UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ROBSON DA PAIXÃO DE SOUZA

FATORES IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI* EM UMA ÁREA ENDÊMICA DA BAHIA, BRASIL

Salvador, BA
2015

ROBSON DA PAIXÃO DE SOUZA

FATORES IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI* EM UMA ÁREA ENDÊMICA DA BAHIA, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Ilma Araújo
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira

Salvador, BA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S729 Souza, Robson da Paixão.

Fatores imunológicos associados a resistência a infecção pelo *Schistosoma mansoni* em uma área endêmica da Bahia, Brasil / Robson da Paixão de Souza. - Salvador, 2015.

147 f. ; il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2015.

1. Imunidade inata. 2. Suscetibilidade a Doenças. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Esquistossomose mansoni. 5. Citocinas. 6. Imunologia. I. Araujo, Maria Ilma Andrade Santos. II. Oliveira, Ricardo Riccio. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 577.27

Dedico este trabalho a Deus, meus pais, meus amigos e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para sua realização

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso.

A Profa. **Maria Ilma Araújo**, pessoa amada e meu grande exemplo de humildade e profissionalismo. Sou eternamente grato por toda a paciência, ensinamentos e carinho sempre disponíveis.

A Profa. **Leda Maria Alcântara** pela dedicação e contribuição em minha formação humana e profissional. Meus eternos agradecimentos.

A **Luciana Cardoso** e **Ricardo Riccio** pelo companheirismo, ensinamentos diários e imensurável auxilio na realização deste trabalho.

A **Diego Mota Lopes**, **Tarcísio Vila Verde** e **Jamille Fernandes** pela imensa ajuda durante todas as fases dos experimentos e pelas palavras de incentivo. Meus sinceros agradecimentos.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental – Fiocruz: **Kelvin Edson**, **Ane Caroline** e **Yuri Tabajara**.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios da Maternidade Climério de Oliveira e Hospital Couto Maia, pelo incentivo diário e ajuda sempre disponíveis.

Ao Professor **Edgar Marcelino** e aos queridos colegas e amigos do Serviço de Imunologia do HUPES. Obrigado pela acolhida e pela colaboração ao longo dessa jornada.

A comunidade do Conde – Bahia, pela generosidade e por ter permitido a realização deste estudo. Em especial as Agentes de Saúde: **Ada**, **Luciana** e **Aline**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia – PPGIm, pelo apoio e infraestrutura. Meus agradecimentos a todos os professores, pesquisadores e funcionários.

Aos meus pais **Jandira** e **Arivaldo** e demais familiares pelo amor incondicional, pelo carinho, educação e compreensão pelos momentos de ausência.

A **Rudval Souza** pelo incentivo e auxilio em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos, obrigado pelo carinho, confiança e pelas orações de vocês. Obrigado por sempre acreditarem em mim e pela compreensão nos momentos em que não me fiz presente!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”. (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A esquistossomose *mansoni* constitui importante infecção que impacta em aspectos socioeconômicos e de saúde pública. Cerca de 6 milhões de brasileiros estão infectados e destes 5 a 10% podem apresentar as formas mais graves da doença. Entretanto, o desenvolvimento de resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* representada por baixa carga parasitária em indivíduos residentes em áreas endêmicas, vem despertando bastante interesse e controvérsia. Através da citometria de fluxo, foram avaliados os perfis dos linfócitos T (CD4 e CD8) e linfócitos B (CD19), grau de ativação celular e produção de citocinas dos padrões de respostas Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-5) e regulatório (IL-10) em indivíduos com diferentes cargas parasitárias e a possível associação no desenvolvimento da resistência à infecção. Além disso, neste estudo foi avaliado a resposta imune dos indivíduios resistentes à infecção participação dos antígenos candidatos vacinais, SWAP, rSm29 e rSm22.6. Foi observado que os indivíduos com baixa carga parasitária apresentam padrão de resposta misto do tipo Th1, Th2 e regulatório. Aliado a isto, os indivíduos resistentes apresentaram maior expressão de moléculas coestimulatórias (CD28 e CTLA-4). Na avaliação das células de memória, os indivíduos com baixas cargas parasitárias apresentam maiores proporções de células memória TCD4^{+}. Por outro lado, sugere-se que a susceptibilidade à infecção e a esteja associada a uma possível exaustão do *pool* de células de memória central e aumento no compartimento de células de memória efetora. Contudo, não foram observadas diferenças significativas nos fenótipos das células T e B e também na produção de citocinas pelas CMSP após estímulo dos antígenos testados neste estudo.

Palavras-chave: Resistência. Susceptibilidade. *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. Perfil de citocinas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an important parasite infection that impacts on socio-economic and public health aspects. About 6 million Brazilians are infected and 5 to 10% may experience the most severe forms of the disease. However, the development of resistance to infection by *Schistosoma mansoni* represented by low parasite burden, in individuals living in endemic areas, is of considerable interest and controversy. Using flow cytometry method were evaluated the profile of T lymphocytes (CD4 and CD8) and B lymphocytes (CD19) and the degree of cellular activation and cytokine production of Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-5) and regulatory (IL-10) patterns in patients with different parasitic loads and possible association with the development of resistance to the infection. Moreover, in this study we evaluated the immune response of resistant individuals to the *Schistosoma* candidate vaccine antigens, SWAP, rSm29 and rSm22.6. It was observed that individuals with low parasite burden presented a mixed type of imune response, characterized by the Th1, Th2 and regulatory response. Added to this, the resistant individuals had a higher expression of costimulatory molecules (CD28 and CTLA-4). In relation to the memory cells, individuals with low parasitic loads had higher proportions of $CD4^+$ T memory cell. Therefore, it is suggest that susceptibility to infection is associated with a possible exhaustion of the main memory cell pool and increased of effector memory cells compartment. There was, however, no significant differences in the phenotypes of B and T cells and cytokine production by PBMC stimulated by the *S. mansoni* antigens used in this study.

Keywords: Resistance. Susceptibility. *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis *mansoni*; Cytokines profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – Caracterização das células de memória em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Figura 1. Fluxograma da estratégia de seleção dos indivíduos para o estudo. 49

Figura 2. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos através da expressão de CD4 e CD8 (B e C). Histograma representativo da classificação de células de memória TCD4 (D) e TCD8 (E) através da expressão de CCR7 e CD45RO.....53

Figura 3. Frequências de células TCD4+ e TCD8+ em CMSP de indivíduos com baixa e alta carga de *S. mansoni*, após adição dos antígenos SWAP, rSm22.6, rSm29. A barra horizontal representa o valor mediano.....57

Figura 4. Proporção de células T *naive* $CD4^+$ ($TCD4^+CD45RO^-CCR7^+$) e $CD8^+$ ($TCD8^+CD45RO^-CCR7^+$) nas culturas de CMSP estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6 (Figuras A e B, respectivamente). A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis).....58

Figura 5. Proporção de células T de memória (CD45RO+) $CD4^+$ e $CD8^+$ nas culturas de CMSP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6 (Figuras A e B, respectivamente). A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis).....59

Figura 6. Proporção de células T_{CM} ($TCD4^+CD45RO^+CCR7^+$; Figura A), células T_{EM} ($TCD4^+CD45RO^+CCR7^-$; Figura B) e células T_{EMRA} ($TCD4^+CD45RO^-CCR7^+$; Figura C), nas culturas de CMSP estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6, em indivíduos infectados pelo *S.mansoni* com alta e baixa cargas parasitárias. A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall – Wallis).....60

CAPÍTULO 2 – Perfil de linfócitos T e B em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Figura 1. Fluxograma da estratégia de seleção dos indivíduos para o estudo.....75

Figura 2. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos através da expressão de CD3 (B), classificação dos linfócitos quanto a expressão de CD4 e CD8 (C). Histograma representativo da expressão de citocinas Th1 e Th2 em TCD4 (D) e em TCD8 (E).....80

Figura 3. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos T através da expressão de CD4 e CD8 (B e C) e linfócitos B através da expressão de CD19 (D). Classificação dos linfócitos T quanto a expressão de CD25 em TCD4 e TCD8 (E e F) e linfócitos B quanto a expressão de CD5 (G). Histograma representativo da expressão de moléculas associadas ao perfil regulatório em TCD4 (H), TCD8 (I) e BCD19 (J).....82

Figura 4. Expressão das citocinas IFN-γ e IL-5 em linfócitos $TCD4^+$ (A e B, respectivamente) e $TCD8^+$ (C e D, respectivamente), através da Média de Intensidade de Fluorescência em culturas de CMSP de indivíduos com baixas e altas cargas *de S. mansoni*, após adição de SWAP, rSm29 e rSm22.6. A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*$p<0,05$; Teste de Kruskall-Wallis).....89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Caracterização das células de memória em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Tabela 1. Caracterização demográfica e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos selecionados para a avaliação da resposta imune.....55

Tabela 2. Perfil coproparasitológico dos indivíduos do estudo 56

CAPÍTULO 2 – Perfil dos linfócitos T e B em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Tabela 1. Caracterização demográfica e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos selecionados para a avaliação da resposta imune.....84

Tabela 2. Avaliação laboratorial dos indivíduos com diferentes cargas parasitárias para *Schistosoma mansoni.*.....86

Tabela 3. Expressão de CD28 em linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.....90

Tabela 4. Expressão de CTLA-4 em linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.....91

Tabela 5. Expressão de IL-10 e FoxP3 em linfócitos $TCD4^+$, $TCD8^+$ e B em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.....94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase Alcalina
ALT/TGP	Alanina Aminotransferase / Transaminase Glutâmico Pirúvica
AST/TGO	Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico Oxaloacética
BCR	Receptor de Células B
B_{REG}	Células B Regulatórias
BSA	Fração V de Albumina Bovina
CBA	Do Inglês “Citometry Bead Array”
CCL	Ligantes de Quimiocinas
CCR	Receptor de Quimiocinas
CD	Do Inglês “Cluster of Diferentiation”
CERC	Antígeno de Cercária
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CTL	Linfócito T Citotóxico
CTLA-4	Do Inglês “Citotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”
FASL	Ligante do receptor Fas
FOXP3	Fator de Transcrição da Família *Forkhead* Expresso Por Linfócitos T Reguladores
GGT/γGT	Gama Glutamiltransferase
GITR	Receptor de TNF Induzido Por Glicocorticóide
GlyCAM-1	Do Inglês “Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1”
GST	Glutationa S Transferase
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil)Piperazina-N'-2-Etanossulfónico
HEV	Vênulas do Endotélio Alto
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IL-	Interleucina
kDa	Kilodaltons

MAdCAM-1	Do Inglês “ Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1”
MHC II	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MyD88	Do Inglês “Myeloid Differentiation Factor 88”
OPG	Ovos por Grama
PAMPs	Padrão Molecular Associado a Patogénos
PAX-5	Do Inglês “Paired Box Protein”
PBS	Tampão Fosfato-Salina
RPMI	Do Inglês “Roswell Park Memorial Institute Medium”
SEA	Antígeno Solúvel do Ovo de *Schistosoma mansoni*
SWAP	Antígeno Solúvel do Verme Adulto do *Schistosoma mansoni*
T_{CM}	Células T de Memória Central
TCR	Receptor de Células T
T_{EM}	Células T de Memória Efetora
T_{EMRA}	Células T de Memória Efetora RA^+
Th	T Auxiliador (“Helper”)
TLR	Do Inglês “Toll-Like Receptor”
TPI	Triose Fosfato Isomerase
T_{REG}	Células T Regulatórias
TSDR	Do Inglês “T_{reg} Specific Demethylation Region”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... 18

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1*SCHISTOSOMA MANSONI* E ESQUISTOSSOMOSE – ASPECTOS GERAIS..... 20

2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA..... 21

2.3 IMUNOPATOGÊNESE DA ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA..... 22

2.4 FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA À INFECÇÃO/REINFECÇÃO PELO *S.MANSONI*..... 24

2.5 RESPOSTA IMUNE RELACIONADA À RESISTÊNCIA À INFECÇÃO/REINFECÇÃO PELO S. *MANSONI*..... 25

2.5.1 Resposta Imune Humoral 25

2.5.2 Resposta Imune Celular..... 28

2.6 FENÓTIPO CELULAR: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS E DE ATIVAÇÃO CELULAR..... 29

2.6.1 Moléculas coestimulatórias: **CD28**, **CTLA4 (CD152) e CD69 ..... 29**

2.6.2 Marcadores de Células de Memória: CD45R, CCR7, CD62L..... 30

2.6.3 Células T Regulatórias..... 33

2.6.4 Células B Regulatórias 35

2.7 ANTÍGENOS PARASITÁRIOS CANDIDATOS À VACINAÇÃO..... 38

2.8 HIPÓTESE..... 42

2.9 OBJETIVOS..... 43

2.9.1 Objetivo Geral..... 43

2.9.2 Objetivos Específicos..... 43

3 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS RESISTENTES À INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI.* 44

3.1 RESUMO..... 45

3.2 INTRODUÇÃO..... 46

3.3 MATERIAL E MÉTODOS 48

3.3.1 Área endêmica 48

3.3.2 Desenho de estudo e estratégia de seleção dos indivíduos 48

3.3.3 Avaliação da exposição à água contaminada 50

3.3.4 Obtenção dos antígenos de *Schistosoma mansoni* utilizados no estudo 51

3.3.5 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico 51

3.3.6 Avaliação do fenótipo das CMSP *ex vivo* 52

3.3.7 Análises estatística 53

3.3.8 Cálculo Amostral 54

3.4 CONSIDERAÇÃO ÉTICA 54

3.5 RESULTADOS 54

3.5.1 Características demográficas dos indivíduos e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos alocados no estudo 54

3.5.2 Avaliação coproparasitológica dos indivíduos alocados no estudo 55

3.5.3 Frequência de linfócitos TCD4$^+$ e TCD8$^+$ em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas de *S. mansoni*, após a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. 56

3.5.4 Células de memória TCD4$^+$, e não as células TCD8$^+$ estão associadas à resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* 58

3.5.5 Indivíduos com baixa carga parasitária apresentam maiores proporções de células TCD4$^+$ T_{CM} 59

3.5.6 Indivíduos com alta carga parasitária apresentam maiores proporções de células TCD4$^+$ de memória efetora quando comparados aos indivíduos resistentes 60

3.6 DISCUSSÃO 61

3.7 REFERÊNCIAS 66

4 CAPÍTULO 2: PERFIL DOS LINFÓCITOS T E B EM INDIVÍDUOS RESISTENTES À INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI* 70

4.1 RESUMO 71

4.2 INTRODUÇÃO 72

4.3 MATERIAL E MÉTODOS 74

4.3.1 Área endêmica 74

4.3.2 Estratégia de Seleção dos Indivíduos 74

4.3.3 Avaliação Hematológica e Bioquímica 76

4.3.4 Avaliação Coproparasitológica 77

4.3.5 Obtenção dos antígenos de *Schistosoma mansoni* 77

4.3.6 Obtenção de Células mononucleares de sangue periférico 78

4.3.7 Avaliação do fenótipo das CMSP *ex vivo* 78

4.3.8 Análise da expressão de citocinas intracelulares 79

4.3.9 Análises estatística 83

4.3.10 Consideração ética 83

4.4 RESULTADOS 84

4.4.1 Características demográficas e avaliação laboratorial 84

4.4.2 Frequência de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta carga de *Schistosoma mansoni*, após a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. 86

4.4.3 Baixa da carga parasitária está associada à alta produção de IFN-γ e IL-5 pelos linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ 87

4.4.4 Alta carga de *Schistosoma mansoni* está associada à diminuição da ativação de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) 89

4.4.5 A resistência à infecção está associada a um perfil de células T e B regulatórios 91

4.5 DISCUSSÃO 95

4.6 REFERÊNCIAS 103

5 CONCLUSÃO GERAL 109

6 REFERÊNCIAS 110

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ADULTO 127

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL / GUARDIÃO DE MENOR DE 18 ANOS DE IDADE 130

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLE SADIO 133

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO 136

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 144

ANEXO B – VALORES DE REFERÊNCIAS DOS EXAMES LABORATORIAIS.....147

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as doenças parasitárias, a esquistossomose assume o segundo lugar em termos de importância socioeconômica e de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. Acomete cerca de 240 milhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento, especialmente em áreas rurais e periurbanas e estima-se que cerca de 700 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de infecção em todo mundo (OMS, 2015). A esquistossomose compreende um grupo de doenças crônicas causadas por helmintos do gênero *Schistosoma*, sendo que a forma geniturinária da doença é causada pela espécie *Schistosoma haematobium* e as formas gastrointestinais e doença hepática pelas espécies *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma malayensis* e *Schistosoma japonicum* (LATIF et al., 2013; OMS, 2013; TCHUEM TCHUENTE et al., 2013).

Estima-se que cerca de 25 milhões de brasileiros estejam expostos à contaminação e que 2,5 a 6 milhões estejam infectados pelo *S. mansoni*. A doença é detectada em todas as regiões do país, onde a grande maioria dos casos ocorre nos estados das regiões Nordeste e Sudeste, consequência da presença dos moluscos transmissores nestas regiões. Os estados de Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia compreendem as áreas endêmicas mais importantes dentro das 19 unidades federativas acometidas pela esquistossomose *mansoni* (BRASIL, 2015).

Cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* evoluem para as formas graves da doença, caracterizada por fibrose hepática e hipertensão portal, ascite e varizes esofágicas e gástricas, que podem evoluir para hemorragias digestivas e até mesmo o óbito (BINA, 1997; HENRI et al., 2002; BINA & PRATA, 2003).

Em áreas endêmicas em esquistossomose em Minas Gerais tem sido demonstrado a ocorrência de indivíduos resistentes à reinfecção que apesar do

contato com a água contaminada apresentam baixa carga parasitária (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1992; VIANA et al., 1994). A resposta imune desses indivíduos caracteriza-se por um perfil misto de resposta imune, sendo tanto a resposta Th2 quanto a Th1 associadas à proteção. Não existem publicações sobre resistência à infecção/reinfecção em outras áreas endêmicas no Brasil.

O nosso grupo vem estudando a resposta imune na esquistossomose em várias áreas endêmicas na Bahia há cerca de 15 anos. Utilizando informações contidas em bancos de dados a respeito da área endêmica do Conde-BA, foram encontrados indivíduos daquela região que apesar de estarem expostos às fontes hídricas contaminadas locais, não são infectados ou apresentam baixas cargas parasitárias de *S. mansoni* (abaixo de 99 opg de fezes) em exames realizados em várias oportunidades. Esses indivíduos foram então denominados de resistentes à infecção/reinfecção. Pouco se sabe sobre a resposta imunológica desses indivíduos.

Neste trabalho o perfil da resposta imunológica específica para diferentes antígenos do *S. mansoni*, o fenótipo e o grau de ativação das células T e B foram avaliados. Esse estudo poderá contribuir para um melhor entendimento do papel das células T e B na resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* e poderá contribuir também na identificação de antígenos com capacidade protetora contra a infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *SCHISTOSOMA MANSONI* E ESQUISTOSSOMOSE – ASPECTOS GERAIS

A infecção pelo *S. mansoni* ocorre através da penetração das cercárias na pele, consequência da atividade lítica de suas glândulas e pela ação mecânica promovida pelos seus movimentos vibratórios intensos. Concomitante a esse processo ocorre à perda da cauda e, após a penetração, as larvas resultantes denominadas esquistossômulos, migram através dos tecidos subcutâneos penetram em vasos sanguíneos e são levadas passivamente da pele para os pulmões, pelo sistema vascular, via coração direito. A migração pela via sanguínea ocorre das arteríolas pulmonares e dos capilares alveolares às veias pulmonares, chegando ao coração esquerdo (ANDRADE, 2009).

Acompanhando o fluxo sanguíneo, os esquistossômulos que ganham o sistema porta intra-hepático se desenvolvem em vermes adultos, machos e fêmeas. Os vermes adultos migram, acasalados, para o território das veias mesentéricas inferiores onde fazem a ovoposição. Os ovos depositados aparecem nas fezes após passarem pelos tecidos da mucosa intestinal ou ganham a circulação porto-hepática e alcançam os espaços porta, levando à formação de granulomas, que são caracterizados pela reação inflamatória aos antígenos do ovo, seguida da produção de colágeno, podendo evoluir para um quadro de fibrose periportal hepática (WYNN & CHEEVER, 1995; ANDRADE, 2004; BAPTISTA & ANDRADE, 2005; WYNN, 2007; CALDAS et al., 2008; ANDRADE, 2009).

Seis a oito semanas após a primeira exposição ao *S. mansoni* inicia-se a fase aguda da doença também conhecida como síndrome toxêmica ou febre de Katayama (FARID et al., 1989; LAMBERTUCCI, 1993; LAMBERTUCCI et al., 1997; RABELLO et al., 1997; ROSS et al., 2007). Esta fase é caracterizada principalmente por febre, astenia, dor abdominal, diarréia e acentuada perda de peso.

A esquistossomose aguda está associada inicialmente a passagem dos esquistossômulos pelos pulmões e com a resposta imune ao verme adulto. Esta fase aguda sintomática é raramente observada em pessoas residentes em áreas endêmicas, sendo mais comum em indivíduos expostos pela primeira vez à infecção. Os autores sugerem que a modulação da resposta imune que ocorre nos indivíduos cronicamente infectados previne o aparecimento destas manifestações (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO, 1995; WYNN et al., 1998).

2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA

No início da infecção pelo *S. mansoni*, a pele constitui a primeira linha de defesa. Estudos em modelos murinos demonstram resposta inflamatória induzida pela passagem de esquistossômulos através da pele, resultando em infiltração da derme por recrutamento de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. A reação inflamatória no local da infecção desencadeia uma resposta de hipersensibilidade do tipo I com ativação de mastócitos e degranulação mediada por IgE (CALDAS et al., 2008; LICHTENBERGOVA et al., 2008).

A produção *in situ* de citocinas (IL-6, IL-12 e IL-10) e ligantes de quimiocinas (CCL-3, CCL-4 e CCL-11) são essenciais para a regulação da resposta imune inata aos esquistossômulos na pele. (MONTEFORT et al., 1998; JENKINS et al., 2005). Este reconhecimento pelo sistema imune inato culmina na indução de respostas pró e anti-inflamatórias, mediadas tanto pela IL-6 quanto a IL-10, respectivamente. Ambas as vias são dependentes de *Toll* - MyD88 (Fator de diferenciação mielóide 88). Alguns estudos sugerem a participação de diferentes receptores *Toll-like* (TLR) no reconhecimento antigênico dos diferentes ligantes derivados dos esquistossômulos, a exemplo do TLR-2, TLR-3 e TLR-4 (MONTEFORT et al., 1998; VAN DER KLEIJ et al., 2002; JENKINS et al., 2005).

A resposta imune adaptativa na fase inicial da infecção pelo *S. mansoni* é do tipo Th1, com produção de IFN-γ e também de citocinas proinflamatórias, a exemplo do TNF-α, IL-6 e IL-1 (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO, 1995; LAMBERTUCCI et al., 1997; WYNN et al., 1998; MONTENEGRO et al., 1999;

DE JESUS et al., 2002). Esta resposta pode estar associada ao controle da carga parasitária no pulmão e fígado através da ativação de macrófagos pelo IFN-γ e ativação de células T citotóxicas (CTL) (SMYTHIES et al., 1992; WYNN et al., 1994). A fase aguda é então modulada, de forma que na fase crônica a resposta é polarizada para o tipo Th2 e regulatória, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, com baixos níveis de IFN-γ (GAZZINELLI & COLLEY, 1992; WILLIAMS et al., 1994; ARAUJO et al., 1996; FINKELMAN et al., 1997; CORREA-OLIVEIRA et al., 1998). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 induzida por antígenos do ovo, a qual coincide com o início da ovoposição (GRZYCH et al., 1991; PEARCE et al., 1991; MONTENEGRO et al., 1999; SILVEIRA et al., 2004).

Além da dicotomia de respostas imunes Th1 *versus* Th2, recentes estudos, em modelos experimentais, mostram a co-existência da resposta inflamatória Th17 no acometimento das formas mais graves da doença esquistossomótica (RUTITZKY et al., 2005; RUTITZKY et al., 2008; TALLIMA et al., 2009).

2.3 IMUNOPATOGÊNESE DA ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA

Após a ovoposição, ocorre migração dos ovos para os diferentes tecidos, o que resulta em resposta inflamatória, caracterizada pela formação do granuloma esquistossomótico. Esta é uma estrutura altamente complexa que exerce importante papel na resposta imunológica ao helminto: os granulomas formados funcionam como barreiras que previnem a dispersão dos antígenos dos ovos do *S. mansoni* e a consequente lesão do parênquima hepático (ANDRADE, 2009). Porém, quando ocorre a deposição de grande número de ovos, o processo inflamatório pode evoluir para fibrose grave, o que leva à interrupção do fluxo sanguíneo normal do sistema venoso para os sinusóides resultando em hipertensão portal, hepatoesplenomegalia, formação de varizes esofágicas e gástricas que podem evoluir para hemorragia e óbito (CHEEVER & ANDRADE, 1967; BAPTISTA & ANDRADE, 2005; WYNN, 2007).

Os elementos importantes da gênese do granuloma representam uma interação entre as secreções do miracídio, que são eliminadas através dos microporos da casca do ovo e da resposta do hospedeiro. Estas secreções são

compostas por proteínas, enzimas proteolíticas, hidrolíticas e polissacarídeos (ANDRADE, 2009).

A formação do granuloma depende da participação dos elementos que compõe a resposta imune inata - macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células dendríticas e a resposta adquirida – linfócitos T, células B e plasmócitos (SADLER et al., 2003; ANTHONY et al., 2007; WYNN, 2008). Estudos em modelos experimentais demonstraram que durante os estágios iniciais de formação do granuloma periovular no fígado, este é grande, edematoso, rico em eosinófilos com presença de centros necróticos e periferia irregular. Nos granulomas mais antigos observam-se a deposição excessiva de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (MEC), causando fibrose periportal e progressiva oclusão das veias e evolução para tecido fibrótico (ANDRADE, 2009).

Outra peculiaridade do granuloma esquistossomótico é a indução de uma potente resposta do tipo Th2 que se sobrepõe a resposta Th1 observada nos períodos iniciais da infecção (PEARCE et al., 2004). Estas respostas são moduladas por mecanismos dependentes de IL-10, que são capazes de regular tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2, por meio da redução dos níveis de IFN-γ e IL-4, respectivamente, além de reduzir a capacidade proliferativa de linfócitos, diminuindo assim o tamanho dos granulomas, minimizando os danos teciduais provocados (FALCAO et al., 1998; HOFFMANN et al., 2000; PEARCE & MACDONALD 2002; SADLER et al., 2003; ANTHONY et al., 2007; HERBERT et al., 2008; BURKE et al., 2009).

Neste cenário, a imunorregulação mediada por IL-10 tem seu efeito incrementado pelo aumento do número de macrófagos alternativamente ativados (MAA) e de células T regulatórias (T_{reg}) que modulam a resposta inflamatória e lesão tecidual, prevenindo a progressão para as formas clínicas mais graves (ANTHONY et al., 2007).

Na fase crônica da esquistossomose são descritas três formas clínicas bem caracterizadas: as formas menos grave da doença, denominadas intestinal e hepatointestinal, e a forma mais grave denominada hepatoesplênica, que pode

ser classificada em compensada e descompensada (BINA 1997; BINA & PRATA, 2003). A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfologicamente pela fibrose hepática periportal, ou *pipestem*, descrita por Symmers (1904)

2.4 FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA À INFECÇÃO/REINFECÇÃO PELO *S. MANSONI*

Estudos realizados em áreas endêmicas em esquistossomose sugerem que existem alguns diferentes tipos de resistência à infecção. Dentre eles destacam-se a resistência relacionada à idade (BUTTERWORTH et al., 1987), resistência à reinfecção após terapia medicamentosa (BUTTERWORTH et al., 1985) e a resistência natural à infecção, independente de idade ou quimioterapia, ao qual os indíviduos resistentes são denominados “normais endêmicos” (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989).

A avaliação da influência da idade na proteção contra infecção demonstra que indivíduos até a segunda década de vida apresentam intensidade de infecção relativamente elevada, a qual vai reduzindo com o avanço da idade (BUTTERWORTH et al., 1987; GRYSEELS et al., 1994; NAUS et al., 1999). Independentemente do nível de exposição à água contaminada, o pico de infecção ocorre na infância e vai decrescendo com o passar dos anos (KABATEREINE et al., 1999). Existem relatos de que após os 60 anos de idade a infecção pode voltar a ter maior intensidade, fenômeno que deve estar diretamente relacionado à senescência da resposta imune (DE JESUS et al., 1993; FULFORD et al., 1998).

A resistência e susceptibilidade à reinfecção pelo *Schistosoma sp* após quimioterapia específica vêm sendo avaliada por alguns autores em indivíduos residentes em áreas endêmicas em esquistossomose (BUTTERWORTH et al., 1985; DUNNE & BICKLE, 1987; DESSEIN et al., 1988; CORREA-OLIVEIRA et al., 2000). Estes estudos têm demonstrado que a resistência à reinfecção após tratamento está relacionada também com a idade, sendo que a maior parte dos indivíduos de áreas endêmicas apresenta resistência após a segunda década de vida. Este tipo de resistência parece não estar relacionado com o nível de

exposição à água contaminada e tem sido atribuída à resposta imune do indivíduo, ao invés das alterações fisiológicas ou comportamentais observadas nas diferentes idades (STURROCK et al., 1976; BARBOUR, 1985; WILKINS et al., 1987).

A resistência natural, por sua vez, é observada em indivíduos que mesmo residindo em áreas endêmicas em esquistossomose e tendo contato com a água que alberga caramujos infectados, não adquirem a infecção. Esta resistência, parece ser independente da idade ou da terapia medicamentosa. Outras características peculiares a este grupo são repetidos exames parasitológicos de fezes negativos, presença de anticorpos anti-esquistossômulo no soro, resposta proliferativa de CMSP após estímulo *in vitro* com antígenos do *S. mansoni* e o relato de não terem sidos tratados para esquistossomose (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; VIANA et al., 1994).

De qualquer modo, considerando que o contato com a água contaminada é fator essencial para aquisição do parasito, faz-se necessário, em estudos que avaliem resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, a avaliação do comportamento da população, o que inclui o estudo do nível de exposição à água, o grau de contaminação das fontes hídricas freqüentadas pela população, e também a localização dessas fontes hídricas em relação aos locais de moradia da população.

2.5 RESPOSTA IMUNE RELACIONADA À RESISTÊNCIA À INFECÇÃO/REINFECÇÃO PELO S. *MANSONI*

2.5.1 Resposta Imune Humoral

A susceptibilidade à infecção/reinfecção parece não estar relacionada a falhas na resposta imune contra o *Schistosoma*, uma vez que todos os indivíduos infectados são hiper-responsivos aos antígenos parasitários (BUTTERWORTH et al., 1994). Entretanto, as composições dos isotipos de anticorpos dirigidos aos antígenos do parasito diferem entre os indivíduos. Como os diferentes isotipos de anticorpos possuem diferentes propriedades biológicas, incluindo a habilidade em mediar ou bloquear a morte do parasito através de uma

variedade de mecanismos, essa heterogeneidade de funções pode influenciar o resultado das infecções.

A resposta imune humoral é caracterizada pela maturação e mudanças de classe de anticorpos e, vários estudos demonstram que essa mudança é controlada pela atividade de algumas citocinas. Por analogia aos resultados obtidos em modelos experimentais, é possível que a produção de IgG2 esteja associada aos estímulos produzidos pelo IFN-γ secretado pelas células não-T (SIBER et al., 1980; SHACKELFORD et al., 1988). Em camundongos, foi demonstrado que antígenos polissacarídicos, predominantemente, estimulam a produção de anticorpos IgG3 na ausência de células T (PERLMUTTER et al., 1979). Antígenos do ovo de *S. mansoni* contêm antígenos T-independentes, que induzem a produção de IgG3 (MAZZA et al., 1990). Em humanos, a produção predominante de anticorpos estimulados por estes antígenos T-independentes é o IgG2, que é exclusivamente dirigido contra epítopos de carboidratos. Já o isotipo IgG1 parece estar restrito aos estímulos provocados por carboidratos (SCOTT et al., 1988). Em contraste com o IgG2, e talvez o IgG1, os anticorpos IgG4 exibem afinidades por epítopos peptídicos (LAL et al., 1991).

Alguns trabalhos demonstram que altos níveis de IgG2 dirigidos a antígenos do ovo do parasito estão associados com o subseqüente aumento na intensidade da reinfecção após o tratamento, ao passo que altos níveis de IgE dirigidos a antígenos dos diferentes estágios evolutivos do parasito estão diretamente relacionados com baixa intensidade de reinfecção (RIHET et al., 1991; DUNNE et al., 1992).

Juntamente com o IgE, altos níveis de IgG4 são produzidos durante infecções helmínticas (AURIAULT et al., 1990) através do estímulo das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (SPIEGELBERG et al., 1991; PUNNONEN et al., 1993; AKDIS et al., 1997) e estudos *in vitro* demonstraram a participação da IgE em diversos mecanismos imunológicos contra o *S. mansoni*, o que sugere que as respostas imunes IgE-dependentes estejam associadas aos mecanismos de proteção contra a esquistossome humana (CAPRON et al., 1999).

A avaliação sérica de anticorpos dirigidos a diferentes antígenos do *S. mansoni* em indivíduos residentes em aréas endêmicas demonstrou que a susceptibilidade a reinfecção pelo parasito após o tratamento, é atribuído a permanência dos anticorpos com atividades bloqueadoras IgM, IgG2 e IgG4 (KHALIFE et al., 1986; DUNNE et al., 1988; DUNNE et al., 1992). O IgG4 inibe a degranulação dos mastócitos através de resposta IgE-mediada e, estudos *in vitro*, demonstraram a inibição da morte de esquistossômulos pelos eosinófilos através de mecanismos IgG1 e IgG3-dependentes (KHALIFE et al., 1989). Corroborando com esse achado, Demeure e colaboradores (1993) demonstraram associação entre a elevada produção de IgG4 e IgG2 e a susceptibilidade a reinfecção pelo *S. mansoni* (DEMEURE et al., 1993). Outros estudos, mostraram que elevados níveis de anticorpos bloqueadores IgG4 (ISKANDER et al., 1981; GROGAN et al., 1996) e IgM (KHALIFE et al., 1986; DUNNE et al., 1988) contra antígenos do ovo correlacionam-se com susceptibilidade à reinfecção. Semelhantemente, estudos realizados por nosso grupo, no município de Conde-Ba, demonstraram que indivíduos susceptíveis apresentaram níveis mais elevados de IgG4 contra SWAP, rSm22.6 e SEA quando comparados aos indivíduos “normais endêmicos” (OLIVEIRA et al., 2012). Estes estudos sugerem que a imunidade protetora não depende dos níveis de IgE e IgG4 isoladamente, mas de um balanço favorável para a produção de IgE (HAGAN et al., 1991; DEMEURE et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 2012).

Trabalho realizado em indivíduos “normais endêmicos” demonstrou que este grupo apresentou níveis de IgE para antígenos do verme adulto semelhantes aos encontrados nos indivíduos susceptíveis a infecção e aos indivíduos que desenvolveram resistência após o tratamento (VIANA et al., 1995). Entretando, os indivíduos “normais endêmicos” apresentaram níveis de IgE anti-esquistossômulo superiores aos observados nos indivíduos infectados. Após o tratamento, observou-se que àqueles indivíduos que adquiriram resistência à reinfecção passaram a apresentar níveis elevados de anticorpos IgE dirigidos aos antígenos do tegumento presentes no esquistossômulos. Demonstrando que após o tratamento, àqueles indivíduos que adquirem resistência à infecção

apresentam respostas IgE dependentes, semelhante as observadas nos indivíduos normais endêmicos (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000).

Apesar dos anticorpos e principalmente o balanço IgE/IgG4 serem muito importantes para determinar susceptibilidade ou resistência à infecção/reinfecção, outros diferentes mecanismos, a exemplo da resposta imune celular, devem também participar deste processo (DESSEIN et al., 1988; GRZYCH et al., 1993).

2.5.2 Resposta Imune Celular

A resposta imune na fase crônica da esquistossomose *mansoni* é predominantemente do tipo Th2, com elevada produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Esse padrão de resposta resulta na mudança de isotipo de anticorpos, o que leva a produção de anticorpos IgE, além de eosinofilia, basofilia, produção de mucina e hiperreatividade das células da musculatura lisa intestinal. A despeito desta resposta participar da patogênese da doença, uma vez que o granuloma é eosinofílico e a evolução para fibrose hepática parece depender da IL-5 e principalmente da IL-13 (CHEEVER et al., 2000), a resposta Th2 participa também da proteção contra a infecção.

Trabalhos que avaliaram a proliferação de linfócitos frente a diferentes preparações antigênicas vêm demostrando distintas respostas associadas com a resistência ou susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni* (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000).

A resposta proliferativa observada em pacientes que se reinfectam após o tratamento diferem significativamente aos resultados observados nos indivíduos resistentes à reinfecção. A resistência à infecção/reinfecção tem sido associada a uma resposta predominantemente do tipo Th2, com presença de eosinofilia (HAGAN et al., 1985), IgE específica para o parasito (HAGAN et al., 1991; RIHET et al., 1991; DUNNE et al., 1992), e produção de IL-4 e IL-5 por CMSP estimuladas *in vitro* por antígenos do parasito (ROBERTS et al., 1993). De Jesus e colaboradores (1993) demonstraram que indivíduos resistentes à

reinfecção apresentaram resposta celular proliferativa, após o estímulo de antígenos do esquistossômulo e verme adulto (DE JESUS et al., 1993).

Além do perfil de citocinas produzidas pelas células dos indivíduos resistentes ou susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*, o fenótipo e o grau de ativação dessas células também devem participar do processo e vêm sendo avaliados em alguns estudos.

2.6 FENÓTIPO CELULAR: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS E DE ATIVAÇÃO CELULAR NA ESQUISTOSSOMOSE *MANSONI*

2.6.1 Moléculas coestimulatórias: CD28, CTLA4 (CD152) e CD69

A ativação das células T requer pelo menos dois sinais independentes. O primeiro é dado pela ligação do complexo peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ao receptor de células T e o segundo por um sinal coestimulador que é emitido pela ligação de moléculas B7 (B7.1 ou B7.2), presentes nas células apresentadoras de antígenos, com os seus receptores nas células T, a molécula CD28 (BRETSCHER & COHN, 1970).

Em células T virgens, CD28 é o único receptor para moléculas B7. Uma vez que as células T estejam ativadas, elas passam a exibir um receptor adicional, homólogo ao CD28, chamado CTLA-4 (WALUNAS et al., 1994). Este se liga às moléculas B7 com 10-20 vezes mais avidez (STAMPER et al., 2001) e, apesar de ser menos abundante que o CD28, emite um sinal inibitório à célula T ativada, limitando a quantidade de produção do fator de crescimento de células T, a IL-2 (MANDELBROT et al., 1999). Assim, a ligação de CTLA-4 às moléculas B7 é essencial para a limitação de resposta proliferativa das células T ativadas. Isso foi confirmado utilizando camundongos desprovidos do gene CTLA-4. Tais camundongos desenvolvem uma doença fatal caracterizada por massiva proliferação de linfócitos (COSTELLO et al., 1998). Alguns trabalhos também demonstraram que o uso de anticorpo anti-B7.2 tem efeitos similares, sugerindo que a interação CD28 com B7.2 é importante no desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2 relacionada à proteção contra a infecção pelo *S.*

mansoni (HAGAN et al., 1991; RIHET et al., 1991; DUNNE et al., 1992; TSUYUKI et al., 1997). Além disso, trabalhos em modelos experimentais mostraram que a co-estimulação pelo CD28 influencia no aumento da sensibilização do receptor de IL-4 (IL-4R) e o consequente incremento da resposta Th2 (KUBO et al., 1999). Aliado a isto, estudos *in vivo* vêm demonstrando que tanto as células de memória $TCD4^+$ quanto as células de memória $TCD8^+$ necessitam da coestimulação de CD28 para atingir sua expansão máxima e a consequente otimização na resposta protetora frente a uma reestimulação antigênica (BOESTEANU & KATSIKIS, 2009).

Outra molécula associada à ativação célular é o CD69, que constitui uma lecitina tipo C, encontrada em células T e B, macrófagos ativados e células NK (ALARI-PAHISSA et al., 2012). O CD69 é uma proteína de membrana tipo II expressa como homodímero constituído por subunidades fortemente glicosiladas. Após a estimulação dos receptores TCR e BCR, o CD69 é rapidamente expresso, sendo por isso considerado um marcador de ativação celular recente (ZIEGLER et al., 1993; TESTI et al., 1994). O papel exato desta molécula nas células ainda não foi totalmente esclarecido pois até o momento não se conhece um ligante específico para essa molécula. Porém alguns autores tem demonstrado a participação do CD69 na geração de células de memória (SHINODA et al., 2012).

Pouco se conhece sobre o papel da ativação das células T e B na resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*. E neste estudo, foram avaliadas a expressão dessas moléculas após estímulos com diferentes antígenos do *S. mansoni*, e sua participação no contexto da resistência a infecção/reinfecção na esquistossomose.

2.6.2 Marcadores de Células de Memória: CD45R, CCR7, CD62L

O sistema imune adaptativo é a peça chave para o desenvolvimento da imunidade adquirida. As respostas imunes mediadas por células T a um determinado antígeno, através de infecção natural ou vacinação, culminam na geração de células T de memória específicas, as quais podem persistir durantes anos ou até mesmo durante toda a vida de um indivíduo. O que

fornece a base para uma resposta eficiente, uma vez que estas células são hábeis para responderem rapidamente a um processo de re-estimulação antigênica (COULSON et al., 1993; GATTINONI et al., 2011) prevenindo ou reduzindo reinfecções (NAUSCH et al., 2012).

As células T de memória apresentam diferenças cruciais sobre vários aspectos e são convencionalmente divididas em células de memória central (T_{CM}) e células de memória efetoras (T_{EM}). As células T_{CM} migram preferencialmente para os linfonodos, onde representam uma importante reserva de linfócitos específicos para um determinado antígeno, podendo ser ativados rapidamente, proliferando e se diferenciando em células efetoras numa situação de reexposição antigênica. As células $T_{EM,}$ por sua vez, residem preferencialmente nas mucosas ou circulam no sangue, de ondem são recrutadas para sítios inflamatórios e rapidamente desencadeiam respostas efetoras que podem eliminar o antígeno (GATTINONI et al., 2011).

A classificação destes grupos celulares, leva em consideração a expressão de distintas isoformas de CD45R, que constitui um complexo de glicoproteínas transmembrana de alto peso molecular, com atividade tirosina fosfatase. É expresso em todas as células hematopoiéticas nucleadas, sendo a proteína mais abundante, abrangendo certa de 10% de toda a superfície celular (THOMAS, 1989). Se apresenta como várias isoformas, devido a *splicing* alternativos de três exons (4, 5 e 6, designados respectivamente A, B e C) no domínio extracelular, resultando em uma isoforma RABC (que inclui os três exons) e a RO estruturalmente menor, pela falta dos três exons. Estes três exons codificam vários sítios de O-glisosilação e são variavelmente modificados por ácido siálico. Consequentemente, estas isoformas variam em tamanho, forma e carga elétrica (HERMISTON et al., 2003).

Por processamento diferencial do mRNA, podem ser produzidas duas isoformas, CD45RA (200kDa) e CD45RO (180kDa). Com isso, demonstrou-se que células $TCD4^{+}$ virgens expressam CD45RA, ao passo que as células T_{CM} e T_{EM} expressam predominantemente CD45RO (CLEMENT, 1992). Essas células são hábeis para responderem rapidamente a reestimulação antigênica em novos desafios parasitários (COULSON & WILSON, 1993).

Outros marcadores de diferenciação de células de memória são associados com a expressão de moléculas coestimuladoras, a exemplo de CD27 e CD28, que fornecem sinais para ativação de células T. Além disso, a expressão de outras moléculas de superfície tem sido utilizada, também, na distinção entre células de memória e linfócitos T *naive* – CD62L e CCR7. Essas moléculas permitem a entrada dos linfócitos nos linfonodos através das vênulas endoteliais altas (HEV) (CAMPBELL et al., 1998).

O CD62L é uma L-selectina expressa nos leucócitos que se liga a porção carboidrato sialyl-Lewis sulfatado nas moléculas denominadas adressinas vasculares (CD34, GlyCAM-1 e MAdCAM-1), as quais são expressas na superfície das células endoteliais vasculares.

O CCR7 constitui o receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21 expressas nas HEV nos locais de entrada dos linfócitos para os linfonodos, portanto trata-se de uma molécula associada ao *homing* de células T em órgãos linfóides secundários, tais como os gânglios linfáticos, permitindo a diferenciação das células T em células efetoras com propriedades inflamatórias e/ou regulatórias (FORSTER et al., 2008; MOSCHOVAKIS & FORSTER, 2012).

As células T *naive* e células de memória podem ser identificadas pela expressão tanto de CD45RA quanto CD45RO (MICHIE et al., 1992). E, aliado a expressão fenotípica de CCR7 e CD62L, as células T humanas $CD45RO^+$ são divididas em duas subpopulações: células de memória central (T_{CM}) - $CD62L^+$ $CCR7^+$ e células de memória efetora (T_{EM}) - $CD62L^-$ $CCR7^-$ como (SALLUSTO, et al., 1999; GEGINAT, et al., 2003). Além disso, Geginat e colaboradores (2003) determinaram uma terceira subpopulação de linfócitos $TCD8^+$ de memória efetora humana, que possuíam alta expressão de CD57, marcador de células terminalmente diferenciadas, designando-as de células de memória efetora altamente diferenciadas ou células de memória efetora $CD45RA^+$ (T_{EMRA}) – $CD45RO^-$ $CCR7^-$ (GEGINAT et al., 2003).

Sob o ponto de vista funcional, as células de memória T_{CM} possuem capacidade de autorrenovação, secreção de IL-2 e pouca atividade efetora; as T_{EM} secretam IL-2 e IFN-γ e possuem atividade efetora imediata; as T_{EMRA} por

sua vez, secretam apenas IFN-γ, possuem potente atividade efetora e pequena capacidade de replicação (GEGINAT et al., 2003; HARARI et al., 2004).

Conforme revisado por Bourke e colaboradores (2012) as células $TCD4^+$ desempenham funções primordiais no processo de defesa contra reinfecções helmínticas incluindo a esquistossomose (BOURKE et al., 2012). Apesar das estratégias do desenvolvimento de vacinas se fundamentarem na indução das respostas efetoras pelas células $TCD4^+$ contra os parasitos, os mecanismos envolvidos nesse processo, ainda carecem de maiores elucidações (CAPRON et al., 2005; MCMANUS & LOUKAS, 2008; BETHONY et al., 2011), especialmente os eventos relacionados à diferenciação de células de memória $TCD4^+$ durante a constante estimulação antigênica observada nas infecções de curso crônico. Aliado, a reexposição antigênica durante os processos de reinfecções comumente observadas nas populações vulneráveis à infecções helmínticas. Essas características podem influenciar tanto no desenvolvimento natural de uma resposta adquirida, quanto na avaliação da eficácia e efeitos imunopatológicos observados em vacinas com antígenos de helmintos (BETHONY et al., 2011).

2.6.3 Células T Regulatórias

As células regulatórias (T_{reg}) constituem um subconjunto de células $TCD4^+$ importantes na regulação da resposta imune. As mais bem caracterizadas são definidas pela expressão do fator de transcrição FoxP3 e pela região desmetilada específica das células T_{reg} (TSDR) presente no *locus* FoxP3, necessária para a função de supressão exercida por estas células (BARON, et al., 2007). Outra função do FoxP3 é a possível ativação da transcrição dos genes da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), o antígeno-4 associado ao linfócito citotóxico (CTLA4) e do receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóides ($GITR^{high}$) que constituem marcadores fenotípicos das células T_{reg} (SAKAGUCHI, et al., 2010), além de apresentarem baixa expressão do receptor de IL-7Rα /CD127 (LIU, et al., 2006).

As células regulatórias podem ser divididas em células T_{reg} naturais (nT_{reg}) e células T_{reg} induzíveis (iT_{reg}). As células nT_{reg} são caracterizadas pela

expressão do Fator de transcrição FoxP3 e são recrutadas para os sítios inflamatórios após seleção tímica. As células iT_{reg} são $FoxP3^-$ e são desenvolvidas na periferia através da ativação apropriada de células efetoras (TAYLOR et al., 2006; WILSON et al., 2007). As iT_{reg} podem ser diferenciadas *in vitro* através do estímulo de citocinas e alguns medicamentos. Atualmente as iT_{reg} são classificadas em: secretoras de IL-10 (Tr1), secretoras de TGF-β (Th3). Coletivamente, as T_{reg} representam uma população de células supressoras profissionais, cuja função primordial é suprimir a resposta imune, prevenindo os seus efeitos deletérios (SHEVACH, 2002; SAKAGUCHI, 2005; HOEPPLI et al., 2015)

Além disso, as T_{regs} podem ser classificadas de acordo com a expressão da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25). Aquelas que não expressam a molécula CD25 ($TCD4^+CD25^-$) são consideradas não ativadas respondedoras. Àquelas que apresentam baixa expressão de CD25 ($TCD4^+CD25^+$), tem sido classificadas em $CD25^{low}$, linfócitos ativados, e as células com alta expressão de CD25 ($TCD4^+$ $CD25^{high}$) seriam as células regulatórias com alta capacidade supressora do sistema imune (BAECHER-ALLAN et al., 2001). O que faz dessas células foco de interesse em diversos campos da imunologia, sobretudo nas doenças infecciosas e parasitárias, especialmente na esquistossomose (HESSE et al., 2004; MCKEE & PEARCE, 2004; MELO & CARVALHO, 2009).

Estudos vem demonstrando que a IL-10 constitui a citocina chave no processo regulatório da imunopatogênese da esquistossomose. Esta citocina é produzida por inúmeros tipos celulares, incluindo linfócitos Th2, linfócitos T e B regulatórios, células T citotóxicas, mastócitos e células mononucleares fagocíticas. Porém, as fontes primárias desta citocina são os linfócitos T_{reg} além de monócitos e linfócitos B.

Hesse e colaboradores (2004) utilizando modelos de transferência adotiva em camundongos deficientes de IL-10/RAG-2, demonstraram a importância das células iT_{reg} como fonte de IL-10 e sua participação na regulação do balanço Th1/Th2 durante a infecção pelo *S. mansoni* (HESSE et al., 2004). Baumgart e colaboradores (2006), entretanto, demonstraram que células nT_{reg} são capazes de suprimir a expressão de citocinas Th1 e Th2 por mecanismos

independentes de IL-10. Estes estudos demonstraram que o recrutamento de células nT_{reg} e iT_{reg} estabilizam a resposta imune e limitam a patogenia hepática na esquistossome por mecanismos dependentes e independentes de IL-10 (HESSE et al., 2004; BAUMGART et al., 2006; WYNN, 2007).

Nos estágios iniciais da resposta granulomatosa, a IL-10 age suprimindo a produção de citocinas Th1, como o IFN-γ. Estudos de Hoffman e colaboradores (2000) demonstraram que a IL-10 é importante na prevenção dos efeitos deletérios provocados pela resposta Th2 exacerbada em camundongos deficientes em IL-10 (HOFFMANN et al., 2000). Outras funções promovidas por esta citocina estão relacionadas à sua atividade inibitória sobre a ativação de células T, produção de IgE, recrutamento de eosinófilos e a ativação de macrófagos. Nos macrófagos, age modulando sua atividade antimicrobiana, inibindo a atividade coestimulatória e a produção de citocinas proinflamatórias. A IL-10 também inibe a diferenciação de células dendríticas e suprime a produção de quimiocinas inflamatórias e citocinas dos padrões de resposta Th1 e Th2 (SHER et al., 1990; DEL PRETE et al., 1993; BORISH & STEINKE, 2003; BURKE et al., 2009).

Outros autores mostram a participação da IL-10 na inibição da histamina pelos mastócitos, prevenindo também processos alérgicos (ROYER et al., 2001) e modulação do granuloma *in vitro*, sugerindo que a ausência desta citocina em pacientes com hepatoesplenomegalia pode promover o desenvolvimento da forma grave da doença (FALCAO et al., 1998). No entanto, De Jesus e colaboradores (2004) demonstraram que indivíduos com fibrose periportal de grau III apresentaram níveis mais elevados de IL-10 quando comparados com indivíduos sem fibrose ou com os graus I e II de fribrose periportal (DE JESUS et al., 2004).

2.6.4 Células B Regulatórias

As células B desempenham diversas funções no sistema imune, podendo participar tanto de mecanismos protetores, quanto participar dos eventos fisiopatogênicos de diversas doenças (LUND & RANDALL, 2010). Estas células são caracterizadas pela expressão de CD19, um marcador de superfície

presente nos precursores das células comprometidas com a linhagem B. O CD19 constitui uma glicoproteína transmembrana envolvidas na sinalização celular. A expressão do CD19 é ativada através de seu fator de transcrição (PAX5) e está presente desde o estágio precursor pró-B tardio ($CD34^+CD10^+CD19^+$) até a diferenciação terminal em plasmócitos. Quando o receptor de células B (BCR) se liga ao epítopo do antígeno, sinais intracelulares são gerados por meio do CD19 que ativam a via de sinalização do fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e co-estimulam a resposta da célula B, intensificando a proliferação, diferenciação e produção de anticorpos (WEILAND et al., 2015, HARDY et al., 2007).

Outro marcador expresso em células B é o CD5, uma glicoproteína transmembrana que pertence à família dos receptores *scavenger* também expresso em linfócitos T (CERUTTI et al., 1996; GRINGHUIS et al., 1998; SINDHAVA & BONDADA, 2012). Sua expressão tem sido útil para distinguir as subpopulações de células B. Aquelas $CD5^+$ ($CD19^+CD5^+$) são classificadas em células B1 e as $CD5^-$ ($CD19^+CD5^-$) constituem as células B2 convencionais (NOH & LEE, 2011).

As células B1 surgem precocemente desde o desenvolvimento embrionário, e são abundantes nas cavidades peritoneal e pleural com capacidade de autorrenovação e repertório de receptor de antígenos menos diverso do que as células B2 convencionais. As células B2, por sua vez, tem origem no fígado fetal e sua população é mantida através de progenitores presentes na medula óssea por toda vida adulta, são capazes de gerar anticorpos hiper-mutados desempenhando importante papel nas respostas imunes humorais. Elas se desenvolvem na medula óssea e migram para o baço onde são chamadas de células B de transição (NOH & LEE, 2011). Através da interação entre os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e outros ligantes no BCR, o CD5 pode promover a secreção de IL-10 nas células B $CD5^+$ (SOLDEVILA et al., 2011).

No contexto da autoimunidade, as células B atuam em processos imunopatogênicos devido à produção de autoanticorpos que podem causar lesão órgão-específico ou podem ainda exercer efeito protetor onde os

autoanticorpos podem atuar na eliminação de células apoptóticas e *clearence* de autoantígenos (LANGHORNE et al., 1998; MASTROENI et al., 2000).

As células B também participam das respostas imunes mediadas por células T através da apresentação de antígenos, contribuindo para a ativação de células virgens e proliferação celular, além da atividade de células T autorreativas (RODRIGUEZ-PINTO & MORENO, 2005; YAN et al., 2006).

Adicionalmente, foi demonstrada a habilidade destas células na produção de diversas citocinas do padrão Th1 e Th2. Adicionalmente, foi demonstrado que além do papel bem definido na produção de anticorpos, as células B podem regular as respostas imunes aos diferentes antígenos através da produção de citocinas dos padrões Th1 e Th2. Esses mesmos autores demonstraram que as subpopulações de células B efetoras comprometidas com a produção de citocinas proinflamatórias TNF-α, IFN-γ e IL-12 são classificadas como B_e1, e que as células B efetoras do tipo 2 (B_e2) produzem IL-4 e IL-13 (HARRIS et al., 2000).

Recentemente, o conceito de células B regulatórias (B_{reg}) vem despertando novas estratégias de investigação no campo de imunorregulação. Estudos mostram a existência de subclasses distintas de células B que suprimem a progressão e melhoram a recuperação de sítios inflamatórios, por mecanismos que incluem a produção de IL-10 e TGF-β (MIZOGUCHI & BHAN, 2006). Outros autores demonstraram que as células B regulatórias desempenham um papel crucial durante a infecção pelo *S. mansoni*, quando foram observadas aumento na expressão de FasL e apoptose de células $TCD4^+$ ativadas (LUNDY & BOROS, 2002)

Além disso, alguns estudos vêm demonstrando o papel destas células durante o curso das infecções helmínticas. Trabalhos em modelos experimentais de esquistosomosse *mansoni*, demonstraram que a deficiência de células B promove um aumento na resposta granulomatosa Th2-dependente, fato também observado nos modelos FCγR-deficiente, indicando uma complexa relação entre a secreção de anticorpos e as células B (JANKOVIC et al., 1998). Em outros modelos de infecção, as células B também foram capazes de

regular negativamente a infiltração de neutrófilos e eliminação de parasitos intracelulares da *Leishmania* (SMELT et al., 2000).

Os antígenos helmínticos são potentes moduladores de doenças inflamatórias de curso crônico, e isso se deve em parte à capacidade de estimularem as células B_{reg} (SMITS et al., 2010). Corroborando com esta hipótese, alguns trabalhos demonstraram que células B_{reg} induzidas pelo *S. mansoni* foram capazes em atenuar doenças alérgicas por mecanismos dependentes de IL-10 (MANGAN et al., 2004; SMITS et al., 2007; AMU et al., 2010) e a infecção pelo *S. mansoni* promove a expansão de células B1 peritoneais e células B esplênicas, e os oligossacarídeos derivados do ovo induzem a proliferação de células B e produção de IL-10 (VELUPILLAI & HARN, 1994; VELUPILLAI et al., 1997). Além disso, em pacientes com esclerose múltipla o aumento na população de células B e IL-10, durante infecção helmíntica natural, teve como consequência uma menor gravidade da doença (CORREALE & FAREZ, 2007; FLEMING & FABRY, 2007; CORREALE et al., 2008).

Estes estudos sugerem que a indução das células B_{reg} pode representar um amplo mecanismo de modulação para infecções parasitárias e doenças crônicas. Porém os estudos que avaliam a participam dessas células no curso da infecção pelo *S. mansoni* em humanos ainda são escassos.

2.7 ANTÍGENOS PARASITÁRIOS CANDIDATOS À VACINAÇÃO

Muitos estudos sobre vacinação na esquistossomose levam em consideração a resposta imune contra antígenos do *S. mansoni* dos indivíduos “normais endêmicos”. Esta resposta difere significativamente da resposta dos cronicamente infectados ou dos que apresentam resistência à reinfecção após o tratamento medicamentoso (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; BAHIA-OLIVEIRA, GAZZINELLI et al., 1992; VIANA et al., 1994; VIANA et al., 1995). Indivíduos “normais endêmicos” apresentam níveis consideravelmente maiores de IgE anti-tegumento do esquistossômulo quando comparados com crônicos infectados (VIANA et al., 1995), enquanto que após quimioterapia específica os níveis destes anticorpos elevam-se apenas naqueles indivíduos que adquiriram resistência à reinfecção (CALDAS et al., 2000). Níveis de IgG anti-paramiosina

são também mais elevados dentre os normais endêmicos que nos indivíduos infectados e, assim como acontece com a IgE, existe também um aumento nos níveis deste anticorpo no soro dos que adquirem resistência à reinfecção após o tratamento (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989).

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos “normais endêmicos” além de proliferarem intensamente após estímulo *in vitro*, secretam também grande quantidade de IFN-γ, independente do antígeno utilizado, havendo, portanto, envolvimento tanto de uma resposta Th1 quanto Th2 associadas à proteção nesses indivíduos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1992; VIANA et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2012).

Os primeiros estudos sobre os indivíduos “normais endêmicos” avaliaram a resposta imune destes frente aos antígenos paramiosina, glutationa s-transferase (GST) (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989), antígeno solúvel de ovo (SEA), antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e antígeno de cercária (CERC) (VIANA et al., 1994).

A escolha do antígeno a ser avaliado nos indivíduos com possível resistência à infecção/reinfecção deve ser feita tendo em vista antígenos que estejam relacionados com proteção em modelos experimentais. Muitos destes antígenos já foram ou vêm sendo avaliados no desenvolvimento de vacinas para a esquistossomose. Em 2008, McManus e Loukas publicaram uma revisão que destaca os principais antígenos estudados como possíveis candidatos a vacinas, como a paramiosina, GST, TPI, Sm14, Sm23, Sm29 e a tetraspanina (MCMANUS & LOUKAS, 2008). Além destes, outro antígeno que vem sendo considerado na avaliação da resistência a infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*, é o antígeno recombinante rSm22.6 (DUNNE et al., 1992, OLIVEIRA et al., 2012).

No presente estudo, foram avaliadas as respostas imune ao SWAP e aos antígenos recombinantes rSm22.6 e rSm29. O antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) é preparado como sobrenadante solúvel em tampão salina, de acordo com metodologia descrita por Hirsch e colaboradores em 1996 (HIRSCH & GOES, 1996).

A proteína rSm22.6 é uma proteína solúvel do tegumento, presente em todos os estágios do ciclo do *S. mansoni*, exceto o ovo (JEFFS et al., 1991). Estudos com esta proteína mostram uma considerável homologia entre os antígenos de 22.6 kDa do *S. mansoni*, *S. haematobuim* e *S. japonicum* (FITZSIMMONS et al., 2004). É considerada o principal alvo da resposta de IgE nos modelos experimentais e humano de infecção pelo *S. mansoni* (SANTIAGO et al., 1998; LI et al., 2000; FITZSIMMONS et al., 2004). Esta produção de IgE específica para o rSm22.6 estaria relacionada a proteção contra a reinfecção pelo *Schistosoma* (DUNNE et al., 1992; WEBSTER et al., 1997). Estudos recentes em modelo experimental de imunização com a rSm22.6 mostram um perfil de resposta celular mista Th1/Th2, com indução de IFN-γ e IL-4, como também a produção de IL-10 (PACIFICO et al., 2006).

O antígeno recombinante rSm29 constitui, em sua forma nativa, uma glicoproteína de membrana do *S. mansoni*, presente no tegumento do esquitossômulo e do verme adulto. Os estudos sobre a resposta imune desenvolvida por esta proteína em modelos experimentais sugerem que a imunização por este antígeno induz uma resposta do tipo Th1 caracterizada por altos níveis de IFN-γ e baixos níveis de IL-4, além da redução em 51% da carga parasitárias nesses animais (CARDOSO et al., 2008). Em humanos, a análise de anticorpos anti-rSm29, de indivíduos residentes em áreas endêmicas, demonstrou altos níveis de IgG1 e IgG3 nos indivíduos resistentes à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* quando comparados com os indivíduos susceptíveis. Alguns estudos estão avaliando o papel deste antígeno como potencial candidato a vacina (CARDOSO et al., 2006; CARDOSO et al., 2008).

Visto que a produção destes anticorpos está associada ao processo de opsonização, citotoxicidade celular associada a anticorpos (ADCC) e ativação da via clássica de complemento.

O entendimento sobre a interação entre a infecção pelos helmintos e as respostas imunológicas do hospedeiro é de suma importância no desenvolvimento de vacinas contra o *Schistosoma spp* e outros helmintos. Alguns autores têm demonstrado que os helmintos são capazes de modular as respostas imunes adaptativas através de mecanismos de escape (GRAINGER

et al., 2010; HARNETT & HARNETT, 2010; GRAINGER et al., 2010; HARNETT & HARNETT, 2010). Além disso, estudos em humanos mostram que a eficácia da vacina é reduzida naqueles indivíduos infectados por helmintos, fenômeno que pode estar relacionado ao desenvolvimento de respostas regulatórias (LABEAUD et al., 2009), ou uma possível incapacidade do organismo desenvolver de forma eficaz respostas de memória conforme demonstrado por Steel e cols (2011) em estudos com indivíduos infectados por *Wuchereria bancrofti* (STEEL & NUTMAN, 2011).

Na esquistossomose, várias estratégias de imunização com diferentes antígenos do parasito vêm sendo desenvolvidas e os resultados mais promissores tem demonstrado a participação das células de memórias neste contexto de proteção ou diminuição dos danos tissulares, provocados pela presença do parasito (ESPINDOLA et al., 2014; ALVES et al., 2015). Em estudos realizados em humanos, Nausch e colaboradores (2014) demonstraram que a infecção pelo *S. haematobium* está associada a diminuição do *pool* de células de memória efetoras $TCD4^+$ nos indivíduos infectados quando comparados ao grupo de indivíduos não infectados, porém esse achado ainda carece de maiores elucidações (NAUSCH et al., 2012).

Entretanto, a caracterização das células de memórias $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em indivíduos resistentes e susceptíveis à infecção/reinfecção pelo *Schistosoma mansoni* ainda são bastante limitados. Deste modo, no presente estudo, além da avaliação do perfil regulatório das células T e B frente aos antígenos do *S. mansoni*, foi também avaliado a caracterização fenotípica e proporção das células de memória em indivíduos com diferentes cargas parasitárias, uma vez que as células de memória devem ser fundamentais nas respostas aos novos contatos com o parasito e devem definir a evolução ou curso da infecção/reinfecção.

2.8 HIPÓTESE

A resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* em indivíduos residentes em áreas endêmicas em esquistossomose está associada a resposta imune aos antígenos parasitários, com ativação de células de memória e uma baixa frequência de células e citocinas regulatórias.

2.9 OBJETIVOS

2.9.1 Objetivo Geral

Avaliar, em uma área endêmica em esquistossomose na Bahia, o perfil de resposta imune de indivíduos resistentes à infecção pelo *S. mansoni* frente a determinados antígenos do parasito, bem como os fatores e ambientais neste grupo de indivíduos.

2.9.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar os parâmetros idade, gênero, grau de exposição à água contaminada, histórico de tratamento e parâmetros laboratoriais dos indivíduos resistentes à infecção pelo *S. mansoni*.
- ✓ Avaliar o fenótipo e o grau de ativação das células T (CD4, CD8, CD25, CD28, CD45RO, CCR7, CTLA-4, FoxP3 e IL-10) e células B (FoxP3, CD19, CD5, CD69)
- ✓ Identificar marcadores imunológicos associados à resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* tais como: níveis de citocinas intracelulares em células T $CD4^+$, T $CD8^+$ (IL-5, IFN-γ e IL-10) e células B (IL-10), após estímulo *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6

3 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS RESISTENTES À INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Caracterização das Células de Memória em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Robson da Paixão de Souza[1,2], Maria Ilma Araújo[3,5], Diego Mota Lopes[1,2], Tarcisio Vila Verde Santana de Almeida[1,2], Jamille Souza Fernandes[1,2], Ricardo Riccio Oliveira[1,6], Edgar M. Carvalho [2,6], Luciana Santos Cardoso[1,2,4]

[1] Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil

[2] Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, Canela, 40.110-160, Salvador, BA, Brasil

[3] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT-CNPQ/MCT), Rua João das Botas s/n, Canela, 40.110-160 Salvador, BA, Brasil

[4] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Avenida Adhemar de Barros s/n, Ondina, 40.170-970 Salvador, BA, Brasil

[5] Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Frei Henrique No. 08, Nazaré, 40.050-420 Salvador, BA, Brasil

[6] FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão No. 121, Candeal, 40296-710 Salvador, BA, Brasil

Autor correspondente: Luciana Santos Cardoso, Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, Canela, 40.110-160, Salvador, BA, Brasil. E-mail: lucianac@ufba.br

3.1 RESUMO

As células de memória representam importante componente da resposta imune adaptativa. Após contato com antígenos específicos, estas se diferenciam e expandem em duas populações, células de memória central e efetora, importantes no desenvolvimento da resposta imune protetora. O papel destas células na proteção contra infecção parasitária não está bem determinado. Através de citometria de fluxo, foi avaliado pela primeira vez em humanos, a caracterização fenotípica e a proporção das células T de memória em indivíduos resistentes e susceptíveis à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, residentes em uma área endêmica. Neste estudo, os indivíduos resistentes apresentaram aumento no *pool* de células de memória $TCD4^+$, associado a um aumento do compartimento de células de memória central (T_{CM}) e diminuição do *pool* de células de memória efetora (T_{EM}). Entretanto, não foram observadas diferenças nas frequências de células de memória $TCD8^+$. Os indivíduos susceptíveis à infecção apresentaram maiores frequências de células de memória efetora quando comparados aos indivíduos resistentes. Não foram observadas, entretanto, diferenças significativas nas frequências de células de memória efetoras altamente diferenciadas (T_{EMRA}) entre os dois grupos. Esses dados indicam que a resistência a infecção pelo *S. mansoni* pode estar associada a um aumento do numero de células $TCD4^+$ de memória ($CD45RO^+$) e, que a susceptibilidade a infecção está associada a uma diminuição no compartimento de células de memória central e altas proporções de células de memória efetora.

3.2 INTRODUÇÃO

A esquistossomose assume o segundo lugar em termos de importância socioeconômica e de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. Acomete cerca de 240 milhões de pessoas no mundo, especialmente em áreas rurais e periurbanas e estima-se que cerca de 700 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de infecção em todo mundo (OMS, 2015a). No Brasil, cerca de 25 milhões de indivíduos estão expostos a contaminação e acredita-se que aproximadamente 6 milhões estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni*, única espécie encontrada em nosso meio (BRASIL, 2015).

Alguns estudos demonstraram que a resistência natural a infecção pelo *S. mansoni* envolve tanto a resposta do tipo Th1 quanto a Th2, além de baixos níveis de IgG4 contra antígenos parasitários (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012), já na resistência a reinfecção após tratamento antiparasitário, a resposta Th2 com a participação de IgE específica, em detrimento da produção de IgG4 (DUNNE et al., 1992; FIGUEREDO et al., 2012) e produção de IL-4 e IL-5 frente à antígenos parasitários (ROBERTS et al., 1993) tem sido relacionada à proteção.

Conforme revisado por Bourke e colaboradores (2012) as células $TCD4^+$ desempenham funções primordiais no processo de defesa contra reinfecções helmínticas incluindo a esquistossomose (BOURKE et al., 2012). Apesar das estratégias do desenvolvimento de vacinas se fundamentarem na indução das respostas efetoras pelas células $TCD4^+$ contra os parasitos, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda carecem de maiores elucidações (CAPRON et al., 2005; MCMANUS & LOUKAS, 2008; BETHONY et al., 2011). Certamente, os eventos relacionados à diferenciação de células de memória $TCD4^+$ e $TCD8^+$ durante a constante estimulação antigênica observada nas infecções helmínticas devem influenciar na susceptibilidade ou resistência a novas infecções, principalmente nos casos dos indivíduos residentes em áreas endêmicas de *S. mansoni,* os quais estão constantemente reexpostos ao parasito em consequência do contato com fontes hídricas contaminadas.

As respostas imunes mediadas por células T a um determinado antígeno, através de infecção natural ou vacinação, culminam na geração de células T de memória específicas, estas podem persistir durantes anos ou até mesmo durante toda a vida do indivíduo culminando para uma resposta eficiente, uma vez que as células de memória respondem rapidamente a processos de reestimulação antigênica (COULSON et al., 1993; GATTINONI et al., 2011). Desse modo, a geração de células de memória específica pode atuar na prevenção de reinfecções (NAUSCH et al., 2012).

As células T de memória são convencionalmente divididas em subtipos, sendo as células de memória central (T_{CM}), as que migram preferencialmente para os linfonodos, onde representam importante reserva de linfócitos específicos para um determinado antígeno. Quando estimuladas, estas células podem ser ativadas rapidamente, proliferando e diferenciando-se em células efetoras numa situação de reexposição antigênica. Por outro lado, as células de memória efetora (T_{EM}) residem preferencialmente nas mucosas ou circulam no sangue, de ondem são recrutadas para sítios inflamatórios e rapidamente desencadeiam respostas efetoras que podem eliminar o antígeno (GATTINONI et al., 2011). A classificação destes grupos celulares leva em consideração a expressão de distintas isoformas da molécula CD45R, que constitui um complexo de glicoproteínas transmembrana de alto peso molecular, com atividade tirosina fosfatase (THOMAS, 1989).

As células T *naive* e células de memória podem ser identificadas pela expressão tanto de CD45RA quanto CD45RO (MICHIE et al., 1992). Aliado a expressão fenotípica de CCR7, que constitue um receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21 associada ao *homing* de células T em órgãos linfóides secundários (FORSTER et al., 2008; MOSCHOVAKIS & FORSTER, 2012) as células de mémoria sãodivididas nas subpopulações: $CD45RO^{-}CCR7^{+}$ células T *naive*, $CD45RO^{+}CCR7^{+}$ células de memória central (T_{CM}) e $CD45RO^{+}CCR7^{-}$ células de memória efetora (T_{EM}) (SALLUSTO et al., 1999; GEGINAT et al., 2003). Em estudos com células $TCD8^{+}$, Geginat e colaboradores (2003) determinaram uma nova subpopulação de linfócitos de memória humana, designando-as de células de memória efetora altamente diferenciadas (T_{EMRA}) – $CD45RA^{-}CCR7^{-}$ (GEGINAT et al., 2003).

O conhecimento sobre o papel das células de memória advém de estudos de infecção viral crônica ou parasitos intracelulares (GOLLOB et al., 2005; BUSTAMANTE et al., 2008) existindo, porém, poucos trabalhos a respeito do papel das células de memória no contexto das infeções por parasitos extracelulares e em especial por helmintos. O objetivo deste estudo, é avaliar o perfil fenotípico dos linfócitos de memória em indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *S. mansoni*. Até o momento, não existem dados publicados a respeito da participação das células de memória $TCD4^+$ e $TCD8^+$ no contexto da resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Área endêmica

Neste estudo, foram avaliados indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, coinfectados ou não por outros helmintos, residentes no município de Conde, Bahia, localizado no Litoral Norte, a cerca de 180 Km da capital Salvador. A população local é constituída por cerca de 1000 habitantes que se distribuem nos vilarejos de Sempre Viva, Camarões, Jenipapo e Buri. As condições sanitárias da região são precárias, colocando os moradores sob alto risco de infecções parasitárias. A principal fonte de renda é a pesca, e a água do rio também é utilizada para realização de afazeres domésticos e lazer, expondo a população à infecção pelo *S. mansoni*.

3.3.2 Desenho de estudo e estratégia de seleção dos indivíduos

A seleção dos indivíduos com baixa carga parasitária, denominados neste estudo como resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, foi realizada utilizando-se Bancos de Dados (BD) gerados durante os anos de 2010, 2008 e 2004, contendo informações sobre sexo, idade, carga parasitária, grau de exposição à água contaminada, período de permanência na área endêmica e histórico de tratamento com praziquantel. Toda a avaliação parasitológica dos estudos realizados nesta área, utilizou a técnica quantitativa de Kato-Katz. A carga parasitária para *S. mansoni*, foi estabelecida através da determinação do número de ovos por grama de fezes, levando-se em consideração os critérios

estabelecidos pela OMS: infecção leve – 0 a 99 opg de fezes; infecção moderada 100 a 399 opg de fezes e infecção intensa ≥ 400 opg de fezes (KATZ et al., 1970; OMS, 2015b). Neste estudo foi considerado alta carga parasitária valores iguais ou superiores a 200 opg de fezes.

Foram selecionados como resistentes a infecção os indivíduos com baixa carga parasitária (≤ 99 opg de fezes), que preencheram os seguintes critérios: idade entre 10 – 65 anos, ambos os sexos, algum contato com a água contaminada e que residiram na região por pelo menos 11 meses durante os inquéritos realizados em 2010, 2008 e 2004.

A estratégia para a seleção desses indivíduos com baixa carga parasitária foi realizada inicialmente com informações contidas no BD de 2010, que havia 850 indivíduos. Destes, foram selecionados 335 indivíduos com baixa carga parasitária e algum contato com a água contaminada. Posteriormente, estes indivíduos foram reavaliados com os mesmos critérios através do BD de 2008, no qual 122, dos 335 indivíduos, preencheram os critérios estabelecidos. Com base nas informações obtidas em 2004, dos 122 indivíduos selecionados anteriormente, 45 foram classificados como resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, Figura 1.

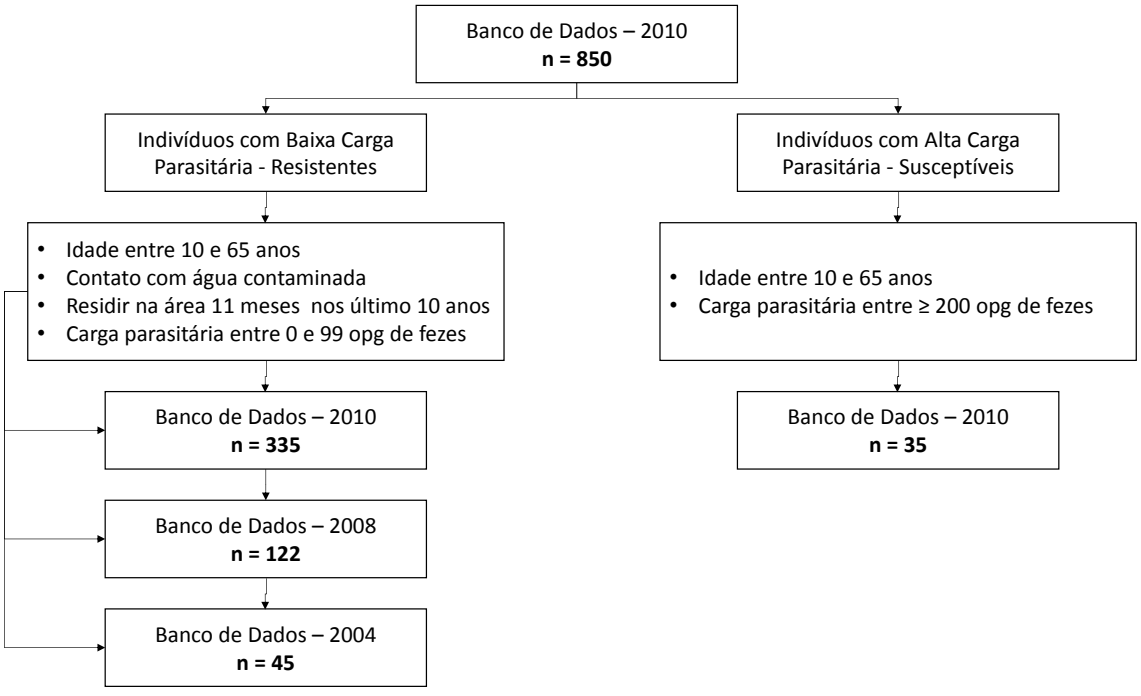

Figura 1. Fluxograma da estratégia de seleção dos indivíduos para o estudo.

Foram considerados susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni* aqueles indivíduos residentes na área endêmica, de ambos os sexos, com idade entre 10 e 65 anos, que apresentaram alta carga parasitária (≥ 200 opg de fezes), durante o levantamento coproparasitológico realizado em 2010. Nessa etapa foram selecionados 39 indivíduos com alta carga parasitária (≥ 200 opg de fezes), denominados neste estudo como susceptíveis.

Todos os indivíduos selecionados, foram então submetidos a nova avaliação coproparasitológica entre 2013 e 2014 para confirmação da resistência/susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. Foram examinadas duas amostras de fezes de cada participante e analisadas duas lâminas de cada amostra (KATZ et al., 1970).

A partir daí foram selecionados randomicamente 20 indivíduos classificados como resistentes à infecção e 16 indivíduos susceptíveis para a avaliação da resposta imune. Adicionalmente, foram inseridos no estudo 05 indivíduos sem infecção helmíntica, de ambos os sexos, sorologia negativa para os antígenos do *S. mansoni* (SWAP e SEA) e que nunca residiram em áreas endêmicas para esquistossomose, para comporem o grupo de controles sadios.

Todos os indivíduos avaliados foram negativos para HIV 1 e 2, HTLV I e II e para Hepatites B e C.

3.3.3 Avaliação da exposição à água contaminada

A avaliação da exposição à água contaminada dos rios da região foi realizada através de questionários específicos aplicados na região (APÊNDICE D). Este questionário foi elaborado baseado em observações e estudos prévios realizados na mesma região, levando-se em consideração hábitos e costumes locais, fornecendo três categorias de exposição à água contaminada: Baixa exposição (< de 1 hora/semana); média exposição (1-3 horas/semana) e alta exposição (1-3 horas por dia) (DESSEIN et al., 1988).

3.3.4 Obtenção dos antígenos de *Schistosoma mansoni* utilizados no estudo

No presente estudo, foram avaliadas as respostas imune de indivíduos com diferentes cargas parasitárias frente aos estímulos dos antígenos SWAP, rSm22.6 e rSm29.

O SWAP é o antígeno do verme adulto preparado como sobrenadante solúvel em tampão salina, de acordo com metodologia descrita por Hirsch e colaboradores em 1996 (HIRSCH & GOES 1996). A proteína recombinante rSm22.6 é uma proteína solúvel do tegumento, presente em todos os estágios do ciclo do *S. mansoni*, exceto o ovo (JEFFS et al., 1991). O antígeno recombinante rSm29 constitui em sua forma nativa uma glicoproteína de membrana do *S. mansoni*, presente no esquistossômulo e no verme adulto (CARDOSO et al., 2008). Estes antígenos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Oliveira e Dr. Alfredo Goes, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.3.5 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

Cerca de 30mL de sangue periférico foram coletados dos participantes do estudo e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas a concentração de 3 x 10^5 células/mL em meio de RPMI 1640, contendo 10% de soro humano (AB positivo e inativado), 100 U/mL estreptomicina 100mg/mL, L-glutamina 2mM, 30 mM HEPES (Life Technologies GIBCO, BRL, Gaithersburg, MS). Posteriormente, foram incubadas 3 x 10^5 células/poço em placa de 96 poços com fundo em “U”, para realizar a avaliação da expressão de moléculas de superfície, CD4, CD8, CD45RO e CCR7. Para cada indivíduo foram realizadas 03 culturas estimuladas com 10µg/mL dos antígenos de *S. mansoni* (SWAP, rSm29 e rSm22.6, respectivamente). As células desses indivíduos também foram cultivadas na ausência de estímulos. Todas as culturas foram incubadas a 37°C por 16h, a uma atmosfera 5% de CO_2.

3.3.6 Avaliação do fenótipo das CMSP *ex vivo*

Após a incubação, as células foram marcadas com 20µL de solução contendo os anticorpos fluorocromo-conjugados específicos CD4 (anti-CD4 PerCP-Cy5.5, clone RPA-T4; e-Bioscience), CD8 (anti-CD8 Pe-Cy7, clone SK1; e-Bioscience), CD45RO (anti-CD45RO PE, clone UCHL1; e-Bioscience) e CCR7 (anti-CCR7 APC, clone 3D12; e-Bioscience). As placas foram incubadas protegidas da luz por 20 min a 4°C. Foram realizadas três lavagens sucessivas utilizando-se PBS 1x e solução de lavagem (PBS 1x, azida 1M e BSA) para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal, seguido de ressuspensão das células em 100µL de PBS 1x e 100µL de formaldeído a 2%. As placas foram mantidas a 4°C protegidas da luz até o momento da aquisição no equipamento FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA).

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência de expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa *FlowJo* (Tree Star). As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, procedeu-se a seleção das populações de linfócitos por janelas nesta população. Foi então delimitada a região específica correspondente a janela na área de linfócitos. A estratégia de seleção dos *gates* das subpopulações de linfócitos e de seus marcadores foi feita com base na utilização dos controles isotípicos específicos para camundongo IgG1-PerCP-CY5.5 (clone P3.6.2.8.1, e-Bioscience), IgG1-Pe-Cy7 (clone P3.6.2.8.1, e-Bioscience), IgG1-PE (clone eBM2a, e-Bioscience) e IgG1-APC (clone P3.6.2.8.1, e-Bioscience), conforme demonstrado na Figura 2.

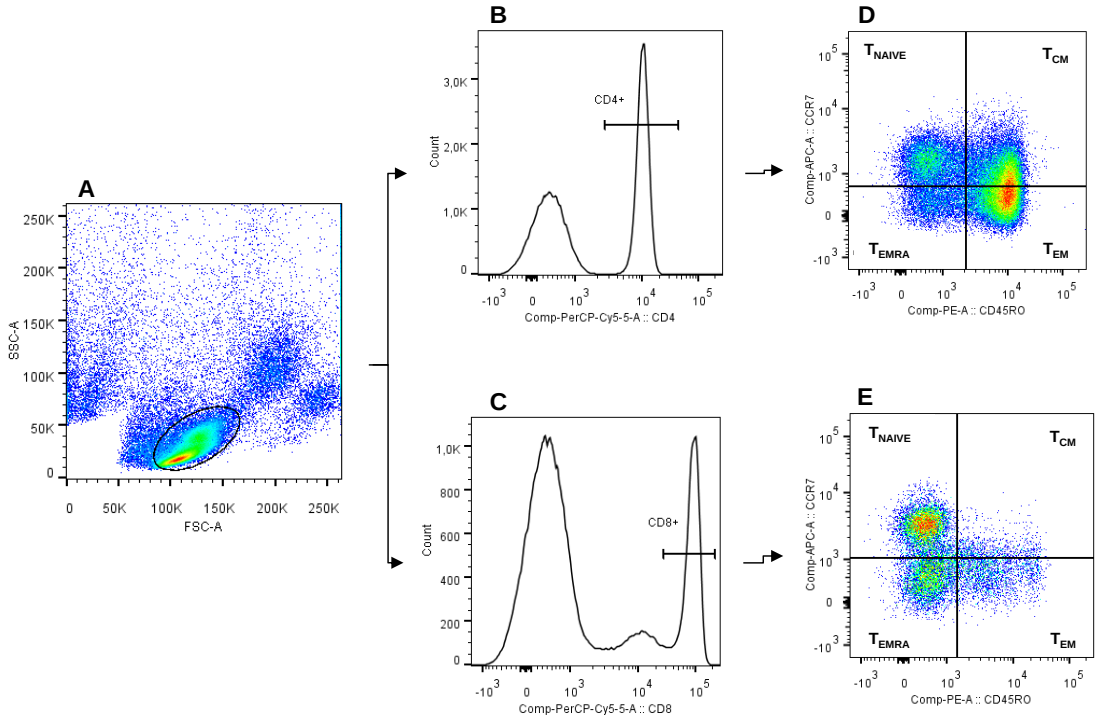

Figura 2. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos através da expressão de CD4 e CD8 (B e C). Histograma representativo da classificação de células de memória TCD4 (D) e TCD8 (E) através da expressão de CCR7 e CD45RO.

3.3.7 Análises estatísticas

Os dados referentes à amostra da população estudada foram apresentados através da mediana (limite mínimo – limite máximo). Os resultados do fenótipo das células por citometria de fluxo foram expressos em percentagem de positividade do total de células, ou percentagem de positividade dentro de um grupo celular específico. Para comparação entre os grupos, testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados de acordo com a natureza dos dados gerados, tais como ANOVA e Kruskal Wallis. Todos os testes estatísticos de hipóteses foram bi-caudais, sendo considerados estatisticamente significantes valores de *p* inferiores ao nível de significância pré-estabelecidos em 5%. A representação gráfica foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism® versão 5.0.

3.3.8 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi realizado para se obter um poder de estudo de 80% e um erro α de 0,05%. O cálculo do tamanho amostral foi feito utilizando o *software* G*Power 3.1.3). Um tamanho mínimo de 16 pacientes por grupo é suficiente para detectar diferenças significativas.

3.4 CONSIDERAÇÃO ÉTICA

O presente trabalho faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM / Fiocruz / Ba (Parecer / Resolução n° 385.806 – 05/09/2013).

Os métodos utilizados para as avaliações não causaram prejuízos aos pacientes, além daqueles inerentes aos procedimentos usuais para o diagnóstico da doença. Antes de entrar no estudo, todos os pacientes foram informados sobre a natureza da pesquisa. A voluntariedade na participação desse estudo foi garantida mediante assinatura dos participantes ou de seus representantes legais, do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), seguindo as normas do Conselho Nacional de Saúde (CNS 466/2012). Todas as coletas e manuseio de material biológico foram realizados utilizando medidas de segurança padronizada.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Características demográficas dos indivíduos e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos alocados no estudo

As características demográficas, carga parasitária, contato com a água contaminada e histórico do tratamento dos indivíduos incluídos neste estudo são mostradas na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto a distribuição da idade e do sexo.

Também não foram observadas diferenças quanto ao grau de contato com a água contaminada em todos os indivíduos.

Na avaliação do histórico de tratamento com o Praziquantel foi observado que os indíviduos foram submetidos a um ciclo de tratamento durante o período de avaliação, não sendo observado, entretanto, diferenças significativas.

Tabela 1. Caracterização demográfica e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos selecionados para avaliação da resposta imune

Categorias	Baixa Carga (n=20)	Alta Carga (n=16)	Controle Sadio (n=5)	*p*
Idade (mediana / faixa etária em anos)*				
	21 (13 - 58)	16 (10 - 65)	28 (21 - 39)	>0,05
Sexo n (%)**				
Masculino	09 (45,0)	09 (56,2)	02 (40,0)	>0,05
Feminino	11 (55,0)	07 (43,8)	03 (60,0)	
Carga Parasitária de *Schistosoma mansoni* (mediana / faixa em opg de fezes)*				
	00 (00 - 72)	**930 (228 - 2376)**	**-**	**<0,0001**
Contato com a àgua contaminada n (%)**				
Baixo contato	04 (20)	02 (13)		
Médio contato	06 (30)	03 (19)	-	>0,05
Alto contato	10 (50)	11 (69)		
Histórico de tratamento com Praziquantel n (%)**				
Sem registro de tratamento	04 (20)	04 (25)	-	>0,05
1 ciclo de tratamento	16 (80)	12 (75)		

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste do Qui-quadrado

3.5.2 Avaliação coproparasitológica dos indivíduos alocados no estudo

A análise do perfil coproparasitológico dos indivíduos selecionados, demonstra que os indivíduos com baixa carga de *S. mansoni* experimentam, também, menores cargas parasitárias e menores frequências de coinfeçcções para os helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e Ancilostomídeos que os indivíduos susceptíveis, Tabela 2.

Tabela 2. Perfil coproparasitológico dos indivíduos do estudo

Categorias	Baixa Carga (n=20)	Alta Carga (n=16)	Controle Sadio (n=5)	*p*
Carga Parasitária de outros helmintos (mediana / faixa em opg de fezes)*				
Ascaris lumbricoides	00 (00 - 17820)	1856 (00 - 30216)	-	**<0,05**
Trichuris trichiura	00 (00 - 540)	252 (00 - 13416)	-	**<0,05**
Ancilostomídeos	00 (00 - 120)	12 (00 - 564)	-	>0,05
Frequência de coinfecção por outros helmintos n (%)**				
Ascaris lumbricoides				
Sim	5 (25)	11 (69)	-	**0,0087**
Não	15 (75)	05 (31)	-	
Trichuris trichiura				
Sim	07 (35)	13 (81)	-	**0,0079**
Não	13 (65)	03 (19)	-	
Ancilostomídeos				
Sim	03 (15)	08 (50)	-	**0.0235**
Não	17 (85)	08 (50)	-	

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste do Qui-quadrado

3.5.3 Frequência de linfócitos TCD4$^+$ e TCD8$^+$ em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas de *S. mansoni*, após a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6.

As frequências de células TCD4$^+$ e células e TCD8$^+$ nas culturas de CMSP sem estímulos e estimulada pelos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6 foram avaliadas neste estudo e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados (p >0,05). A razão entre as células TCD4$^+$ e TCD8$^+$ também foi avaliada, não sendo observadas diferenças significantes entre os grupos de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias (p >0,05), Figura 3.

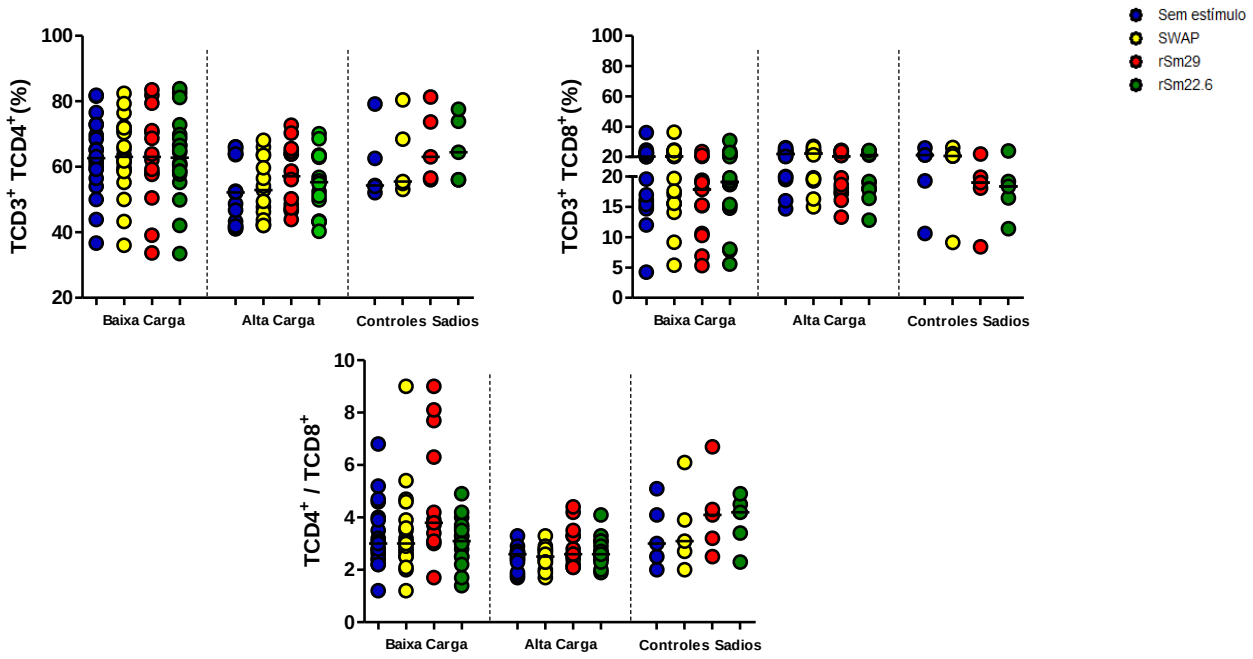

Figura 3. Frequências de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em CMSP de indivíduos com baixa e alta carga de *S. mansoni*, após adição dos antígenos SWAP, rSm22.6, rSm29. A barra horizontal representa o valor mediano.

A expressão das moléculas CD45RO e CCR7 em células TCD4⁺ e TCD8⁺ foi avaliada. E baseado na expressão destas moléculas, as células foram classificadas em: células T *naive* (CD45RO⁻CCR7⁺) e células de memória (CD45RO⁺). Estas últimas foram subclassificadas em células de memória central (T_{CM}; CD45RO⁺CCR7⁺), células de memória efetora (T_{EM}; CD45RO⁺CCR7⁻) e células de memória efetora RA⁺ (T_{EMRA}; CD45RO⁻CCR7⁻), conforme demonstrada na Figura 2.

As frequências de células T CD4⁺ *naive* (TCD4⁺CD45RO⁻CCR7⁺) nas culturas de CMSP não estimuladas foram significativamente superiores nos indivíduos com baixa carga, comparado àqueles com alta carga parasitária [Baixa carga – 36,3% (13,3% – 57,2%); Alta carga – 12,1% (1,1% – 59,0%); p<0,05] e após adição dos antígenos SWAP [Baixa carga – 31,4% (15,0% – 58,0%); Alta carga – 14,5% (1,8% – 28,2%); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 28,5% (19,6% – 58,8%); Alta carga – 21,1% (5,6% – 38,1%); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 37,5% (17,0% – 55,2%); Alta carga – 22,0% (1,1% – 58,5%); p<0,05],Figura 4A.

Resultados semelhantes foram observados com as células TCD8$^+$ *naive* (TCD8$^+$CD45RO$^-$CCR7$^+$) tanto nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 41,7% (18,2% – 72,5%); Alta carga – 12,7% (1,2% – 26,9%); p<0,05] quanto nas culturas estimuladas pelo SWAP [Baixa carga – 47,8% (17,5% – 73,8%); Alta carga – 13,6% (2,7% – 32,2%); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 51,6% (18,3% – 73,2%); Alta carga – 16,2% (2,7% – 45,6%); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 49,4% (17,7% – 70,9%); Alta carga – 16,4% (1,8% – 40,9%); p<0,05], Figura 4B.

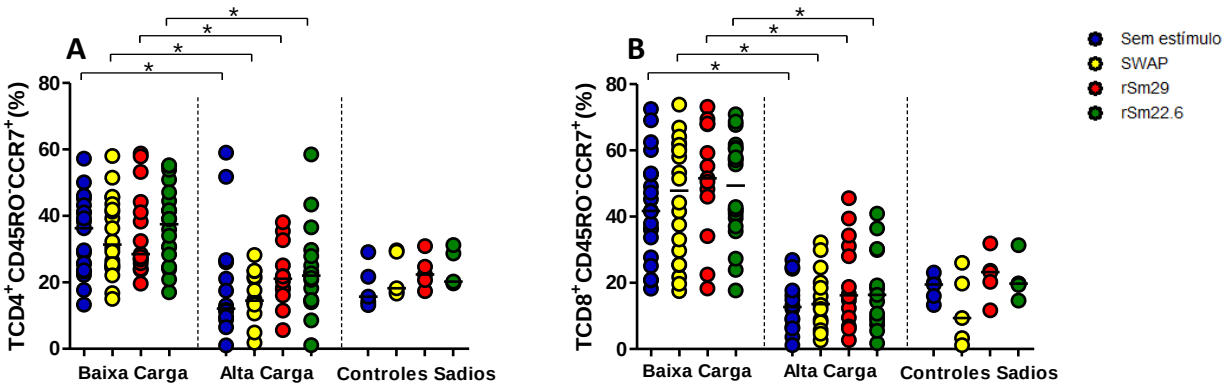

Figura 4. Proporção de células T *naive* CD4$^+$ (TCD4$^+$CD45RO$^-$CCR7$^+$) e CD8$^+$ (TCD8$^+$CD45RO$^-$CCR7$^+$) nas culturas de CMSP estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6 (Figuras A e B, respectivamente). A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis).

3.5.4 Células de memória TCD4$^+$, e não as células TCD8$^+$ estão associadas à resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Foi observado frequências mais elevadas de células TCD4$^+$CD45RO$^+$ no grupo de baixa carga, tanto nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 37,5% (15,2% – 69,7%); Alta carga – 20,4% (1,9% – 51,4%); p<0,05] quanto as culturas estimuladas pelo SWAP [Baixa carga – 33,2% (13,9% – 68,2%); Alta carga – 23,7% (1,4% – 51,0%); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 30,3% (12,1% – 63,1%); Alta carga – 15,3% (2,9% – 34,7%); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 34,8% (11,6% – 71,1%); Alta carga – 16,9% (7,3% – 45,2%); p<0,05], Figura 5A.

No entanto, não foram observadas diferenças significativas na frequência de células de memória TCD8$^+$CD45RO$^+$ entre os grupos avaliados (Figura 5B).

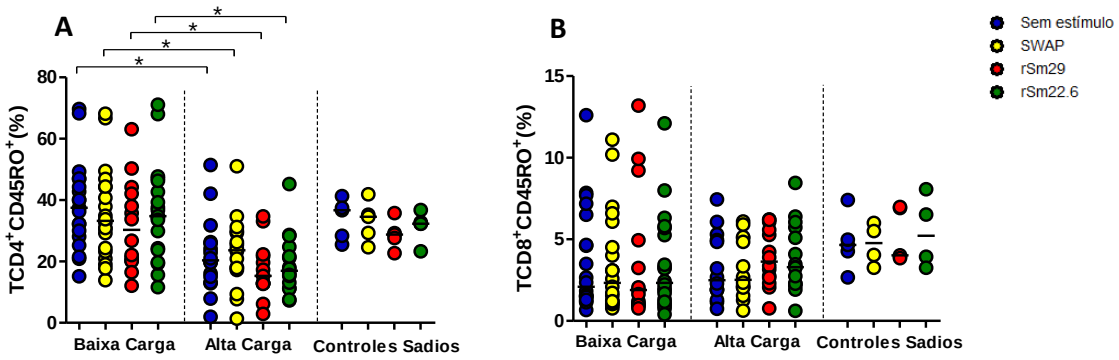

Figura 5. Proporção de células T de memória (CD45RO$^+$) CD4$^+$ e CD8$^+$ nas culturas de CMSP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6 (Figuras A e B, respectivamente). A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis)

3.5.5 Indivíduos com baixa carga parasitária apresentam maiores proporções de células TCD4$^+$ T$_{CM}$.

Quanto a frequência de células de memória central (TCD4$^+$CD45RO$^+$CCR7$^+$), maiores frequências desta subpopulação de células foram observadas no grupo de baixa carga parasitária, nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 27,6% (3,5% – 37,0%); Alta carga – 11,3% (3,2% – 21,3%); p<0,05] e nas estimuladas pelo SWAP [Baixa carga – 21,3% (2,3% – 52,7%); Alta carga – 9,4% (0,6% – 22,6%); p<0,05]. Aliado a isto, o grupo de indivíduos com alta carga também apresentou menores proporções destas células, independentemente do estímulo utilizado, quando comparado ao grupo de controles sadios (p<0,05), Figura 6A.

3.5.6 Indivíduos com alta carga parasitária apresentam maiores proporções de células TCD4⁺ de memória efetora quando comparados aos indivíduos resistentes.

Na avaliação da frequência de células de memória efetora ($TCD4^+CD45RO^+CCR7^+$; Figura 6B), verificou-se um aumento na frequência dessa subpopulação de células nos indivíduos com alta carga, tanto nas culturas não estimuladas [Alta carga – 43,5% (16,6% – 82,9%); Baixa carga – 29,0% (11,2% – 47,5%); p<0,05], quanto nas culturas estimuladas pelos antígenos SWAP [Alta carga – 44,5% (14,9% – 79,4%); Baixa carga – 28,3% (4,9% – 46,8%); p<0,05], rSm29 [Alta carga – 40,8% (21,8% – 81,3%); Baixa carga – 28,3% (11,1% – 47,3%); p<0,05] e rSm22.6 [Alta carga – 37,8% (16,7% – 77,6%); Baixa carga – 27,8% (11,1% – 49,3%); p<0,05].

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências de células T_{EMRA} nos diferentes grupos estudados, independentemente dos estímulos utilizados nas culturas (p>0,05; Figura 6C).

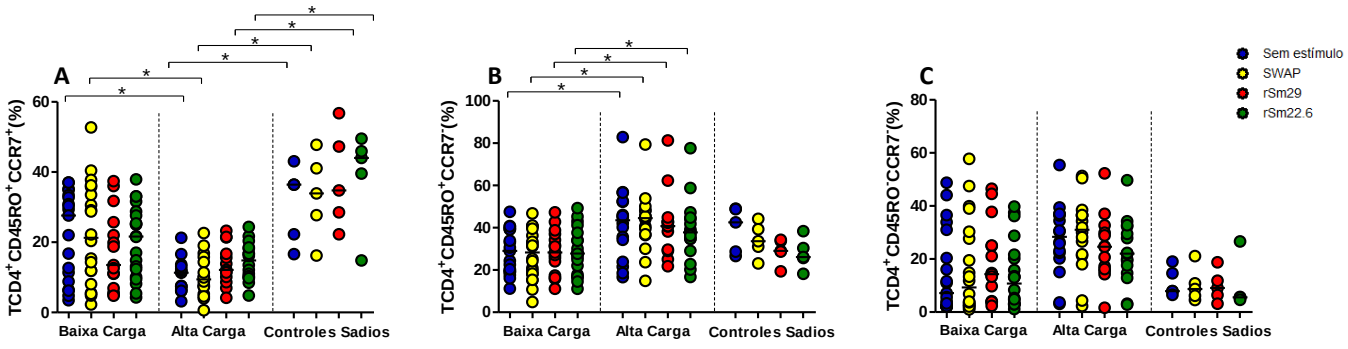

Figura 6. Proporção de células T_{CM} ($TCD4^+CD45RO^+CCR7^+$; Figura A), células T_{EM} ($TCD4^+CD45RO^+CCR7^-$; Figura B) e células T_{EMRA} ($TCD4^+CD45RO^-CCR7^+$; Figura C), nas culturas de CMSP estimuladas *in vitro* pelo SWAP, rSm29 e rSm22.6, em indivíduos infectados pelo *S.mansoni* com alta e baixa cargas parasitárias. A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis).

3.6 DISCUSSÃO

Infecções crônicas como a esquistossomose, submetem os indíviduos a longos períodos de estimulação antigênica em consequência a sucessivos processos de reexposição aos antígenos do parasito, longevidade do *Schistosoma mansoni* e até mesmo diversos episódios de reinfecção. O efeito destes ciclos contínuos de exposição aos antígenos de *S. mansoni* durante o curso da infecção sobre o processo de desenvolvimento e manutenção do repertório de células de memória carece de maiores elucidações. Alguns autores discutem que a imunidade adquirida associada a proteção contra a infecção está relacionada aos antígenos do pararito, duração da infecção e tempo de exposição do hospedeiro a infecção atual e anteriores (MUTAPI et al., 2008). Além disso, alguns trabalhos demonstram que o tratamento anti-helmíntico associado aos processos de reexposição antigênica está associado ao desenvolvimento da resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* (BLACK et al., 2010).

O presente estudo avaliou a relação entre as diferentes subpopulações de células de memória no contexto da resistência e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. O risco de infecção pelo *S. mansoni* está diretamente associado ao contato com a água contaminada. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre o grau de contato com reservas hídricas contaminadas e a resistência ou susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni*, o que sugere que o grau de exposição à água contaminada não é um fator preponderante para o desenvolvimento da resistência a infecção. Além disso, nossos dados sugerem que a resistência a infecção pelo *S. mansoni* confere resistência às infecções por outros helmintos. Estes dados corroboram com estudos prévios realizados neste mesmo povoado em que os autores demonstraram que características socioeconômicas e comportamentais não estariam associadas com a resistência à esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2012).

Adicionalmente, quando avaliamos a influência do sexo no desenvolvimento da resistência à infecção pelo *S. mansoni* não observamos diferenças significativas entre os grupos de indivíduos resistentes e o grupo de indivíduos

susceptíveis a esquistossomose, semelhante aos estudos que avaliaram a resistência à infecção pelo *Schistosoma* (NAUSCH et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Neste trabalho, foi analisado o perfil de células de memória em cultura de CMSP de indivíduos residentes em área endêmica para *Schistosoma mansoni* que apresentaram, ao longo de 10 anos, baixas cargas parasitárias. E, avaliando-se as frequências do *pool* de células T *naive* $CD4^+$ e $CD8^+$ foi observado que os indivíduos com baixa carga parasitária apresentaram maiores frequências dessas células quando comparados aos indivíduos susceptíveis. Estes dados sugerem uma possível exaustão ou mobilização destas células nos indivíduos que experimentam maior intensidade de infecção. Corroborando com essa hipótese, foi observado que os indivíduos com alta carga de *S. mansoni* apresentaram menores frequências do número total de células de memória $TCD4^+$ $CD45RO^+$ quando comparados ao grupo com baixa carga parasitária. Porém, não foram observadas diferenças significativas quando se avaliou a frequência de células de memória $TCD8^+CD45RO^+$. Em trabalhos realizados com indivíduos não infectados, residentes em áreas endêmicas para *Schistosoma*, Nausch e colaboradores (2012) observaram que esses indivíduos apresentaram maiores frequência de células de memória $TCD4^+$ quando comparados aos indivíduos infectados residentes na mesma área de estudo e, semelhantemente aos nossos resultados, também não foram observadas diferenças significativas quando se avaliou a subpopulação de células de memória $TCD8^+$ (NAUSCH et al., 2012).

Na avaliação da compartimentalização das células de memória ($CD45RO^+$), os indivíduos com alta carga parasitárias cursaram com baixas proporções de células de memória central (T_{CM} $CD4^+$) quando comparadas aos indivíduos com baixa carga parasitária e também com o grupo de controles sadios. Uma possível explicação é que os indivíduos susceptíveis a infecção pelo *S. mansoni*, expostos a grandes quantidades de antígeno do parasito, necessitariam de uma maior mobilização do compartimento de células de memória para um maior aporte de células efetoras, hábeis ao controle do processo inflamatório experimentado nos indivíduos com alta carga parasitária.

Em consonância com essa hipótese, foi observado que os indivíduos com alta carga apresentaram maiores frequências de células de memória efetora (T_{EM} $CD4^+$), quando comparados aos indivíduos com baixa carga. Esses achados, são semelhantes aos observados em trabalhos realizados em áreas endêmicas de *Wuchereria bancrofti*, onde os autores observaram que os indivíduos com filariose apresentavam diminuição no compartimento de células de memória T_{CM} e aumento no *pool* de células de memória efetora T_{EM}, quando comparados aos indivíduos normais endêmicos (STEEL & NUTMAN, 2011). Porém, nossos resultados contrastam com os obtidos em trabalhos conduzidos em área endêmica de *S. haematobium*, no qual se observou que os indivíduos não infectados apresentaram menores proporções de células de memória efetora (T_{EM} $CD4^+$) que os indivíduos normais endêmicos (NAUSCH et al., 2012). Esses resultados controversos podem estar associados ao *background* genético dos indivíduos nessas diferentes áreas, a diferenças nas concentrações dos antígenos no sangue e diferenças intrínsecas a constituição antigênica dos parasitos *S. mansoni*, *S. haematobium* e *Wuchereria bancrofti*. Associado a isso, a carga parasitária influencia diretamente no repertório das células T_{EM} e T_{CM} (HARARI et al., 2004).

Na avaliação das células T_{EMRA}, não foram observadas diferenças significativas entre as frequências desta subpopulação entre os diferentes grupos avaliados e entre os antígenos testados. Entretanto, STEEL & NUTMAN (2011) demonstraram que indivíduos infectados pela *Wuchereria bancrofti* bem como aqueles curados da infecção, apresentaram maiores frequências de células T_{EMRA} $CD4^+$ e $CD8^+$ do que o grupo de indivíduos normais endêmicos (STEEL & NUTMAN 2011) e em algumas infecções virais elas constituem as células de memórias predominantes (CHAMPAGNE et al., 2001).

Na esquistossomose, várias estratégias de imunização, com diferentes antígenos do parasito, vêm sendo desenvolvidas e os resultados mais promissores tem demonstrado a participação das células de memórias neste contexto de proteção ou diminuição dos danos tissulares provocados pela presença do parasito (ESPINDOLA et al., 2014; ALVES et al., 2015). A escolha dos antígenos utilizados neste estudo levou em consideração a sua possível associação no desenvolvimento da resistência a esquistossomose.

O SWAP é considerado o principal alvo da resposta de IgE em modelos experimentais e humano de infecção pelo *S. mansoni* (SANTIAGO et al., 1998; LI et al., 2000; FITZSIMMONS et al., 2004). A produção de IgE específica para o rSm22.6 estaria relacionada a proteção contra a reinfecção pelo *Schistosoma* (DUNNE et al., 1992; WEBSTER et al., 1997). Estudos recentes em modelo experimental de imunização com a rSm22.6 mostram um perfil de resposta celular mista Th1/Th2, com indução de IFN-γ e IL-4, como também a produção de IL-10 (PACIFICO et al., 2006). Estudos sobre a resposta imune desenvolvida em modelos experimentais sugerem que a imunização pelo rSm29 induz uma resposta do tipo Th1 caracterizado por altos níveis de IFN-γ e baixos níveis de IL-4, além da redução em 51% da carga parasitárias nesses animais (CARDOSO et al., 2008).

Uma vez que este antígeno se localiza no tegumento do verme adulto e a produção destes anticorpos está associada ao processo de opsonização, citotoxicidade celular associada a anticorpos (ADCC) e ativação da via clássica de complemento, alguns estudos estão avaliando o papel do rSm29 como potencial candidato a vacina (CARDOSO et al., 2006; CARDOSO et al., 2008). Além disso Alves e colaboradores (2015) demonstraram que o rSm29 é capaz de induzir proteção em animais previamente infectados pelo *S. mansoni*, o que reforça essa idéia (ALVES et al., 2015).

Porém, nas culturas de CMSP dos indivíduos com baixa carga parasitária, a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6 parece não influenciar no compartimento das células de memória ($CD45RO^+$) e suas subpopulações T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA}, uma vez que as proporções destes tipos celulares não diferiram às frequências das culturas não estimuladas. Entretanto, este fato não altera a interpretação dos resultados, aqui observados, já que as frequências das culturas não estimuladas dos indivíduos com baixa carga diferiram significativamente das culturas não estimuladas dos indivíduos com alta carga parasitária.

Portanto, nossos achados sugerem que a susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* demonstrada pela alta carga parasitária, está associada a uma diminuição na diferenciação das células de memória $TCD4^+$, o que pode estar associada a uma exaustão desse repertório celular e/ou comprometimento para

a manutenção de células T_{EM} capazes de migrar para sítios inflamatórios ondem exercem sua função efetora.

Neste trabalho, não foi possível determinar se os antígenos com capacidade vacinal estariam associados ao desenvolvimento da resistência à infecção pelo *S. mansoni* em humanos, o que sugere a necessidade de outros estudos para confirmar o papel destes antígenos no contexto da resistência e susceptibilidade na esquistossomose. De qualquer modo, este constitui o primeiro trabalho em humanos que avalia o fenótipo das células de memória e a sua participação na resistência a infecção pelo *S. mansoni*.

3.7 REFERÊNCIAS

ALVES, C. C. et al. Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. **PLoS Negl Trop Dis,** 10(2): 1-20, 2015.

ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol,** 31(11): 656-63, 2009.

ASAHI, H. & STADECKER, M. J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. **Parasitol Int,** 52(4): 361-7, 2003.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol** 167(3): 1245-53, 2001

BARBOUR, A. D.The importance of age and water contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** 79(2): 151-3, 1985.

BETHONY, J. M. et al. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunol Rev,** 239(1): 237-70, 2011.

BLACK, C. L. et al. Increases in levels of schistosome-specific immunoglobulin E and CD23(+) B cells in a cohort of Kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis,** 202(3): 399-405, 2010.

BOURKE, C. D. et al. Acquired immune heterogeneity and its sources in human helminth infection. **Parasitology**, 138(2): 139-59, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose - Situação Epidemiológica. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados. Acesso em: 11/02/2015.

BUSTAMANTE, J. M. et al. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat Med,** 14(5): 542-50, 2008.

BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis *mansoni*. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** 79(3): 393-408, 1985.

CAMPBELL, J. J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. **J Immunol**, 166(2): 877-84, 2001.

CAPRON, A. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends Parasitol**, 21(3): 143-9, 2005.

CARDOSO, F. C. et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clin Exp Immunol**, 144(3): 382-91, 2006.

_____. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 2(10): e308, 2008.

CHAMPAGNE, P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. **Nature**, 410(6824): 106-11, 2001.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 83(6): 798-804, 1989.

_____. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Today** 16(9): 397-9, 2000.

COULSON, P. S. et al. Pulmonary granulomatous hypersensitivity: cell-mediated responses to embolized schistosome larvae and eggs. **Reg Immunol** 5(3-4): 165-73, 1993.

DESSEIN, A.J. et al. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **J Immunol**. 140(8): 2727-36, 1988.

DUNNE, D. W., et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol** 22(6): 1483-94, 1992

ESPINDOLA, M. S. et al. Combined immunization using DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 increases CD8+ memory T cells, reduces chronic pathology and decreases egg viability during *Schistosoma mansoni* infection. **BMC Infect Dis** 14: 263, 2014.

FIGUEIREDO, J. P. et al. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunol** 34(12): 604-10, 2012.

FITZSIMMONS, C. M. et al. Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. **Parasite Immunol**, 26(8-9): 371-6, 2004.

FORSTER, R. et al. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nat Rev Immunol**, 8(5): 362-71, 2008.

GATTINONI, L. et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. **Nat Med** 17(10): 1290-7, 2011.

GEGINAT, J. et al. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood**, 101(11): 4260-6, 2003.

GOLLOB, K. J. et al. Insights into CD4+ memory T cells following Leishmania infection. **Trends Parasitol**, 21(8): 347-50, 2005.

GROGAN, J. L. et al. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. **J Infect Dis**, 173(5): 1242-7, 1996.

HARARI, A. et al. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. **Eur J Immunol**, 34(12): 3525-33, 2004.

HIRSCH, C. & GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. **Parasitology**, 112 (Pt 6): 529-35, 1996.

JEFFS, S. A. et al. Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. **Mol Biochem Parasitol**, 46(1): 159-67, 1991.

KATZ, N. et al. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. **J Parasitol**, 56(5): 1032-3, 1970.

LI, Y. et al. Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunol**, 22(8): 415-24, 2000.

LIMA E COSTA, M. F. et al. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis *mansoni* in an endemic area in Brazil. **Bull World Health Organ**, 65(1): 57-66, 1987.

MCMANUS, D. P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, 21(1): 225-42, 2008.

MICHIE, C. A. et al. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. **Nature** 360(6401): 264-5, 1992.

MOSCHOVAKIS, G. L. & FORSTER, R. Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. **Eur J Immunol**, 42(8): 1949-55, 2012.

MUTAPI, F. et al. Age-related and infection intensity-related shifts in antibody recognition of defined protein antigens in a schistosome-exposed population. **J Infect Dis**, 198(2): 167-75, 2008.

NAUSCH, N. et al. Proportions of CD4+ memory T cells are altered in individuals chronically infected with *Schistosoma haematobium*. **Sci Rep**, 2: 472, 2012.

OLIVEIRA, R. R. et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 86(2): 296-305, 2012.

OMS, Organização Mundial de Saúde. Schistosomiasis. Disponível em: http://www.who.int/schistosomiasis/en/. Acesso em: 10/02/2015a.

_____.Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Disponível em: http://apps.who.int/iris/handle/10665/69482. Acesso em: 04/06/2015b.

PACIFICO, L. G. et al. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. **Immunobiology**, 211(1-2): 97-104, 2006.

ROBERTS, M. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Infect Immun**, 61(12): 4984-93, 1993.

SALLUSTO, F. et al.Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, 401(6754): 708-12, 1999.

_____. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol**, 22: 745-63, 2004.

SANTIAGO, M. L. et al. Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides. **Int Arch Allergy Immunol**, 117(2): 94-104, 1998.

SOUZA, R. P. et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **J Parasitol Res**, 2012: 0-10, 2012.

STEEL, C. & NUTMAN, T. B. Altered T cell memory and effector cell development in chronic lymphatic filarial infection that is independent of persistent parasite antigen. **PLoS One**, 6(4): e19197, 2011.

STURROCK, R. F. et al. *Schistosoma mansoni* in the baboon (*Papio anubis*): parasitological responses of Kenyan baboons to different exposures of a local parasite strain. **Parasitology**, 73(3): 239-52, 1976

THOMAS, M. L. The leukocyte common antigen family. **Annu Rev Immunol**, 7: 339-69, 1989.

WEBSTER, M. et al. IgG4 and IgE responses to *Schistosoma mansoni* adult worms after treatment. **J Infect Dis**, 175(2): 493-4, 1997.

WILKINS, H. A. et al. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81(1): 29-35, 1987.

4 CAPÍTULO 2: PERFIL DOS LINFÓCITOS T E B EM INDIVÍDUOS RESISTENTES À INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Perfil dos Linfócitos T e B em indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Robson da Paixão de Souza[1,2], Maria Ilma Araújo[3,5], Luciana Santos Cardoso[1,2,4], Diego Mota Lopes[1,2], Tarcisio Vila Verde Santana de Almeida[1,2], Jamille Souza Fernandes[1,2], Kelvin Edson M. de Jesus[6], Edgar M. Carvalho [2,6], Ricardo Riccio Oliveira[1,2,6]

[1] Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brazil

[2] Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, Canela, 40.110-160, Salvador, BA, Brazil

[3] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT-CNPQ/MCT), Rua João das Botas s/n, Canela, 40.110-160 Salvador, BA, Brazil

[4] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Avenida Adhemar de Barros s/n, Ondina, 40.170-970 Salvador, BA, Brazil

[5] Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Frei Henrique No. 08, Nazaré, 40.050-420 Salvador, BA, Brazil

[6] FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão No. 121, Candeal, 40296-710 Salvador, BA, Brazil

Autor correspondente: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão No. 121, Candeal, 40296-710 Salvador, BA, Brazil E-mail: ricardo.riccio@bahia.fiocruz.br

4.1 RESUMO

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à infecção/reinfecção pelo *Schistosoma mansoni* despertam até os dias atuais grande interesse e controvérsia. Alguns autores demonstram que a resistência à infecção está atribuída a uma resposta mista Th1 e Th2 e a resistência à reinfecção após repetidos tratamentos através de mecanismos associados à resposta Th2. Por meio da citometria de fluxo, foi avaliado pela primeira vez em humanos, a caracterização fenotípica e a proporção de células B e T em indivíduos residentes em áreas endêmicas que cursam com baixas cargas parasitárias ao longo de 10 anos. Neste estudo os indivíduos com baixas cargas parasitárias para *Schistosoma mansoni* apresentaram uma maior proporção de células Th1 e Th2, caracterizadas através da expressão de IFN-γ e IL-5, respectivamente. Aliado a isto, linfócitos destes indivíduos resistentes apresentaram maior grau de expressão de moléculas coestimulatórias CD28 e CTLA-4, quando comparados aos indivíduos com altas cargas parasitárias e uma maior expressão de moléculas regulatórias FoxP3 e IL-10, tanto nas populações de linfócitos T (CD4 e CD8) quanto nas células B (CD19). Nossos dados indicam que o controle da carga parasitária de *S. mansoni* deve estar associado a uma resposta Th1, Th2 e regulatória, e que novos estudos serão necessários para elucidar a possibilidade de mecanismos associados a aparente anergia dos linfócitos de indivíduos com altas cargas parasitárias.

4.2 INTRODUÇÃO

Considerada uma das mais importantes doenças parasitárias do mundo, a esquistossomose acomete mais que 240 milhões de indivíduos e estima-se que cerca de 700 milhões estejam sob risco de infecção (OMS, 2015). No Brasil, a esquistossomose *mansoni* acomete cerca de 6 milhões de brasileiros e, aproximadamente, 25 milhões de pessoas estão expostas a contaminação, especialmente aqueles indivíduos que residem em áreas rurais e periurbanas (BRASIL, 2015).

A fase inicial da infecção pelo *S. mansoni* cursa com resposta imune do tipo Th1, com produção de IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-1 (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO, 1995; LAMBERTUCCI et al., 1997; WYNN et al., 1998; MONTENEGRO et al., 1999; DE JESUS et al., 2002). Esta resposta pode estar associada ao controle da carga parasitária no pulmão e fígado através da ativação de macrófagos pelo IFN-γ e ativação de células $TCD8^+$ (SMYTHIES et al., 1992; WYNN et al., 1994). A partir da ovoposição, a fase aguda é então modulada, de forma que na fase crônica a resposta é polarizada para o tipo Th2 e regulatória, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, com baixos níveis de IFN-γ (GAZZINELLI & COLLEY 1992; WILLIAMS et al., 1994; ARAUJO et al., 1996; FINKELMAN et al., 1997; CORREA-OLIVEIRA et al., 1998; SOUZA et al., 2012). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 e IL-10 induzida por antígenos do ovo e o aumento do número de células regulatórias - T_{reg} (GRZYCH et al., 1991; PEARCE et al., 1991; MONTENEGRO et al., 1999; SILVEIRA et al., 2004).

As células T_{reg} são classificadas como subconjuntos de células $TCD4^+CD25^+$ que podem ser divididas em células T_{reg} naturais (nT_{reg}) e células T_{reg} induzíveis (iT_{reg}). As células nT_{reg} são caracterizadas pela expressão do Fator de transcrição FoxP3 e são recrutadas para os sítios inflamatórios após seleção tímica. As células iT_{reg} são $FoxP3^-$ e são desenvolvidas na periferia através da ativação apropriada de células efetoras (TAYLOR et al., 2006; WILSON et al., 2007). As iT_{reg} podem ser diferenciadas *in vitro* através do estímulo de citocinas e alguns medicamentos e são classificadas em: secretoras de IL-10 (Tr1), células secretoras de TGF-β (Th3) e regulatórias aquelas $CD4^+CD25^+FoxP3^-$.

Além dos linfócitos T, as células B também desempenham diversas funções no sistema imune, podendo participar tanto de mecanismos protetores, quanto de eventos fisiopatogênicos de diversas doenças. Participam ainda das respostas imunes mediadas por células T através da apresentação de antígenos, contribuindo para a ativação de células virgens, proliferação celular e atividade de células T autorreativas (RODRIGUEZ-PINTO & MORENO 2005; YAN et al., 2006). Aliado ao seu papel bem definido na produção de anticorpos, as células B podem regular as respostas imunes aos diferentes patógenos atuando como fonte produtora de citocinas (HARRIS et al., 2000). Alguns autores vêm demonstrando o papel destas células durante o curso das infecções helmínticas. Estudos em modelos experimentais de esquistossomose *mansoni*, demonstraram que a deficiência de células B promove um aumento na resposta granulomatosa Th2-dependente, fato também observado nos modelos FCγR-deficiente, indicando uma complexa relação entre a secreção de anticorpos e a importância das células B nestes modelos (JANKOVIC et al., 1998).

A resposta imune na esquistossomose pode, além de estar associado à patogênese, apresentar papel importante na proteção contra a infecção. Em áreas endêmicas em esquistossomose, tem sido demonstrado a ocorrência de indivíduos resistentes naturais (“normais endêmicos”) à infecção, onde apesar do contato com a água contaminada apresentam sucessivos exames parasitológicos de fezes negativos para o parasito (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1992; VIANA et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). A resposta imune desses indivíduos caracteriza-se por um perfil misto de resposta imune, sendo a presença das respostas Th2 e Th1, concomitantes, associadas à proteção.

Apesar disto, a resposta imune de indivíduos infectados com baixa carga parasitária, independente de nível de exposição, ainda não foi caracterizada. É possível que indivíduos residentes em área endêmica e que possuem baixa carga parasitária ao longo do tempo apresentem um perfil de citocinas peculiar, o qual pode conferir algum nível de resistência à infecção.

Existem poucos trabalhos a respeito da caracterização e participação dos linfócitos T e B na infecção pelo *Schistosoma mansoni* e a possível associação destas células no desenvolvimento da resistência em humanos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil dos linfócitos B e T quanto a produção de citocinas do perfil Th1, Th2 e regulatório e também quanto a expressão de moléculas regulatórias, a exemplo de CD25, CTLA4 e FoxP3. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros hematológicos e bioquímicos nos grupos de indivíduos resistentes e susceptíveis a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Área endêmica

Foram avaliados neste estudo, indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni,* coinfectados ou não por outros helmintos, residentes no município de Conde – Bahia, localizado a cerca de 180 Km da capital Salvador. O povoado estudado compreende os vilarejos de Buri, Camarões, Jenipapo e Sempre Viva, cuja população é constituída por aproximadamente 1000 habitantes. As condições sanitárias são precárias o que compromete o controle efetivo das infecções parasitárias. A principal fonte de renda é baseada na pesca nos rios, locais que também são utilizados como fonte de lazer e realização de atividades domésticas, o que expõe a população à infecção pelo *S. mansoni*.

4.3.2 Estratégia de Seleção dos Indivíduos

A seleção dos indivíduos resistentes à infecção pelo *S. mansoni* foi realizada utilizando-se informações contidas nos Banco de Dados dos anos de 2010, 2008 e 2004, sobre idade, sexo e carga parasitária. O parâmetro carga parasitária foi avaliado através da técnica de sedimentação espontânea e Kato-Katz, tendo sido analisadas três a cinco amostras e duas lâminas por amostra de fezes. Consta também do banco de dados, tempo de permanência na área endêmica, histórico de tratamento com praziquantel e o grau de exposição à água contaminada, avaliada de acordo com Lima et al (1987), Figura 1.

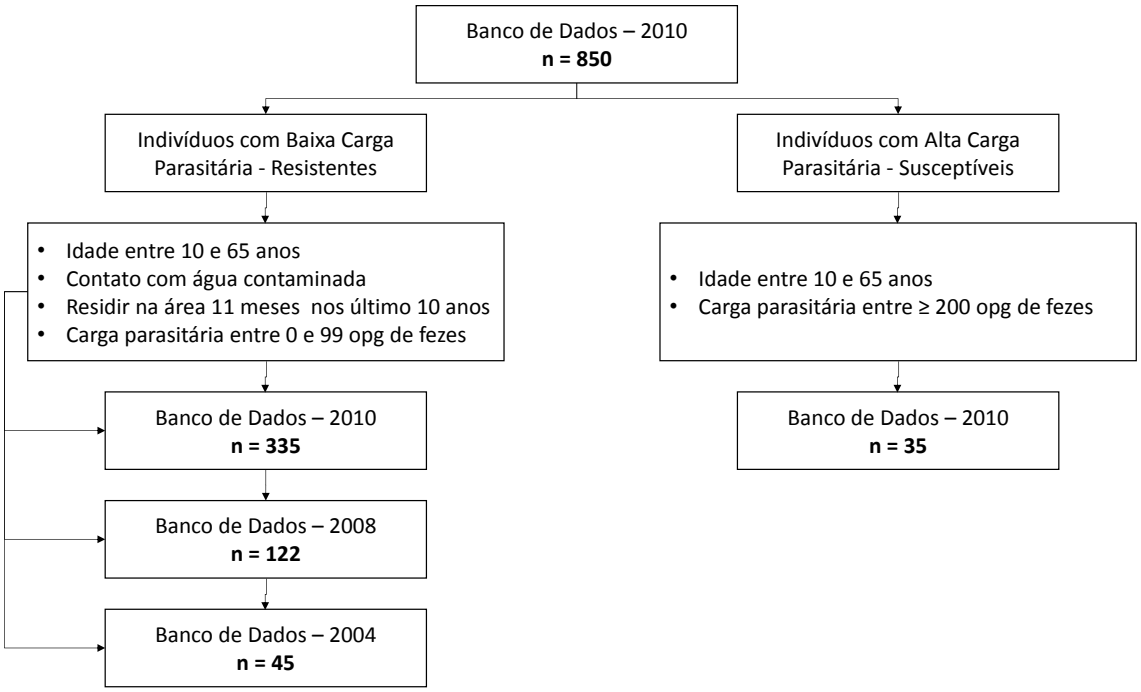

Figura 1. Fluxograma da estratégia de seleção dos indivíduos para o estudo.

A estratégia para a seleção desses indivíduos com baixa carga parasitária foi realizada inicialmente com informações contidas no BD de 2010, que havia 850 indivíduos. Destes, foram selecionados 335 indivíduos com baixa carga parasitária e algum contato com a água contaminada. Posteriormente, estes indivíduos foram reavaliados com os mesmos critérios através dos dados de 2008, no qual 122, dos 335 indivíduos, preencheram os critérios estabelecidos. Com base nas informações obtidas em 2004, dos 122 indivíduos selecionados anteriormente, 45 foram classificados como resistentes à infecção pelo *S. mansoni*.

Foram considerados susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni* aqueles indivíduos residentes na área endêmica, de ambos os sexos, com idade entre 10 e 65 anos, que apresentaram alta carga parasitária (≥ 200 opg de fezes), durante o levantamento coproparasitológico realizado em 2010. Nessa etapa foram selecionados 39 indivíduos com alta carga parasitária (≥ 200 opg de fezes), denominados neste estudo como susceptíveis.

Todos os indivíduos selecionados, foram então submetidos a nova avaliação coproparasitológica entre 2013 e 2014 para confirmação da resistência/susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. Foram examinadas duas amostras de fezes de cada participante e analisadas duas lâminas de cada amostra (KATZ et al., 1970).

A partir daí foram selecionados randomicamente 20 indivíduos classificados como resistentes à infecção/reinfecção e 16 indivíduos susceptíveis para a avaliação da resposta imune. Adicionalmente, foram inseridos no estudo 05 indivíduos sem infecção helmíntica, de ambos os sexos, sorologia negativa para os antígenos do *S. mansoni* (SWAP e SEA) e que nunca residiram em áreas endêmicas para esquistossomose, para comporem o grupo de controles sadios.

Todos os indivíduos avaliados foram negativos para HIV 1 e 2, HTLV I e II e para Hepatites B e C.

4.3.3 Avaliação Hematológica e Bioquímica

Cerca de 15 mL de sangue venoso foram coletados e acondicionados em tubos apropriados (Vacutainer®; Becton Dickinson) para as análises Hematológicas e Bioquímicas.

A primeira amostra foi acondicionada em tubo contendo EDTA-K2 ou EDTA-K3 para realização de hemograma completo com plaquetas. Esfregaços delgados foram confeccionados para o estudo morfológico celular e elementos figurados sanguíneos. A contagem celular foi realizada através do princípio de citometria de fluxo, com o equipamento Sysmex XS-1000i.

A amostra destinada ao estudo da coagulação, foi conservada em tubo contendo citrato de sódio tamponado 0,109 mol/L (3,2%), na proporção de nove partes de sangue para uma parte de solução de citrato. O plasma pobre em plaquetas foi obtido após centrifugação a 2000g for 15 minutos, separado e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O Tempo de Protrombina (TP) e a determinação do RNI (relação normalizada internacional) foram realizadas utilizando-se o Coagulômetro Clot/Drake *timer* digital.

Uma terceira amostra foi coletada para a avaliação bioquímica. O perfil hepático foi avaliado através dos parâmetros ALT/TGP, AST/TGO, γGT, ALP e albumina e o perfil renal através dos analitos de uréia e creatinina. As dosagens foram realizadas no equipamento Metrolab 2300®, Wiener Lab Group.

Todas as análises laboratoriais foram realizadas nos Laboratórios de Análises Clínicas da rede UFBa e os respectivos valores de referências encontram-se no Anexo B.

4.3.4 Avaliação Coproparasitológica

Todos os indivíduos selecionados foram submetidos a nova avaliação coproparasitológica e realização de novo inquérito socioeconômico para determinação da resistência/susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. Foram examinadas duas amostras de fezes de cada participante e analisadas duas lâminas de cada amostra pelo método de Kato-Katz (KATZ, et al., 1970; KATZ, et al., 1972).

4.3.5 Obtenção dos antígenos de *Schistosoma mansoni*

No presente estudo, foram avaliadas a resposta imune frente ao SWAP e aos antígenos recombinantes rSm22.6 e rSm29. Foram selecionados randomicamente 20 indivíduos classificados como resistentes à infecção e 16 indivíduos susceptíveis para a avaliação da resposta imune. Adicionalmente, foram inseridos no estudo 05 indivíduos sem infecção helmíntica de ambos os sexos, sorologia negativa para os antígenos SWAP e SEA e que nunca residiram em áreas endêmicas para esquistossomose, para serem incluídos no grupo de controles sadios.

O SWAP é o antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) preparado como sobrenadante solúvel em tampão salina, de acordo com metodologia descrita por Hirsch e colaboradores em 1996 (HIRSCH & GOES 1996). A proteína rSm22.6 é uma proteína solúvel do tegumento, presente em todos os estágios do ciclo do *S. mansoni*, exceto o ovo (JEFFS et al., 1991). O antígeno

recombinante rSm29 constitui em sua forma nativa uma glicoproteína de membrana do *S. mansoni*, presente no esquistossômulo e no verme adulto (CARDOSO et al., 2008).

Os antígenos de *Schistosoma mansoni* utilizados neste estudo, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Oliveira da UFMG.

4.3.6 Obtenção de Células mononucleares de sangue periférico

Foram coletados cerca de 30mL de sangue periférico e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas a concentração de 3 x 10^5 células/mL em meio de RPMI 1640, contendo 10% de soro humano (AB positivo e inativado), 100 U/mL estreptomicina 100mg/mL, L-glutamina 2mM, 30 mM HEPES (Life Technologies GIBCO, BRL, Gaithersburg, MS). As células foram então incubadas (3 x 10^5 células/poço) em placa de 96 poços com fundo em “U”, para realizar a avaliação da expressão de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas, CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD25, CD28, CD69, CCR7, CTLA-4 e FoxP3, com e sem estímulos dos antígenos de *Schistosoma mansoni* (SWAP, rSm29 e rSm22.6). As culturas foram incubadas a 37°C por 16h, a uma atmosfera 5% de CO_2.

4.3.7 Avaliação do fenótipo das CMSP *ex vivo*

Após a incubação, as células foram marcadas com 20µL de solução contendo os anticorpos fluorocromo-conjugados, numa proporção de 2µL de anticorpos/poço, específicos CD3 (anti-CD3 PerCP-Cy5.5, clone SK7; eBioscience), CD4 (anti-CD4 PerCP-Cy5.5, clone RPA-T4; eBioscience), CD5 (anti-CD5-FITC, clone L17F12; eBioscience), CD8 (anti-CD8 Pe-Cy7, clone SK1; eBioscience), CD19 (anti-CD19 PerCP-Cy5.5, clone SJ25C1; eBioscience), CD25 (anti-CD25 PE-Cy7, clone BC96; eBioscience), CD28 (anti-CD28 APC, clone CD28.2; eBioscience), CD69 (anti-CD69, clone FN50; eBioscience), CCR7 (CD197) (anti-CCR7 APC, clone 3D12; eBioscience) e CTLA-4 (CD152) (anti-CTLA-4 PE, clone 14D3; eBioscience). As placas foram incubadas protegidas da luz por 20 min a 4°C. Foram realizadas três lavagens

sucessivas utilizando-se PBS 1x e solução de lavagem (PBS 1x, azida 1M e BSA) para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal, seguido de re-suspensão das células em 100µL de PBS 1x e 100µL de formaldeído a 2%. As placas foram mantidas a 4°C protegidas da luz até o momento da análise no equipamento FACSCanto® (BD Biosciences, San Jose, CA).

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência e intensidade de expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa *FlowJo* (Tree Star). As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e complexidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, procedeu-se a seleção das populações de linfócitos por janelas nesta população. Foi então delimitada a região específica correspondente a janela na área de linfócitos.

A estratégia de seleção das regiões das subpopulações de linfócitos e de seus marcadores foi feita com base na utilização dos controles isotípicos específicos para camundongo IgG1-PerCP-CY5.5 (clone P3.6.2.8.1, eBioscience), IgG1-Pe-Cy7 (clone P3.6.2.8.1, eBioscience), IgG1-PE (clone eBM2a, eBioscience) e IgG1-APC (clone P3.6.2.8.1, eBioscience), IgG1-PE (clone M1-14D12) e IgG1-FITC (clone M1-14D12).

4.3.8 Análise da expressão de marcadores intracelulares

A expressão das citocinas IFN-γ, IL-5, IL-10 e do fator de transcrição FoxP3, foi analisada como descrito por Sornasse e colaboradores (1996) (Sornasse, Larenas et al., 1996). Suspensões com 3 x 10^5 células/mL foram incubadas em placas de 96 poços por 16 horas a 37ºC, 5% de CO_2 na presença ou não dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Após a incubação, foram adicionados 20µL/poço de brefeldina A (Sigma-Aldrich) diluída 10 vezes e realizada nova incubação sob as mesmas condições por 4 horas. As células foram então marcadas com os anticorpos monoclonais, lavadas com PBS 1X e azida sódica, fixadas com 200µL de formaldeído a 2% e mantidas a 4°C. Após esta etapa, as placas foram centrifugadas e incubadas com 150µL/poço do tampão de permeabilização (PBS 1X, azida sódica e saponina 10%) por 10 minutos

em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para IFN-γ (anti-IFN-γ APC, clone 4S.B3; eBioscience), IL-5 (anti-IL-5 PE, catálogo IC605P, R&D Systems), IL-10 (anti-IL-10, clone JES3-19F1) e FoxP3 (anti-FoxP3 PE, clone PCH 101; eBioscience) seguido de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida foram feitas sucessivas lavagens utilizando-se o tampão de permeabilização, seguidas de ressuspensão das células em 200 μL de formaldeído a 2% e transferência para tubos de leitura do FACS. A aquisição foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), num total de 100.000 eventos.

As estratégias de seleção das células T (CD4 e CD8 e a expressão das moléculas intracelulares IL-5 e IFN-γ são mostradas nas Figuras 2.

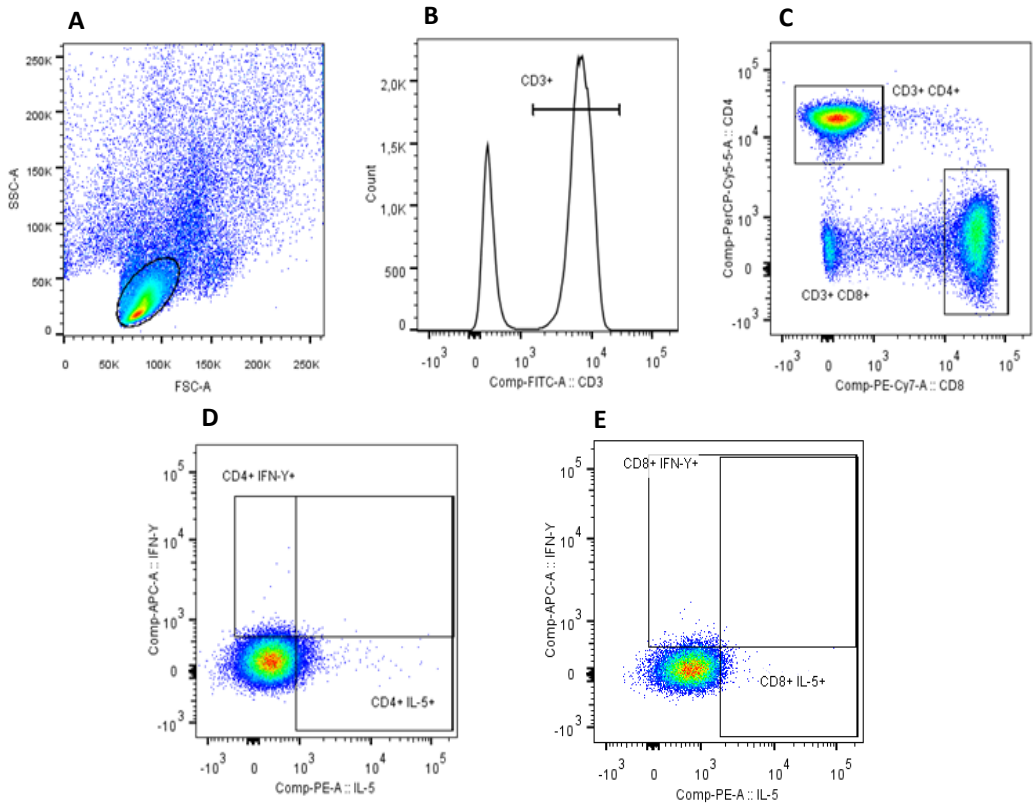

Figura 2. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos através da expressão de CD3 (B), classificação dos linfócitos quanto a expressão de CD4 e CD8 (C). Histograma representativo da expressão de citocinas Th1 e Th2 em TCD4 (D) e em TCD8 (E).

Na Figura 3, são mostradas as estratégias de seleção das células T (CD4 e CD8) e a expressão das moléculas CD25. Também são mostradas as estratégias para seleção das células B (CD19) e a expressão de CD5. Além disso, a figura mostra a estratégia para análise do perfil regulatórios das células T e B através da expressão das moléculas intracelulares FoxP3 e IL-10.

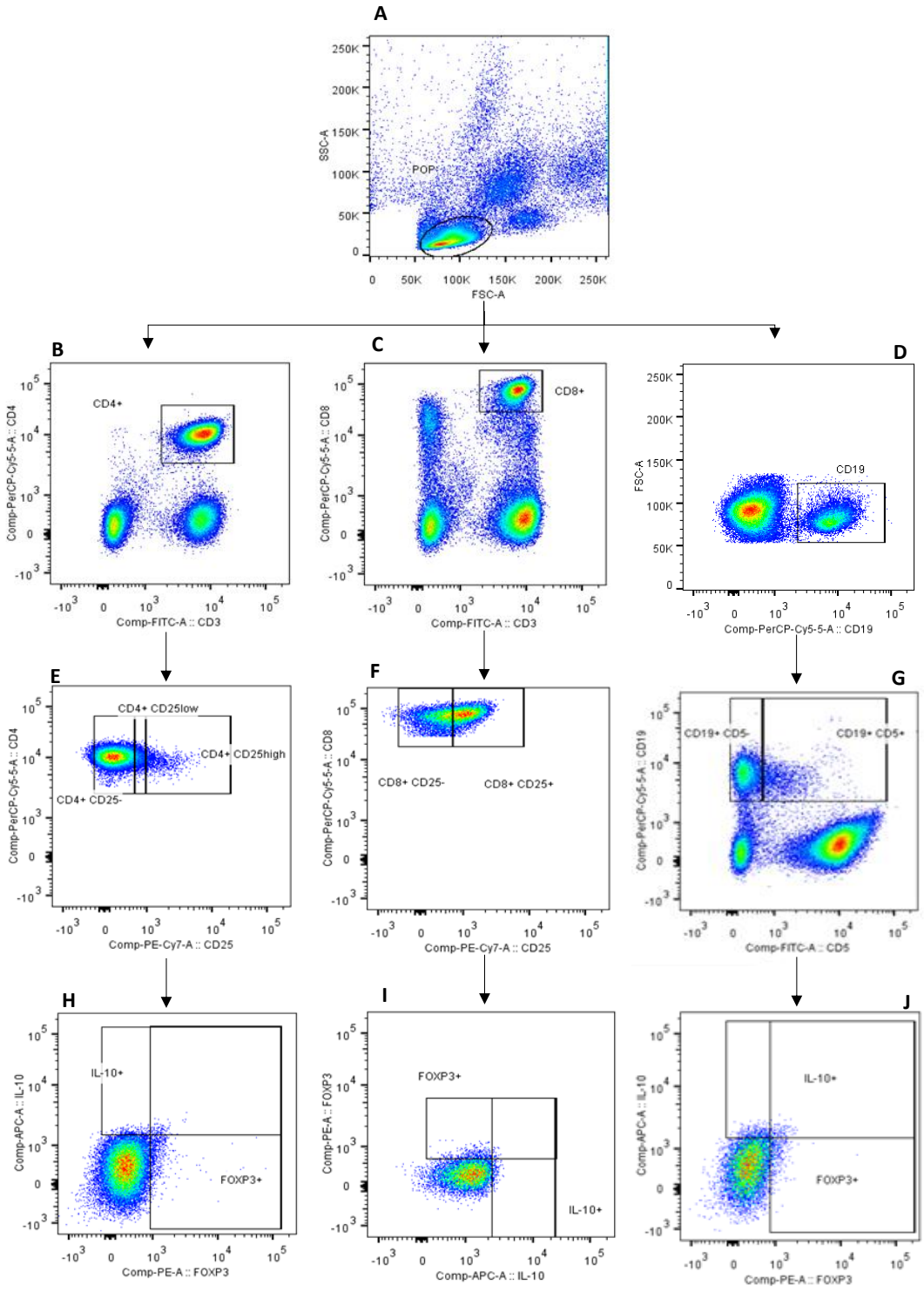

Figura 3. Região de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias de *Schistosoma mansoni* (A). Estratégia de classificação de linfócitos T através da expressão de CD4 e CD8 (B e C) e linfócitos B através da expressão de CD19 (D). Classificação dos linfócitos T quanto a expressão de CD25 em TCD4 e TCD8 (E e F) e linfócitos B quanto a expressão de CD5 (G). Histograma representativo da expressão de moléculas associadas ao perfil regulatório em TCD4 (H), TCD8 (I) e BCD19 (J).

4.3.9 Análises estatística

Os dados referentes à amostra da população estudada foram apresentados através da mediana (limite mínimo – máximo). Os resultados do fenótipo das células por citometria de fluxo foram expressos em percentagem de positividade do total de células, ou percentagem de positividade dentro de um grupo celular específico. Os valores das citocinas intracelulares, o fator de transcrição FoxP3 e moléculas coestimulatórias foram expressos através da média de intensidade de fluorescência (MIF). Para comparação entre os grupos, testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados de acordo com a natureza dos dados gerados, tais como ANOVA e Kruskal Wallis, respectivamente. Todos os testes estatísticos foram bi-caudais, sendo considerados estatisticamente significantes valores de *p* inferiores ao nível de significância pré-estabelecidos em 5%. A representação gráfica foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism® versão 5.0.

4.3.10 Consideração ética

O presente trabalho faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM / Fiocruz / Ba (Parecer / Resolução n° 385.806 – 05/09/2013).

Os métodos utilizados para as avaliações não causaram prejuízos aos pacientes, além daqueles inerentes aos procedimentos usuais para o diagnóstico da doença. Antes de entrar no estudo, todos os pacientes foram informados sobre a natureza da pesquisa. A voluntariedade na participação desse estudo foi mediante assinatura dos participantes ou de seus representantes legais, do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), seguindo as normas do Conselho Nacional de Saúde (CNS 466/2012). Todas as coletas e manuseio de material biológico foram realizados utilizando medidas de segurança padronizada.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Características demográficas e avaliação laboratorial

As características demográficas, carga parasitária, contato com a água contaminada e histórico do tratamento dos diferentes grupos de indivíduos incluídos neste estudo são mostradas na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto a distribuição da idade e do sexo.Também não foram observadas diferenças entre os grupos quanto ao grau de contato com a água contaminada em todos os indivíduos. Na avaliação do histórico de tratamento com o Praziquantel foi observado que os indíviduos foram submetidos a um ciclo de tratamento durante o período de avaliação, não sendo observado, entretanto, diferenças significativas.

Tabela 1. Caracterização demográfica e avaliação dos fatores de risco à infecção dos indivíduos selecionados para a avaliação da resposta imune

Categorias	Baixa Carga (n=20)	Alta Carga (n=16)	Controle Sadio (n=5)	*p*
Idade (mediana / faixa etária em anos)*				
	21 (13 - 58)	16 (10 - 65)	28 (21 - 39)	>0,05
Sexo n (%)**				
Masculino	09 (45,0)	09 (56,2)	02 (40,0)	>0,05
Feminino	11 (55,0)	07 (43,8)	03 (60,0)	
Carga Parasitária de *Schistosoma mansoni* (mediana / faixa em opg de fezes)*				
	00 (00 - 72)	**930 (228 - 2376)**	**-**	**<0,0001**
Contato com a àgua contaminada n (%)**				
Baixo contato	04 (20)	02 (13)		
Médio contato	06 (30)	03 (19)	-	>0,05
Alto contato	10 (50)	11 (69)		
Histórico de tratamento com Praziquantel n (%)**				
Sem registro de tratamento	04 (20)	04 (25)	-	>0,05
1 ciclo de tratamento	16 (80)	12 (75)		

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste do Qui-quadrado

A análise do perfil coproparasitológicos dos indivíduos selecionados neste estudo demonstra que os indivíduos resistentes à infecção pelo *S. mansoni*

experimentam, também, menores cargas parasitárias e menores frequências de coinfecções para os helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e Ancilostomídeos (dados não mostrados).

Os resultados da avaliação laboratorial dos perfis renal, hepático e hematológico estão mostrados na Tabela 2. Não foram observadas diferenças nas dosagens de uréia e creatinina. Quanto a avaliação do perfil hepático também não foi observada diferenças significativas nas concentrações dos analitos ALT/TGP, AST/TGO, γGT, albumina entre os grupos estudados. Porém, os indivíduos com altas cargas parasitárias apresentaram níveis de ALP superiores aos observados no grupo de indivíduos com baixa carga e o grupo controle ($p<0,05$). Contudo, dos 10 indivíduos que apresentaram níveis séricos de ALP aumentados, 07 possuíam idades entre 10 e 18 anos. Para os demais indivíduos, os níveis de ALP aumentados constituíam o único parâmetro alterado.

Na avaliação do hemograma, apenas 05 indivíduos (02 com baixa carga e 03 com alta carga) apresentaram anemia (Hb <11,5 g/dL). Porém não foram observadas diferenças significativas em todos os parâmetros que compõem o eritrograma nos diferentes grupos.

A contagem de leucócitos totais não diferiu entre os grupos, porém quatro indivíduos de cada grupo apresentaram leucopenia ou leucocitose. As concentrações de neutrófilos, linfócitos e basófilos também não diferiram entre os grupos avaliados. Entretanto, foi observado que os indivíduos com alta carga parasitária apresentaram maiores concentrações de eosinófilos quando comparados aos controles sadios. Este mesmo grupo apresentou, ainda, concentrações de monócitos menores do que os observados no grupo de controles sadios.

Na avaliação do plaquetograma e a avaliação da coagulação, não foram observadas diferenças entre as contagens de plaquetas e RNI entre os grupos avaliados.

Tabela 2. Avaliação laboratorial dos indivíduos com diferentes cargas parasitárias para *Schistosoma mansoni.*

Categorias	Baixa Carga (n=20)	Alta Carga (n=16)	Controle Sadio (n=5)	*p*
Função Renal; mediana (intervalo)*				
Uréia (mg/dL)	19 (9 - 38)	24 (13 - 42)	31 (25 - 34)	>0,05
Creatinina (mg/dL)	0,80 (0,60 - 1,20)	0,61 (0,42 - 1,02)	0,70 (0,60 - 0,93)	>0,05
Função Hepática; mediana (intervalo)*				
AST (U/L)	25 (13 - 67)	25 (16 - 45)	20 (19 - 29)	>0,05
ALT (U/L)	24 (9 - 54)	18 (10 - 46)	17 (13 - 48)	>0,05
GGT (U/L)	33 (10 - 166)	27 (10 - 68)	28 (15 - 52)	>0,05
ALP (U/L)	**109 (65 - 1002)**	**284 (139 - 740)**	**178 (83 - 283)**	**<0,05[a,b]**
Albumina (g/dL)	4,3 (3,0 - 4,8)	4,4 (4,1 - 4,7)	4,4 (4,3 - 4,5)	>0,05
RNI	1,10 (1,00 - 1,38)	1,07 (1,00 - 1,27)	1,15 (1,10 - 1,19)	>0,05
Parâmetros Hematológicos; mediana (intervalo)*				
Hemácias (milhões/mm^3)	4,69 (3,98 - 5,66)	4,49 (4,24 - 5,11)	4,73 (4,29 - 5,76)	>0,05
Hemoglobina (g/dL)	13,2 (11,2 -15,4)	13,0 (11,3 - 14,8)	13,2 (13,0 - 15,8)	>0,05
Hematócrito (%)	39,9 (34,6 - 45,7)	38,7 (34,8 - 42,9)	40,5 (37,4 - 44,7)	>0,05
Leucócitos Totais (/mm^3)	6240 (3890 - 11020)	6060 (3720 - 9010)	6300 (5130 - 7570)	>0,05
Segmentados (/mm3)	3461 (696 - 6191)	3254 (1339 - 5198)	3749 (1919 - 4732)	>0,05
Eosinófilos (/mm3)	417 (81 - 2442)	**697 (348 - 1848)**	**208 (47 - 292)**	**<0,05[b]**
Basófilos (/mm3)	21,3 (0,0 - 56,0)	0,0 (0,0 - 53,3)	37,9 (6,7 - 69,7)	>0,05
Linfócitos (/mm3)	2148 (1101 - 4026)	1817 (1320 - 3136)	1998 (1758 - 2378)	>0,05
Monócitos (/mm3)	408 (219 - 844)	**316 (112 - 558)**	**549 (407 - 689)**	**<0,05[b]**
Plaquetas (mil/mm3)	243 (166 - 369)	224 (144 - 359)	294 (221 - 356)	>0,05

*Teste de Kruskall-Wallis ([a]Baixa Carga *vs* Alta Carga; [b]Alta Carga *vs* Controle Sadio)

4.4.2 Frequência de linfócitos T (CD4$^+$ e CD8$^+$) e linfócitos B (CD19$^+$) em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta carga de *Schistosoma mansoni*, após a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6

Neste estudo foram avaliadas as frequências de linfócitos T (CD4$^+$ e CD8$^+$) em culturas de CMSP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, com baixa e alta cargas parasitárias estimuladas com antígenos do *Schistosoma mansoni*. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências das células TCD4$^+$ e TCD8$^+$ quando foram utilizados os diferentes antígenos, bem como entre os grupos avaliados (p >0,05). A razão entre as células TCD4$^+$ e TCD8$^+$ também foi avaliada. Entretanto, não foi observada diferenças significativas entre os grupos de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias. Foi também avaliada neste estudo a frequência de linfócitos B, através do marcador CD19, nas culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas de *S. mansoni*. Não

se observou, entretanto, nenhuma diferença significativa na frequência destas células nos grupos avaliados, independentemente dos antígenos utilizados (dados não mostrado).

4.4.3 Baixa carga parasitária está associado à alta produção de IFN-γ e IL-5 pelos linfócitos TCD4$^+$ e TCD8$^+$

Na avaliação da expressão de IFN-γ por linfócitos TCD4$^+$, foi observado que o grupo de indivíduos com baixa carga parasitária apresentaram maiores frequências de células TCD4$^+$ IFN-γ$^+$ nas culturas não estimuladas [3,14% (0,78% – 6,90%); p<0,05], e estimuladas com rSm29 [3,62% (1,47% – 5,03%); p<0,05] e rSm22.6 [3,03% (0,85% – 7,32%); p<0,05], quando comparados aos valores encontrados nas culturas não estimuladas [0,79% (0,24% – 3,69%)], estimuladas com rSm29 [1,07%(0,48% – 5,84%)] e rSm22.6 [0,75% (0,20%– 3,22%)] dos indivíduos com alta carga parasitária. A intensidade da expressão de IFN-γ nas células T foi avaliada através das médias de intensidade de fluorescência (MIF). Foi observado que as culturas de CMSP dos indivíduos com baixa carga apresentaram valores significantemente maiores do que àqueles verificados no grupo de indivíduos com alta carga, tanto para culturas não estimuladas [Baixa carga – 164 (57,3 – 345,0); Alta carga – 42,4 (26,2 – 75,4); p<0,05], quanto para culturas estimuladas com SWAP [Baixa carga – 177,5 (57,4 – 330,0); Alta carga – 39,5 (28,8 – 79,1); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 128,5 (59,0 – 284,0); Alta carga – 42,6 (26,4 – 79,5); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 161,5 (54,5 – 312,0); Alta carga – 41,4 (28,0 – 79,8); p<0,05]. Foi observado também, uma maior intensidade de expressão de IFN-γ nas culturas estimuladas pelo SWAP no grupo de controles sadios [147 (51,8 – 165)], quando comparados às culturas dos indivíduos com alta carga [42,6 (26,4 – 79,5); p<0,05], Figura 4A.

Avaliando-se a expressão de IFN-γ em linfócitos TCD8$^+$, foi observado uma maior frequência desta citocina em células TCD8$^+$ de culturas estimuladas pelo rSm29 nos indivíduos com baixa carga [4,73% (0,76% – 6,16%)], em comparação aos valores observados no grupo com alta carga [2,15% (0,13% – 4,69%); p<0,05]. Houve também maior intensidade de expressão de IFN-γ em

células TCD8$^+$ de indivíduos com baixa carga, tanto para as culturas sem estímulo [Baixa carga – 71,4 (30,2 – 125); Alta carga – 41,3 (16,0 – 77,5); p<0,05] quanto para as culturas estimuladas por SWAP [Baixa carga – 77,4 (29,1 – 134,0); Alta carga – 41,9 (15,9 – 73,2); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 75,4 (34,1 – 143,0); Alta carga – 45,6 (17,4 – 62,0); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 89,5 (33,8 – 172,0); Alta carga – 42,6 (18,0 – 76,6); p<0,05], em comparação aos valores observados nas culturas do grupo de pacientes com alta carga parasitária, Figura 4B.

Na avaliação da frequência de células TCD4$^+$IL-5$^+$ foi observado que o grupo de indivíduos com baixa carga parasitária, apresentaram maior frequência de células TCD4$^+$IL-5$^+$ nas culturas não estimuladas [3,89% (1,07% – 6,01%); p<0,05], quando comparados aos valores encontrados nas culturas não estimuladas dos indivíduos com alta carga parasitária [2,52% (1,40% – 5,00%)]. Porém, avaliando-se a expressão de IL-5 através das médias de intensidade de fluorescências (MIF), observou-se uma maior expressão de IL-5 nas células TCD4$^+$ de indivíduos com baixa carga, quando comparados ao grupo de alta carga, tanto nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 673 (196 – 1266); Alta carga – 169 (132 – 306); p<0,05] quanto após a adição de SWAP [Baixa carga – 661 (188 – 1447); Alta carga – 163 (128 – 385); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 921 (205 – 1013); Alta carga – 174 (135 – 298); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 754 (198 – 1521); Alta carga – 165 (139 – 399); p<0,05], conforme mostrado Figura 4C.

Não foram observadas diferenças significativas na frequência de linfócitos TCD8$^+$IL-5$^+$ entre os grupos avaliados, em resposta aos antígenos de *S. mansoni*. Entretanto, quando se avaliou a expressão desta citocina, através das médias de intensidade de fluorescência, verificou-se que células TCD8$^+$ de indivíduos com baixa carga apresentaram valores significativamente superiores aos observados em células TCD8$^+$ de indivíduos do grupo de alta carga, tanto nas culturas não estimulada [Baixa carga – 712,0 (226,0 – 1446,0); Alta carga – 329,5 (133,0 – 985,0); p<0,05] quanto nas culturas estimuladas pelo SWAP [Baixa carga – 765 (222,0 – 1893,0); Alta carga – 302,0 (135,0 – 973,0); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 849,5 (253,0 – 1022,0);Alta carga – 347,0

(148,0 – 909,0); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 812,5 (240,0 – 2382,0); Alta carga – 299,5 (155,0 – 1126,0); p<0,05], conforme demonstrado na Figura 4D.

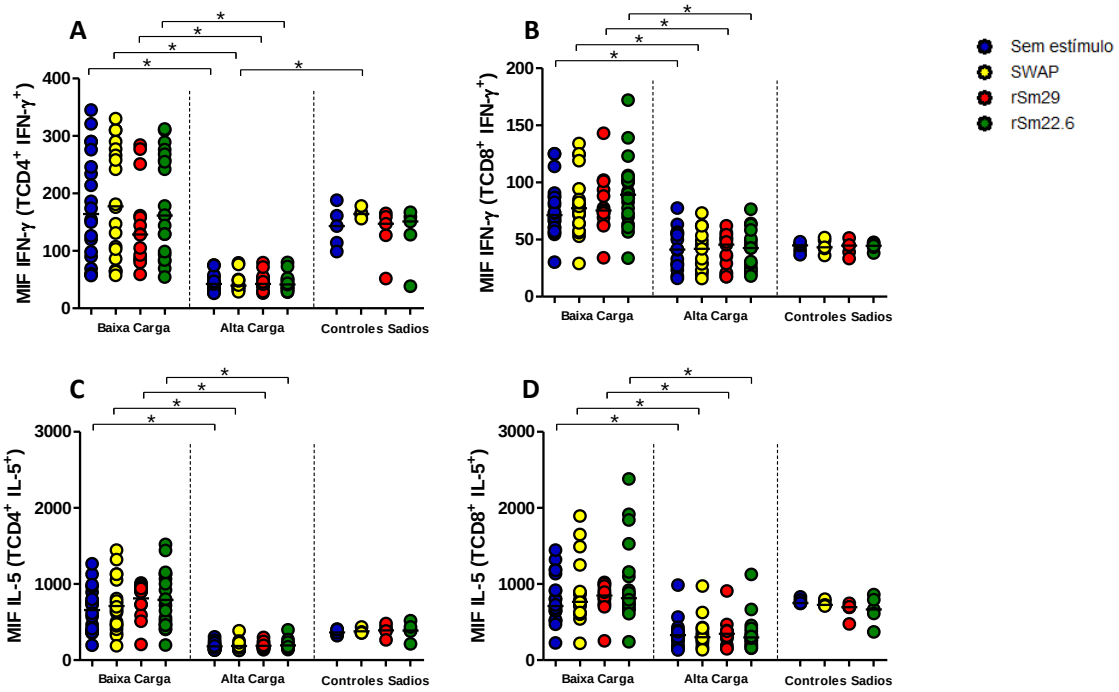

Figura 4. Expressão das citocinas IFN-γ e IL-5 em linfócitos TCD4⁺ (A e B, respectivamente) e TCD8⁺ (C e D, respectivamente), através da Média de Intensidade de Fluorescência em culturas de CMSP de indivíduos com baixas e altas cargas *de S. mansoni*, após adição de SWAP, rSm29 e rSm22.6. A barra horizontal representa o valor mediano. Os asteriscos representam testes estatisticamente significantes (*p<0,05; Teste de Kruskall - Wallis).

4.4.4 Alta carga parasitária de *Schistosoma mansoni* está associada à diminuição da ativação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺)

Neste estudo foi avaliado a expressão das moléculas de superfície associadas à ativação - CD28 e regulação celular - CTLA-4 nas culturas de CMSP estimuladas pelos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Foi observado que as células de indivíduos com baixa carga parasitária *de S. mansoni* apresentaram maior expressão da molécula CD28, tanto na população de linfócitos TCD4⁺ quanto na população de linfócitos TCD8⁺ para todas as condições avaliadas, comparado aos indivíduos com alta carga (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão de CD28 em linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta carga parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.

Linfócitos	Estímulos	CD28			
		Baixa Carga	**Alta Carga**	**Controles Sadios**	**p**
$TCD4^+$	Sem estímulos	**3461 (1128 - 6310)**	**1224 (707 - 2170)**	2202 (1910 - 2485)	p<0,05
	SWAP	**3024 (1305 - 6682)**	**1211 (598 - 2229)**	2288 (827 - 2450)	p<0,05
	rSm29	**2989 (1426 - 5712)**	**1257 (786 - 2747)**	2126 (1715 - 2429)	p<0,05
	rSm22.6	**3447 (1337 - 5761)**	**1175 (997 - 2472)**	1791 (1045 - 2047)	p<0,05
$TCD8^+$	Sem estímulos	**2048 (733 - 4199)**	**635 (470 - 1639)**	1174 (1025 - 1453)	p<0,05
	SWAP	**1909 (767 - 4140)**	**622 (534 - 1666)**	1219 (729 - 1569)	p<0,05
	rSm29	**1889 (893 - 3787)**	**632 (427 - 1886)**	1231 (849 - 1397)	p<0,05
	rSm22.6	**1922 (832 - 3781)**	**663 (477 - 1808)**	955 (710 - 1329)	p<0,05

* Teste de Kruskall-Wallis (Baixa Carga *vs* Alta Carga)

Resultados semelhantes foram observados para a expressão da molécula CTLA-4*,* conforme mostrado na Tabela 4. Não houve, entretanto, diferenças estatisticamente significantes entre os valores observados nas culturas de CMSP do grupo de baixa carga, quando comparados ao grupo de Controles sadios, e deste grupo com os indivíduos de alta carga (p>0,05; Teste de Kruskall-Wallis).

Tabela 4. Expressão de CTLA-4 em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.

Linfócitos	Estímulos	CTLA4			
		Baixa Carga	Alta Carga	Controles Sadios	p
TCD4⁺	Sem estímulos	**687 (267 - 1008)**	**196 (146 - 520)**	695 (425 - 1039)	p<0,05
	SWAP	**663 (147 - 1653)**	**158 (141 - 590)**	591 (483 - 799)	p<0,05
	rSm29	**678 (272 - 936)**	**195 (148 - 584)**	756 (508 - 1213)	p<0,05
	rSm22.6	**770 (218 - 1364)**	**195 (149 - 633)**	774 (618 - 1076)	p<0,05
TCD8⁺	Sem estímulos	**1650 (224 - 3811)**	**213 (195 - 374)**	771 (752 - 778)	p<0,05
	SWAP	**1843 (230 - 3035)**	**216 (195 - 262)**	753 (740 - 784)	p<0,05
	rSm29	**1489 (231 - 2510)**	**224 (190 - 279)**	759 (746 - 811)	p<0,05
	rSm22.6	**2112 (243 - 3496)**	**209 (196 - 278)**	763 (715 - 806)	p<0,05

* Teste de Kruskall-Wallis (Baixa Carga *vs* Alta Carga)

4.4.5 A resistência à infecção está associada a um perfil de células T e B regulatórios

No sentido de avaliar se os antígenos do *S. mansoni* induzem perfil regulatório nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ de indivíduos com baixa e alta carga, foram avaliados a expressão das moléculas CD25, FoxP3 e IL-10 nestas células. Inicialmente, as células TCD4⁺ foram classificadas em subpopulações que apresentavam ausência, baixa e alta expressão de CD25 ($CD25^{neg}$, $CD25^{low}$ e $CD25^{high}$, respectivamente), as células TCD8+, por sua vez, foram classificadas atráves da expressão de CD25 em subpopulações $TCD8^{+}CD25^{neg}$ e $TCD8^{+}CD25^{+}$.

A frequência das subpopulações de células $TCD4^{+}CD25^{high}$ e $TCD4^{+}CD25^{low}$ foi semelhante entre os grupos estudados, independentemente do estímulo utilizado (p>0,05). Em relação a subpopulação de células $TCD4^{+}CD25^{neg}$, foi observado que indivíduos com alta carga apresentaram maior frequência destas células nas culturas não estimuladas [88,7% (82,0% – 95,2%)], quando comparado às culturas de indivíduos com baixa carga parasitária [92,6% (89,6% – 96,5%); p<0,05]. Quanto à subpopulação $TCD8^{+}CD25^{neg}$ não foram

observadas diferenças significativas na frequência destas células entre os grupos estudados (p>0,05).

A expressão das moléculas regulatórias FoxP3 e IL-10 nas subpopulações de células $TCD4^{+}CD25^{neg}$, $TCD4^{+}CD25^{low}$, $TCD4^{+}CD25^{high}$, linfócitos $TCD8^{+}CD25^{neg}$, $TCD8^{+}CD25^{+}$, linfócitos B $CD19^{+}CD5^{neg}$ e $CD19^{+}CD5^{+}$ em culturas estimuladas, está apresentada na Tabela 4. Foi observado que, para todas as subpopulações avaliadas, houve maior expressão de FoxP3 e IL-10 nas culturas dos indivíduos com baixa carga parasitária estimuladas ou não com antígenos, quando comparados com o grupo de alta carga (tabela 5).

Neste estudo foi também avaliada a expressão de CD5 por linfócitos $CD19^{+}$ em culturas de CMSP de indivíduos com diferentes cargas parasitárias. Não foram observadas diferenças significativas na frequência das células B $CD19^{+}CD5^{+}$ e B $CD19^{+}CD5^{neg}$ entre os grupos, nas culturas estimuladas com os diferentes antígenos do *S. mansoni*.

Quanto à frequência de FoxP3 nestas subpopulações, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados, independentemente do estímulo utilizado (p>0,05).

Em relação à expressão de IL-10 pelas células B $CD19^{+}CD5^{+}$ nas culturas estimuladas pelos antígenos do *S. mansoni*, foi observado maior expressão desta citocina nos indivíduos com baixa carga, em relação ao encontrado no grupo de alta carga, tanto nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 35,3% (0,2% – 87,4%); Alta carga – 2,6% (0,0% – 25,4%); p<0,05] quanto nas culturas estimuladas pelo SWAP [Baixa carga – 35,3% (1,3% – 90,5%); Alta carga – 2,3% (1,0% – 28,3%); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 52,4% (0,4% – 89,2%); Alta carga – 2,1% (1,1% – 43,3%); p<0,05]. Não foi observado, entretanto, diferenças significantes nas culturas estimuladas pelo rSm29 (p>0,05).

Quanto a expressão de IL-10 pelos linfócitos $BCD19^{+}CD5^{neg}$, esta também foi mais elevada no grupo de indivíduos com baixa carga, comparado aos valores encontrados nos indivíduos com alta carga, tanto nas culturas não estimuladas [Baixa carga – 27,5% (1,0% – 86,0%); Alta carga – 0,7% (0,1% – 27,4%);

p<0,05], quanto nas culturas estimuladas pelos antígenos SWAP [Baixa carga – 27,0% (0,81% – 85,7%); Alta carga – 0,7% (0,2% – 30,2%); p<0,05], rSm29 [Baixa carga – 18,6% (0,75– 59,9); Alta carga – 1,0 (0,2 – 17,1); p<0,05] e rSm22.6 [Baixa carga – 38,8% (1,1% – 83,7%); p<0,05; Alta carga – 1,1% (0,2% – 45,2%); p<0,05].

Tabela 5. Expressão de IL-10 e FoxP3 em linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e B em culturas de CMSP de indivíduos com baixa e alta cargas parasitárias *de S. mansoni,* estimuladas *in vitro* com os antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6. Os resultados obtidos representam a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos.

Subpopulações	Estímulos	IL-10				FoxP3			
		Baixa Carga	Alta Carga	Controles Sadios	p	Baixa Carga	Alta Carga	Controles Sadios	p
$TCD4^+ CD25^{neg}$	Sem estímulos	**767 (54 - 1488)**	**44 (30 - 73)**	133 (114 - 190)	p<0,05	**439 (209 - 761)**	**158 (117 - 518)**	325 (302 - 396)	p<0,05
	SWAP	**736 (56 - 1303)**	**45 (36 - 78)**	188 (165 - 214)	p<0,05	**436 (185 - 702)**	**154 (122 - 493)**	346 (332 - 362)	p<0,05
	rSm29	**865 (59 - 5765)**	**46 (33 - 125)**	183 (63 - 199)	p<0,05	**478 (196 - 657)**	**167 (127 - 431)**	331 (264 - 407)	p<0,05
	rSm22.6	**1132 (59 - 4673)**	**44 (32 - 76)**	159 (44 - 189)	p<0,05	**451 (161 - 794)**	**152 (123 - 451)**	327 (212 - 348)	p<0,05
$TCD4^+ CD25^{low}$	Sem estímulos	**854 (54 - 1843)**	**47 (30 - 688)**	149 (118 - 192)	p<0,05	**500 (211 - 852)**	**166 (123 - 631)**	337 (305 - 414)	p<0,05
	SWAP	**776 (49 - 2254)**	**46 (32 - 802)**	179 (153 - 205)	p<0,05	**516 (186 - 852)**	**168 (34 - 618)**	360 (350 - 365)	p<0,05
	rSm29	**774 (61 - 3533)**	**49 (30 - 131)**	186 (70 - 195)	p<0,05	**538 (205 - 761)**	**193 (144 - 549)**	343 (302 - 436)	p<0,05
	rSm22.6	**1044 (56 - 1829)**	**43 (32 - 668)**	162 (42 - 186)	p<0,05	**584 (156 - 1068)**	**173 (39 - 554)**	350 (246 - 352)	p<0,05
$TCD4^+ CD25^{high}$	Sem estímulos	**780 (51 - 1773)**	**43 (27 - 1624)**	130 (111 - 175)	p<0,05	**650 (209 - 1276)**	**189 (141 - 994)**	362 (335 - 443)	p<0,05
	SWAP	**806 (48 - 3194)**	**44 (30 - 834)**	158 (148 - 194)	p<0,05	**708 (205 - 1541)**	**201 (145 - 989)**	378 (372 - 401)	p<0,05
	rSm29	**632 (56 - 1808)**	**43 (32 - 144)**	162 (70 - 186)	p<0,05	**567 (219 - 1244)**	**213 (154 - 760)**	399 (357 - 465)	p<0,05
	rSm22.6	**718 (54 - 2596)**	**44 (33 - 694)**	146 (52 - 188)	p<0,05	**676 (176 - 1635)**	**198 (154 - 884)**	364 (348 - 382)	p<0,05
$TCD8^+ CD25^{neg}$	Sem estímulos	**928 (39 - 1521)**	**52 (20 - 650)**	63 (44 - 77)	p<0,05	**504 (242 - 1243)**	**297 (120 - 884)**	781 (678 - 912)	p<0,05
	SWAP	**927 (33 - 1922)**	**48 (22 - 589)**	64 (46 - 78)	p<0,05	**571 (209 - 1182)**	**277 (136 - 850)**	730 (550 - 837)	p<0,05
	rSm29	**672 (42 - 1718)**	**57 (24 - 75)**	54 (47 - 87)	p<0,05	**574 (229 - 956)**	**306 (143 - 585)**	692 (475 - 837)	p<0,05
	rSm22.6	**1165 (38 - 1769)**	**52 (23 - 476)**	52 (32 - 62)	p<0,05	**550 (222 - 931)**	**288 (130 - 689)**	687 (349 - 741)	p<0,05
$TCD8^+ CD25^+$	Sem estímulos	**1148 (121 - 2613)**	**74 (11 - 739)**	82 (55 - 103)	p<0,05	**520 (323 - 1485)**	**404 (130 - 1109)**	866 (777 - 1026)	p<0,05
	SWAP	**1151 (50 - 1920)**	**47 (19 - 866)**	70 (41 - 80)	p<0,05	**552 (271 - 1403)**	**330 (180 - 484)**	778 (646 - 923)	p<0,05
	rSm29	**769 (75 - 1453)**	**74 (19 - 684)**	71 (66 - 118)	p<0,05	**632 (249 - 1296)**	**451 (195 - 736)**	866 (663 - 1095)	p<0,05
	rSm22.6	**1388 (48 - 2381)**	**53 (17 - 571)**	54 (0 - 76)	p<0,05	**606 (261 - 1160)**	**350 (180 - 891)**	764 (508 - 841)	p<0,05
$BCD19^+ CD5^{neg}$	Sem estímulos	**913 (44 - 1872)**	**42 (26 - 705)**	100 (66 - 112)	p<0,05	**393 (223 - 616)**	**216 (150 - 484)**	440 (221- 493)	p<0,05
	SWAP	**966 (43 - 1688)**	**47 (26 - 758)**	95 (20 - 108)	p<0,05	**408 (226 - 614)**	**210 (154 - 507)**	436 (245 - 478)	p<0,05
	rSm29	**1319 (50 - 3305)**	**47 (27 - 754)**	101 (43 - 114)	p<0,05	**416 (242 - 657)**	**227 (160 - 471)**	446 (344 - 469)	p<0,05
	rSm22.6	**1037 (46 - 3037)**	**43 (27 - 624)**	116 (95 - 124)	p<0,05	**439 (235 - 703)**	**226 (153 - 550)**	461 (432 - 497)	p<0,05
$BCD19^+ CD5^+$	Sem estímulos	**1415 (45 - 9224)**	**74 (22 - 1023)**	102 (100 - 106)	p<0,05	**710 (249 - 1363)**	**271 (135 - 566)**	494 (436 - 535)	p<0,05
	SWAP	**1284 (51 - 9772)**	**66 (38 - 1016)**	104 (31 - 140)	p<0,05	**757 (246 - 1595)**	**235 (142 - 597)**	500 (366 - 640)	p<0,05
	rSm29	**1122 (74 - 9409)**	**67 (24 - 1672)**	117 (52 - 142)	p<0,05	**981 (318 - 2168)**	**280 (170 - 749)**	578 (438 - 838)	p<0,05
	rSm22.6	**1129 (42 - 8274)**	**57 (26 - 693)**	105 (91 - 151)	p<0,05	**892 (259 - 1320)**	**263 (166 - 864)**	554 (502 - 809)	p<0,05

4.5 DISCUSSÃO

A resistência natural a infecção pelo *Schistosoma mansoni* tem sido associada a um perfil misto de resposta Th1 e Th2 (VIANA et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2012; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1993). A resistência à reinfecção, por sua vez, tem sido associada à uma resposta predominantemente Th2 com presença de eosinofilia (HAGAN et al., 1985), IgE específica para o parasito e produção de IL-4 e IL-5 por células mononucleares de sangue periférico estimuladas *in vitro* (DUNNE et al., 1992; RIHET et al., 1991; HAGAN et al., 1991). Estudos realizados anteriormente na área do Conde, Bahia, demonstraram que cerca de 5% dos indivíduos apresentavam resistência natural a infecção pelo *Schistosoma* (OLIVEIRA et al., 2012). Contudo a resposta imune de indivíduos infectados com baixas cargas parasitárias, independente do nível de exposição a água contaminada, ainda carece de estudos. O presente estudo avaliou o perfil fenotípico e funcional das células T e B em indivíduos residentes em área endêmica para *S. mansoni* que apresentaram, ao longo de 10 anos, baixas cargas parasitárias. Além disso, foi avaliado a associação entre o fenótipo e a função destas células e sua possível participação nos mecanismos envolvidos na resistência à infecção pelo *S. mansoni*.

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas quando se avaliou o sexo e a idade dos grupos de baixa e alta carga. O risco de infecção pelo *S. mansoni* está diretamente associado ao contato com a água contaminada. Não foram observadas diferenças significativas entre o grau de exposição à água contaminada. Este dado reforça a idéia de que a resistência ou susceptibilidade à infecção não esteja condicionada ao grau de exposição a fontes hídricas contaminadas. Além disso, nossos dados sugerem que a resistência a infecção pelo *S. mansoni* confere resistência às infecções por outros helmintos. Corroborando com essa hipótese, Oliveira e colaboradores (2012) demonstraram que a resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* não estaria associada às características comportamentais e socioeconômicas (OLIVEIRA et al., 2012).

Por ser uma doença de curso crônico, na qual as formas mais graves estão associadas, dentre outros fatores, a altas cargas parasitárias e, que as

diferentes formas clínicas da doença podem apresentar respostas imunes dispares (ANDRADE et al., 2008; CALDAS et al., 2008), fez-se necessário neste estudo, avaliar os aspectos hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com as diferentes cargas parasitárias, uma vez que, a resposta imune em indivíduos com as formas descompensadas da doença poderiam interferir na interpretação dos resultados obtidos neste trabalho. Na esquistossomose crônica, os exames laboratoriais não revelam grandes alterações, porém nas formas hepatoesplênicas com hiperesplenismo, podem ser observadas anemia e plaquetopenia (MCCORMICK & MURPHY, 2000) e na nefropatia severa podem ser observadas diminuição da função renal, devido ao depósito de imunocomplexos aos glomérulos renais, que ocasionam o desenvolvimento de glomerulopatias (ELSHEIKH et al., 1989; GRYSCHEK & CHIEFFI, 2008). Não foram observadas neste estudo evidencias laboratoriais de formas graves da doença esquistossomótica. Não houve diferenças significativas nos parâmetros que avaliaram o perfil renal dos indivíduos avaliados neste estudo.

Na avaliação do perfil hepático, entretanto, foi observado que os indivíduos com altas cargas parasitárias apresentaram níveis de ALP superiores aos observados no grupo com baixa carga parasitária e dos indivíduos sadios. Uma possível explicação é que a maioria dos indivíduos com alta carga que apresentaram níveis séricos de ALP aumentados, eram adolescentes. E, devido ao processo osteoclástico observada nesta fase da vida, a isoenzima óssea encontra-se aumentada, produzindo valores de ALP mais elevados que nos adultos (RIDEFELT et al., 2014). Portanto, este achado não configuraria alteração significativa observada nas formas graves da esquistossomose *mansoni*.

Dentre os dados da avaliação hematológica, a eosinofilia foi o único parâmetro que deferiu entre os grupos. O aumento no número absoluto de eosinófilos observado no grupo com alta carga parasitária está associado ao padrão de resposta à infecção helmíntica – Th2, com produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (RUMBLEY et al., 1999). Cumpre destacar que a IL-5 é considerada a mais importante eosinofilopoetina, que participa do processo de maturação e aumento da sobrevida os eosinófilos. Estas células possuem a habilidade de migração para sítios inflamatórios sendo decisivas na resposta granulomatosa,

a fase que envolve a participação de diversos tipos celulares a exemplo das células T e B (SWARTZ et al., 2006).

A resposta granulomatosa observada na esquistossomose é mediada por diversos tipos celulares dentre eles destacam-se as células $TCD4^+$ específicas para os antígenos parasitários que constituem importantes fontes de citocinas Th2 e regulatórias associadas à resposta imune protetora na infecção pelo *Schistosoma mansoni*. As células $TCD8^+$, por sua vez, são importantes fontes de citocinas e estão associados a modulação da resposta granulomatosa (CHENSUE et al., 1981). Além disso, alguns trabalhos demonstram a habilidade das células B na produção de diversas citocinas associadas ao padrão de resposta Th1, Th2 e regulatório. Porém o seu papel na esquistossomose em humanos ainda é pouco explorado (HARRIS et al., 2000).

Neste estudo, a frequência de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$, a relação $TCD4^+$/ $TCD8^+$ e a frequência de células B ($CD19^+$) não diferiram entre o grupo de indivíduos com baixa carga e alta carga parasitária de *S. mansoni*. Esse dado reforça a idéia de que, a despeito da semelhança na proporção destas células nos diferentes grupos avaliados, o fenótipo celular deve influenciar o padrão de respostas e que as diferenças fenotípicas aqui encontradas não seriam consequência da proporção aumentada de um ou outro compartimento celular. Trabalho desenvolvido por Oliveira-Prado e colaboradores (2009), em área endêmica para *S. mansoni*, demonstrou frequências de células $TCD4^+$ e relação $TCD4^+/TCD8^+$ menores nos indivíduos infectados quando comparado aos indivíduos não-infectados (OLIVEIRA-PRADO et al., 2009). Porém diferenças nas estratégias de seleção dos pacientes estudados, neste estudo, diferem dos critérios de seleção do presente trabalho que avaliou indivíduos com baixas cargas parasitárias ao longo de 10 anos.

Vários autores demonstraram que variações na resposta imune celular podem influenciar tanto o desenvolvimento dos eventos imunopatológicos quanto a resistência à infecção. Porém, estes estudos avaliaram apenas a produção de citocinas em sobrenadantes de CMSP estimuladas por diversos antígenos. Estes autores demonstraram que CMSP de indivíduos normais endêmicos produziam altos níveis de IFN-γ, importante citocina do padrão Th1 (BAHIA-

OLIVEIRA et al., 1992; VIANA et al., 1994; BRITO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012). Aliado a isto, alguns trabalhos evidenciam o fato de que a resistência esteja associada a um padrão misto de resposta Th1 e Th2 (Revisado por CORREA-OLIVEIRA et al., 2000). Reforçando essa hipótese, trabalhos realizados por nosso grupo, no Conde-Ba demonstraram que as CMSP de indivíduos resistentes naturais estimulados por antígenos do *S. mansoni* produziam níveis significativos de IL-5, IL-13 e IFN-γ (OLIVEIRA et al., 2012). Em contraste, os indivíduos que apresentam resistência droga-induzida apresentam um perfil Th2 predominante (COUISSINIER-PARIS & DESSEIN 1995).

Neste estudo, foi possível avaliar as possíveis fontes de IFN-γ e IL-5 e, foi observado que tanto os linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ constituem importantes fontes destas citocinas. Os indivíduos com baixas cargas apresentaram uma maior expressão de IFN-γ e IL-5 quando comparados aos indivíduos com alta carga parasitária. Estes dados, sugerem que o padrão misto de resposta Th1 e Th2 pode estar associado ao controle da carga parasitária nestes indivíduos, e que a susceptibilidade esteja associada a uma inapetência das células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em produzirem estas citocinas. O que reforça essa hipótese é que os indivíduos com altas cargas parasitárias apresentaram menor expressão das moléculas coestimulatórias CD28 e CTLA-4 cruciais para os processos de expansão e otimização na resposta protetora (BOESTEANU & KATSIKIS 2009). Adicionalmente, o aumento na expressão de CTLA-4 demonstrado nestes indivíduos atuaria na prevenção de danos provocados pelas respostas Th1 e Th2 observadas nos indivíduos com baixa carga parasitária (WALSH et al., 2007). Neste trabalho não foi possível estabelecer a participação das células B na produção de citocinas IFN-γ e IL-5.

As células regulatórias exercem funções primordiais no processo de modulação da resposta imune prevenindo possíveis efeitos deletérios e a IL-10 constitui a citocina chave no processo regulatório da imunopatogênese da esquistossomose (BURKE et al., 2009).

A hipótese deste trabalho era de que a susceptibilidade à infecção estaria associada a uma resposta predominantemente regulatória.

Surpreendentemente, foi verificado neste estudo que os indivíduos com baixas cargas parasitárias apresentaram um perfil regulatório tanto nas células $TCD4^{+}CD25^{neg}$, $TCD4^{+}CD25^{low}$ quanto nas células regulatórias clássicas $TCD4^{+}CD25^{high}$, visto que essas subpopulações apresentaram alta expressão das moléculas regulatórias FoxP3 e IL-10 quando comparados aos indivíduos com altas cargas e até mesmo os controles sadios. Uma possível explicação para esse achado, seria a tentativa de controle das respostas Th1 e Th2 apresentadas pelos indivíduos com baixas cargas parasitária e controle do processo de ativação celular, visto que esses mesmos indivíduos apresentaram maior expressão de CD28 tanto para as células $TCD4^{+}$ e $TCD8^{+}$. Paralelo a isso, o aumento concomitante da expressão de CTLA-4 pelos linfócitos T reforça à idéia da participação das células regulatórias neste contexto (WALSH et al., 2007) que efetuam sua potente atividade de supressão através de contato célula a célula (BAECHER-ALLAN et al., 2001) ou através da síntese de citocinas regulatórias, a exemplo da IL-10 e TGF-β (SAITO et al., 2005).

Semelhante aos resultados observados na avaliação das células regulatórias $TCD4^{+}$, a expressão de FoxP3 e IL-10 nas células $TCD8^{+}$ foi maior nos indivíduos com baixa carga parasitária quando comparados ao observado nos indivíduos com alta carga. Pouco se sabe sobre o papel das células regulatórias $TCD8^{+}$, que possuem similaridades funcionais com as células T_{reg} $CD4^{+}$ (CHURLAUD et al., 2015).

Recentemente, vem sendo demonstrado a participação das células B na modulação das células T efetora, regulatórias e de memória, por mecanismos independentes de anticorpos (LUND & RANDALL, 2010). A concepção das células B como importantes fontes de citocinas dos perfis Th1, Th2 e regulatório vem despertando bastante interesse. Os linfócitos B são subdivididos em duas linhagens: B1 e B2. As células B1 podem ser subdivididas em células B1a ($CD11^{+}$ $CD5^{+}$) e células B1b ($CD11^{+}CD5^{neg}$) e, juntamente com as células B2, são capazes de responder rapidamente a estímulos antigênicos. No entanto, a produção de IL-10, não é exclusiva de células $CD5^{+}$ (TAKANASKI et al., 1994; TUNG et al., 2006). Neste estudo foi avaliado o perfil regulatório das células B através da expressão de FoxP3 e IL-10 e, semelhante aos resultados observados na avaliação dos linfócitos $TCD4^{+}$

e $TCD8^+$, os indivíduos com baixa carga parasitária apresentaram maior expressão das moléculas associados ao perfil regulatório. Pela primeira vez foi demonstrada associação entre os linfócitos B e a resistência à infecção helmíntica e em especial a esquistossomose.

Análises preliminares mostraram que os níveis de IL-2 determinados nos sobrenadantes das culturas de CMSP desses indivíduos com baixa carga são superiores aos encontrados no grupo de alta carga parasitária (dados não publicados). Este dado reforça a idéia de provável anergia nas células ou a existência de mecanismos inibitórios nos indivíduos com alta carga parasitária, característica que estaria associada à diminuição na produção de IL-2, principal fator de desenvolvimento de células regulatórias (BENSINGER et al., 2004) e participar da inibição da polarização de células (WOHLFERT et al., 2011; WANG et al., 2011). Porém os mecanismos envolvidos neste dado controverso necessitam de maiores investigações.

Vários autores vêm avaliando a participação de antígenos do *Schistosoma mansoni* no processo de desenvolvimento da resistência à esquistossomose. A resposta imune contra antígenos do *S. mansoni* dos indivíduos normais endêmicos difere significativamente da resposta dos cronicamente infectados ou dos que apresentam resistência à reinfecção após o tratamento medicamentoso (CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1992; VIANA et al., 1994; VIANA et al., 1995). Neste trabalho foram avaliadas a participação dos antígenos de *Schistosoma mansoni* considerados possíveis candidatos vacinais.

O SWAP é considerado o principal alvo da resposta de IgE em modelos experimental e humano de infecção pelo *S. mansoni*. Alguns trabalhos demonstraram que indivíduos normais endêmicos apresentam níveis consideravelmente maiores de IgE anti-tegumento do esquistossômulo quando comparados com crônicos infectados (VIANA et al., 1995), enquanto que após quimioterapia específica os níveis destes anticorpos elevam-se apenas naqueles indivíduos que adquiriram resistência à reinfecção (CALDAS et al., 2000).

O antígeno recombinante rSm22.6 é também induz produção de IgE em modelos experimentais e humano de infecção pelo *S. mansoni* (SANTIAGO et al., 1998; LI et al., 2000; FITZSIMMONS et al., 2004). Esta produção de IgE específica para o rSm22.6 estaria relacionada a proteção contra a reinfecção pelo *Schistosoma* (DUNNE et al., 1992; WEBSTER et al., 1997). Estudos recentes em modelo experimental de imunização com a rSm22.6 mostram um perfil de resposta celular mista Th1/Th2, com indução de IFN-γ e IL-4, como também a produção de IL-10 (PACIFICO et al., 2006).

Estudos que avaliaram o antígeno recombinante rSm29 em modelos experimentais sugerem que a imunização por este antígeno induz uma resposta do tipo Th1 caracterizado por altos níveis de IFN-γ e baixos níveis de IL-4, além da redução em 51% da carga parasitárias nesses animais (CARDOSO et al., 2008). Em humanos, a análise de anticorpos anti-rSm29, em indivíduos residentes em áreas endêmicas, demonstrou altos níveis de IgG1 e IgG3 nos indivíduos resistentes à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* quando comparados com os indivíduos susceptíveis. Alves e colaboradores (2015) demonstraram que o rSm29 é capaz de induzir proteção em animais previamente infectados pelo *S. mansoni* (ALVES et al., 2015).

No presente estudo, a adição dos antígenos SWAP, rSm29 e rSm22.6 às culturas de CMSP dos indivíduos com baixa carga parasitária, não modificou o perfil fenotípico e funcional dos linfócitos T e B, uma vez que os resultados obtidos nas culturas estimuladas pelos antígenos do parasito não diferiram daqueles observados nas culturas não estimuladas, tanto no grupo de indivíduos com baixa e alta carga parasitária. Este fato não altera a interpretação dos resultados apresentados, uma vez que, os valores observados nas culturas não estimuladas dos indivíduos com baixa carga diferiram significativamente das culturas não estimuladas do grupo de indivíduos com altas cargas parasitárias.

Portanto, nossos achados evidenciam que a resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* demonstrada pela baixa carga parasitária, está associada a uma resposta mista entre os perfis Th1, Th2 e regulatório representados pelos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e também pelas células B.

Outros estudos deverão ser realizados com o objetivo de determinar quais os mecanismos implicados na redução da resposta protetora nos indivíduos com altas cargas parasitárias.

4.6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.Z. A patologia na esquistossomose humana. In: CARVALHO, O. S. (org.) *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 547-568, 2008.

_____. Shistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol** 31(11): 656 – 63, 2009.

_____.Schistosomal hepatopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99 (5 Suppl 1): 51 – 7, 2013.

ALVES, C. C. et al. Sm29, but not Sm22.6 retains its ability to induce a protective immune response in mice previously exposed to a *Schistosoma mansoni* infection. **PLoS Negl Trop Dis** 10(2): e0003537, 2015.

ARAUJO, M. I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol** 26(6): 1399-403, 1996.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol** 167(3): 1245-53, 2001

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis *mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 86(1): 57-61, 1992.

BENSINGER, S. J.et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Immunol** 172(9): 5287-96, 2004.

BOESTEANU, A. C. & KATSIKIS, P. D. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. **Semin Immunol** 21(2): 69-77, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose - Situação Epidemiológica. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados. Acesso em: 11/02/2015.

BRITO, C. F. et al. 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** 51(6): 595-601, 2000.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol** 31(4): 163-76, 2009.

CALDAS, I. R. et al. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am J Trop Med Hyg** 62(1): 57-64, 2000.

_____. Human schistosomiasis *mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop** 108(2-3): 109-17, 2008.

CARDOSO, F. C. et al. *Schistosoma mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. **PLoS Negl Trop Dis** 2(10): e308, 2008.

CHENSUE, S. W. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity. II. Participation of Ly 1+ and Ly 2+ T lymphocytes in the suppression of granuloma formation and lymphokine production in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **J Immunol** 127(1): 363-7, 1981.

CHURLAUD, G. et al. Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FoxP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. **Front Immunol** 6: 171, 2015.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The human response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 83(6): 798-804, 1989.

_____. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Braz J Med Biol Res** 31(1): 171-7, 1998.

_____. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Today** 16(9): 397-9, 2000.

COUISSINIER-PARIS, P. & DESSEIN, A. J. Schistosoma-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. **Eur J Immunol** 25(8): 2295-302, 1995.

DE JESUS, A. R. et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis *mansoni*. J Infect Dis 185(1): 98-105, 2002.

DESSEIN, A.J. et al. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **J Immunol**. 140(8): 2727-36, 1988

DUNNE, D. W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol** 22(6): 1483-94, 1992.

ELSHEIKH, M. et al. Renal function in Sudanese school children with *Schistosoma mansoni* infection. **Pediatr Nephrol** 3(3): 259-64, 1989.

FIGUEIREDO, J. P.et al. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunol** 34(12): 604-10, 2012.

FINKELMAN, F. D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annu Rev Immunol** 15: 505-33, 1997.

FITZSIMMONS, C. M. et al. Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. **Parasite Immunol** 26(8-9): 371-6, 2004.

GAZZINELLI, G. & COLLEY, D. G. Human immune responses during schistosomiasis *mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop** 25(2): 125-34, 1992.

GRYSCHEK, R.C.B. & CHIEFFI, P.P. Esquistossomose. In: NETO, V. A. (org.) Parasitologia - Uma abordagem Clínica. Rio de Janeiro, **Elsevier**,175-184, 2008.

GRZYCH, J. M. et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. **J Immunol** 146(4): 1322-7, 1991.

HAGAN, P. et al. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immunol** 7(6): 625-32, 1985.

HARRIS, D. P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nat Immunol** 1(6): 475-82, 2000.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol** 172(5): 3157-66, 2004.

HIRSCH, C. & GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. **Parasitology** 112 (Pt 6): 529-35, 1996.

HOEPPLI, R. E. et al. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. **Front Immunol** 6: 61, 2015.

JANKOVIC, D. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **J Exp Med** 187(4): 619-29, 1998.

JEFFS, S. A. et al. Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. **Mol Biochem Parasitol** 46(1): 159-67, 1991.

KATZ, N. et al. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. **J Parasitol** 56(5): 1032-3, 1970.

_____. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis *mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 14(6): 397-400, 1972.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 35(5): 399-404, 1993.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Acute schistosomiasis: report on five singular cases." Mem Inst Oswaldo Cruz 92(5): 631-5, 1997.

LI, Y. et al. Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of Schistosoma japonicum. **Parasite Immunol** 22(8): 415-24, 2000.

LIMA E COSTA, M. F. et al. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis *mansoni* in an endemic area in Brazil. **Bull World Health Organ** 65(1): 57-66, 1987.

LUND, F. E. & RANDALL T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. **Nat Rev Immunol** 10(4): 236-47, 2010.

MCCORMICK, P. A. & MURPHY, K. M. Splenomegaly, hypersplenism and coagulation abnormalities in liver disease. **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol** 14(6): 1009-31, 2000.

MCKEE, A. S. & PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol** 173(2): 1224-31, 2004.

MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis *mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis** 179(6): 1502-14, 1999.

OLIVEIRA-PRADO, R. et al. CD4 and CD8 distribution profile in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. Scand J Immunol 69(6): 521-8, 2009.

OLIVEIRA, R. R. et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 86(2): 296-305, 2012.

OMS, Organização Mundial de Saúde. Schistosomiasis. Disponível em: http://www.who.int/schistosomiasis/en/. Acesso em: 10/02/2015a.

PACIFICO, L. G. et al. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. **Immunobiology** 211(1-2): 97-104, 2006.

PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med** 173(1): 159-66, 1991.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis *mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 90(2): 277-80, 1995.

RIDEFELT, P. et al. Alkaline phosphatase in healthy children: reference intervals and prevalence of elevated levels. **Horm Res Paediatr** 82(6): 399-404, 2014.

RODRIGUEZ-PINTO, D. & MORENO J. B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. **Eur J Immunol** 35(4): 1097-105, 2005.

RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol** 162(2): 1003-9, 1999.

SAITO, S. et al. CD4(+) CD25high regulatory T cells in human pregnancy." J **Reprod Immunol** 65(2): 111-20, 2005.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising FoxP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol** 6(4): 345-52, 2005.

SANTIAGO, M. L. et al. Identification of the Schistosoma japonicum 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides. **Int Arch Allergy Immunol** 117(2): 94-104, 1998.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol** 2(6): 389-400, 2002.

SILVEIRA, A. M. et al. Human schistosomiasis *mansoni*: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 98(9): 514-9, 2004.

SMYTHIES, L. E. et al. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. **J Immunol** 149(11): 3654-8, 1992.

SORNASSE, T. et al. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. **J Exp Med** 184(2): 473-83, 1996.

SOUZA, R. P. et al., Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **J Parasitol Res** 2012: 0-10, 2012.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood** 108(7): 2420-7, 2006.

TAKANASKI, S. et al. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. **J Exp Med 180(2)**: 711-5, 1994.

TAYLOR, J. J. et al. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J Immunol** 176(10): 5839-47, 2006.

TUNG, J. W. et al. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(16): 6293-8, 2006.

VIANA, I. R. et al. Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 88(4): 466-70, 1994.

VIANA, I. R. et al. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol** 17(6): 297-304, 1995.

WALSH, C. M. et al. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. **Parasite Immunol** 29(6): 293-308, 2007.

WANG, Y. et al. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. **Immunity** 35(3): 337-48, 2011.

WEBSTER, M. et al. IgG4 and IgE responses to *Schistosoma mansoni* adult worms after treatment. **J Infect Dis** 175(2): 493-4, 1997.

WILLIAMS, M. E. et al. 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** 170(4): 946-54, 1994.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol** 85(2): 148-54, 2007.

WOHLFERT, E. A. et al. GATA3 controls FoxP3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. **J Clin Invest** 121(11): 4503-15, 2011.

WYNN, T. A. et al. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol** 153(11): 5200-9, 1994.

_____. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis *mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J Immunol** 160(9): 4473-80, 1998.

YAN, J. et al. B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation. **J Immunol** 177(7): 4481-7, 2006.

5 CONCLUSÃO GERAL

A resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, evidenciada por baixas cargas parasitárias em indivíduos residentes em áreas endêmicas, não se associa a idade, sexo, e grau de exposição à agua contaminada e nem a parâmetros hematológicos e bioquímicos. Houve, entretanto, nos indivíduos resistentes a coexistência das respostas imunes Th1, Th2 e regulatória, com a participação das células T e B, independentemente aos antígenos utilizados. Associado a isto, a susceptibilidade à infecção se correlaciona com a diminuição da frequência de células de memória central.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, Z. A. Schistosomal hepatopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99(5 Suppl 1): 51-7, 2004.

_____. A patologia na esquistossomose humana. In: CARVALHO, O. S. (org.) *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 547-568, 2008

_____. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol**, 31(11): 656-63, 2009.

AKDIS, C. A. et al. Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies *in vitro* requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. **J Allergy Clin Immunol**, 99(3): 345-53, 1997.

ALARI-PAHISSA, E. et al. CD69 does not affect the extent of T cell priming. **PLoS One**, 7(10): e48593, 2012.

ALVES, C. C.et al. Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 10(2): e0003537, 2015.

AMU, S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J Allergy Clin Immunol**, 125(5): 1114-1124 e8, 2010.

ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol**, 7(12): 975-87, 2007.

ARAUJO, M. I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, 26(6): 1399-403, 1996.

ASAHI, H. & STADECKER, M. J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosoma infection. **Parasitol Int**, 52(4): 361-7, 2003.

AURIAULT, C. et al. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. **J Clin Microbiol**, 28(9): 1918-24, 1990.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol** 167(3): 1245-53, 2001

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis *mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 86(1): 57-61, 1992.

BAPTISTA, A. P & ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100(2): 183-5, 2005.

BARBOUR, A. D. The importance of age and water contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 79(2): 151-3, 1985.

BARON, U. et al. DNA demethylation in the human FoxP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FoxP3(+) conventional T cells. **Eur J Immunol**, 37(9): 2378-89, 2007.

BAUMGART, M. et al. Naturally occurring CD4+FoxP3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. **J Immunol**, 176(9): 5374-87, 2006.

BENSINGER, S. J.et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Immunol** 172(9): 5287-96, 2004.

BETHONY, J. M. et al. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunol Rev**, 239(1): 237-70, 2011.

BINA, J. C. Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissào. **Rev Patol Trop**, 26: 69-128, 1997.

BINA, J. C. & PRATA, A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-*Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36(2): 211-6, 2003.

BLACK, C. L. et al. Increases in levels of schistosome-specific immunoglobulin E and CD23(+) B cells in a cohort of Kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis,** 202(3): 399-405, 2010.

BOESTEANU, A. C. & KATSIKIS, P. D. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. **Semin Immunol**, 21(2): 69-77, 2009.

BORISH, L. C. & STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, 111(2 Suppl): 460-75, 2003.

BOURKE, C. D. et al. Acquired immune heterogeneity and its sources in human helminth infection. **Parasitology** 138(2): 139-59, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose - Situação epidemiológica. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados. Acesso em: 11/02/2015.

BRETSCHER, P & COHN, M. A theory of self-nonself discrimination. **Science**, 169(950): 1042-9, 1970.

BRITO, C. F. et al. 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** 51(6): 595-601, 2000.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, 31(4): 163-76, 2009.

BUSTAMANTE, J. M. et al. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat Med,** 14(5): 542-50, 2008.

BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity in human schistosomiasis *mansoni*: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. **Parasitology**, 94 (Pt 2): 281-300, 1987.

BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis *mansoni*. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 79(3): 393-408, 1985.

_____. Immunity and morbidity in human schistosomiasis *mansoni*. **Trop Geogr Med**, 46(4): 197-208, 1994.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis *mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop**, 108(2-3): 109-17, 2008.

_____. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am J Trop Med Hyg**, 62(1): 57-64, 2000.

CAMPBELL, J. J. et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3 beta receptor CCR7. **J Cell Biol**, 141(4): 1053-9, 1998.

CAPRON, A. et al. Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. **Microbes Infect**, 1(7): 485-90, 1999.

_____. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends Parasitol**, 21(3): 143-9, 2005.

CARDOSO, F. C. et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clin Exp Immunol**, 144(3): 382-91, 2006.

_____. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 2(10): e308, 2008.

CERUTTI, A. et al. The CD5/CD72 receptor system is coexpressed with several functionally relevant counterstructures on human B cells and delivers a critical signaling activity. **J Immunol**, 157(5): 1854-62, 1996.

CHEEVER, A. W. & ANDRADE, Z. A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 61(5): 626-39, 1967.

CHENSUE, S. W. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity. II. Participation of Ly 1+ and Ly 2+ T lymphocytes in the suppression of granuloma formation and lymphokine production in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **J Immunol** 127(1): 363-7, 1981.

CHURLAUD, G. et al. Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. **Front Immunol** 6: 171, 2015.

CLEMENT, L. T. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. **J Clin Immunol**, 12(1): 1-10, 1992.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 83(6): 798-804, 1989.

_____. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Braz J Med Biol Res**, 31(1): 171-7, 1998.

_____. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Today**, 16(9): 397-9, 2000.

CORREALE, J. & FAREZ, M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 61(2): 97-108, 2007.

CORREALE, J. et al. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. **Ann Neurol**, 64(2): 187-99, 2008.

COSTELLO, R. et al. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. **Eur J Immunol**, 28(1): 90-103, 1998.

COULSON, P. S. et al. Pulmonary granulomatous hypersensitivity: cell-mediated responses to embolized schistosome larvae and eggs. **Reg Immunol**, 5(3-4): 165-73, 1993.

COUISSINIER-PARIS, P. & DESSEIN, A. J. Schistosoma-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. **Eur J Immunol** 25(8): 2295-302, 1995.

DE JESUS, A. M. et al. Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. **Eur J Immunol**, 23(1): 152-8, 1993.

_____. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis *mansoni*. **J Infect Dis**, 185(1): 98-105, 2002.

_____. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, 72(6): 3391-7, 2004.

DEL PRETE, G. et al. 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**, 150(2): 353-60, 1993.

DEMEURE, C. E. et al. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. **J Infect Dis**, 168(4): 1000-8, 1993.

DESSEIN, A. J. et al. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **J Immunol**, 140(8): 2727-36, 1988.

DUNNE, D. W. & BICKLE, Q. D. Identification and characterization of a polysaccharide-containing antigen from *Schistosoma mansoni* eggs which cross-reacts with the surface of schistosomula. **Parasitology**, 94 (Pt 2): 255-68, 1987.

_____. Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. **Eur J Immunol**, 18(1): 123-31, 1988.

_____. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol**, 22(6): 1483-94, 1992.

ELSHEIKH, M. et al. Renal function in Sudanese school children with *Schistosoma mansoni* infection. **Pediatr Nephrol** 3(3): 259-64, 1989.

ESPINDOLA, M. S. et al. Combined immunization using DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 increases CD8+ memory T cells, reduces chronic pathology and decreases egg viability during *Schistosoma mansoni* infection. **BMC Infect Dis**, 14: 263, 2014.

FAILACE, R. Hemograma: Manual de interpretação. 5.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2009. 312p.

FALCAO, P. L. et al. Human Schistosomiasis *mansoni*: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. **Parasite Immunol**, 20(10): 447-54, 1998.

FARID, Z. et al. Praziquantel and acute urban schistosomiasis. **Trop Geogr Med**, 41(2): 172, 1989.

FIGUEIREDO, J. P. et al. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunol**, 34(12): 604-10, 2012.

FINKELMAN, F. D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annu Rev Immunol**, 15: 505-33, 1997.

FITZSIMMONS, C. M. et al. Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. **Parasite Immunol**, 26(8-9): 371-6, 2004.

FLEMING, J. & FABRY, Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 61(2): 85-9, 2007.

FORSTER, R. et al. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nat Rev Immunol**, 8(5): 362-71, 2008.

FULFORD, A. J. et al. Puberty and age-related Changes in Susceptibility to Schistosome Infection. **Parasitol Today**, 14(1): 23-6, 1998.

GATTINONI, L. et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. **Nat Med**, 17(10): 1290-7, 2011.

GAZZINELLI, G. & COLLEY, D. G. Human immune responses during schistosomiasis *mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, 25(2): 125-34, 1992.

GEGINAT, J. et al. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood**, 101(11): 4260-6, 2003.

GOLLOB, K. J. et al. Insights into CD4+ memory T cells following Leishmania infection. **Trends Parasitol**, 21(8): 347-50, 2005.

GRAINGER, J. R. Helminth secretions induce de novo T cell FoxP3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. **J Exp Med**, 207(11): 2331-41, 2010.

GRINGHUIS, S. I. et al. Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. **Mol Cell Biol**, 18(3): 1725-35, 1998.

GROGAN, J. L. et al. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. **J Infect Dis**, 173(5): 1242-7, 1996.

GRYSCHEK, R.C.B. & CHIEFFI, P.P. Esquistossomose. In: NETO, V. A. (org.) Parasitologia - Uma abordagem Clínica. Rio de Janeiro, **Elsevier**,175-184, 2008.

GRYSEELS, B. et al. Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. **Trop Geogr Med**, 46(4): 209-19, 1994.

GRZYCH, J. M. et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. **J Immunol**, 146(4): 1322-7, 1991.

_____. IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis *mansoni*. **J Immunol**, 150(2): 527-35, 1993.

HAGAN, P. et al. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immunol**, 7(6): 625-32, 1985.

_____. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, 349(6306): 243-5, 1991.

_____. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. **Eur J Immunol**, 34(12): 3525-33, 2004.

HARDY, R. R. et al. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. **Immunity**, 26(6): 703-14, 2007.

HARNETT, W. & HARNETT, M. M. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill?" **Nat Rev Immunol**, 10(4): 278-84, 2010.

HARRIS, D. P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nat Immunol**, 1(6): 475-82, 2000.

HENRI, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. **J Immunol**, 169(2): 929-36, 2002.

HERBERT, D. R. et al. IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. **J Immunol**, 181(10): 7214-20, 2008.

HERMISTON, M. L. et al. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. **Annu Rev Immunol**, 21: 107-37, 2003.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, 172(5): 3157-66, 2004.

HIRSCH, C. & GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. **Parasitology**, 112 (Pt 6): 529-35, 1996.

HOEPPLI, R. E. et al. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. **Front Immunol**, 6: 61, 2015.

HOFFMANN, K. F. et al. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, 164(12): 6406-16, 2000.

ISKANDER, R. et al. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 66(2): 200-7, 1981.

JANKOVIC, D. et al. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **J Exp Med** 187(4): 619-29, 1998.

JEFFS, S. A. et al. Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. **Mol Biochem Parasitol**, 46(1): 159-67, 1991.

JENKINS, S. J. et al. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. **Int Immunol** 17(11): 1409-18, 2005.

KABATEREINE, N. B. et al. Adult resistance to schistosomiasis *mansoni*: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitology**, 118 (Pt 1): 101-5, 1999.

KATZ, N. et al. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. **J Parasitol**, 56(5): 1032-3, 1970.

_____. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis *mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 14(6): 397-400, 1972.

KHALIFE, J. et al. Immunity in human schistosomiasis *mansoni*. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. **J Exp Med**, 164(5): 1626-40, 1986.

_____. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, 142(12): 4422-7, 1989.

KUBO, M. et al. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. **J Immunol**, 163(5): 2432-42, 1999.

LABEAUD, A. D. et al. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? **PLoS Negl Trop Dis**, 3(5): e442, 2009.

LAL, R. B. et al. Lack of IgG4 antibody response to carbohydrate antigens in patients with lymphatic filariasis. **Immunology**, 74(2): 333-7, 1991.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 35(5): 399-404, 1993.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Acute schistosomiasis: report on five singular cases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92(5): 631-5, 1997.

LANGHORNE, J. et al. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(4): 1730-4, 1998.

LATIF, B. et al. Autochthonous human schistosomiasis, Malaysia. **Emerg Infect Dis**, 19(8): 1340-1, 2013.

LI, Y. et al. Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of Schistosoma japonicum. **Parasite Immunol**, 22(8): 415-24, 2000.

LICHTENBERGOVA, L.et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite Immunol**, 30(11-12): 585-95, 2008.

LIMA E COSTA, M. F. et al. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis *mansoni* in an endemic area in Brazil. **Bull World Health Organ**, 65(1): 57-66, 1987.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J Exp Med**, 203(7): 1701-11, 2006.

LUND, F. E. & RANDALL, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. **Nat Rev Immunol**, 10(4): 236-47, 2010.

LUNDY, S. K. & BOROS, D. L. Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4(+)-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10. **Infect Immun**, 70(2): 812-9, 2002.

MANDELBROT, D. A. et al. B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). **J Exp Med**, 189(2): 435-40, 1999.

MANGAN, N. E. et al. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **J Immunol**, 173(10): 6346-56, 2004.

MASTROENI, P. et al. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent Salmonella enterica serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to Salmonella antigens. **Infect Immun**, 68(1): 46-53, 2000.

MAZZA, G. et al. Antibody isotype responses to the *Schistosoma mansoni* schistosomulum in the CBA/N mouse induced by different stages of the parasite life cycle. **Parasite Immunol**, 12(5): 529-43, 1990.

MCCORMICK, P. A. & MURPHY, K. M. Splenomegaly, hypersplenism and coagulation abnormalities in liver disease. **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol** 14(6): 1009-31, 2000.

MCKEE, A. S. & PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol** 173(2): 1224-31, 2004.

MCMANUS, D. P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, 21(1): 225-42, 2008.

MELO, K. M. & CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismo de ação e função nas doenças humanas. **Rev Bra Alerg Imunopatol**, 32(5): 184 – 188, 2009.

MICHIE, C. A. et al. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. **Nature**, 360(6401): 264-5, 1992.

MIZOGUCHI, A. & BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **J Immunol**, 176(2): 705-10, 2006.

MONTEFORT, S. et al. Asthma, rhinitis and eczema in Maltese 13-15 year-old schoolchildren -- prevalence, severity and associated factors [ISAAC]. International Study of Asthma and Allergies in Childhood. **Clin Exp Allergy**, 28(9): 1089-99, 1998.

MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis *mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, 179(6): 1502-14, 1999.

MOSCHOVAKIS, G. L. & FORSTER, R. Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. **Eur J Immunol**, 42(8): 1949-55, 2012.

MUTAPI, F. et al. Age-related and infection intensity-related shifts in antibody recognition of defined protein antigens in a schistosome-exposed population. **J Infect Dis**, 198(2): 167-75, 2008.

NAUS, C. W. et al. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naive immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age. **Infect Immun**, 67(7): 3444-51, 1999.

NAUSCH, N. et al. Proportions of CD4+ memory T cells are altered in individuals chronically infected with *Schistosoma haematobium*. **Sci Rep**, 2: 472, 2012.

NOH, G. & LEE, J. H. Regulatory B cells and allergic diseases. **Allergy Asthma Immunol Res**, 3(3): 168-77, 2011.

OLIVEIRA-PRADO, R.et al. CD4 and CD8 distribution profile in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. Scand J Immunol 69(6): 521-8, 2009.

OLIVEIRA, R. R. et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 86(2): 296-305, 2012.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Research Priorities for the Environment, Agriculture and Infectious Diseases of Poverty. **WHO Technical Report Series**, 976: 142, 2013.

OMS, Organização Mundial de Saúde. Schistosomiasis. Disponível em: http://www.who.int/schistosomiasis/en/. Acesso em: 10/02/2015.

_____.Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Disponível em: http://apps.who.int/iris/handle/10665/69482. Acesso em: 04/06/2015b.

PACIFICO, L. G. et al. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. **Immunobiology**, 211(1-2): 97-104, 2006.

PEARCE, E. J. & MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, 2(7): 499-511, 2002.

PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunol Rev**, 201: 117-26, 2004.

_____. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, 173(1): 159-66, 1991.

PERLMUTTER, R. M. et al. Immunoglobulin subclass-specific immunodeficiency in mice with an X-linked B-lymphocyte defect. **J Exp Med**, 149(4): 993-8, 1979.

PRATA, A. R. A., et al. Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni*. Salvador, 1984.

PUNNONEN, J., G. Aversa, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90(8): 3730-4, 1993.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis *mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 90(2): 277-80, 1995.

RABELLO, A. L. et al. Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. **Clin Infect Dis**, 24(3): 304-8, 1997.

RIDEFELT, P.et al. Alkaline phosphatase in healthy children: reference intervals and prevalence of elevated levels. **Horm Res Paediatr** 82(6): 399-404, 2014.

RIHET, P. et al. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol**, 21(11): 2679-86, 1991.

ROBERTS, M. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Infect Immun**, 61(12): 4984-93, 1993.

RODRIGUEZ-PINTO, D. & MORENO, J. B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. **Eur J Immunol**, 35(4): 1097-105, 2005.

ROSS, A. G. et al. Katayama syndrome. **Lancet Infect Dis**, 7(3): 218-24, 2007.

ROYER, B. et al. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. **Clin Exp Allergy**, 31(5): 694-704, 2001.

RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol** 162(2): 1003-9, 1999.

RUTITZKY, L. I. et al. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. **J Immunol**, 180(4): 2486-95, 2008.

RUTITZKY, L. I. et al. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **J Immunol**, 175(6): 3920-6, 2005.

SADLER, C. H. et al. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur J Immunol**, 33(4): 880-8, 2003.

SAITO, S. et al. CD4(+) CD25high regulatory T cells in human pregnancy." J **Reprod Immunol** 65(2): 111-20, 2005.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising FoxP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, 6(4): 345-52, 2005.

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol**, 10(7): 490-500, 2010.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, 401(6754): 708-12, 1999.

_____. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol**, 22: 745-63, 2004.

SANTIAGO, M. L. et al. Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides. **Int Arch Allergy Immunol**, 117(2): 94-104, 1998.

SCOTT, M. G. et al. Human IgG subclasses and their relation to carbohydrate antigen immunocompetence. **Diagn Clin Immunol**, 5(5): 241-8, 1988.

SHACKELFORD, P. G. et al. Human antibodies to group A streptococcal carbohydrate. Ontogeny, subclass restriction, and clonal diversity. **J Immunol**, 140(9): 3200-5, 1988.

SHER, A. et al. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(1): 61-5, 1990.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol**, 2(6): 389-400, 2002.

SHINODA, K. et al. Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109(19): 7409-14, 2012.

SIBER, G. R. et al. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. **N Engl J Med**, 303(4): 178-82.

SILVEIRA, A. M. et al. Human schistosomiasis *mansoni*: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 98(9): 514-9, 2004.

SINDHAVA, V. J. & BONDADA, S. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. **Front Immunol**, 3: 372, 2012.

SMELT, S. C. et al. B cell-deficient mice are highly resistant to Leishmania donovani infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **J Immunol**, 164(7): 3681-8, 2000.

SMITS, H. H., B. Everts, et al. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Curr Allergy Asthma Rep**, 10(1): 3-12, 2010.

SMITS, H. H., H. Hammad, et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **J Allergy Clin Immunol**, 120(4): 932-40, 2007.

SMYTHIES, L. E. et al. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. **J Immunol**, 149(11): 3654-8, 1992.

SOLDEVILA, G. et al. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. **Curr Opin Immunol**, 23(3): 310-8, 2011.

SORNASSE, T. et al. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. **J Exp Med** 184(2): 473-83, 1996.

SOUZA, R. P. et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **J Parasitol Res** 2012: 0-10, 2012.

SPIEGELBERG, H. L. et al. Interleukin-4 induced IgE and IgG4 secretion by B cells from atopic dermatitis patients. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 94(1-4): 181-3, 1991.

STAMPER, C. C. et al. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. **Nature**, 410(6828): 608-11, 2001.

STEEL, C. & NUTMAN, T. B. Altered T cell memory and effector cell development in chronic lymphatic filarial infection that is independent of persistent parasite antigen. **PLoS One**, 6(4): e19197, 2011.

STURROCK, R. F. et al. *Schistosoma mansoni* in the baboon (*Papio anubis*): parasitological responses of Kenyan baboons to different exposures of a local parasite strain. **Parasitology**, 73(3): 239-52, 1976.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood** 108(7): 2420-7, 2006.

TAKANASKI, S. et al. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. **J Exp Med 180(2)**: 711-5, 1994.

TALLIMA, H. et al. Transforming growth factor-beta and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis *mansoni*. **Cytokine**, 48(3): 239-45, 2009.

TAYLOR, J. J. et al. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J Immunol**, 176(10): 5839-47, 2006.

TCHUEM TCHUENTE, L. A. et al. Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Littoral, North-West, South and South-West Cameroon and recommendations for treatment. **BMC Infect Dis**, 13: 602, 2013.

TESTI, R. et al. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. **Immunol Today**, 15(10): 479-83, 1994.

THOMAS, M. L. The leukocyte common antigen family. **Annu Rev Immunol**, 7: 339-69, 1989.

TSUYUKi, S., J. Tsuyuki, et al. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. **J Exp Med**, 185(9): 1671-9, 1997.

TUNG, J. W. et al. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(16): 6293-8, 2006.

VAN DER KLEIJ, D., E. Latz, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J Biol Chem**, 277(50): 48122-9, 2002.

VELUPILLAI, P. & HARN, D. A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 91(1): 18-22, 1994.

VELUPILLAI, P. et al. B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars. **J Immunol,** 158(1): 338-44, 1997

VIANA, I. R. et al. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol**, 17(6): 297-304, 1995.

VIANA, I. R. et al. Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 88(4): 466-70, 1994.

WALSH, C. M. et al. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. **Parasite Immunol** 29(6): 293-308, 2007.

WALUNAS, T. L. et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, 1(5): 405-13, 1994.

WANG, Y. et al. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. **Immunity** 35(3): 337-48, 2011.

WEBSTER, M. et al. IgG4 and IgE responses to *Schistosoma mansoni* adult worms after treatment. **J Infect Dis**, 175(2): 493-4, 1997.

WEILAND, J. et al. CD19: A multifunctional immunological target molecule and its implications for Blineage acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, 2015.

WILKINS, H. A. et al. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81(1): 29-35, 1987.

WILLIAMS, M. E. et al. 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**, 170(4): 946-54, 1994.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, 85(2): 148-54, 2007.

WOHLFERT, E. A., J. R. Graingeret al. GATA3 controls FoxP3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. **J Clin Invest** 121(11): 4503-15, 2011.

WYNN, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **J Clin Invest**, 117(3): 524-9, 2007.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**, 214(2): 199-210, 2008.

WYNN, T. A. & CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol**, 7(4): 505-11, 1995.

WYNN, T. A., A. W. Cheever, et al. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis *mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J Immunol**, 160(9): 4473-80, 1998.

WYNN, T. A. et al. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, 153(11): 5200-9, 1994.

YAN, J. et al. B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation. **J Immunol**, 177(7): 4481-7, 2006.

ZIEGLER, S. F. et al. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **Eur J Immunol**, 23(7): 1643-8, 1993.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ADULTO

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTO

Nome do Projeto: ESTUDO DOS FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A ESQUISTOSSOMOSE NA BAHIA, BRASIL

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

Comitê de Ética: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

Introdução:
Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado "Estudo dos fatores associados a resistência a esquistossomose na Bahia, Brasil". Você foi selecionado como um possível participante pois no ano de 2004 você participou de um outro estudo que mostrou que você tinha contato com a água do rio por algum motivo, e uma grande parte das pessoas do Conde estavam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (xistose) enquanto uma pequena parte não tinha esquistossomose. Por favor, leia este documento com calma e tire qualquer dúvida que tenha antes de aceitar em participar do estudo.
Caso concorde em participar do estudo iremos fazer três exames de fezes, coletar 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) e fazer algumas perguntas sobre você.

Porque o estudo está sendo feito:
A esquistossomose é uma doença provocada por um verme e ainda não existe uma vacina que possa proteger contra a doença, mas tem tratamento. A doença é transmitida quando se tem contato com a água de rios onde existem caramujos infectados pelo verme. Por algum motivo parece que existem algumas pessoas que não pegam a doença ou apresentam uma forma muito leve da doença, mesmo tendo contato com água de rio que tenha o caramujo infectado. Estas pessoas devem ser resistentes à infecção, o que significa dizer que mesmo sem se vacinar elas ficam protegidas da esquistossomose. A parte do nosso organismo que cria resistência contra estes doenças é chamada de sistema imunológico. O objetivo deste estudo é avaliar o sistema imunológico e outros fatores destas pessoas que não tem esquistossomose ou que tem a forma leve da doença e tentar entender o que faz com que elas sejam protegidas contra esta infecção, comparando com o que acontece naquelas pessoas que tem a doença.

Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:
Cerca de 60 pessoas que moram no Conde, tem contato com água do rio e não tem esquistossomose. Essas pessoas serão entrevistadas e farão exames de fezes. Depois disso aproximadamente 30 pessoas serão sorteadas para participar do estudo de avaliação do sistema imunológico, sendo necessário doar uma amostra de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa). Trinta pessoas com esquistossomose também farão parte do estudo, sendo a escolha aleatória também. Dez pessoas que não moram no Conde e relataram nunca terem tido a doença também serão selecionados para este estudo.

Procedimentos envolvidos no estudo:
Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos em 3 amostras colhidas em dias diferentes. Em seguida, você responderá a algumas perguntas sobre você e seus hábitos que estão presentes em um questionário. Caso seja selecionado você doará 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa), que será coletado por profissional treinado e preparo para fazer coleta de sangue, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. O sangue será coletado para realizar exames que são importantes para o acompanhamento da sua doença.

Duração do Estudo:
Sua participação neste estudo terá uma duração máxima prevista de 2 meses. Neste período você será convocado em três diferentes momentos: o primeiro deles para fazer dois exames de fezes, o segundo para responder às perguntas presentes no questionário e ter outra amostra de fezes examinada e o terceiro encontro será para fazer a coleta de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Riscos envolvidos no estudo:
A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.
Pelo fato de um questionário estar sendo utilizado, pode existir o risco de invasão de privacidade bem como perda de confidencialidade. Entretanto, os pesquisadores irão fazer as perguntas de forma profissional e o questionário completado com suas respostas será guardado em local seguro para que suas informações sejam mantidas em sigilo.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:
Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a proteção contra a esquistossomose ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento de uma vacina contra a doença. Você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com esquistossomose no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectados pelo *S. mansoni* ou qualquer outro verme serão tratados gratuitamente.

Confidencialidade:
Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe e com a organização internacional que protege os indivíduos envolvidos em pesquisas (Escritório de Proteção de Pesquisa com Seres Humanos dos Estados Unidos da América). Todas as agências internacionais apropriadas poderão ter acesso aos arquivos da pesquisa. Representantes do Comitê de Ética Em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.
Para proteger contra violação de informação ou falsificação as informações que forem cadastradas em computadores sofrerão seguintes precauções: Todas as informações do banco de dados terão um código ao invés do seu nome, e as informações deste código será mantida em local seguro. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

Participação Voluntária:
A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Custos:
Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Utilização, armazenamento e descarte dos dados:
Após a realização dos exames imunológicos para este estudo, uma pequena parte do seu sangue será guardada em tubos plásticos em congelador por cinco anos, sem a identificação do seu nome no tubo. Gostaríamos de sua permissão para utilizar seu sangue, ou parte dele, em outros estudos que possam ser realizados no futuro. Como muitas descobertas são realizadas a todo tempo em relação à defesa do corpo contra doenças, gostaríamos de ter seu sangue guardado para fazer novos exames, no futuro, caso descubram algum outro fator importante para proteger contra a esquistossomose. Se no futuro for descoberto, no seu sangue, alguma característica importante para sua saúde, nós o informaremos e daremos as devidas orientações a respeito. Mesmo que permita a utilização futura, você poderá voltar atrás nesta decisão a qualquer momento. Marque abaixo a opção desejada sobre esta questão.

Esclarecimentos:
Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Ricardo Riccio Oliveira, coordenador do projeto, pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?
[ ] Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras
[ ] Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Assinatura do Participante	Data	Hora
Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
Assinatura da Testemunha	Data	Hora

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL / GUARDIÃO DE MENOR DE 18 ANOS DE IDADE

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL / GUARDIÃO DE MENOR DE 18 ANOS DE IDADE

Nome do Projeto: ESTUDO DOS FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A ESQUISTOSSOMOSE NA BAHIA, BRASIL

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

Comitê de Ética: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

Introdução:
Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado "Estudo dos fatores associados a resistência a esquistossomose na Bahia, Brasil". Ele(a) foi selecionado como um possível participante pois no ano de 2004 ele(a) participou de um outro estudo que mostrou que ele(a) tinha contato com a água do rio por algum motivo, e uma grande parte das pessoas do Conde estavam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (xistose), enquanto uma pequena parte não tinha esquistossomose. Por favor, leia este documento com calma e tire qualquer dúvida que tenha antes de autorizar seu filho a participar do estudo.
Caso concorde em participar do estudo iremos fazer três exames de fezes, coletar 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) e fazer algumas perguntas.

Porque o estudo está sendo feito:
A esquistossomose é uma doença provocada por um verme e ainda não existe uma vacina que possa proteger contra a doença, mas tem tratamento. A doença é transmitida quando se tem contato com a água de rios onde existem caramujos infectados pelo verme. Por algum motivo parece que existem algumas pessoas que não pegam a doença ou apresentam uma forma muito leve da doença, mesmo tendo contato com água de rio que tenha o caramujo infectado. Estas pessoas devem ser resistentes à infecção, o que significa dizer que mesmo sem se vacinar elas ficam protegidas da esquistossomose. A parte do nosso organismo que cria resistência contra estes doenças é chamada de sistema imunológico. O objetivo deste estudo é avaliar o sistema imunológico e outros fatores destas pessoas que não tem esquistossomose ou que tem a forma leve da doença e tentar entender o que faz com que elas sejam protegidas contra esta infecção, comparando com o que acontece naquelas pessoas que tem a doença.

Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:
Cerca de 60 pessoas que moram no Conde, tem contato com água do rio e não tem esquistossomose. Essas pessoas serão entrevistadas e farão exames de fezes. Depois disso aproximadamente 30 pessoas serão sorteadas para participar do estudo de avaliação do sistema imunológico, sendo necessário doar uma amostra de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa). Trinta pessoas com esquistossomose também farão parte do estudo, sendo a escolha aleatória também. Dez pessoas que não moram no Conde e relataram nunca terem tido a doença também serão selecionados para este estudo.

Procedimentos envolvidos no estudo:
Caso autorize seu filho(a) a participar do estudo, ele(a) receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos em 3 amostras colhidas em dias diferentes. Em seguida, ele(a) responderá a algumas perguntas sobre seus hábitos que estão presentes em um questionário. Caso seja selecionado ele(a) doará 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa), que será coletado por profissional treinado e preparo para fazer coleta de sangue, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. O sangue será coletado para realizar exames que são importantes para o acompanhamento da sua doença.

Duração do Estudo:
A participação dele(a) neste estudo terá uma duração máxima prevista de 2 meses. Neste período ele(a) será convocado em 3 diferentes momentos: o primeiro deles para fazer dois exames de fezes, o segundo para responder às perguntas presentes no questionário e ter outra amostra de fezes examinada e o terceiro encontro será para fazer a coleta de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Riscos envolvidos no estudo:
A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.
Pelo fato de um questionário estar sendo utilizado, pode existir o risco de invasão de privacidade bem como perda de confidencialidade. Entretanto, os pesquisadores irão fazer as perguntas de forma profissional e o questionário completado com suas respostas será guardado em local seguro para que suas informações sejam mantidas em sigilo.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:
Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a proteção contra a esquistossomose ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento de uma vacina contra a doença. Seu filho(a) não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com esquistossomose no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectadas pelo *S. mansoni* ou qualquer outro verme serão tratados gratuitamente.

Confidencialidade:
Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe e com a organização internacional que protege os indivíduos envolvidos em pesquisas (Escritório de Proteção de Pesquisa com Seres Humanos dos Estados Unidos da América). Todas as agências internacionais apropriadas poderão ter acesso aos arquivos da pesquisa. Representantes do Comitê de Ética Em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.
Para proteger contra violação de informação ou falsificação as informações de seu filho(a) que forem cadastradas em computadores sofrerão as seguintes precauções: Todas as informações do banco de dados terão um código ao invés do nome dele(a), e as informações deste código será mantida em local seguro. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

Participação Voluntária:
A participação do seu filho(a) neste estudo é voluntária e ele(a) estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para não autorizar a participação dele(a) no estudo.

Custos:
Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Utilização, armazenamento e descarte dos dados:
Após a realização dos exames imunológicos para este estudo, uma pequena parte do sangue do seu filho(a) será guardada em tubos plásticos em congelador por cinco anos, sem a identificação do nome dele(a) no tubo. Gostaríamos de sua permissão para utilizar este material, ou parte dele, em outros estudos que possam ser realizados no futuro. Como muitas descobertas são realizadas a todo tempo em relação à defesa do corpo contra doenças, gostaríamos de ter o sangue do seu filho(a) guardado para fazer novos exames, no futuro, caso descubram algum outro fator importante para proteger contra a esquistossomose. Se no futuro for descoberto, no sangue do seu filho(a), alguma característica importante para sua saúde, nós o informaremos e daremos as devidas orientações a respeito. Mesmo que permita a utilização futura, você poderá voltar atrás nesta decisão a qualquer momento. Marque abaixo a opção desejada sobre esta questão.

Esclarecimentos:
Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Ricardo Riccio Oliveira, coordenador do projeto, pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?
[ ] Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras
[ ] Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Assinatura do Responsável	Data	Hora
Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
Assinatura da Testemunha	Data	Hora

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLE SADIO

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLE SADIO

Nome do Projeto: ESTUDO DOS FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A ESQUISTOSSOMOSE NA BAHIA, BRASIL

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

Comitê de Ética: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

Introdução:
Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado "Estudo dos fatores associados a resistência a esquistossomose na Bahia, Brasil". Você foi selecionado como um possível participante pois você não reside em áreas endêmicas em esquistossomose ou esteve presente nestas áreas nos últimos anos e relatou nunca ter tido esquistossomose.
Caso concorde em participar do estudo iremos fazer três exames de fezes e coletar 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Porque o estudo está sendo feito:
A esquistossomose é uma doença provocada por um verme e ainda não existe uma vacina que possa proteger contra a doença, mas tem tratamento. A doença é transmitida quando se tem contato com a água de rios onde existem caramujos infectados pelo verme. Por algum motivo parece que existem algumas pessoas que não pegam a doença ou apresentam uma forma muito leve da doença, mesmo tendo contato com água de rio que tenha o caramujo infectado. Estas pessoas devem ser resistentes à infecção, o que significa dizer que mesmo sem se vacinar elas ficam protegidas da esquistossomose. A parte do nosso organismo que cria resistência contra estes doenças é chamada de sistema imunológico. O objetivo deste estudo é avaliar o sistema imunológico e outros fatores destas pessoas que não tem esquistossomose ou que tem a forma leve da doença e tentar entender o que faz com que elas sejam protegidas contra esta infecção, comparando com o que acontece naquelas pessoas que tem a doença.

Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:
Cerca de 60 pessoas que moram no Conde, tem contato com água do rio e não tem esquistossomose. Essas pessoas serão entrevistadas e farão exames de fezes. Depois disso aproximadamente 30 pessoas serão sorteadas para participar do estudo de avaliação do sistema imunológico, sendo necessário doar uma amostra de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa). Trinta pessoas com esquistossomose também farão parte do estudo, sendo a escolha aleatória também. Dez pessoas que não moram

no Conde e relataram nunca terem tido a doença também serão selecionados para este estudo.

Procedimentos envolvidos no estudo:
Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos em 3 amostras colhidas em dias diferentes. Em seguida você doará 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa), que será coletado por profissional treinado e preparo para fazer coleta de sangue, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

Duração do Estudo:
Sua participação neste estudo terá uma duração máxima prevista de 1 mês. Neste período você será convocado em 2 diferentes momentos: o primeiro deles para fazer os três exames de fezes e o segundo para fazer a coleta de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Riscos envolvidos no estudo:
A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:
Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a proteção contra a esquistossomose ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento de uma vacina contra a doença. Você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com esquistossomose no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectados pelo *S. mansoni* ou qualquer outro verme serão tratados gratuitamente.

Confidencialidade:
Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe e com a organização internacional que protege os indivíduos envolvidos em pesquisas (Escritório de Proteção de Pesquisa com Seres Humanos dos Estados Unidos da América). Todas as agências internacionais apropriadas poderão ter acesso aos arquivos da pesquisa. Representantes do Comitê de Ética Em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.
Para proteger contra violação de informação ou falsificação as informações que forem cadastradas em computadores sofrerão seguintes precauções: Todas as informações do banco de dados terão um código ao invés do seu nome, e as informações deste código será mantida em local seguro. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

Participação Voluntária:
A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Custos:
Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos:
Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Ricardo Riccio Oliveira, coordenador do projeto, pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?
[ ] Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras
[ ] Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Assinatura do Participante	Data	Hora
Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
Assinatura da Testemunha	Data	Hora

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

GUIA DE ENTREVISTA

Projeto de resistência a esquistossomose – Conde

Guia de Entrevista

Data da entrevista:___ /___ /___

Horário de início da entrevista:_____ ☐AM ☐PM

Oi, meu nome é [ ]. Inicialmente eu queria agradecer por você ter aceitado em ser entrevistado. Eu represento o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. Você faz parte de um grupo de aproximadamente 1000 pessoas que concordaram em participar de forma voluntária em um estudo que estamos fazendo para tentar aprender mais sobre os mecanismos relacionados com a proteção para evita a infecção pelo *Schistosoma* e outras parasitoses, e nós gostaríamos de saber um pouco mais sobre você e sua exposição à água dos rios da região.

Não existe resposta certa ou errada para qualquer pergunta e sua participação nesta entrevista não terá nenhuma consequência para você.

As suas respostas serão utilizadas para o melhor entendimento de como as pessoas que mesmo entrando em contato com a água do rio não se infectam com o *Schistosoma*. Portanto, nós apreciamos muito a sua participação nesta entrevista que tomará apenas alguns minutos do seu tempo.

Antes de começar será necessário que você assine este documento confirmando que nos dá permissão para entrevistá-lo. [*Ler o termo de consentimento. Responda qualquer pergunta que ele tiver. Obtenha a assinatura em cada cópia do consentimento e forneça uma cópia para o mesmo*]. Sua entrevista será inserida em um banco de dados que conterá todas as entrevistas que estamos fazendo. Entretanto, o seu nome ou qualquer outra informação que nos forneça não serão utilizados identificá-los ou associar suas respostas a você. Em outras palavras, tudo que você disser nesta entrevista é confidencial e anônimo. Tudo bem para você?

Ótimo. Agora você tem alguma dúvida ou preocupação antes de começarmos? [*Se ele(a) tiver dúvidas tente respondê-las. Se ele responder Não, prossiga*.]

Muito bem, vamos começar então.

ID Individual:_____ Gênero: ☐Masculino ☐Feminino

A – Questões relacionadas a esquistossomose

Inicialmente irei fazer algumas poucas perguntas sobre esquistossomose.

1. Qual foi a última vez que você foi tratado para esquistossomose? [Circule um]
    i. 2010
    ii. 2008
    iii. 2007
    iv. 2006
    v. 2005
    vi. 2004
    vii. Antes de 2004
    viii. Nunca tratado
    ix. Não sei, não tenho certeza

2. Você utilizou remédio natural para tratar esquistossomose no último ano? [Circule um]
    i. Sim. Qual? _____
    ii. Não

3. Agora eu gostaria que você me informasse se você teve contato com água do rio para alguma das atividades listadas abaixo. Em caso positivo, por favor, me informe quantas vezes por dia, semana, mês ou ano você tem este contato e também o nome do rio para cada atividade.

Atividades	**Frequência/ Número de vezes**	**Nome do rio**	**Observações**
1. Banho ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
2. Nadar ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
3. Brincar ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
4. Pesca em barco ou com vara ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
5. Pesca com contato com o rio ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
6. Lavar roupas ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
7. Uso da água do rio para agricultura ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
8. Coleta de água para a casa ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
9. Lavar pratos ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
10. Cruzar / Passar pelo rio ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
11. Lavagem de animais ☐ Sim ☐ Não	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
12. Outro_____	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
13. Outro_____	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		
14. Outro_____	#____ ☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Ano		

B – Informações demográficas e socioeconômicas

Muito bem, agora irei fazer algumas perguntas específicas sobre você e o local onde você mora.

4. Qual a sua idade?
   i. ____ anos ou Idade estimada_____
   ii. Data de nascimento? ___ /___ /___

5. Onde você mora? [Circule um]
    i. Buri
    ii. Camarões
    iii. Jenipapo
    iv. Sempre Viva
    v. Cobó
    vi. Outro_____

6. Há quanto tempo você mora neste lugar (em anos ou meses)?
    _____ ☐ Anos ☐ Meses

7. Você morou neste mesmo lugar por pelo menos 11 meses por ano nos últimos 10 anos? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

8. Qual a agente de saúde de sua região? [Circule um]
    i. Ada
    ii. Luciana
    iii. Aline
    iv. Ivanice

9. Incluindo você quantas pessoas moram na sua casa nas seguintes faixas etárias?
    i. ____ Abaixo de 18 anos
    ii. ____ Igual ou acima de 18 anos

10. Me diga o número de pessoas morando na sua casa que:
    i. Você é responsável ____
    ii. Dormem no mesmo quarto ____
    iii. Estão trabalhando ____
11. Como é o esgotamento sanitário de sua casa? [Circule um]
    i. Esgoto
    ii. Fossa
    iii. Céu aberto
    iv. Outros_____

12. Qual o destino do lixo? [Circule um]

i. Coleta pública
ii. Queima
iii. Joga no rio
iv. Joga a céu aberto
v. Enterra
vi. Transforma em adubo
vii. Outros_____

13. Qual a origem da água utilizada para consumo em sua casa? [Circule um]
    i. Fornecimento público
    ii. Cisterna (*Ir para questão 15*)
    iii. Poço (*Ir para questão 15*)
    iv. Outros _____ (*Ir para questão 15*)

14. Com que freqüência a água fornecida publicamente chega à sua casa? [Circule um]
    i. Diariamente
    ii. Dias alternados
    iii. 1 vez por semana
    iv. Outros_____

15. Qual o tratamento dado para a água ingerida? [Circule um]
    i. Filtra
    ii. Ferve
    iii. Sem tratamento
    iv. Outros_____

16. Você possui algum destes possíveis poluentes em sua casa:
    i. Fogão a lenha: 1. Sim 2. Não [Circule um]
    ii. Queima diesel: 1. Sim 2. Não [Circule um]
    iii. Estoca grãos: 1. Sim 2. Não [Circule um]

17. Você trabalha formal ou informalmente? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não (*Ir para questão 19*)
    iii. Não, eu sou estudante (*Ir para questão 21*)

18. Qual a sua ocupação? [Circule um]
    i. Atividade agrícola

ii. Pescador

iii. Comércio

iv. Atividade doméstica

v. Outros _____

19. Você sabe a quantidade mínima de dinheiro que recebe em cada mês? [Circule um]

i. Sim

ii. Não (*Ir para questão21*)

20. Qual a sua renda mensal média? [Circule um]

i. Menos de 1 salário mínimo

ii. 1 salário mínimo

iii. Até R$ 500,00

iv. De R$ 500,00 a R$ 1.000,00

v. Acima de R$ 1.000,00

21. Me diga o maior nível escolar que você completou:

_____

C – Questões relacionadas a saúde

OK, agora eu irei perguntar a você algumas questões relacionadas à sua saúde e seus hábitos de saúde.

Você tem alguma das doenças listadas abaixo? [Circule um]

1. Hipertensão	2. Diabetes	3. Tuberculose
4. Câncer	5. Asma	6. Doença de Chagas
7. Leishmaniose	8. Esquistossomose	9. Hepatite

10. Outras_____

Agora eu gostaria de te fazer algumas perguntas sobre sua alimentação nos últimos 6 meses.

22. Você já se preocupou com o fato de sua casa poder vir a não ter comida suficiente? [Circule um]

i. Sim

ii. Não

23. Alguma vez já deixou de ter comida em sua casa por falta de dinheiro? [Circule um]

i. Sim

ii. Não

24. Você ou algum dos membros de sua casa já foi dormir com fome por não ter comida? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

25. Você ou alguém de sua casa já ficou o dia e a noite sem comer por falta de comida? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

Muito bem, agora irei fazer algumas perguntas sobre bebida e fumo.

26. Você bebe algum tipo de bebida alcoólica? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não *(Ir para questão 33)*

27. Com que freqüência você bebe? [Circule um]
    i. Diariamente. *Tipo de bebida e dose*_____
    ii. Semanalmente. *Tipo de bebida e dose*_____
    iii. Mensalmente. *Tipo de bebida e dose*_____
    iv. Esporadicamente. *Tipo de bebida e dose*_____

28. Alguma vez você já pensou que deveria deixar de beber? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

29. Alguém já te criticou por causa da bebida? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

30. Você já se sentiu mal ou culpado por causa da bebida? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

31. Você já bebeu logo ao amanhecer para tentar se curar de uma ressaca ou deixar seu corpo firme? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

32. Alguma vez em sua vida você já fumou? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não (*Finalizar a entrevista*)

33. Você fuma atualmente? [Circule um]
    i. Sim
    ii. Não

Obrigado. Concluímos a entrevista. Obrigado por utilizar o seu tempo para responder estas perguntas. Aproveite o dia

*Horário do final da entrevista:*_____ ☐*AM* ☐*PM*

Comentários do entrevistador

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS FATORES ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA À ESQUISTOSSOMOSE NA BAHIA, BRASIL

Pesquisador: Ricardo Riccio Oliveira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 16061213.3.1001.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 385.806

Data da Relatoria: 05/09/2013

Apresentação do Projeto:

A esquistossomose constitui um importante problema de saúde pública, devido às altas taxas de prevalência mundial, do difícil controle epidemiológico e da morbidade associada à doença. Estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas estejam infectadas pelo Schistosoma sp. e outras 600 milhões estão sob risco de infeção. Além de fatores genéticos e ambientais, a presença de coinfecções por outros helmintos também parecem influenciar na resistência à infecção pelo S. mansoni. Existem poucas informações sobre a influência das coinfecções nas diferentes formas clínicas da esquistossomose, no estado geral de saúde do paciente, bem como na qualidade de vida do mesmo. Neste projeto serão avaliadas a contribuição de coinfecções por outros helmintos na qualidade de vida e os fatores associados a resistência à infecção pelo S.mansoni. Este estudo será desenvolvido na população do município do Conde-BA, localizado a aproximadamente 200 km de Salvador, a qual vem sendo acompanhada pelo Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) desde 2001, devido à elevada frequência de esquistossomose observada. Trata-se de um estudo multicêntrico, onde participarão pesquisadores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ e da Universidade Federal da Bahia. Os resultados deste estudo poderão possibilitará o entendimento de mecanismos de proteção contra a infecção pelo S. mansoni em indivíduos

Endereço: RuaWaldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal **CEP:** 40.296-710
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

residentes em áreas endêmicas, contribuindo para a geração de conhecimentos necessários para o desenvolvimento de uma vacina contra a
esquistossomose. Os novos conhecimentos obtidos neste estudo, associado à informação sobre
qualidade de vida e estado nutricional dos indivíduos infectados pelo S. mansoni ou outros helmintos poderá auxiliar na conscientização popular e elaboração de medidas de controle destas parasitoses de modo a minimizar o estigma destas doenças negligenciadas.

Objetivo da Pesquisa:

Primário:

Avaliar a resposta imune de indivíduos resistentes à infecção pelo Schistosoma mansoni frente aos antígenos vacinais Sm22.6 e Sm29 e a carboidratos isolados do parasita, e a influência de coinfecções por geohelmintos, estado nutricional e qualidade de vida sobre a resistência à infecção.

Secundários:

Em indivíduos resistentes à infecção pelo S. mansoni, avaliar:

1. A frequência de coinfecção por helmintos e a carga parasitária dos mesmos;
2. Influência de fatores socioeconômicos, demográficos, exposição, estado nutricional e qualidade de vida (SF-36) na aquisição da infecção.
3. Os níveis das citocinas IL-5, IL-9, IL-33, IFN-y e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP estimuladas com os antígenos do S. mansoni SWAP, SEA,Sm29 e Sm22.6;
4. As populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ ativadas e de memória (CD28, CD40L, CD62L, CD27, CD45RA, CD45RB, CCR7) e regulatória (CD25, CTLA-4, E FoxP3) em resposta aos antígenos do S. mansoni;
5. Expressão intracelular das citocinas IL-10, IFN-¿ e IL-5 nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ em resposta aos antígenos do S. mansoni;
6. O perfil dos linfócitos B em resposta aos antígenos do S. mansoni através da expressão de CD5, CD19, CD24, CD27, CD38, FoxP3 e IL-10;
7. Níveis séricos de IgE total e de IgE e IgG4 específicos para os antígenos do S.
mansoni SWAP, SEA, Sm29 e Sm22.6;8. Níveis séricos de IgM, IgA, IgG4 e IgE específicos
paracarboidratos isolados do verme adulto e do ovo do S. mansoni.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Devidamente apresentado.

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA

Continuação do Parecer: 385.806

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Realizado anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Itens necessários foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Informamos que o parecer cosubstanciado emitido anteriormente (381967) deixou equivocadamente ainda uma pendência - a qual já havia sido atendida pelo pesquisador responsável. Desta forma, o protocolo está aprovado.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Apresentar relatório parcial em 09/2014 e final, em 07/2015.

SALVADOR, 05 de Setembro de 2013

Assinador por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)

Endereço: RuaWaldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal **CEP:** 40.296-710
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO B – VALORES DE REFERÊNCIAS DOS EXAMES LABORATORIAIS

Analitos / Determinações	Valores de Referência
Função Renal [a]	
Uréia (mg/dL)	15 - 45
Creatinina (mg/dL)	0,7 - 1,3
Função Hepática [a]	
AST (U/L)	15 - 46
ALT (U/L)	até 45
GGT (U/L)	12 - 58
ALP (U/L)	Adultos: 40 - 190; <18 anos: até 645
Albumina (g/dL)	2,6 - 3,1
RNI	até 1,30
Parâmetros Hematológicos [b]	
Hemácias (milhões/mm^3)	H: 4,5 - 6,5 M: 3,9 - 5,6
Hemoglobina (g/dL)	H: 13,5 - 17,5 M: 11,5 - 15,5
Hematócrito (%)	H: 40 - 52 M: 36 - 48
Leucócitos Totais (/mm^3)	4000 - 11000
Segmentados (/mm3)	2500 - 7500
Eosinófilos (/mm3)	40 - 440
Basófilos (/mm3)	10 - 100
Linfócitos (/mm3)	1500 - 3500
Monócitos (/mm3)	200 - 800
Plaquetas (mil/mm3)	150 - 450

H: Homens; M: Mulheres

Fontes: [a] - Bulas dos kits Wiener; [b] - Failace, 2009