000.

LEPTAK, C.L. & MCKERROW, J.H. Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. **J Immunology**, v.158(1), p.301-307, 1997.

MA, X. and TRINCHIERI, G.. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Adv. Immunol.**, v.79, p.55-92, 2001.

MaCDONALD, A.S.; PATTON, E.A.; La FLAMME, A.C.; ARAUJO, M.I.; HUXTABLE, C.R.; BAUMAN, B. and PEARCE, E.J. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. **J Immunol.**, v.168(9), p.4643-9, 1 May, 2002.

MACKAY, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat Immunol.**, v.2(2), p.95-101, Feb, 2001.

MAGALHÃES, A.; MIRANDA, D.G.; MIRANDA, R.G.; ARAÚJO, M.I.; de JESUS, A.A.; SILVA, A.; SANTANA, L.B.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. and de JESUS, A.R. Cytokine Profile Associated with Human Chronic Schistosomiasis Mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99(Suppl. I), p.21-26, 2004.

MAGALHÃES, T.V.; GAZZINELLI, G.; ALVAREZ, M.C.; LIMA e SILVA, F.C.; FRAGA, L.A.; SILVEIRA, A.M.; GAZZINELLI, A.; BETHONY, J.; LOVERDE, P.; CALDAS, I.R.; CORREA-OLIVEIRA, R. and PRATA, A. 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.**, v.38, p.33-37, 2005.

MALAQUIAS, L.C.C.; FALCÃO, P.L.; SILVEIRA, A.M.S.; GAZZINELLI, G.; PRATA, A.; COFFMAN, R.L.; PIZZIOLO, V.; SOUZA, C.P.; COLLEY, D.G. and CORREA-OLIVEIRA, R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*. Analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand. J. Immunol.**, v.46, p.393-398, 1997.

MALLAT, A.; PREAUX, A.M.; BLAZEJEWSKI, S.; ROSENBAUM, J.; DHUMEAUX, D. and MAVIER, P. Interferon and inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. **Hepatology**, v.21, p.1003-1010, 1995.

MALOPE, B.I.; MACPHAIL, A.P.; ALBERTS, M.; and HISS, D.C. The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. **Br. J. Haematol.**, v. 115, p.84-89, 2001.

MARGUERITE, M.; GALLISSOT, M.C.; DIAGNE, M.; MOREAU, C.; DIAKKHATE, M.M.; ROBERTS, M.; REMOUE, F.; THIAM, A.; DECAM, C.; ROGERIE, F.; COTTREZ, F.; NEYRINCK, J.L.; BUTTERWORTH, A.E.; STURROCK, R.F.; PIAU, J.P.; DAFF, B.; NIANG, M.; WOLOWCZUK, I.; RIVEAU, G.; AURIAULT, C. and CAPRON, A. Cellular immune responses of a Senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni*: correlations of infection level with age and inflammatory cytokine production by soluble egg antigen-specific cells. **Trop Med Int Health.**,v.4(8), p.530-543, Aug, 1999.

MARTINS, M.J.; PINTO-SILVA, R.A.; SERUFO, J.C.; RAYES, A.A.; DAMASCENO, M.P.; MARTINS, M.L.; SANTOS, A.P.; DRUMMOND, S.C.; BEZERRA, M.A. and LAMBERTUCCI, J.R. 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**, v.93, (Suppl 1), p.243-244, 1998.

MARTINS-FILHO, O.A. **Aspectos celulares da Esquistossomose Mansoniana humana, nas Fases Aguda e Crônica da Infecção:** Uma Análise Fenotípica. 1992. 135 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

MARTINS-FILHO, O.A.; DUTRA, W.O.; FREEMAN, G.L.; SILVEIRA A.M.; RABELLO, A.; COLLEY, D.G.; PRATA, A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. and CARVALHO-PARRA, J. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. **Scand J Immunol.**, v.46(3), p.304-311, Sep, 1997.

MARTINS-LEITE, P.; GAZZINELLI, G.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; GAZZINELLI, A.; MALAQUIAS, L.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. and SILVEIRA, A.M. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52(8), p.2780-2786, Aug, 2008.

McKEE A.S. and PEARCE E.J. CD25+CD4+ Cells Contribute to Th2 Polarization during Helminth Infection by Suppressing Th1 Response Development. **The Journal of Immunology**, v.173, p.1224–1231, 2004.

MDULUZA, T.; NDHLOVU, P.D.; MIDZI, N.; SCOTT, J.T.; MUTAPI, F.; MARY, C.; COUISSINIER-PARIS, P.; TURNER, C.M.; CHANDIWANA, S.K.; WOOLHOUSE, M.E.; DESSEIN, A.J. and HAGAN, P. Contrasting cellular responses in *Schistosoma haematobium* infected and exposed individuals from areas of high and low transmission in Zimbabwe. **Immunology Letters**, v.88, p.249-256, 2003.

MEDHAT, A.; SHEHATA, M.; BUCCI, K.; MOHAMED, S.; DIEF, A.D.; BADARY, S.; GALAL, H.; NAFEH, M. and KING, C.L. Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to *Schistosoma haematobium* adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. **J Infect Dis.**, v.178(2), p.512-519, Aug, 1998.

MELLMAN, I. and STEINMAN, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, p. 255-258, 2001.

MELTZER, E.; ARTOM, G.; MARVA, E.; ASSOUS, M.V.; RAHAV, G. and SCHWARTZ, E. Schistosomiasis among Travelers: New Aspects of an Old Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.11, 2006.

METWALI, A.; ELLIOTT, D.; BLUM, A.M.; J. SANDOR, Li.; LYNCH, M.R.; NOBEN, T. and WEINSTOCK, J.V. The granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni* does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. **J Immunol.**, v.157, p.4546–4553, 1996.

MOHAMED-ALI, Q.; ELWALI, N.E.M.A.; ABDELHAMEED, A.A.; MERGANI, A.; RAHOUD, S.; ELAGIB, K.E.; SAEED, O.K.; ABEL, L.; MAGZOUN, M.M.A. and DESSEIN, A.J. 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**, v.180, p. 1298-1306, 1999.

MOLA, P.W.; FARAH, I.O.; KARIUKI, T.M.; NYINDO, M.; BLANTON, R.E. and KING, C.L. Cytokine control of the granulomatous response in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of exposure and treatment. **Infect Immun.**, v.67(12), p.6565-6571 ,Dec, 1999.

MONTENEGRO, S.M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.G.; TEIXEIRA, K.M.; COUTINHO, E.M.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L.A.; SHER, A. and WYNN, T.A. 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.**, v. 179(6), p.1502-1514, 1999.

DE MORAIS, C.N.; RODRIGUES DE SOUZA, J.; GOMES DE MELO, W.; AROUCHA, M.L.; DOMINGUES, A.L.; WYNN, T.; ABATH, F.G. and MONTENEGRO, S.M. Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and interferon-gamma in human *Schistosomiasis mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, Suppl 1, p.113-114, 2002.

MOUKOKO, C.E.; EL-WALI, N.; SAEED, O.K.; MOHAMED-ALI, Q.; GAUDART, J.; DESSEIN, A.J. and CHEVILLARD, C. No evidence for a major effect of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in periportal fibrosis caused by *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun.**, v.71(10), p.5456- 5460, Oct, 2003.

MURPHY, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Immunology**, v.12, p. 593-633, 1994.

MUTAPI, F.; NDHLOVU, P.D.; HAGAN, P.; SPICER, J.T.; MDULUZA, T.; TURNER, C.M.R.; CHANDIWANA, S.K. and WOOLHOUSE, M.E.J. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.289-293, 1998.

MUTAPI, F.; WINBORN, G.; MIDZI, N.; TAYLOR, M.; MDULUZA, T. and MAIZELS, R.M. Cytokine responses to *Schistosoma haematobium* in a Zimbabwean population: contrasting profiles for IFN-g, IL-4, IL-5 and IL-10 with age. **BMC Infectious Diseases**, v.7, p.139, 2007.

MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KAMAU, T.; MBUGUA, G.G.; OUMA, J.H.; MUMO, J.; FULFORD, A.J.C.; JONES, F.M.; BUTTERWORTH, A.E.; ROBERTS, M.B. and DUNNE, D.W. High Levels of TNF, Soluble TNF Receptors, Soluble ICAM-1 and IFN-g, but Low Levels of IL-5, Are Associated with Hepatosplenic Disease in Human *Schistosomiasis Mansoni*. **The Journal of Immunology**, v.160, p.1992–1999, 1998.

NAUS, C.W.; BOOTH, M.; JONES, F.M.; KEMIJUMBI, J.; VENNERVALD, B.J.; KARIUKI, C.H.; OUMA, J.H.; KABATEREINE, N.B. and DUNNE, D.W. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. **Tropical Medicine International Health**, v.8 (6), p.561-568, 2003.

PEARCE, E.J. and MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews | Immunology**, v.2, p.499-511, Jul, 2002.

PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; MENTINK-KANE, M.M.; WILSON, M.S.; EL KASMI, K.C.; SMITH, A.M.; THOMPSON, R.W.; CHEEVER, A.W.; MURRAY, P.J. and WYNN, T.A. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS Pathog.**, v. 5(4), p.10371, Apr, 2009.

PHILLIPS, S.M. & LAMMIE, P.J. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. **Parasitol. Today** v.2, p.296–302, 1986.

POLI, G. Patogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. **Mol. Aspects Med.**, v.21, p.49-98 ,2000.

POULOS, J.E.; WEBER, J.D.; BELLEZZO, J.M.; DI BISCEGLIE, A.M.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; BALDASSARE, J.J. Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity, and transin gene expression in rat hepatic stellate cells. **Am J Physiol.** v.273, n.4, Pt 1, p.G804-811, Oct, 1997.

PRATA, A.; BINA, J.C.; BARRETO, A.C. and ALECRIM, M.G. Ensaio de controle da transmissão da esquistossomose pela oxaminiquine, em uma localidade hiperendêmica. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.22, (supl 4), p.182-185, 1980.

QIU, B.; FRAIT, K.A.; REICH, F.; KOMUNIECKI, E. and CHENSUE S.W. Chemokine Expression Dynamics in Mycobacterial (Type-1) and Schistosomal (Type-2) Antigen-Elicited Pulmonary Granuloma Formation. **Am J Pathol.**, v.158, p.1503–1515, 2001.

RAZIUDDIN, S.; MASIHUZZAMAN, M.; SHETTY, S. and IBRAHIM, A. Tumor necrosis factor alpha production in schistosomiasis with carcinoma of urinary bladder. **J. Clin. Immunol.**, v.13(1), p.23- 29, Jan, 1993.

REIMAN, R.M.; THOMPSON, R.W.; FENG, C.G.; HARI, D.; KNIGHT, R.; CHEEVER, A.W.; ROSENBERG, H.F. and WYNN, T.A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun.**, v.74(3), p.1471-1479, Mar, 2006.

REIMERT, C.L., FITZSIMMONS, C.M.; JOSEPH, S.; MWATHA, J.K.; JONES, F.M.; KIMANI, G.; HOFFMANN, K.F.; BOOTH, M.; KABATEREINE, N.B.; DUNNE, D.W. and VENNERVALD, B.J. 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**, v.13, p.584-593, 2006.

ROBERTS, M.; BUTTERWORTH, A.E.; KIMANI, G.; KAMAU, T.; FULFORD, A.J.; DUNNE, D.W.; OUMA, J.H. and STURROCK, R.F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Infect. Immun.**, v.61, p.4984–4993, 1993.

RUMBLEY, C.A.; SUGAYA, H.; ZEKAVAT, S.A.; EL REFAEI, M.; PERRIN, P.J. and PHILLIPS, S.M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol.**, v.162(2), p.1003-1009, Jan, 1999.

SCOTT, J.T.; TURNER, C.M.; MUTAPI, F.; WOOLHOUSE, M.E.; NDHLOVU, P.D. and HAGAN, P. Cytokine responses to mitogen and *Schistosoma haematobium* antigens are different in children with distinct infection histories. **Parasite Immunol.**, v.23(10), p.519-26, Oct, 2001.

SHEN, L.; ZHANG, Z.S.; WU, H.W.; WEIR, R.E.; XIE, Z.W.; HU, L.S.; CHEN, S.Z.; JI, M.J.; SU, C.; ZHANG, Y.; BICKLE, Q.D.; COUSENS, S.N.; TAYLOR, M.G. and WU, G.L. Down-regulation of specific antigen-driven cytokine production in a population with endemic *Schistosoma japonicum* infection. **Clin Exp Immunol.**, v.129, p.339–345, 2002.

SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; LAMBERTUCCI, J.R. and SERUFO, J.C.; RODRIGUES, V.Jr. Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v.11(3), p.627-30, May, 2004.

SILVA, L.M.; MENEZES, R.M.C.; OLIVEIRA, S.A. and ANDRADE, Z.A. Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36(3), p.335-341, 2003.

SILVEIRA, A.M.S.; BETHONY, J.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; GAZZINELLI, A.; KLOOS, H.; ALVARES, M.C.B.; PRATA, A.; GUERRA, H.L.; LOVERDE, P.T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. and GAZZINELLI, G. High levels of IgG4 to *S. mansoni* egg antigens are observed in individuals with periportal fibrosis. **Am.J. Trop. Med. Hyg.**, v.66(5), p.542-549, 2002.

SILVEIRA, A.M.S.; GAZZINELLI, G.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; BETHONY, J.; GAZZINELLI, A.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; ALVAREZ, M.C.; LIMA-SILVA, F.C.; PRATA, A.; LOVERDE, P.T. and CORREA-OLIVEIRA, R. 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.**, v.98(9), p.514-519, Sep, 2004.

SILVEIRA-LEMOES, D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; COSTA-SILVA, M.F.; MATOSO, L.F.; de SOUZA, L.J.; GAZZINELLI, A. and CORRÊA-OLIVEIRA, R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta Trop.**, v.108(2-3), p.150-159, Nov, 2008.

SINGH, K.P.; GERARD, H.C.; HUDSON, A.P. and BOROS, D.L. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. **Immunology**, v.111(3), p.343- 352, Mar, 2004.

SMART, S.J. & CASALE, T.B. Interleukin-8-induced transcellular neutrophil migration is facilitated by endothelial and pulmonary epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.9, p.489-495, 1993.

SOUZA, JR; MORAIS, C.N.L.; AROUCHA, M.L.; MIRANDA, P.J.C.; BARBOSA, C.S.; DOMINGUES, A.L.C.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; ABATH, F.G.C. and MONTENEGRO, S.M.L. Treatment of human acute schistosomiasis with oxamniquine induces an increase in interferon- response to *Schistosoma mansoni* antigens. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102(2), p.225-228, Mar, 2007.

TALAAT, R.M.; EL-BASSIOUNY, A.I.; OSMAN, A.M.; YOSSIF, M.; CHARMY, R. and Al-SHERBINY, M.M. Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in *S. mansoni*-infected Egyptian patients. **Parasitol Res.**, v.101, p.289-299, 2007.

TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A., ANDRADE, Z.A.; CUNHA-MELLO, J.R.; WILSON, R.A. and CORRÊA-OLIVEIRA, R. The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human *Schistosomiasis mansoni* infection. **Scand J Immunol.**, v.56, p.315-322, 2002.

TOURÉ, S.; ZHANG, Y.; BOSQUÉ-OLIVA, E.; KY, C.; OUEDRAOGO, A.; KOUKOUNARI, A.; GABRIELLI, A.F.; BERTRAND, S.; WEBSTER, J.P. and FENWICK, A. Two-year impact of single praziquantel treatment on infection in the national control programme on schistosomiasis in Burkina Faso. **Bull. World Health Organization**, n.86(10), p.780-787, Oct, 2008.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.**, v.3(2), p.133-146, Feb, 2003.

ULFMAN, L.H.; JOOSTEN, D.P.; VAN DER LINDEN, J.A.; LAMMERS, J.W.; ZWAGINGA, J.J. and KOENDERMAN, L. IL-8 induces a transient arrest of rolling eosinophils on human endothelial cells. **J Immunol.**, v.166(1), p.588-595, Jan, 2001.

VAN der BIGGELAAR, A.H.J.; BORRMANN, S.; KREMSNER, P. and YAZDANBAKHSH, M. Immune Responses Induced by Repeated Treatment Do Not Result in Protective Immunity to *Schistosoma haematobium*: Interleukin (IL)–5 and IL-10 Responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p.1474–1482, 2002.

VAN LIEMPT, E.; VAN VLIET, S.J.; ENGERING, A.; GARCIA-VALLEJO, J.J.; BANK, C.M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VAN KOOYK, Y. and VAN DIE, I. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. **Mol Immunol.**, v.44, p. 2605-2615, 2007.

VARIN, A. & GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology **Immunobiology**, Mar 3, 2009.

VIANA, I.R.C.; SHER, A.; CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; ELOI-SANTOS, S.M.; PEARCE, E.J.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G. and CORRÊA-OLIVEIRA, R. Interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.88, p.466-470, 1994.

VIANA, I.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; COLOSIMO, E.; COLLEY, D.G. and GAZZINELLI, G. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol.**, v.17(6), p.297-304, Jun, 1995.

WALTER, K.; FULFORD, A.J.C.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KARIUKI, H.C.; MWATA, J.K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N.B.; VENNERVALD, B.J.; OUMA, J.H. and DUNNE, D.W. Increase human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. **The Journal of Immunology**, v.177, p.5490- , 2006.

WEBSTER, M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, G.; VIANA, I. R. C.; OLIVEIRA-FRAGA, L. A.; SILVEIRA, M. A. S.; DUNNE, D. W. Factors Affecting High And Low Human IgE Responses To Schistosome Worm Antigens In An Area Of Brasil Endemic For *Schistosoma Mansoni* And Hookworm. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p.487-494, 1997.

WILKINS, M.A.; BLUMENTHAL, P.; HAGAN, P.; HAYES, R.J. and TULLOCH, S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.8, p.29-35, 1987.

WILLIAMS, M.E.; MONTENEGRO, S.; DOMINGUES, A.L.; WYNN, T.A.; TEIXEIRA, K.; MAHANTY, S.; COUTINHO, A. and SHER, A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **J Infect Dis.**, v.170(4), p.946-954, Oct, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis Control**. First report of the WHO Expert Committee. Geneva, 1985 (WHO Technical Report Series No. 728), 1985. Disponível em: <[www.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/social-context-schistosomiasis](http://www.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/social-context-schistosomiasis)> Acesso em 13. mai. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Meeting on ultrasonography in schistosomiasis. **Proposal for a practical guide to the standardized use of ultrasound in the assessment of pathological changes**. 1991. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/TDR\\_SCH\\_ULTRASON\\_91.3.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/TDR_SCH_ULTRASON_91.3.pdf)> Acesso em 13. mai. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **The control of schistosomiasis**. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, 1993. World Health Organization (WHO Technical Report Series No. 830), 1993. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)> Acesso em 13. mai. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control**. Geneva, December, 1998. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)>WHO/CDS/CPC/SIP/99.2 2-4. Acesso em 20. ago. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 912), 2002. Disponível em: <[www.who.int/entity/wormcontrol/documents/en/Controlling%20Helminths.pdf](http://www.who.int/entity/wormcontrol/documents/en/Controlling%20Helminths.pdf)>

WYNN, T.A. and CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, p.505–511, 1995.

WYNN, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nat Rev Immunol.**, v.4(8), p.583-94, Aug, 2004.

ZLOTNIK, A. and YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12(2), p.121-127, 2000.

ZWINGENBERGER, K.; HARMA, G.; FELDMIEIER, H.; MULLER, O.; STEINER, A. and BIENZLE, U. Liver involvement in human schistosomiasis mansoni. Regression of immunological and biochemical disease markers after specific treatment. **Acta Tropica**, v.45, p.263-275, 1988.

ZWINGENBERGER, K.; IRSCHICK, E.; SIQUEIRA-VERGETTI, J.G.; CORREIA-DACAL, A.R.; JANSSEN-ROSSECK, R.; BIENZLE, U.; HUBER, C. and FELDMIEIER, H. Release of interleukin-2 and Interferon-gamma by peripheral blood cells in human *S. mansoni* infection normalizes after chemotherapy. **Scand. J. Immunol.**, v.30, p.463–471, 1989.

ZWINGENBERGER, K.; IRSCHICK, E.; VERGUETTI-SIQUEIRA, J.G.; CORREIA-DACAL, A.R. and FELDMIEIER, H. Tumor necrosis factor in hepatosplenic schistosomiasis. **Scand J. Immunol.**, v.31, p.205-211, 1990.

ZWINGENBERGER, K.; HOHMANN, A.; CARDOSO-BRITO, M. and RITTER, M. Impaired balance of Interleukin-4 and Interferon- production in infections with *Schistosoma mansoni* and intestinal nematodes. **Scand. J. Immunol.**, v.34, p.243-251, 1991.



# 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](#)