



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR PÓS-TERAPÊUTICA EM
PACIENTES CRÔNICOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Recife
2020

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR PÓS-TERAPÊUTICA EM
PACIENTES CRÔNICOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorado em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Coutinho Domingues

Co-orientadora: Prof Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F475e Figueiredo, Anna Lígia de Castro.
 Estudo da resposta imune celular pós-terapêutica em pacientes crônicos com esquistossomose mansônica / Anna Lígia de Castro Figueiredo. – 2020.
 131 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Ana Lúcia Coutinho Domingues.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Esquistossomose. 2. Biomarcadores. 3. Tratamento farmacológico. 4. Critérios de cura. 5. Eficácia terapêutica I. Domingues, Ana Lúcia Coutinho (Orientadora). I. Título.

610 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-134)

ANNA LÍGIA DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR PÓS-TERAPÊUTICA EM
PACIENTES CRÔNICOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Aprovado em: 17/07/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Coutinho Domingues (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Sheilla Andrade de Oliveira (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE

Prof^ª. Dr^ª. Maria Almerice Lopes da Silva (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Leticia da Silva (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE

Dedico essa tese aos meus pais, Edson e Cremilda, minha irmã, Anna Carolina, e minha filha de quatro patas, Nina Maria (*in memoriam*), que são minha fonte de inspiração e de força. Tudo que sou e tudo o que faço sempre será por eles e para eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que é minha fortaleza e meu guia, sempre me dando forças para lutar pelos meus sonhos e objetivos;

Aos pacientes que confiaram no nosso grupo de pesquisa e aceitaram participar deste estudo;

Aos meus pais, Edson Figueiredo e Cremilda Figueiredo, fundamentais na minha formação pessoal e profissional, que sempre acreditam em mim e me apoiam em todas as minhas escolhas;

À minha irmã Anna Carolina Figueiredo, que é minha melhor amiga e confidente, além de ser minha maior incentivadora;

À minha filha de quatro patas, Nina Maria Figueiredo, que mesmo não estando mais presente fisicamente, continuará para sempre na minha memória e no meu coração. Te amo;

Ao Paulo Henrique Jaborandy e família, que foram pessoas fundamentais ao longo de todos esses anos, estando presente em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins;

A todos os meus familiares, que estiveram presentes, direta ou indiretamente, apoiando minhas conquistas e entendendo minha ausência em alguns momentos;

Aos meus amigos de trabalho, por todo apoio necessário e por acreditarem em mim, além de contribuírem para meu crescimento profissional;

Aos meus amigos de pós-graduação, em especial a Ana Virgínia Barreto, Heytor Neco, Raul Emídio e Renan Garcia. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada ajuda, por estarem sempre comigo e por nunca desistirem de mim;

Às minhas amigas Maria Eduarda Mendonça, Mariana Mendes, Sonelba Santos, Aline Magalhães e Janaina Litwak, grandes companheiras que quero levar para sempre junto comigo. Obrigada por entenderem minha ausência e, mesmo distantes, me apoiarem e contribuírem com carinho para a conclusão de mais essa etapa;

Aos componentes da banca, por terem aceitado participar desse momento tão importante e especial da minha vida;

Ao Instituto Aggeu Magalhães, a Universidade Federal de Pernambuco e a Pós-graduação em Medicina Tropical, que foram minha segunda casa por muitos

anos, me concedendo todo espaço e materiais necessários para realização da minha pesquisa. Além do CNPq e FACEPE, pelo financiamento;

Às minhas orientadoras, Dr^a Silvia Montenegro, Dr^a Clarice Moraes e Dr^a Ana Lúcia Coutinho, que abriram as portas do universo acadêmico e me deram oportunidade de desenvolver todos os meus trabalhos (desde a iniciação científica até o doutorado). Agradeço, de coração, por todo apoio e ensinamento. Tenham certeza que foram anos de muito conhecimento e aprendizado;

Aos funcionários de Escada por permitirem a realização das etapas de coleta nos postos de saúde e por estarem sempre dispostos em ajudar;

Os meus sinceros agradecimentos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
(CORALINA, 1983, p. 136).

RESUMO

A esquistossomose é uma doença negligenciada que gera grande impacto socioeconômico em países subdesenvolvidos afetando a saúde e a produtividade dos mais de 250 milhões de indivíduos infectados. Atualmente o diagnóstico parasitológico e imunológico demonstra baixa acurácia. Portanto, é importante desenvolver ferramentas mais efetivas para diagnóstico, prevenção, controle e eliminação da esquistossomose. Um possível caminho é através da identificação de biomarcadores para doença e sua associação a diferentes padrões de fibrose periportal e das formas clínicas da doença. Um maior conhecimento da resposta imune celular e humoral da esquistossomose em pacientes poderá resultar na identificação de novos biomarcadores para infecção, controle da morbidade e critério de cura da doença. Diante do exposto, o principal objetivo do presente estudo foi a identificação de biomarcadores imunológicos (resposta celular e humoral) para diagnóstico, morbidade e critério de cura pós-terapia específica com praziquantel. Através de exame parasitológico de fezes, ultrassonografia e coleta sanguínea de pacientes crônicos, com posterior marcação e quantificação celular e de citocinas. Identificamos aumento nos níveis de IL-2, o que sugere resistência à infecção. Níveis de IL-4 elevaram e de IL-10 diminuíram após tratamento com praziquantel, indicando possível proteção contra reinfecção. Os níveis de monócitos também elevaram após tratamento, indicando proteção contra danos hepatocelulares. Linfócitos B e de T helper foliculares tiveram seus níveis diminuídos após tratamento, por não ter infecção ativa após tratamento, o que pode indicar cura parasitológica da infecção. Sendo assim, a identificação de potenciais biomarcadores, poderão ser aplicados na prática clínica e laboratorial em ações integradas para o controle da esquistossomose nas áreas endêmicas.

Palavras-chave: Esquistossomose. Biomarcadores. Tratamento farmacológico. Critérios de cura. Eficácia terapêutica.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease that generates great socioeconomic impact in underdeveloped countries affecting the health and productivity of more than 250 million infected individuals. Currently the parasitological and immunological diagnosis demonstrates low accuracy. Therefore, it is important to develop more effective tools for diagnosis, prevention, control and elimination of schistosomiasis. One possible way is through the identification of biomarkers for disease and its association with different patterns of periportal fibrosis and the clinical forms of the disease. A greater knowledge of the cellular and humoral immune response of schistosomiasis in patients may result in the identification of new biomarkers for infection, morbidity control and cure criteria of the disease. In view of the above, the main objective of the present study was the identification of immunological biomarkers (cellular and humoral response) for diagnosis, morbidity and cure criterion after specific therapy with praziquantel. Through parasitological examination of feces, ultrasound and blood collection of chronic patients, with subsequent marking and quantification of cell and cytokines. We identified an increase in IL-2 levels, suggesting resistance to infection. Levels of IL-4 increased and IL-10 decreased after treatment with praziquantel, indicating possible protection against reinfection. Monocytes levels also increased after treatment, indicating protection against hepatocellular damage. Follicular B and T helper lymphocytes had their levels decreased after treatment, because they did not have active infection after treatment, which may indicate stitutionic cure of the infection. Thus, the identification of potential biomarkers can be applied in clinical and laboratory practice in integrated actions to control schistosomiasis in endemic áreas

Keywords: Schistosomiasis. Biomarkers. Pharmacological treatment. Healing criterion. Therapeutic efficacy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição geográfica mundial dos casos de Esquistossomose.....	19
Figura 2 –	Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil.....	20
Figura 3 –	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 4 –	Diferenciação de células T CD4 ⁺	31
Figura 5 –	Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Niamey.....	44
Figura 1 –	Níveis de citocinas Th1 e Th2 nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel.....	57
Figura 1 –	Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com diferentes padrões de fibrose periportal, segundo a classificação de Niamey.....	65
Figura 2 –	Níveis de linfócitos B nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel.....	70
Figura 3 –	Níveis de linfócitos Thf nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento co Praziquantel.....	71
Figura 4 –	Níveis de monócitos nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias 6 meses de tratamento com Praziquantel.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Correlações das citocinas Th1/Th2 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel....	58
Tabela 1 –	Características demográficas e epidemiológicas de pacientes esquistossomóticos do município de Escada.....	69
Tabela 2 –	Padrão de fibrose periportal dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após seis meses de tratamento com Praziquantel.....	70
Tabela 3 –	Correlações de linfócitos B, Th folicular e monócitos com citocinas IL-4 e IL-10 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel.....	73
Tabela 1 –	Correlações de linfócitos B, Thf e monócitos com citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-6 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel...	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARFI	Impulso de Força de Radiação Acústica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCA	Antígenos de superfície catódicos
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CNS	Conselho nacional de saúde
ECM	Elementos da matriz extracelular
EH	Esquistossomose hepática
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
EHI	Esquistossomose hepatointestinal
ECM	Elementos da matriz extracelular
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN	Interferon gamma
IL	Interleucina
MHC II	Complexo de histocompatibilidade de classe II
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PSF	Programa de saúde da família
PZQ	Praziquantel
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
<i>S.mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SWAP	Antígeno solúvel do verme adulto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Thf	T helper folicular
Th	T helper
TNF	Fator de necrose tumoral
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Epidemiologia da Esquistossomose.....	19
2.2	Patogenia e manifestações clínicas.....	24
2.3	Fibrose hepática na esquistossomose mansônica.....	27
2.4	Imunopatologia da esquistossomose.....	28
2.4.1	Linfócitos B.....	30
2.4.2	Células T Helper foliculares (Thf).....	31
2.4.3	Monócitos.....	32
2.5	Diagnóstico.....	34
2.6	Tratamento e controle.....	37
2.7	Critério de cura parasitológica.....	39
3	JUSTIFICATIVA.....	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	Objetivo geral.....	41
4.2	Objetivos específicos.....	41
5	METODOLOGIA.....	42
5.1	Desenho, local e população do estudo.....	42
5.1.1	Critérios de Inclusão.....	42
5.1.2	Critérios de Exclusão.....	42
5.2	Definição do tamanho amostral.....	43
5.3	Coleta e processamento dos dados.....	43
5.4	Determinação do grau de fibrose, através de classificação de Niamey.....	43
5.5	Coleta sanguínea e obtenção do soro.....	44
5.6	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	44
5.7	Citometria de Fluxo para determinação de monócitos,	

	linfócitos Thf e B.....	45
5.8	Detecção de citocinas Th1/Th2 por Cytometric Bead A usando citômetro de fluxo.....	46
5.9	Definição e categorização das variáveis de coleta dados.....	47
5.9.1	Variáveis dependentes.....	47
5.9.2	Variáveis independentes.....	47
5.10	Análise estatística.....	48
5.11	Limitações metodológicas do estudo.....	48
6	ASPECTOS ÉTICOS.....	50
7	VIABILIDADE.....	51
8	RESULTADOS.....	52
8.1	Artigo 1 - Redução nos níveis de IL-10 em pacientes crônicos com Esquistossomose mansônica após tratamento com Praziquantel: é um fator de proteção?.....	52
8.2	Artigo 2 - Avaliação da resposta imune celular de monócitos, linfócitos B e linfócitos T helper foliculares e suas interações com citocinas de perfil Th2 em pacientes esquistossomóticos crônicos antes e após tratamento com praziquantel.....	63
9	CONCLUSÃO.....	81
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	91
	APÊNDICE B – FICHA DE PACIENTES DE CAMPO.....	92

APÊNDICE C – RESULTADOS SUPLEMENTARES.....	93
APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	94
APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	107
ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO MUNICÍPIO ESCADA.....	130
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ ÉTICA EM PESQUISA.....	131

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença helmíntica negligenciada causada por vermes do gênero *Schistosoma* (*S.*) *spp.* (SOUSA et al., 2018). A infecção pelo *Schistosoma mansoni* causa uma doença parasitária crônica que progride para danos graves hepáticos e gastrointestinais graves e, eventualmente, pode resultar em óbito do indivíduo (SOUSA et al., 2018). Essa progressão é desenvolvida devido a reações imunopatológicas contra os ovos de *S. mansoni* que são depositados pelas fêmeas do parasita (FERREIRA et al., 2017).

A resposta imune celular contra os antígenos do *S. mansoni* ainda não está totalmente elucidada (EGESA et al., 2018). Diante da complexidade existente, acredita-se que uma maneira de entender como a infecção esquistossomótica altera o equilíbrio imunológico do hospedeiro (e associar com o efeito do tratamento) seria avaliar e comparar a resposta imune celular, frente à estimulação antigênica, antes e após a terapia com praziquantel (PZQ) (NESSIM; DEMERDASH., 2000).

Grande parte das pesquisas atuais se baseiam no entendimento da associação entre a resposta imune e a formação do granuloma, que se desenvolve ao redor dos ovos depositados, assim como a fibrose hepática desenvolvida (SOUZA et al., 2012). Esses granulomas esquistossomóticos estão associados a respostas de células T helper (Th) CD4⁺ e representam reação de hipersensibilidade tardia. Estudos revelaram que citocinas do perfil Th1 estão envolvidas com a redução da patologia associada à fibrose, e que citocinas do perfil Th2 tem papel importante na patogênese e progressão da doença (KUMAR et al., 2015; MENTINK-KANE et al., 2011). Além disso, estudos vêm demonstrando papel de citocinas do perfil Th17 na atividade de granulomas e consequente progressão da fibrose (KALANTARI et al., 2019; NADY et al., 2017; BARRETO et al., 2016).

Outro perfil celular estudado na associação com a patologia envolvida na infecção esquistossomótica são as células B. Acredita-se que células B são responsáveis pela produção de anticorpos específicos contra patógenos multicelulares. Os linfócitos B1, um subconjunto de células B, expressam, na sua superfície, o marcador CD5 em conjunto com os outros marcadores de células B, e são subdivididos em B1a e B1b. Estudos *in vitro* indicaram a produção de

imunoglobulinas por esses subtipos de células B, que atuam na defesa contra infecções virais e na proteção contra infecções causadas por parasitas, incluindo o *Schistosoma* (OLIVEIRA et al., 2005). Além disso, Fairfax et al (2012) e Fairfax et al (2013) indicaram papel de linfócitos B na diminuição da patologia associada à infecção esquistossomótica, dependentes de IL-10. Porém, mais estudos são necessários para entendimento das alterações que acontecem com a funcionalidade e com o fenótipo dos linfócitos B na infecção pelo *Schistosoma mansoni* (OLIVEIRA et al., 2005).

Além disso, o linfócito helperfolicular (Thf), outro subconjunto de células T, tem a função de auxiliar os linfócitos B, onde estudos recentes demonstraram o papel dos linfócitos Th foliculares na patologia autoimune, auxiliando os linfócitos B na sua expansão, diferenciação e maturação de afinidade dos anticorpos dessas células. Porém, em estudo sobre a infecção com *Schistosoma japonicum* foi identificado um novo papel para essas células que desafia o paradigma existente de que elas seriam apenas especializadas no auxílio às células B. Os linfócitos Thf produzidos contribuíram na formação do granuloma hepático e progressão da patologia (CHEN et al., 2014).

Também, é importante salientar que as células mononucleares estão envolvidas na patogênese de doenças hepáticas crônicas, especialmente aquelas onde ocorre formação de fibrose. Um estudo avaliando essas células identificou que elas estão intimamente relacionadas com predisposição a alterações hemostáticas (predisposição de alteração vascular como, por exemplo, sangramentos de varizes esofágicas) característica da doença, principalmente nos estágios finais descompensados e caracterizados por hematêmese (AMER; AMER., 2002). Porém, monócitos CD14⁺/CD16⁺, após diferenciação celular, foram relacionados na proteção contra danos hepáticos (SOUSA et al., 2018). Mais estudos são necessários para compreender a participação dessas células na patologia relacionada com a esquistossomose mansônica.

Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2, em pacientes crônicos com esquistossomose mansônica, antes e após tratamento com praziquantel e quantificar os níveis de linfócitos Thf, B e monócitos, correlacionando com os níveis de citocinas encontrados. Em seguida, foi

analisada uma possível associação dessas informações com dados da ultrassonografia abdominal, utilizando classificação de Niamey, com níveis das células e citocinas encontradas para esquistossomose mansônica. Os resultados encontrados contribuirão na elucidação do entendimento da participação da resposta imune celular (através das alterações imunes e interações celulares) na patologia da esquistossomose, antes e após tratamento com praziquantel, facilitando na identificação de marcadores para o sucesso terapêutico dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Esquistossomose

A esquistossomose possui grande importância socioeconômica devido a sua ampla distribuição geográfica, cronicidade e impacto na economia, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005; UTZINGER *et al.*, 2001). A doença é considerada parasitária crônica mundial, e continua sendo um grave problema de saúde pública causando significativa morbidade e mortalidade especialmente nos países em desenvolvimento (RESENDES, SOUZA, BARBOSA, 2005; CHEN *et al.*, 2013). Além disso, é a forma mais grave de parasitoses causadas por organismos multicelulares e dentre as doenças parasitárias humanas, é a segunda mais prevalente, ficando atrás apenas dos casos de malária (KATZ; ALMEIDA., 2003; BICHLER *et al.*, 2001; UTZINGER *et al.*, 2001).

De acordo com dados atuais, mais de 250 milhões de pessoas estão infectadas pela esquistossomose (PANIC; RUF; KEISER, 2017; KNOWLES *et al.*, 2015) e 800 mil pessoas apresentam o risco de se contaminar. A doença está distribuída de forma endêmica atualmente em 54 países do mundo, com distribuição geográfica de maior prevalência em certas áreas tropicais e subtropicais da África, Oriente Médio, América do Sul e Caribe (figura 1) (DA SILVA *et al.*, 2019; ELBAZ; ESMAT., 2013). Nesses países endêmicos, é a principal causa de morbidade, e leva a mais de 300.000 mortes por ano apenas na África (FAIRFAX *et al.*, 2012).

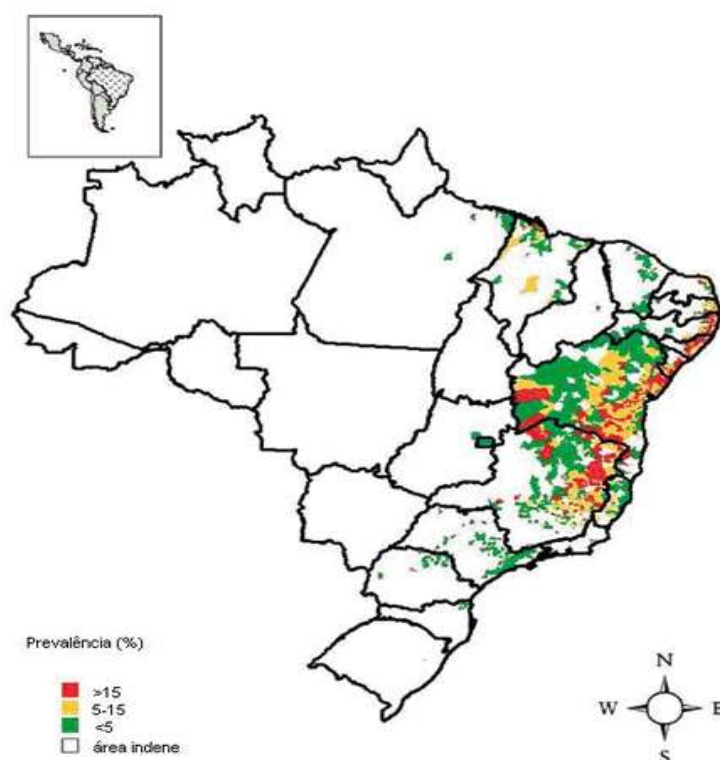
Figura 1 - Distribuição geográfica mundial dos casos de Esquistossomose



Fonte: adaptado de WHO, 2012.

Existem cinco espécies de *Schistosoma* que podem causar doença no homem: *S. hematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (NEVES, 2006). No Brasil a doença é causada pelo *S. mansoni*, e é popularmente conhecida como “barriga d’água” ou “xistose”, sendo encontrada em 18 estados brasileiros e no Distrito Federal. As regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste são as que concentram o maior número de casos. Das unidades federativas brasileiras, 2 estados na região Sudeste (Espírito Santo e Minas Gerais) e 7 estados da região Nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe) são consideradas áreas endêmicas (figura 2) (DA SILVA et al., 2019). Existem estados, como Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Ceará, que a transmissão é considerada focal por não atingir grandes áreas (BRASIL, 2010; LEAL NETO et al., 2013).

Figura 2 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil



Fonte: AMARAL; TAIUIL; ENGELS., 2006.

Devido ao tráfico de escravos africanos e à imigração oriental e asiática, a doença surgiu no nosso país. Alguns fatores facilitaram a instalação e propagação do *S. mansoni* no território brasileiro, tais como: a presença do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*), hospedeiros definitivos

susceptíveis e condições ambientais semelhantes às da região de origem. As três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* extremamente importantes para a doença no Brasil são: *B. tenagophila*, *B. glabrata*, *B. straminea*, onde apenas as duas últimas são encontradas na região Nordeste (NEVES, 2006).

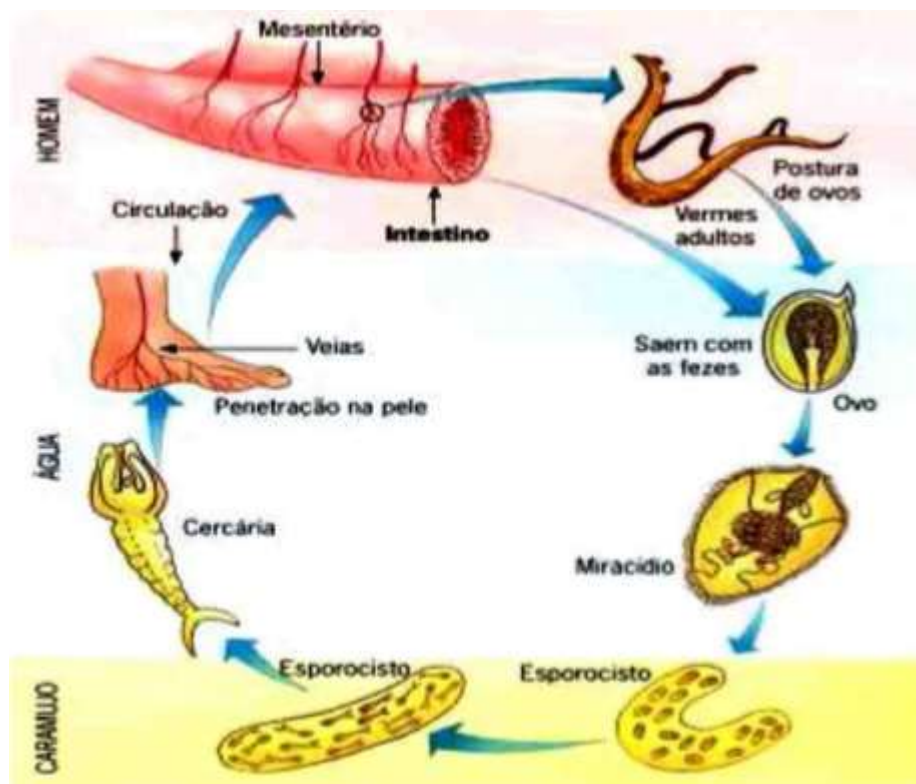
O ciclo do parasita apresenta uma fase de reprodução assexuada em hospedeiro intermediário (caramujo) e uma fase sexuada em hospedeiro definitivo (UTZINGER et al., 2001), e inicia (figura 3) quando o parasita atinge a forma adulta no sistema vascular do hospedeiro vertebrado e alcança as veias mesentéricas (locais onde machos e fêmeas realizam a cópula). As fêmeas, acopladas ou não aos machos, migram contra a corrente sanguínea até atingirem a submucosa de vasos menos calibrosos da parede intestinal e realizam a postura dos ovos. Cerca de 400 ovos por dia são depositados por essas fêmeas e 20% chegam ao ambiente externo (NEVES, 2006).

Os ovos levam cerca de uma semana para atingir a maturidade e contêm em seu interior o miracídio formado. Alguns fatores (reações inflamatórias, pressão dos ovos, perfuração da parede dos vasos) contribuem para a chegada desses ovos à luz intestinal juntamente com o bolo fecal (NEVES, 2006; SOUZA, et al., 2011). Na água, devido à estímulos de temperatura elevada, luz intensa e oxigenação, os ovos liberam os miracídios, e assim, esses miracídios podem penetrar nos moluscos vetores, não vetores e até mesmo em girinos. Porém, apenas aqueles miracídios que penetrarem no hospedeiro intermediário específico da doença é que vão se desenvolver. No interior do molusco, após a perda dos cílios, os miracídios perdem transformam-se em esporocistos primários, que através de poliembrionia originam os esporocistos secundários. Esses esporocistos, então, migram do local de penetração dos miracídios até as glândulas digestivas dando origem as cercarias. Vesículas são formadas no tegumento do molusco e, após rompimento, essas cercarias são liberadas e atingem a água. Elas, então, nadam livremente, e são atraídas por um hospedeiro definitivo, o homem, no qual se fixam entre os folículos pilosos e penetram ativamente na pele (SOUZA, et al., 2011).

A maneira pela ocorre transmissão da esquistossomose para homem é através do contato com essas águas contaminadas com as cercárias (larvas infectantes do *S. mansoni*). Esse contato pode ser devido às atividades agrícolas, domésticas, de lazer ou entre outras (BRASIL, 2010). As cercárias podem penetrar através da pele e/ou mucosas e, após essa etapa, ocorre diferenciação das larvas

endoparasitárias resultantes (chamadas esquistossômulos). Elas, então, migram pelo tecido subcutâneo e são levadas até os pulmões, coração e daí migram para todo organismo. Os vermes que atingem o fígado através dos ramos das veias mesentéricas e da veia porta vão sendo retidos, se acasalam e migram contra a corrente para as alças intestinais do sigmóide e reto. Larvas que passaram através do sistema vascular pulmonar e chegam no sistema porta intra-hepático, se alimentam até se desenvolverem, amadurecerem e se transformarem em formas adultas. Depois migram para veias mesentéricas e iniciam a deposição dos ovos, completando o ciclo do helminto (SOUSA, et al., 2018).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



Fonte: PORTAL SÃO FRANCISCO, 2010.

Apesar dos esforços para o controle da doença, o Brasil é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados, estimando-se que aproximadamente 1,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *S. mansoni* e mais de 25 milhões vivam em áreas com alto risco de transmissão. Dados recentes apontam para 22.434 casos só em 2015, e destes, 459 resultaram em morte do indivíduo (DA SILVA et al., 2019).

A esquistossomose mansônica é uma doença relacionada com questões de pobreza e de saúde pública. A presença de caramujos transmissores da doença, a existência de extensas áreas agrícolas com projetos de irrigação, amplos habitat aquáticos, aliados com precariedade na educação sanitária, ausência de infraestrutura e saneamento adequados, devastação ambiental, ocupação de terras por populações de baixa renda e mudanças ambientais que resultam do desenvolvimento de recursos hídricos e de crescimento e migração da população, contribuem para a expansão da doença e manutenção da endemia naquelas áreas onde a mesma já foi instalada. Sendo assim, como grande parte da população exerce a maioria de suas atividades do dia-a-dia nas coleções hídricas, a doença é um indicativo socioeconômico importante (BARBOSA et al., 2018; MELO; COELHO, 2005; PORDEUS et al., 2008; SILVA; CHIEFFI; CARRILHO., 2005).

A expansão geográfica da esquistossomose é algo preocupante (DOMINGUES; SILVA, 2011). Novos focos de transmissão da doença no litoral e as prevalências humanas atuais demonstram a contínua expansão da doença o que a torna cada vez mais cruel, acarretando em danos irreversíveis na população afetada (BARBOSA; SILVA; SIMÕES, F., 1996).

No Nordeste, onde se concentra o maior número de indivíduos infectados, é um dos principais problemas de saúde pública e o aumento da esquistossomose urbana nessa região, revela a ameaça constante que a doença representa (RESENDES, SOUZA, BARBOSA, 2005; BARBOSA; SILVA; SIMÕES, F., 1996), além de ser a região brasileira com a maior mortalidade do país em decorrência da forma grave da doença (FERREIRA, SILVA, 2007). De 2005 a 2013, dentre os casos notificados pelo Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), foram identificados aproximadamente 300 óbitos/ano devido à esquistossomose (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Pernambuco ocupa o terceiro lugar em prevalência no Brasil, e foi registrado, nos últimos anos, um crescente aumento no número de casos registrados, atingindo em torno de 17 mil indivíduos. A área endêmica em Pernambuco ocupa 101 dos 185 municípios (BARBOSA et al., 2019). Fatores biológicos, sócio-econômicos e culturais contribuem para a endemia da doença e novas áreas de transmissão têm sido encontradas na Região Metropolitana do Recife e em regiões próximas ao litoral, demonstrando que a doença continua em expansão no estado. Nessa

expansão pelo litoral, a maioria dos casos encontrados afeta principalmente pessoas de classe médio-alta. Nas áreas rurais, a maioria da população afetada é de baixa renda e a doença continua a se manifestar predominantemente na forma crônica (PEREIRA *et al.*, 2010).

Assim, é preciso que mais estudos científicos e investigações epidemiológicas, aliados a melhores condições de saneamento básico e educação sanitária, abranjam toda a complexidade da endemia, desde seus determinantes até a dinâmica das interações parasita-hospedeiro, com estratégias na busca de novos meios de controle da doença (PORDEUS *et al.*, 2008).

2.2 Patogenia e manifestações clínicas

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* inicia no momento da penetração das cercarias através da pele, porém, a patogenia da doença depende de uma série de fatores do parasita e do hospedeiro definitivo (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES, 2006). O desenvolvimento da infecção pode ser influenciado por existência de outras infecções, padrões de fibrose, tempo de exposição, entre outros fatores, porém, a formação do granuloma é um processo mediado por fatores imunes, que influenciam a indução e modulação da resposta imune contra antígenos do parasita, e esses fatores também podem ser determinantes na progressão da esquistossomose grave (NEGRÃO-CORREA *et al.*, 2014). Resposta imune do indivíduo, carga parasitária, cepa, intensidade de infecção são alguns dos fatores que vão estabelecer um amplo espectro das formas clínicas, desde leves até as mais graves. A evolução clínica da doença pode variar desde formas assintomáticas até formas mais graves e a mesma possui uma fase aguda e uma crônica (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES, 2006).

A fase aguda pode ser assintomática ou sintomática e corresponde ao período desde a penetração das cercarias através da pele até o segundo mês da infecção (NEVES *et al.*, 2006). Na maioria dos casos ocorre a presença da forma assintomática e, para seu diagnóstico, são necessários exames laboratoriais, já que ela pode ser confundida com outras doenças ou passar despercebida (BURKE *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2006).

A forma sintomática, da fase aguda, é caracterizada pelo aparecimento da síndrome de Katayama e de dermatite cercariana (BURKE *et al.*, 2009; NEVES,

2006; PORDEUS *et al.*, 2008). A síndrome ou febre de Katayama corresponde a uma reação de hipersensibilidade mediada por imuno-complexos contra os esquistossômulos ou contra os primeiros ovos depositados. A sintomatologia apresentada pelo indivíduo ocorre após três a sete semanas de infecção, sendo caracterizada principalmente por dores de cabeça, anorexia, febre, e dor abdominal. Em menor frequência, os indivíduos podem apresentar tosse seca, vômitos, diarreia, náuseas. Geralmente esse quadro regride de forma espontânea, porém em alguns casos a doença pode continuar o seu curso e se tornar mais persistente e complicada (BURKE *et al.*, 2009). A dermatite é uma resposta de hipersensibilidade, mediada por IgE, contra as cercárias que penetram na pele, e é caracterizada por erupção papular eritematosa e pruriginosa persistindo até cinco dias após a infecção (BURKE *et al.*, 2009; PORDEUS *et al.*, 2008).

Muitos indivíduos que residem em áreas endêmicas não apresentam manifestações clínicas na fase aguda e já são diagnosticados, na maioria das vezes, em plena fase crônica. Esse fator pode ser justificado pela provável “sensibilização” dessa população face aos antígenos do parasita, devido à exposição precoce. Portanto, sintomatologia nessa fase é mais comumente encontrada em visitantes, imigrantes ou nas infecções primárias (PORDEUS *et al.*, 2008).

Quando o indivíduo realiza tratamento específico, a fase aguda dura cerca de 60 dias e seus sintomas e sinais clínicos começam a melhorar gradualmente até desaparecem. Contudo, se o indivíduo não for tratado, a doença pode progredir para uma forma crônica comprometendo vários órgãos (BRASIL, 2010; KATZ; ALMEIDA, 2003). O ciclo de vida do parasita no hospedeiro, explica porque o parasita pode atingir e danificar vários órgãos (SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005).

A fase crônica representa o indicador de maior gravidade da doença em populações de algumas regiões do país, principalmente naquelas áreas com piores condições socioeconômicas (BARBOSA; GONÇALVES; de MELO, 1995). Essa fase é dividida em forma leve (assintomática, hepatointestinal e hepática) e a forma mais grave ou avançada (hepatoesplênica). Essa forma hepatoesplênica ainda pode ser subdividida em compensada e descompensada (de MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

Devido à falta de sintomatologia, a forma assintomática é detectada apenas a partir de achados de ovos nas fezes dos pacientes. A sintomatologia da forma hepatointestinal é caracterizada por dor abdominal, náuseas, diarreias e sensação

de plenitude gástrica. A maioria dos casos é benigna sendo observadas diarreias sanguinolentas devido à passagem simultânea de uma grande quantidade de ovos pela luz intestinal. Porém, pode-se observar fibrose da alça retossigmóide (SOUZA *et al.*, 2012). Essas manifestações clínicas da esquistossomose hepatointestinal (EHI) são encontradas principalmente em jovens e crianças. Ao exame clínico, o baço não é palpável e o fígado pode estar aumentado, principalmente o lobo esquerdo (NEVES, *et al.*, 2006). Durante anos, utilizou-se uma separação em forma intestinal e hepatointestinal, porém, a forma intestinal caiu em desuso devido à semelhança clínica e patológica entre essas duas formas clínicas (ambas apresentavam o mesmo comprometimento do fígado) (de MATTOS; DANTAS-CORREA *et al.*, 2010).

A forma hepática (EH) pode ser assintomática ou com sintomas semelhantes aos da forma hepatointestinal, a depender da carga parasitária e do acúmulo de ovos. Através do exame clínico, é identificado endurecimento do fígado e o mesmo se torna bastante palpável (característica semelhante àquela observada na forma hepatoesplênica) (NEVES, *et al.*, 2006). A fibrose característica dessa forma da doença é moderada a intensa, do tipo Symmers (fibrose periportal com neoformação vascular) e não apresenta esplenomegalia. Alguns pacientes com forma hepática podem apresentar varizes esofágicas. O aparecimento de ascite está relacionado com forma hepática descompensada (de MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

No momento da oviposição pela fêmea do parasita e na formação dos granulomas (formados tanto por substâncias antigênicas do ovo como também por substâncias antigênicas do verme adulto) começam a ocorrer as alterações hepáticas características da doença. Após a liberação desses ovos nas veias mesentéricas, eles alcançam o interior do órgão através da circulação. Estes, então, ficam retidos nos espaços porta e induzem uma vigorosa resposta imune com a formação de granulomas, com depósito excessivo de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, nas ramificações intra-hepáticas da veia porta e, conseqüentemente, levando ao surgimento de alterações hepáticas típicas. Com o acúmulo das lesões granulomatosas, as alterações ficam cada vez mais sérias, o que leva ao desenvolvimento de uma fibrose periportal em torno das ramificações intra-hepáticas, a qual representa a característica morfológica principal da forma grave mais avançada da doença (NEVES, 2006).

Com a fibrose hepática periportal ocorre o aumento na pressão sanguínea portal, e isso causa as consequências mais graves da infecção pelo *S. mansoni*. A

fibrose periportal, com a evolução da doença, tende a progredir causando congestionamento do fluxo sanguíneo da veia intra-hepática portal, e da veia esplênica o que contribui para o desenvolvimento da forma mais grave da doença, a esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (MANZELLA *et al.*, 2008). Essa forma representa de 4% a 12% dos pacientes encontrados nas áreas endêmicas e se caracteriza pelo comprometimento e crescimento do fígado e baço. (DOMINGUES, 2008). A forma hepatoesplênica é representada pela fibrose periportal, hipertensão portal e desenvolvimento de circulação colateral. Hipertensão portal, a principal complicação, muitas vezes resulta na formação de varizes esofágicas. A ruptura dessas varizes, e consequente hematêmese, é a principal e mais séria causa de mortalidade associada com a esquistossomose mansônica (TALAAT *et al.*, 2007).

2.3 Fibrose hepática na esquistossomose mansônica

A reparação tecidual é dividida em duas fases (FRIEDMAN; ALOMAN, 2008). A primeira fase, chamada de regeneração hepática consiste em crescimento tecidual organizado e ordenado, acarretando em restauração da massa hepática (quando da perda do parênquima) (RAMALHO *et al.*, 1993). A segunda, chamada fibrose, inicialmente benéfica, pode evoluir para um processo patogênico levando a remodelação e formação de tecido de cicatrização permanente (FRIEDMAN; ALOMAN, 2008). Essa reparação representa um processo biológico importante, sendo mecanismo crucial para sobrevivência do indivíduo (FRIEDMAN; ALOMAN, 2008).

O evento principal da fibrogênese é a ativação das células estreladas hepáticas. Essas células são responsáveis pela formação da matriz extracelular, pela manutenção da homeostase do órgão e tem papel na resposta à lesão hepática (WYNN, 2007). Com a ativação dessas células, ocorre mudança fenotípica delas em fibroblastos e em miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos (ANTHONY *et al.*, 2010; FRIEDMAN; ALOMAN, 2008).

Em decorrência dessa ativação celular, ocorre mudança qualitativa e quantitativa nos elementos da matriz celular (ECM), com acúmulo em excesso de proteínas componentes dessa matriz e que são produzidas pelos miofibroblastos (BRANDT *et al.*, 2010). Isso pode acarretar em obstrução do fluxo sanguíneo portal, resultando em hipertensão portal e suas sequelas (esplenomegalia e varizes

gastroesofagianas), o que causa morbidade e mortalidade associada com a esquistossomose (BURKE et al., 2009).

No processo inflamatório provocado pelo *S. mansoni* a lesão típica resulta em uma reação granulomatosa em torno dos ovos que são depositados, pela fêmea do parasita, no sistema venoso portal intra-hepático, desencadeando uma resposta imune celular de perfil Th2 (BRANDT et al., 2010). A formação do granuloma, embora inicialmente benéfica por bloquear os efeitos hepatotóxicos das toxinas liberadas pelo miracídio, pode acarretar em progressão da doença, levando ao desenvolvimento da fibrose pela produção excessiva de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular no espaço periportal (FAIRFAX et al., 2012; MORAIS et al., 2008). Essa fibrose é limitada ao espaço periportal, não comprometendo o parênquima hepático (BRANDT et al., 2010).

2.4 Imunopatologia da esquistossomose

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* provoca uma gama de morbidades no indivíduo e essas morbidades são influenciadas pela natureza da resposta imune induzida e seus efeitos na formação do granuloma. Estudos em áreas endêmicas demonstram que a resposta imune é influenciada pela genética do hospedeiro, carga parasitária, pelo nível de infecção e outros fatores. A relação entre o desenvolvimento da resposta imune e a gravidade da doença vem sendo amplamente estudada (OLIVEIRA-PRADO et al., 2012).

Complicações adicionais ao estudo da esquistossomose mansônica associada com a infecção pelo parasita, tais como presença de indivíduos reinfectados após quimioterapia específica, indivíduos co-infectados com outras parasitoses e indivíduos resistentes, tornam a interpretação da resposta imunológica complexa. Entretanto, o estudo dessa resposta nesses indivíduos provenientes de áreas endêmicas, tem contribuído para a compreensão de processos envolvidos na susceptibilidade e resistência à infecção, bem como para o desenvolvimento da doença (CALDAS et al., 2008).

As respostas celulares são mecanismos extremamente importantes para o entendimento do desenvolvimento da patologia associada com a esquistossomose. A resposta imunológica induzida a partir de infecções produzidas pelo *S. mansoni*,

varia de acordo com a evolução parasitária e migração por diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro definitivo (FITTIPALDI, 2006).

A formação do granuloma, mediada por células T CD4⁺ e, posteriormente, de fibrose hepática, são as principais causas de morbidade e mortalidade associadas com a esquistossomose (FAIRFAX et al., 2012; MORAIS et al., 2008). O conhecimento da diferenciação celular em linfócitos T CD4⁺ tem sido crucial para o entendimento das bases que tornam uma resposta imunológica benéfica ou não para o hospedeiro em resposta aos patógenos (MOSMANN et al., 1997).

A ativação dos linfócitos T CD4⁺ é realizada pelo reconhecimento de determinantes antigênicos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), na superfície de células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar, principalmente em células T efectoras, chamadas de Th1 e Th2. Esta classificação ocorre de acordo com o padrão de citocinas produzidas por essas células. As citocinas Th1 são responsáveis pela indução de uma reação de hipersensibilidade tardia, através da ativação de uma resposta inflamatória e citotóxica. Por outro lado, as citocinas Th2 são responsáveis pela proliferação de linfócitos B, que estimula a produção de IgE e aumenta o número de eosinófilos e mastócitos. A regulação e a produção dessas respostas Th1 e Th2, ocorre de forma simultânea e a resposta Th1 inibe a resposta Th2 e vice-versa (ABATH et al., 2000; JANEWAY et al., 2010).

Atualmente, as pesquisas se concentram em entender os mecanismos envolvidos na interação entre a formação do granuloma (e consequente formação de fibrose) e a resposta imune que é dirigida contra ela. Os granulomas estão associados com as células Th CD4⁺. Estudos revelaram que citocinas do perfil Th2 (principalmente IL-4 e IL-13) estão envolvidas na progressão da doença, enquanto citocinas Th1 estão relacionadas com diminuição do processo fibrótico (FALLON et al., 2000; WYNN et al., 2004, MENTINK-KANE et al., 2011).

Em contraste com o conhecimento do papel de citocinas na formação de granulomas e sua associação com gravidade da doença, a participação da resposta de linfócitos B (e a produção de imunoglobulinas), linfócitos T helper foliculares e monócitos contra infecção pelo *Schistosoma* e sobre a progressão da doença, ainda não está totalmente elucidada. A importância dessas células e a resposta de anticorpos tem sido sugerida em infecções experimentais de camundongos deficientes dessas células (NEGRÃO-CORREA et al., 2014).

O tratamento com Praziquantel (PZQ) em indivíduos infectados pelo parasita altera a resposta imune e tem sido sugerido para acelerar o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida específica. A caracterização das alterações induzidas pelo tratamento é importante a fim de se entender o desenvolvimento da resposta imune e sua heterogeneidade (MUTAPI *et al.*, 2003).

As interações entre linfócitos T foliculares, monócitos, linfócitos B e anticorpos em resposta à presença do parasita, após tratamento com praziquantel, demonstram a importância das respostas celular e humoral na definição dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção e em relação à patologia causada por esse helminto (MUTAPI *et al.*, 2003).

2.4.1 Linfócitos B

Os linfócitos B possuem receptores específicos para antígenos nas suas membranas, as chamadas imunoglobulinas. Após a ativação dessas células (por linfócitos T auxiliares), as imunoglobulinas serão secretadas pelos plasmócitos para desencadear suas funções. Todos os linfócitos B possuem IgM na sua membrana e apenas alguns possuem, além dessa, outras imunoglobulinas, como IgG, IgA ou IgE (BALESTIERI, 2006).

Linfócitos B em repouso possuem as imunoglobulinas distribuídas de forma homogênea e quando ocorre o reconhecimento de um antígeno, essas moléculas se aglutinam em regiões diferentes da célula. Esse fenômeno é conhecido como *patching* e após cerca de 10 minutos as imunoglobulinas são capazes de se aglomerar em um dos polos da célula (*capping*). Após um período, ocorre endocitose do antígeno e das imunoglobulinas. Isso faz com que os linfócitos B sejam apresentadores de antígenos, assim como macrófagos e células dendríticas (BALESTIERI, 2006).

Essas células são produtores de imunoglobulinas específicas contra patógenos multicelulares e recentemente têm sido associados com aumento da resistência à infecção em crianças com esquistossomose (BLACK *et al.*, 2010). Os linfócitos B1, um subconjunto de células B, expressam na sua superfície o marcador CD5 em conjunto com os outros marcadores de células B, e são subdivididos em B1a e B1b. Estudo *in vitro* indicaram a produção, por células B1a, de IgG2 e IgG3, enquanto que células B1b estariam produzindo IgG1 e IgE na defesa contra

infecções virais e na proteção contra infecções por grandes parasitas, como o *Schistosoma* (OLIVEIRA et al., 2005).

Anticorpos desempenham papel importante no controle de infecções esquistossomótica. As células que os produzem, são extremamente essenciais no controle da infecção e foram encontradas em níveis elevados após três e seis meses de tratamento com PZQ, indicando contribuição no processo (LABUDA et al., 2013).

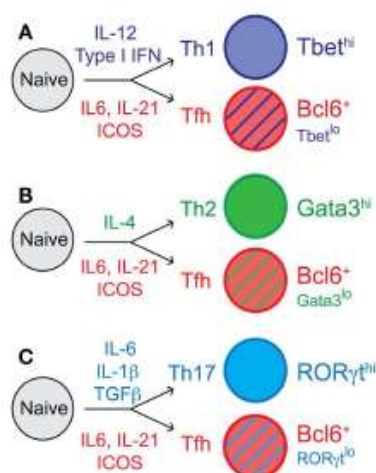
A ativação de células B e de IgE estão associados com resistência à infecção e esses parâmetros imunológicos podem variar de acordo com os ciclos de infecção e com tratamento com PZQ (BLACK et al., 2010).

2.4.2 Células T Helper foliculares (Thf)

Célula T helper folicular é um subtipo de linfócitos T CD4⁺ necessário para manutenção das reações contra agentes patogênicos e para geração de resposta humoral. Se caracterizam pela expressão de moléculas, incluindo marcadores de superfície (CXCR5, PD-1, ICOS) e fatores de transcrição (Bcl-6) (CHEN et al., 2014).

Esse subtipo celular é capaz de fornecer ajuda para linfócitos B através da expressão de CD40, IL-21 e IL-4. Sem esse auxílio, os linfócitos B são incapazes de gerar e manter uma resposta. Estudos tem relatado uma semelhança entre esses linfócitos com outras linhagens de T auxiliares (Th1, Th2, Th17 e Treg). Após ativação de T CD4⁺, elas vão se diferenciar nos subtipos celulares específicos (Figura 4). Uma diferenciação precoce de T CD4⁺ em linfócitos T foliculares requer presença de ICOS e sinalização de Bcl-6 (HALE; AHMED, 2015).

Figura 4 - Diferenciação de células T CD4⁺



Fonte: Hale e Ahmed, 2015

Estudos recentes demonstraram o papel dos linfócitos T foliculares auxiliando as células B em patologia autoimune. Embora essas células tenham papel no auxílio ao desenvolvimento, expansão e ativação de células B, estudos mais recentes têm indicado papel na patologia de doenças hepáticas (CHEN et al., 2014).

Em estudo sobre a infecção com *S. japonicum* foi identificado esse novo papel para essas células que nos leva a refletir sobre elas estarem envolvidas apenas no auxílio às células B. Os linfócitos Th foliculares produzidos estavam contribuindo na formação do granuloma hepático e progressão da patologia. O mecanismo exato de formação dos granulomas ainda não é totalmente conhecido. Estudos estão indicando papel de células Th foliculares na formação de granulomas e lesão hepática em camundongos infectados com *S. japonicum* (CHEN et al., 2014).

Embora essas células tenham sido induzidas durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni* e que a maioria das células TCD4⁺ produtoras de IL-4 tenham sido células Th foliculares, ainda não está claro se elas estariam envolvidas na formação do granuloma e da fibrose hepática na esquistossomose japonicum (CHEN et al., 2014).

2.4.3 Monócitos

As células mononucleares também estão envolvidas na patogênese de doenças hepáticas crônicas, especialmente aquelas onde ocorre formação de fibrose. Monócitos participam no desenvolvimento desse processo de fibrose através de vários mecanismos, incluindo produção de citocinas e proteínas da matriz extracelular relacionados com estresse oxidativo (FERNANDES et al., 2014).

Os monócitos também estão envolvidos na morte dos esquistossômulos. Assim como macrófagos, essas células expressam o receptor FcγRIIIa (receptor CD16) que é relacionado com condições pró-inflamatórias. O receptor funciona como um elo entre a resposta imune inata e humoral. Existem relatos indicando a importância entre a interação de IgG e receptores Fcγ. Infecção esquistossomótica exacerbada foi encontrada em camundongos com receptor Fcγ e deficientes de células B destacando a importância da sinalização de anticorpos via receptor na proteção da doença. No entanto, existem poucos estudos relacionados com

subclasses de IgG e receptores de monócitos na esquistossomose (APPLEBY et al., 2014).

Um estudo avaliando associação entre níveis de IgG e monócitos em indivíduos saudáveis e em pacientes infectados com *S. haematobium*, identificou aumento de expressão de monócitos e IgG1 nos indivíduos saudáveis demonstrando efeito protetor contra infecção. Essa relação indica uma ligação entre resposta imune inata e adaptativa na proteção contra infecção por helmintos (APPLEBY et al., 2014). Estudo avaliando subclasses de IgG identificou que níveis de IgG1 e IgG3 estão relacionados com resistência a infecção por *S. haematobium*. Posteriormente avaliando monócitos, o mesmo estudo encontrou que níveis elevados dessas células e IgG1 estão relacionados com proteção contra a doença (APPLEBY et al., 2014).

Monócitos CD14⁺/CD16⁺ estão sendo relacionados com reconhecimento de *Schistosoma* pelo sistema imune inato, através de ligação a produtos excretados/secretados por cercarias e ovos. Os monócitos são diferenciados em macrófagos ativados alternativamente, os quais estariam relacionados na proteção contra danos hepáticos celulares (SOUSA et al., 2018).

Além disso, os monócitos são as células-chave na iniciação da via extrínseca da coagulação. Um estudo avaliando essas células identificou que eles estão intimamente relacionados com predisposição a alterações hemostática característica da esquistossomose mansônica, progredindo com o avanço da esquistossomose em relação aos estágios finais descompensados (AMER; AMER., 2002).

Em resumo, sabe-se que diferentes padrões de resposta imune estão associadas com as diversas formas clínicas e morbidade da doença esquistossomótica (ABATH et al., 2000; MORAIS et al., 2008; CORREIA et al., 2009). Entretanto, apesar dos extensos esforços nas pesquisas, a avaliação a resposta imune adaptativa na infecção pelo *S. mansoni* é complexa e em contraste com um maior conhecimento do papel de citocinas na formação de granulomas e sua associação com gravidade da doença, a participação da interação da resposta de linfócitos B (e a produção de imunoglobulinas), linfócitos T helper foliculares e monócitos contra infecção pelo *Schistosoma* e sobre a progressão da doença, ainda não está totalmente elucidada (NEGRÃO-CORREA et al., 2014).

Adicionalmente, tratamento com praziquantel em indivíduos infectados pelo parasita altera a resposta imune e tem sido indicado para acelerar o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida específica, induzir alterações associadas com resistência à infecção, além de participar na redução da fibrose hepática. A caracterização das alterações induzidas pelo tratamento é importante a fim de se entender o desenvolvimento da resposta imune e sua heterogeneidade (MUTAPI et al., 2003).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da doença depende de certas ferramentas microscópicas (identificação de ovos), sorológicas e de imagem. Outros achados não específicos incluem eosinofilia (em relação à fase e intensidade de infecção), trombocitopenia (a partir do comprometimento esplênico) e anemia (devido a perda crônica de sangue) (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser divididos em: diretos (exames parasitológicos para detecção dos parasitas, imunológicos para pesquisa de antígenos e moleculares para detecção de DNA e RNA); indiretos (testes imunológicos para detecção de anticorpos específicos); métodos de imagem (ultrassonografia) para avaliação da morbidade e caracterização das formas clínicas da doença e o uso de citocinas e metabolitos do *S. mansoni* como biomarcadores (WEERAKOON et al., 2015).

. Os parasitológicos (métodos diretos), considerados como padrão-ouro para diagnóstico da doença, detectam ovos do parasito nas fezes ou nos tecidos do paciente. O método Kato-Katz é o mais utilizado pelos programas de controle, e recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por ser o exame parasitológico de fezes mais rápido e eficaz, permitindo a avaliação da eficácia de tratamentos e intensidade de parasitismo (além de ser de fácil execução) (KATZ; ALMEIDA., 2003).

A identificação de ovos nas fezes é o mais comum método utilizado para fazer o diagnóstico da esquistossomose, além de avaliar a intensidade da infecção. Resultados negativos nos exames parasitológicos de pacientes com infecção leve ou em fase crônica não excluem a possibilidade de infecção (BRASIL 2010; NEVES, 2006). Novas leituras provenientes de uma mesma amostra de fezes utilizando a

técnica de Kato-Katz, associada com um teste sorológico (três lâminas de leitura e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* anti-IgG) provaram ser mais um procedimento útil para aumentar a sensibilidade de diagnóstico (ELBAZ; ESMAT., 2013). Esquistossomose também pode ser diagnosticada em amostras de biópsias de tecido retal, intestinal e hepático. No entanto, a sensibilidade desses procedimentos é variável (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Testes sorológicos podem detectar anticorpos anti-esquistossomóticos. Entre as técnicas sorológicas mais utilizadas está o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (NEVES, 2006). O ELISA possui boa sensibilidade e é bem utilizado em estudos populacionais e proporciona ensaios quantitativos. Porém, sua utilização é limitada devido à falta de reagentes comerciais aplicáveis aos diagnósticos da doença (OLIVEIRA et al., 2004). Além disso, esse teste pode apresentar reações cruzadas com outras helmintoses (dando falso-positivos, além de permanecerem positivos após a cura do paciente) e, com isso, não permitem a confirmação absoluta do parasitismo (GRYSEELS et al., 2006).

A principal desvantagem é a incapacidade de distinguir entre infecção atual e passada. Outro inconveniente é que eles se mantêm positivos durante períodos prolongados. No entanto, um teste negativo pode excluir infecção na população endêmica (ELBAZ; ESMAT., 2013). Testes de diagnósticos utilizando urina podem detectar antígenos circulantes catódicos (CCA). Eles foram úteis em localidades onde era difícil se obter amostras de fezes consecutivas e forneceu um diagnóstico mais sensível e rápido para esquistossomose intestinal (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Métodos mais sensíveis e específicos são importantes para diagnosticar e evitar o aumento de reações induzidas por ovos do parasita. *Polimerase chain reaction* (PCR) surgiu para melhorar a detecção direta do parasita. Esses testes podem ser feitos nas fezes ou com material de biópsia e envolvem a preparação de DNA a partir de ovos para amplificação desse material. Apenas um pequeno volume de amostra pode ser utilizado para a extração do DNA. Esperançosamente, um ensaio de PCR está disponível para a detecção de DNA de *S. mansoni*. Ele permite o aquecimento da amostra para facilitar a ruptura do ovo e lise celular. Também inclui Inhibitex, um inibidor que adsorve substâncias danificadas e inibidores de PCR presentes no material fecal. Para amplificação do material, DNA é diluído 5 vezes com boa reprodutibilidade e o estudo pode proporcionar resultados com alta sensibilidade e especificidade (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Além disso, devemos salientar que os exames de imagem, como a ultrassonografia (US), tornaram-se uma importante ferramenta no diagnóstico e na avaliação e acompanhamento da morbidade devido à infecção pelo *S. mansoni*. A US é uma ferramenta bem estabelecida no diagnóstico e classificação da patologia relacionada com a esquistossomose. Métodos parasitológicos podem indicar se um paciente tem cura através do tratamento quimioterápico, enquanto que US, através da avaliação de imagens, está relacionada com estado de infecção. Devido à suas vantagens em termos de confiabilidade, economia, segurança e aplicabilidade em campo, a US é amplamente utilizada (TALAAT et al., 2007).

A introdução de US (baseada na observação da espessura da fibrose periportal), em levantamentos de campo expandiu os critérios para avaliação de pacientes esquistossomóticos e tornou claro que os exames físicos por si só não refletiam o estágio da doença. Portanto, além dos exames clínicos, outros parâmetros avaliados com a US, tais como: tamanho do fígado, espessura das paredes dos ramos periféricos e centrais, tamanho do baço e veias esplênicas, são importantes para melhorar a determinação do estágio da doença (CALDAS et al., 2008).

A fibrose hepática avançada era considerada uma condição irreversível. No entanto, esse conceito sofreu mudança drástica quando drogas quimioterápicas eficazes contra a indução de fibrose foram utilizadas, resultando na melhora clínica de doenças hepáticas crônicas, acompanhadas de considerável redução de fibrose (ANDRADE, 2009).

Através da classificação de Cairo, a US pode avaliar o grau de fibrose periportal através da medição da espessura dos ramos de segunda e terceira bifurcação da veia porta intra-hepática: Grau I se a espessura é 3-5mm, Grau II se é 5-7mm e Grau III sendo maior do que 7mm. A hipertensão portal é identificada pela US quando se observa dilatação da veia porta mesentérica e esplênica (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Através da classificação Niamy, a mais utilizada atualmente, a fibrose periportal é classificada em seis padrões: A – ausência; B – duvidosa (céu estrelado); C – periférica; D – central; E – avançada; F – muito avançada (RICHTER ET AL., 2001). Pela US, utilizando a classificação de Niamy, é identificada, na forma hepática, uma fibrose periportal com padrão central (D) ou avançado (E) (de MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

Foi introduzida uma técnica ultrassonográfica capaz de avaliar o grau de elasticidade do tecido hepático permitindo uma medida do grau de rigidez hepática que decorre da fibrose existente no tecido. O Impulso de Força de Radiação Acústica (ARFI) é uma técnica de diagnóstico à base de ultrassom que avalia a rigidez do tecido, através da velocidade de propagação de onda. Dependendo da interação com o transdutor, a onda gerada fornece respostas qualitativas (imagem) ou quantitativas (onda de valores de velocidade, medida em m/s) referentes à fibrose desenvolvida. É acoplada a máquina de ultrassom convencional, o que reduz a dependência de outro operador, pois não necessita de novas compreensões externas, e representa uma nova maneira de classificar o grau de fibrose hepática (PALMERI et al., 2008).

Com diagnóstico e tratamento considerados simples, o controle da esquistossomose é um desafio para os serviços de saúde pública. Existem fatores que contribuem para a expansão da doença, tais como: frequência do contato humano com água infectada pelo molusco transmissor, seja por lazer, trabalho agrícola ou doméstico, ausência de métodos eficazes de controle contra disseminação de moluscos (o que permite sua rápida propagação), condições de moradia, falta de saneamento básico, incluindo precárias condições de moradia, além da falta de uma vacina capaz de prevenir a doença (PORDEUS et al., 2018). O diagnóstico, aliado ao tratamento, é eficaz na diminuição da infecção e da sintomatologia do paciente, porém, a erradicação da doença, na comunidade, só é possível através de melhoria no saneamento básico e mudança no comportamento das pessoas que vivem em áreas endêmicas e com medidas que interrompam o ciclo evolutivo do parasita (KATZ; ALMEIDA., 2003).

2.6 Tratamento e controle

O controle da infecção pelo *S. mansoni* envolve uso de quimioterapia através de administração da droga em massa, quimioterapia individual, bem como melhora no saneamento básico e nas condições ambientais para minimizar a exposição do homem ao hospedeiro intermediário e as cercarias, além de medidas educacionais para reduzir o contato com água contaminada (ERKO et al., 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os programas de controles de parasitoses devem priorizar a população em idade escolar, devido as crianças representarem o

grupo mais vulnerável de rápido crescimento da doença nos países endêmicos (FONTES *et al.*, 2003).

Atualmente só se dispõe do Praziquantel para o tratamento de pacientes portadores de esquistossomose. O praziquante tem boa tolerância e, por ser nacionalmente produzida, em Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz/RJ, é a droga atualmente utilizada. É bastante segura e eficaz com uma única dose, através de via oral, de 40-60mg/kg. Mesmo indivíduos que não são completamente curados tem redução drástica no número de ovos excretados nas fezes. PZQ atua contra todas as espécies de *Schistosoma* que infecta humanos, uma característica importante especialmente em áreas onde atua mais de uma espécie do parasita, sendo mais vantajosa do que a oxamniquine e pertence ao grupo químico isoquinolino-pirazino (GREENBERG, 2013).

Uma limitação do PZQ é que ele não atua contra formas jovens do parasita. Dias após a infecção, o praziquantel parece atuar de forma eficaz, mas sua atividade cai até atingir níveis insignificantes na quarta semana de infecção, começando a subir novamente e atingindo picos na sétima semana. Como consequência desse processo, indivíduos em áreas endêmicas tendem a abrigar formas jovens do parasita e com isso, diminui a taxa de cura da doença (ELBAZ; ESMAT., 2013).

Devido à limitação de se ter apenas uma droga disponível para controle da doença, a resistência ao praziquantel pode aumentar e se espalhar (GREENBERG, 2013). Nas áreas onde ele é largamente utilizado, se faz necessário o desenvolvimento de ferramentas que diminuam ou até mesmo evitem a disseminação dessa resistência (GREENBERG, 2013). Os fatores que levam a essa resistência a droga em *Schistosomas* não são totalmente esclarecidos devido à falta de conhecimento dos mecanismos exatos de atuação da droga. Tem sido demonstrado que o surgimento da resistência se deve a sequência de larga escala e ao uso repetido do mesmo quimioterápico. Embora essa resistência seja pouco detectada em campo, uma susceptibilidade reduzida da droga em *S. mansoni* tem sido encontrada em muitos focos endêmicos (GREENBERG, 2013; WANG; WANG; LIANG, 2012).

2.7 Critério de cura parasitológica

O Programa de Controle da Esquistossomose preconiza a realização do controle de cura nos indivíduos infectados após o tratamento com o praziquantel. Para avaliar a cura parasitológica, devem ser realizados três exames de fezes seriados no quarto mês após o tratamento, através do método de Kato-Katz (BRASIL, 2014). Entretanto, surgem algumas dificuldades inerentes a baixa sensibilidade de diagnóstico após a quimioterapia específica. Como o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* é feito utilizando a detecção microscópica de ovos do parasita nas fezes (OMS, 1993), pode não ter o resultado esperado em indivíduos com baixa carga parasitária, devido ao pequeno número de ovos eliminados nas fezes, devido as variações diárias de oviposição por vermes do sexo feminino, e quando apenas uma pequena quantidade da amostra é examinada em uma única lâmina (KONGS et al., 2001).

Além disso, a contínua exposição dos indivíduos em coleções hídricas contaminadas, nas áreas endêmicas, é outro fator importante para o risco de reinfecção, o que dificulta a avaliação da cura pós terapêutica da doença. Dessa forma, é bastante incentivado tanto pelo Ministério da Saúde bem como pela OMS, o estudo de biomarcadores para diagnóstico precoce da infecção e controle de cura pós terapia que apresentem alta sensibilidade e sejam específicos da doença. Como estratégia para minimizar as lacunas dos exames parasitológicos no estudo de biomarcadores imunológicos e moleculares para esquistossomose, nosso grupo de estudo adotou como critério de cura a realização de exames parasitológicos de fezes seriados no primeiro e no sexto mês após o tratamento específico com praziquantel, segundo Domingues (2008).

3 JUSTIFICATIVA

A heterogeneidade da resposta imune do hospedeiro frente à infecção já é bem documentada em algumas doenças parasitárias, especialmente a leishmaniose, mas em relação à esquistossomose mansônica ainda necessita ser esclarecida. A avaliação dos níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 e de células B, monócitos e linfócitos Th folicular e suas interações, ainda não foi realizada e poderá contribuir para um maior entendimento sobre a evolução da doença, o que resultará na identificação de marcadores para o sucesso terapêutico e controle da infecção.

Portanto, dando continuidade às pesquisas do nosso grupo, analisamos as interações das respostas imunes inata, através do perfil de monócitos; e a adaptativa celular, avaliando o perfil fenotípico de células T CD4⁺ helper foliculares, células B. Além disso, identificamos níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 em pacientes antes, 30 dias, e 6 meses após terapia com praziquantel (correlacionando com os níveis dos perfis celulares identificados), que possam ser utilizados como critério de cura parasitológica pós-terapêutica da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar a resposta imune celular e humoral pós-terapêutica em pacientes crônicos com esquistossomose mansônica

4.2 Objetivos específicos

Em pacientes esquistossomóticos antes e após tratamento com praziquantel:

- Caracterizar o perfil demográfico, epidemiológico e parasitológico;
- Identificar os padrões de fibrose periportal da doença através da classificação Niamey;
- Avaliar a produção de citocinas de perfil Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e perfil Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), correlacionando os níveis de citocinas entre si;
- Quantificar as populações de linfócitos B, Thf e monócitos em pacientes com as diferentes formas clínicas crônicas da doença;
- Verificar a associação entre a frequência das populações de monócitos, linfócitos Thf, linfócitos B com os níveis de citocinas Th1/Th2 encontrados;
- Verificar a presença de biomarcadores relacionados com a cura parasitológica pós-terapêutica.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho, local e população do estudo

O desenho do estudo foi do tipo coorte (seguimento observacional, com intervenção) com comparação antes e depois do tratamento com praziquantel.

O município de Escada, local de coleta das amostras, é de área endêmica no estado de Pernambuco e foi selecionado devido aos seguintes critérios: a) ter realizado mais de 1.000 exames coproscópicos em um ano; b) estar inserido no Programa de Controle da Esquistossomose integrado com a atenção básica (QUININO et al., 2010).

Após anuência do município (ANEXO A), os pacientes foram selecionados através da história epidemiológica, exame clínico, ultrassonografia abdominal e parasitológico de fezes. Eles tiveram amostras de sangue coletadas em três momentos: no primeiro momento antes de realizar o tratamento com praziquantel, um mês e seis meses após tratamento.

A US foi realizada antes e após seis meses de tratamento para que se possa avaliar a classificação de fibrose periportal Niamey.

O exame parasitológico foi realizado nos três momentos de coleta para confirmação da presença (antes do tratamento) e ausência (após tratamento com praziquantel) de ovos nas fezes.

5.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes esquistossomóticos, de ambos os sexos, entre 18 e 65 anos, no período de Julho/2017 até Março/2018 em duas unidades de Programa de Saúde da Família (PSF) do município de Escada. Foram selecionados 25 indivíduos com parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni*, e que não tinham realizado tratamento prévio com PZQ.

5.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos, indivíduos com história de uso abusivo de álcool (acima de 40g por semana no sexo feminino e 60g no masculino), e/ou que apresentavam

esteatose hepática ou outras doenças hepáticas no ultrassom do abdome, além de HIV e Hepatite B ou C (ANGULO, 2002).

5.2 Definição do tamanho amostral

De acordo com outros estudos da literatura, com objetivos semelhantes ao estudo proposto, o tamanho amostral foi obtido aleatoriamente, por conveniência, no qual os indivíduos são selecionados por semelhança e disponibilidade (MUTAPI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004). O número amostral pequeno é justificado pela necessidade de não haver co-infecções nos indivíduos recrutados e nem realização de tratamento prévio com PZQ. Sendo assim, totalizamos 25 amostras em três tempos diferentes: antes e após 30 dias e seis meses de tratamento.

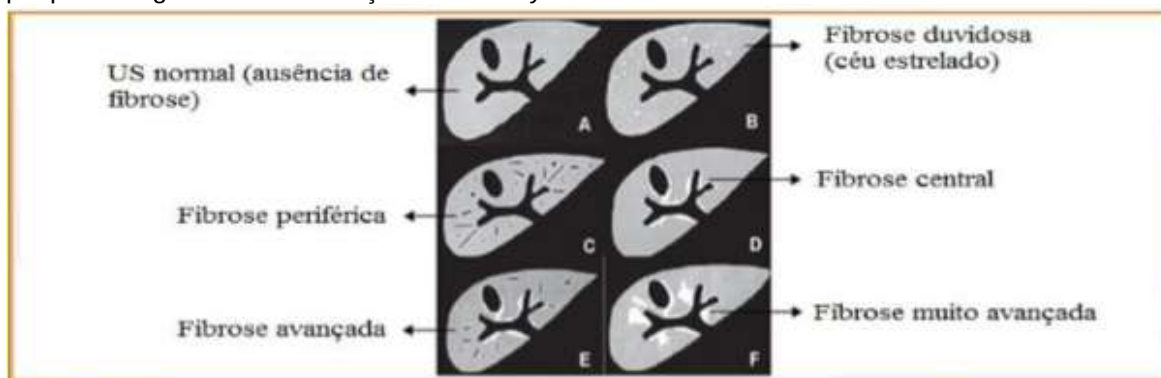
5.3 Coleta e processamento dos dados

Ao aceitar participar da pesquisa, o paciente assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) que lhe assegurou o cumprimento das normas da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Posteriormente, os dados dos pacientes foram coletados por meio de um formulário (APÊNDICE B) afim de levantar as variáveis necessárias para o estudo.

5.4 Determinação do grau de fibrose, através de classificação de Niamey

Os pacientes tiveram a confirmação da presença ou não da fibrose periportal através da ultrassonografia abdominal utilizando a classificação de Niamey, onde identificamos espessura dos vasos, tamanho do fígado e baço e presença de ascite (RICHTER et al., 2001). Essa classificação caracteriza a fibrose periportal em seis padrões: A – ausência; B – duvidosa (céu estrelado); C – periférica; D – central; E – avançada; F – muito avançada (figura 5). A US foi realizada antes e após 6 meses do tratamento com PZQ.

Figura 5 - Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal segundo a classificação de Níamey



Fonte: adaptado de RICHTER et al., 2001

5.5 Coleta sanguínea e obtenção do soro

Os pacientes que aceitaram participar do estudo, de forma voluntária, tiveram, aproximadamente, 15mL de sangue coletado: 10mL em tubo de EDTA, 5mL em tubo sem anticoagulante. As coletas foram realizadas antes e após 30 dias e 6 meses do tratamento. O tratamento quimioterápico foi realizado no posto de saúde do município, utilizando PZQ administrado por via oral. Dez ml de sangue foram destinados à realização da quantificação de linfócitos B, linfócitos T foliculares e monócitos através de citometria de fluxo. Cinco mL de sangue foram centrifugados, a 1500rpm (200xg) por 15 minutos na temperatura ambiente, para obtenção do soro, e o sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20°C até sua utilização. O material foi processado no Laboratório Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE.

5.6 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Ao sangue coletado com EDTA, foi adicionado Ficoll-Hypaque em 10 mL na proporção 1:2 em tubo do tipo Falcon e, logo em seguida, foi centrifugado a 400xg por 30 minutos. Como resultado, quatro fases puderam ser identificadas no tubo: plasma, anel de PBMCs, Ficoll-Hypaque e o sedimento hemático. Com auxílio de pipeta de transferência, o anel de PBMCs foi retirado e colocado em outro tubo Falcon para lavagem das células com phosphate buffer saline (PBS) (pH 7,2) e centrifugação a 200xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspenso em

meio RPMI 1640 completo e as células foram contadas para análise da viabilidade celular através da contagem de células mononucleares pela câmara de Neubauer, utilizando o azul de Trypan.

5.7 Citometria de Fluxo para determinação de monócitos, linfócitos Thf e B

Para determinação da percentagem de células Thf e B e monócitos, as amostras de PBMCs (após análise da viabilidade celular através da contagem de células mononucleares pela câmara de Neubauer, utilizando o azul de trypan) foram descongeladas em banho-maria e colocadas, com pipeta de transferência, em tubos Falcon de 15ml contendo 10ml de RPMI com soro fetal bovino. Elas então foram centrifugadas a 1500rpm (200xg) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em meio RPMI com soro e foi adicionado Fito. Os tubos Falcon referentes a cada amostra foram deixados “overnight” em estufa 37°C em estufa de CO₂. No dia seguinte, foi colocado 2µl de Golgi Stop e os tubos foram colocados novamente em estufa 37°C em estufa de CO₂, por 4 horas. Após isso, adicionamos 220µl de EDTA, PBS-Wash até a marcação de 10ml do tubo e centrifugamos por 1500rpm (200xg), 10 minutos e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ressuspendemos as células em 1ml de PBS-Wash. Adicionamos os anticorpos de superfície, incubamos por 30 minutos e adicionamos 1ml de PBS-Wash. Em seguida, centrifugamos por 1500rpm (200xg), 10 minutos e temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Fixamos com 100µl de Cytofix (BD Systems) para incubação de 150 minutos em temperatura 4°C no escuro e após isso, será adicionado 1ml de PBS-Wash para lavagem. Centrifugamos novamente por 1500rpm (200xg), 10 minutos e temperatura ambiente, descartamos o sobrenadante e adicionamos 300µl de PBS-Wash para posterior leitura em citômetro FACSCalibur da BD Systems. As marcações específicas que foram realizadas: CXCR5-AlexaFluor®488 – 2,5 µl, CD4-APC – 2,5µl, PD-1-PeCy7 - 5µl (linfócito T folicular), CD20-PE - 5µl, CD19-PE-Cy™7 - 2,5µl (linfócito B) e CD14-APC - 2,5µl, CD16-AlexaFluor®488 - 5µl (monócitos).

5.8 Detecção de citocinas Th1/Th2 por Cytometric Bead Array usando citômetro de fluxo

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram quantificadas em soro dos pacientes selecionados, através de Citometria de fluxo (CBA- Cytometric Bead Array), com o kit BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, seguindo as instruções do fabricante, no citômetro BD FACS Aria III. Esse citômetro é um analisador analógico equipado com dois lasers com a capacidade de análise multicolor padrão (até 4 cores). O laser principal é lido em um comprimento de onda de 488nm, enquanto o laser secundário é lido em 635nm. O kit CBA (BD) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α (Th1), IL-4, IL-6 e IL-10 (Th2) em uma mesma amostra. Sete populações de beads com intensidades de fluorescências distintas foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturados para formar o CBA e lidos no canal FL4 do citômetro de fluxo. As populações de cada bead foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as beads de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio. Os tubos foram preparados utilizando 25 μ l da amostra, 30 μ l da mistura de beads e 25 μ l do anticorpo de detecção (Human Th1/Th2 – II PE Detection Reagente). O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção da curva padrão (que continha 10 tubos, incluindo o tubo sem amostra ou padrão, denominado branco). Os tubos foram então, homogeneizados e incubados por 3 horas, em temperatura ambiente, no escuro. Após essa etapa, foi adicionado 0,5ml de Wash Buffer em cada tubo e todos foram centrifugados por 5 minutos em 200xg. Os sobrenadantes de cada tubo foram então descartados e foi adicionado 300 μ l de Wash Buffer para ressuspender o pellet bead de cada tubo. E os resultados foram obtidos através de gráficos e tabelas utilizando o software FCAP.

5.9 Definição e categorização das variáveis de coleta de dados

5.9.1 Variáveis dependentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL
Presença de ovos nas fezes	Indivíduos com esquistossomose mansônica com presença de ovos nas fezes
Ausência de ovos nas fezes	Indivíduos com esquistossomose mansônica com ausência de ovos nas fezes

5.9.2 Variáveis independentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	CATEGORIZAÇÃO
Sexo	Conformação física, orgânica, celular, particular que permite distinguir o homem e a mulher	Feminino; Masculino
Idade	O tempo de vida decorrido desde o nascimento até uma determinada data tomada como referência	18 até 55 anos
Classificação Niamey	Confirmação da presença ou não da fibrose periportal através da ultrasonografia abdominal utilizando a classificação de Niamey, que classifica a fibrose em 6 padrões:	A (ausência); B (duvidosa); C (periférica); D (central); E (avançada); F (muito avançada)
Níveis de citocinas Th1 e Th2	Níveis de citocinas presentes no soro dos pacientes	-
Marcação Linfócitos Thf, monócitos e linfócitos B	Quantificação de Linfócitos Thf, monócitos e linfócitos B	-

5.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do GraphPad Prism versão 5, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos nas dosagens celulares e de citocinas. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de gráficos e tabelas incluindo também o uso de medidas descritivas, como mediana. Os dados relativos aos níveis de citocinas, linfócitos T foliculares, B e monócitos foram testados quanto à normalidade usando o teste D-Agostino, por ser um teste mais amplo e para pequenos grupos comparados. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado ANOVA quando observado o pressuposto de normalidade. Quando não observado o pressuposto, os testes utilizados foram Mann-Whitney (para comparação de dois grupos) e Kruskal-Wallis (para comparação de 3 grupos). Também utilizamos o teste Tukey para múltiplas comparações.

Para correlacionar os níveis de citocinas entre si e com os perfis celulares analisados, foi utilizado o teste de Spearman. O coeficiente de correlação de Spearman é denominado pela letra grega ρ (rho) e é usado para análise de dados não-paramétricos (WAYNE, 1995).

5.11 Limitações metodológicas do estudo

Viés de seleção: os exames parasitológicos foram realizados pelos próprios profissionais da unidade de saúde do Cabo. Além disso, os mesmos profissionais pré-selecionaram os pacientes para possível participação no estudo. Para evitar um possível viés de seleção, os profissionais foram treinados e foi realizado exame de parasitológicos de fezes nos três momentos de coleta de sangue de cada paciente (Kato-Katz, realizadas três lâminas por amostra de fezes).

Viés de informação: Profissionais treinados realizaram entrevistas com perguntas simples e claras, para melhor entendimento dos pacientes, na tentativa de minimizar o possível viés de informação.

Perda de seguimento: A perda de seguimento poderia ser ou por desistência do paciente (não aparecimento na unidade de coleta em algum dos momentos de

coleta de amostra. Nesses casos, realizamos tentativa de ligação a fim de se evitar a perda antes de considerá-la) ou por novo contato com água contaminada no período do estudo.

Para evitar a desistência dos pacientes, eles foram estimulados, através de palestras e ações educativas, durante todo o período, sobre a importância do estudo na saúde e qualidade de vida. Apesar dos esforços, tivemos perda de pacientes devido à ausência em um dos momentos das coletas.

Para evitar o contato com água contaminada, trabalhos de conscientização foram realizados com palestras.

O contato permanente com esses pacientes também foi realizado (através de visitas e ligações) na tentativa de evitar esse viés.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do IAM – FIOCRUZ/PE para apreciação, obtendo aprovação (ANEXO B). Os pacientes esquistossomóticos envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, após leitura e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, com respeito às normas da resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS 466/12).

7 VIABILIDADE

O estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo de marcadores imunológicos e moleculares para morbidade, diagnóstico e avaliação de critério de cura pós-terapêutica em pacientes com esquistossomose mansônica”, o qual foi aprovado no edital FACEPE 2015 – Apoio ao Programa de Excelência em Pesquisa –PROEP. Além disso, os ensaios do presente trabalho foram desenvolvidos no Departamento de Virologia do IAM/Fiocruz-PE e na Plataforma Tecnológica do mesmo centro, onde estão disponíveis toda estrutura física, equipamentos e materiais necessários para a realização do projeto. As metodologias a serem empregadas já se encontravam bem estabelecidas e todos os equipamentos a serem usados nos experimentos já estavam disponíveis.

8 RESULTADOS

8.1 ARTIGO 1 - Redução nos níveis de IL-10 em pacientes crônicos com Esquistossomose mansônica após tratamento com Praziquantel: é um fator de proteção?

INTRODUÇÃO

A esquistossomose continua sendo um grave problema de saúde pública, sendo considerada uma parasitose crônica mundial, com altas taxas de morbidade e mortalidade (1). Atualmente, estima-se que mais de 250 milhões de pessoas estão infectadas e 800 mil apresentam risco de se contaminar (2, 3, 4). Ela é classificada como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas por atingir, em sua grande maioria, populações de baixa renda, tendo efeitos importantes na saúde, além de levar a uma discriminação social (2).

No Brasil, é causada pelo *Schistosoma mansoni* e é considerada endêmica em 8 unidades federativas brasileiras, atingindo os estados do Maranhão até Minas Gerais (5).

A lesão típica da inflamação provocada pelo *S. mansoni* resulta em uma reação granulomatosa em torno dos ovos que são depositados no sistema venoso portal intra-hepático (6). A formação desses granulomas inicialmente é benéfica, porém, devido a imunomodulação, pode acarretar em progressão da doença, levando ao desenvolvimento de uma fibrose no espaço periportal, em decorrência de uma produção excessiva de proteínas da matriz extracelular (7, 8). A formação do granuloma e o desenvolvimento de fibrose hepática são as principais causas de morbidade e mortalidade associadas com a esquistossomose (7, 8).

Ambos os processos de formação do granuloma e da fibrose são mediados por linfócitos T CD4⁺ e conhecer os mecanismos de diferenciação celular dessas células tem sido alvo de grande parte dos estudos atuais. Isso é importante para o entendimento das bases que tornam uma resposta imunológica benéfica ou não para o hospedeiro em resposta aos patógenos. (9).

Atualmente, as pesquisas se concentram em entender os mecanismos envolvidos na interação entre a formação desses granulomas e da fibrose hepática, com a resposta imune que é dirigida nesses processos (10).

A resposta imune celular inicial, originada de linfócitos CD4+ frente à infecção pelo *Schistosoma mansoni* é do tipo Th1, marcada pela produção de citocinas pró-inflamatórias tais como: IFN- γ , TNF- α e IL-1. Com a progressão da doença, a infecção se torna crônica e encontramos níveis elevados de citocinas Th2: IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 (11). Estudos revelaram que citocinas do perfil Th2 (principalmente IL-4 e IL-13) estão envolvidas na progressão da doença, enquanto citocinas Th1 estão relacionadas com diminuição do processo fibrótico (12, 13, 10). Tratamento com praziquantel (PZQ), além de reduzir prevalência e intensidade da infecção, pode acelerar o desenvolvimento de uma resposta imune protetiva, aumentando resistência à reinfeção bem como diminuindo carga parasitária (14).

Sendo assim, devido a importância da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, especialmente em áreas onde é considerada endêmica, o objetivo do nosso artigo é avaliar, antes e após tratamento com praziquantel, os níveis de citocinas de perfil Th1 e Th2 em pacientes com diferentes padrões de fibrose hepática e correlacionar esses níveis entre si. Isso pode contribuir para um maior entendimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na progressão da doença, e consequentemente, contribuir para uma melhora de monitoramento terapêutico dos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho e população do estudo

O desenho do estudo foi do tipo coorte (seguimento observacional, com intervenção) com comparação antes e depois do tratamento com praziquantel. Vinte e cinco indivíduos foram selecionados, no município de Escada, de acordo com histórico epidemiológico.

Os indivíduos tiveram amostras de sangue coletadas (5ml em tubo sem anticoagulante) em três momentos: no primeiro momento antes de realizar o tratamento com praziquantel, um mês e seis meses após esse tratamento. O tubo contendo o sangue foi centrifugado a 1500rpm (200xg) por 15 minutos, em temperatura ambiente, para obtenção do soro. O sobrenadante foi aliquoteado e

estocado a -20°C até sua utilização. O material foi processado no Laboratório do Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE.

Foram excluídos aqueles com história de uso abusivo de álcool (acima de 40g por semana no sexo feminino e 60g no masculino), e/ou que apresentavam esteatose hepática ou outras doenças hepáticas no ultrassom do abdome, além de HIV e Hepatite B ou C foram excluídos (15).

Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre esclarecido e o estudo foi encaminhado para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ/PE), sendo aprovado (CAAE: 50950615.9.0000.5190).

Deteção de citocinas Th1/Th2 por Cytometric Bead Array usando citômetro de fluxo

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram quantificadas em soro dos pacientes selecionados, através de Citometria de fluxo (CBA- Cytometric Bead Array), com o kit BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, seguindo as instruções do fabricante, no citômetro BD FACS Aria III. Esse citômetro é um analisador analógico equipado com dois lasers com a capacidade de análise multicolor padrão (até 4 cores). O laser principal é lido em um comprimento de onda de 488nm, enquanto o laser secundário é lido em 635nm. O kit CBA (BD) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α (Th1), IL-4, IL-6 e IL-10 (Th2) em uma mesma amostra. Sete populações de “beads” com intensidades de fluorescências distintas foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturados para formar o CBA e lidos no canal FL4 do citômetro de fluxo. As populações de cada bead foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as “beads” de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio. Os tubos foram preparados utilizando 25 μ l da amostra, 30 μ l da mistura de “beads” e 25 μ l do anticorpo de detecção (Human Th1/Th2 – II PE Detection Reagente). O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção da curva padrão (que continha 10 tubos, incluindo o tubo sem amostra ou padrão, denominado branco). Os tubos foram então, homogeneizados e incubados por 3 horas, em temperatura ambiente, no

escuro. Após essa etapa, foi adicionado 0,5ml de Wash Buffer em cada tubo e todos foram centrifugados por 5 minutos em 200g. Os sobrenadantes de cada tubo foram então descartados e foi adicionado 300µl de Wash Buffer para ressuspender o “pellet bead” de cada tubo. E os resultados foram obtidos através de gráficos e tabelas utilizando o software FCAP.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do GraphPad Prism versão 5, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos nas dosagens de citocinas. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de gráficos e tabelas.

Os dados relativos aos níveis de citocinas foram testados quanto à normalidade usando o teste D-Agostino. O pressuposto de normalidade não foi observado e por isso os testes utilizados foram Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Para correlacionar os níveis de citocinas entre si foi utilizado o teste de Spearman e é usado para análise de dados não-paramétricos (16).

RESULTADOS

Avaliação dos níveis de citocinas Th1 e Th2 em pacientes esquistossomóticos antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com praziquantel

Citocinas do perfil Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α)

Foram analisados os níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α nos pacientes antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com PZQ. Foi observado um aumento nos níveis da IL-2 após 6 meses de tratamento, quando comparado os três momentos de coleta ($p = 0,0074$) (figura 1). Também identificamos elevação dessa citocina quando comparamos os níveis antes e após 6 meses de tratamento ($p = 0,0091$) e entre 30 dias de tratamento e seis meses ($p = 0,0014$).

Não houve diferença estatisticamente significativa, antes e após tratamento com PZQ, nos níveis de IFN- γ ($p = 0,4535$) e TNF- α ($p = 0,5525$).

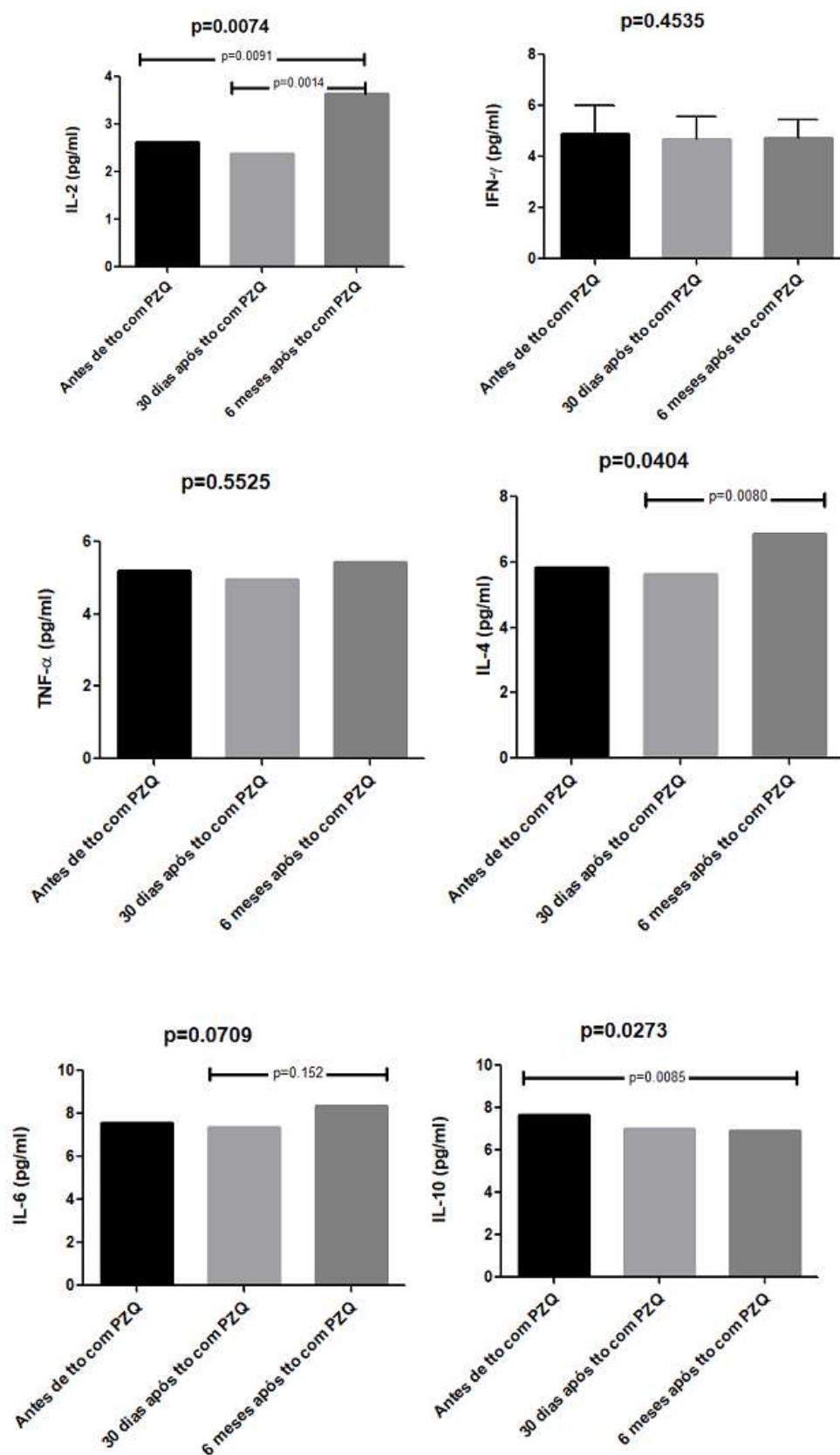
Citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10)

Com relação aos níveis de IL-4 produzidos antes e após tratamento foi observado aumento dessa citocina após 6 meses de ter recebido o PZQ ($p= 0,0404$) quando comparamos os três momentos de coleta (figura 1). Também encontramos valor estatístico significativo quando comparamos os níveis de IL-4 após 30 dias e 6 meses de coleta ($p= 0,0080$).

A diferença entre os níveis de IL-6 produzidos antes e após tratamento não foi estatisticamente significativa, quando comparamos os três momentos de coleta ($p= 0,0709$) (figura 1). Porém, ao compararmos os níveis dessa citocina 30 dias e 6 meses após PZQ, encontramos diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0152$).

Com relação a produção de IL-10, podemos observar, na figura 2, níveis elevados dessa citocina antes do tratamento, quando comparamos os níveis antes e após tratamento com PZQ (comparação dos três momentos de coleta), com $p= 0,0273$. Além disso, ao compararmos os níveis dessa citocina antes e após 6 meses de PZQ, também encontramos diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0085$).

Figura 1- Níveis de citocinas Th1 e Th2 nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel



Fonte: Elaborada pelo autor. Teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis

Correlação entre a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 em pacientes esquistossomóticos antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com praziquantel

A tabela 1 expressa as correlações entre as citocinas produzidas antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com praziquantel. Os resultados apontam para correlações positivas significativas entre as citocinas avaliadas.

Antes do tratamento com praziquantel, destacamos as correlações fortemente positivas entre IFN- γ x TNF- α (0.8306). IFN- γ e IL-2 (0.8050) entre TNF- α x IL-2 (0.9000). Após 30 dias de tratamento com PZQ, podemos destacar as correlações positivas entre TNF- α x IL-2 (0.9419) e entre IL-2 e IL-10 (0.7103).

Quando analisamos as correlações após 6 meses de tratamento, encontramos valores elevados entre IFN- γ e TNF- α (0.9195), IFN- γ e IL-2 (0.9128), IFN- γ e IL-4 (0.9369), TNF- α e IL-2 (0.9736), TNF- α e IL-10 (0.9760), IL-2 e IL-4 (0.9677), IL-2 e IL-10 (0.9653) e IL-4 e IL-10 (0.9717).

Tabela 1 - Correlações das citocinas Th1/Th2 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel

Correlação	Antes PZQ		Após 30 dias PZQ		Após 6 meses	
	(ρ)	p	(ρ)	p	(ρ)	p
IFN- γ x TNF- α	0.8306*	<0,0001	0.5536	0,0050	0.9195*	<0,0001
IFN- γ x IL-2	0.8050*	<0,0001	0.5793	0,0030	0.9128*	<0,0001
IFN- γ x IL-4	0.4252*	0,0341	0.2605	0,2190	0.9369*	<0,0001
IFN- γ x IL-6	0.1304	0,5344	0.1759	0,4110	0.0808	0,7836
IFN- γ x IL-10	0.3026	0,1415	0.2826	0,1809	0.8854*	<0,0001
TNF- α x IL-2	0.9000*	<0,0001	0.9419*	<0,0001	0.9736*	<0,0001
TNF- α x IL-4	0.3789	0,0618	0.4860*	0,0160	0.9771*	<0,0001
TNF- α x IL-6	0.0541	0,7972	0.0952	0,6581	0.1173	0,6897
TNF- α x IL-10	0.3181	0,1213	0.6560*	0,0005	0.9760*	<0,0001
IL-2 x IL-4	0.4343*	0,0301	0.5816*	0,0029	0.9677*	<0,0001
IL-2 x IL-6	0.0144	0,9452	0.0829	0,7000	0.1910	0,5130
IL-2 x IL-10	0.2451	0,2377	0.7103*	0,0001	0.9653*	<0,0001
IL-4 x IL-6	-0.0446	0,8323	-0.0774	0,7191	0.1156	0,6940
IL-4 x IL-10	0.1367	0,5148	0.4414*	0,0308	0.9717*	<0,0001
IL-6 x IL-10	0.0018	0,9930	0.0214	0,9207	0.1693	0,5630

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: ρ = valores de rho da correlação de spearman; * = correlação significativa existente entre as citocinas; PZQ= praziquantel.

DISCUSSÃO

A resposta imune celular frente ao *Schistosoma mansoni* vem sendo amplamente estudada. Inicialmente é do tipo Th1, marcada pela produção de citocinas pró-inflamatórias tais como: IFN- γ , TNF- α e IL-2. Com as mudanças que ocorrem na matriz extracelular, a doença progride se tornando crônica, devido ao aparecimento de fibrose periportal, e ocorre uma imunomodulação onde encontramos níveis elevados de citocinas Th2: IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 (11). Equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é importante para diminuição da morbidade associada à esquistossomose (17).

O tratamento com praziquantel altera a resposta imune específica contra o *S. mansoni*, promovendo uma maior resistência à infecção. O efeito desse tratamento é dependente do estágio de vida do parasita e do fenótipo celular ao qual ele está associado. As respostas imunes Th1, Th2 e Th17 regulam umas às outras durante infecção parasitária e a interação entre elas pode influenciar nessa resistência (18). Essa resposta mista que se desenvolve antes e após tratamento com PZQ foi apresentada através das fortes correlações positivas que encontramos entre as citocinas dos perfis Th1 e Th2.

Após tratamento com PZQ, identificamos elevação de IL-2 e esse aumento de resposta pró-inflamatória é o mais observado, sugerindo um aumento de resistência à infecção (18). Um amplo espectro de citocinas, permite o entendimento maior de como a resposta imune altera em decorrência do tratamento com praziquantel e como elas podem interagir durante a infecção (18). Antígenos liberados pelo parasita fornecem estímulo para indução de resposta imune Th1 frente ao parasita e isso pode ser acelerado por tratamento com praziquantel (14).

Proteção contra reinfecção, após tratamento, está sendo associada com resposta imune de perfil Th2, com elevação principalmente de IL-4 e IL-5. Em camundongos deficientes de IL-4, ocorreu maior produção de IFN- γ e TNF- α , o que acarretou em desenvolvimento de doença grave e fatal (19). Nos nossos resultados, não encontramos diferenças significativas para elevação de IFN- γ e TNF- α , após tratamento com praziquantel (e controle da carga parasitária) e isso pode ser pelo fato da IL-4 estar elevada.

A interação entre as respostas Th1 e Th2 acarreta em uma resposta mista frente à infecção e após tratamento (18). Identificamos fortes correlações positivas

entre citocinas de perfis celulares diferentes. Ademais, IL-4 e IL-13 podem estar atuando juntas, em altos níveis, na supressão de algumas citocinas Th1 (20), o que também poderia justificar a ausência de diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IFN- γ , TNF- α antes e após tratamento.

Apesar da proteção contra reinfecção estar relacionada com perfil Th2, estudos mostram que elevação de IL-10 pós tratamento não é benéfica. IL-10 é relacionada ao desenvolvimento da regulação imunológica após infecção crônica com helmintos. Tem papel bem caracterizado na limitação da patologia hepática e na mediação da resistência ao estágio crônico da doença esquistossomótica, onde os ovos liberados agem como um grande estímulo. O papel do IL-10 na manutenção da homeostase imunológica e na resolução da inflamação é fundamental para a sobrevivência e função do hospedeiro e isso é bem estudado na patogenia da esquistossomose crônica (21). Porém, elevação dessa citocina pós tratamento pode bloquear a proteção contra uma possível reinfecção (14). Martins-Leite et al (2008) identificaram níveis baixos de IL-10 após PZQ e isso está de acordo com nossos resultados, onde também identificamos diminuição dos níveis de IL-10 após tratamento.

Os principais benefícios do tratamento com praziquantel estão relacionados com diminuição da morbidade e da progressão da doença (14), e atualmente esse é o método mais aceito para identificar controle da doença. Além disso, há evidências de que o tratamento produz efeitos na resposta imune do indivíduo, protegendo contra infecção pelo *Schistosoma*, não sendo apenas uma proteção transitória (22).

Porém o entendimento da imunorregulação após utilização de praziquantel não está totalmente esclarecido, sendo necessário para avaliar o potencial na resistência a futuras reinfecções (14). Para melhor compreensão da modulação da resposta imune após tratamento com praziquantel se faz necessário estudos envolvendo um maior número de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* (17).

REFERENCIAS

1. CHEN, D. et al. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunol.*, 2013, v. 139, p. 523-532.
2. PANIC, G.; RUF, M-T.; KEISER, J. Immunohistochemical Investigations of Treatment with Ro 13-3978, Praziquantel, Oxamniquine, and Mefloquine in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, v.61, n.12.
3. KNOWLES, S.C.L. et al. Epidemiological interactions between urogenital and intestinal human schistosomiasis in the context of praziquantel treatment across three west african countries. *Plos Neglet Trop Dis*. 2015
4. ELBAZ, T; ESMAT.G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J of Adv Research*. 2013, v. 4, p. 445–452.
5. NETO O.B.L. et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 20123, Rio de Janeiro. v. 29, n. 2.
6. BRANDT, C.T. et al. Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. *Rev col bras cir*. 2010, Rio de Janeiro. v. 10, n. 5, p. 333-337.
7. FAIRFAX, K.C. et al. IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansoni Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. *PLOS Pathogens*. 2012, v. 8, n. 8.
8. MORAIS, C.N.L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568.
9. MOSMANN TR et al. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp*. Amsterdam. 1997, v. 204, p. 148-154.
10. MENTINK-KANE, M.M. et al. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R₂. *Gastroenterology*., 2011, v. 141, p. 2200–2209.
11. KUMAR, R. et al. The Causal Role of IL-4 and IL-13 in *Schistosoma mansoni* Pulmonary Hypertension. *Americ. jour. of resp. and critic. care med*. 2015, v.192, n.8.
12. FALLON, P.G et al. Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with cronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect immun*. 2000, Washington. v. 68, n. 10, p. 6005-6011.

- 13.WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm. Nat. Rew., 2004, v. 4, p. 583-594.
- 14.NDOMBI, E.M. et al. Effect of four rounds of annual school-wide mass praziquantel treatment for schistosoma mansoni control on schistosomespecific immune responses. Parasite Immunology. 2018, v.40.
- 15.ANGULO, P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J.Med. Boston. v. 346, p. 1221-1231, 2002.
- 16.WAYNE. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Editorial Limusa.1995.
- 17.TWEYONFGYERE, et al. Effect of Maternal Schistosoma mansoni infection praziquantel treatment during pregnancy on Schistosoma mansoni infection and immune responsiveness among offspring at age five years. PLOS neglect. trop. diseases. 2013, v. 7, n.10.
- 18.BOURKE, C.D. et al. Integrated Analysis of Innate, Th1, Th2, Th17, and Regulatory Cytokines Identifies Changes in Immune Polarisation Following Treatment of Human Schistosomiasis. The Journ. of infect. diseases. 2013, v. 208, 159-69.
- 19.SOUSA, C.O.S. et al. CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis. Frontiers in immunology. 2018, v. 9.
- 20.CHIARAMONTE, M.G. et al. IL-13 Is a Key Regulatory Cytokine for Th2 Cell-Mediated Pulmonary Granuloma Formation and IgE Responses Induced by Schistosoma mansoni Eggs. J Immunol. Bethesda. 1999, v. 162, p. 920-930.
- 21.SANIN, D.E. et al. Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4+ TCells That Are Functionally Suppressive. PLOS Pathogens. 2015, v.14, p. 1-23.
- 22.MARTINS-LEITE, P. et al. Effect of Chemotherapy with Praziquantel on the Production of Cytokines and Morbidity Associated with Schistosomiasis Mansoni. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008, v.52, p. 2780–2786.

8.2 ARTIGO 2- Avaliação da resposta imune celular de monócitos, linfócitos B e linfócitos T helper foliculares e suas interações com citocinas de perfil Th2 em pacientes esquistossomóticos crônicos antes e após tratamento com praziquantel

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta mais de 250 milhões de indivíduos em todo mundo (1). Tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na África, América do Sul e Caribe (2).

A patologia hepática da infecção pelo *S. mansoni* resulta de uma resposta imune em resposta aos ovos do parasita que ficam presos no espaço porta periportal. Ocorre formação de granuloma em torno dos ovos, depositados pela fêmea do parasita, agindo como uma barreira protetora para evitar dispersão antigênica. O processo de formação do granuloma é mediado por células T CD4⁺ e vários artigos tem demonstrado papel da resposta imune celular e de citocinas que estariam controlando o desenvolvimento da progressão da doença (2).

Porém, com o acúmulo cada vez maior de ovos, o processo inflamatório se torna intenso e evolui para fibrose periportal (1). Um grande problema da infecção causada pelo *S. mansoni* é o desenvolvimento dessa fibrose periportal, predominantemente causada pela resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos do parasita (3).

A esquistossomose continua sendo um grave problema de saúde pública e demonstrar os mecanismos imunológicos utilizados pelo hospedeiro para suprimir a inflamação crônica têm sido uma área de grande importância e crescimento na pesquisa, pois elucidar essa heterogeneidade da imunomodulação pode auxiliar para evitar a progressão para a forma mais grave e consequente morte do paciente portador da doença esquistossomótica (3,4).

Estudos mostram que citocinas Th1 estão envolvidas com diminuição do processo fibrótico, enquanto citocinas do perfil Th2 (principalmente IL-4 e IL-13) estão relacionadas com progressão da doença (5, 6, 7). O tratamento com praziquantel (PZQ) se mostra eficaz na redução da prevalência da doença e intensidade da infecção, bem como, pode contribuir em uma resposta imune

protetiva mais rápida, aumentando a resistência à reinfecção bem como diminuindo carga parasitária (8).

A heterogeneidade da resposta imune do hospedeiro frente à infecção já é bem documentada em algumas doenças parasitárias, especialmente a leishmaniose, mas em relação à esquistossomose ainda necessita ser esclarecida (9). Em resumo, sabe-se que diferentes padrões de resposta imune estão associadas com as diversas formas clínicas e morbidade da doença esquistossomótica (9, 10, 11). Entretanto, apesar dos extensos esforços nas pesquisas, a avaliação a resposta imune adaptativa na infecção pelo *S. mansoni* é complexa e em contraste com o conhecimento do papel de citocinas na formação de granulomas e sua associação com gravidade da doença, a participação da interação da resposta de linfócitos B (e a produção de imunoglobulinas), linfócitos T helper foliculares (Thf) e monócitos contra infecção pelo *Schistosoma* e sobre a progressão da doença, ainda não está totalmente elucidada (12).

Em Pernambuco, a esquistossomose é endêmica e devido à importância da doença no estado e na região nordeste, a elucidação e compreensão dos mecanismos imunes, que controlam o processo de fibrogênese hepática em humanos são de grande relevância para essa doença e todas as outras onde o processo de fibrogênese é a principal causa de morbidade e mortalidade (13).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as interações das respostas imunes inata, através do perfil de monócitos; e a adaptativa celular, avaliando o perfil fenotípico de células T CD4⁺ helper foliculares, células B. Além disso, identificamos níveis de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) em pacientes antes, 30 dias e 6 meses após terapia com praziquantel (e correlacionamos com os perfis celulares estudados) que possam ser utilizados como critério de cura parasitológica pós-terapêutica da doença, o que poderá resultar na identificação de marcadores para o sucesso terapêutico e controle da infecção.

MÉTODOS

Desenho do estudo

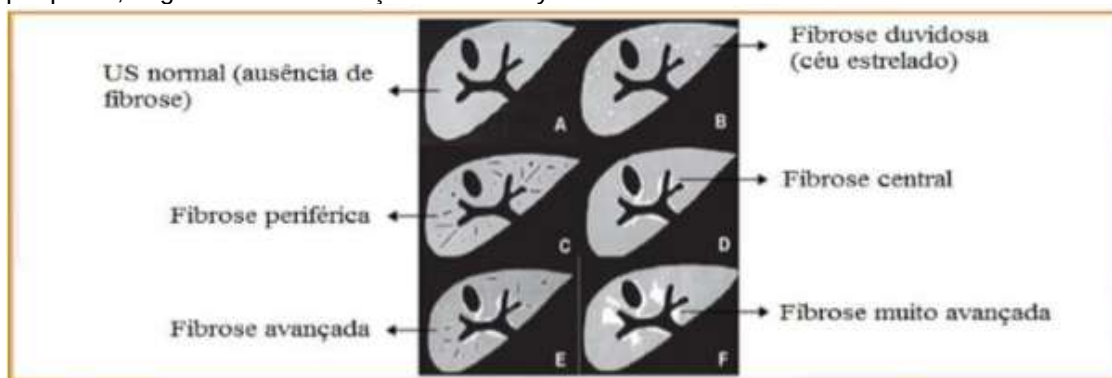
Vinte e cinco pacientes do município de Escada foram selecionados, de forma voluntária e após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo

foi do tipo coorte com seguimento observacional, comparando antes e após tratamento com praziquantel.

Crítérios relacionados com histórico epidemiológico, parasitológico de fezes e ultrassonografia abdominal (US) foram avaliados. Não fizeram parte do estudo, os pacientes que possuíam histórico abusivo de álcool e que apresentavam alguma doença hepática na US, além de HIV e/ou Hepatite B ou C (14).

A US foi realizada antes e após seis meses de tratamento para que se possa avaliar a classificação de fibrose periportal Niamey. De acordo com a US, eles tiveram a confirmação da presença ou não de fibrose periportal através da classificação Niamey. Essa classificação, divide a fibrose periportal em seis padrões: A – ausência de fibrose; B – duvidosa (padrão estrelado); C – periférica; D – central; E – avançada; F – muito avançada (figura 1). A US foi realizada antes e após 6 meses do tratamento com PZQ.

Figura 1- Representação ultrassonográfica do fígado de acordo com os diferentes padrões de fibrose periportal, segundo a classificação de Niamey



Fonte: adaptado de RICHTER et al., 2001

Legenda: US: ultrassonografia; A= padrão de fibrose A; B= padrão de fibrose B; C= padrão de fibrose C; D= padrão de fibrose D; E= padrão de fibrose E; F= padrão de fibrose F

O exame parasitológico foi realizado nos três momentos de coleta para confirmação da presença (antes do tratamento) e ausência (após tratamento com praziquantel) de ovos nas fezes.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ/PE) (CAAE: 50950615.9.0000.5190).

Coleta sanguínea e obtenção do soro

Os pacientes tiveram aproximadamente 15ml de sangue coletado, sendo 10ml em tubo com EDTA e 5ml em tubo sem anticoagulante. As coletas foram realizadas em três momentos: antes de tratamento com praziquantel, após 30 dias e após 6 meses de tratamento. Dez ml de sangue foram destinados à realização da quantificação de linfócitos B, linfócitos T foliculares e monócitos através de citometria de fluxo. Cinco mL de sangue foram centrifugados, a 200xg por 15 minutos na temperatura ambiente, para obtenção do soro, e o sobrenadante foi aliquotado e estocado a -20°C até sua utilização. O material foi processado no Laboratório Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ/PE.

Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue coletado no tubo com EDTA foi misturado, em tubo Falcon, com Ficoll-Hypaque, na proporção 1:2. Em seguida foi centrifugado a 400xg por 30 minutos. Obtivemos quatro fases que puderam ser identificadas no tubo: plasma, anel de PBMCs, Ficoll-Hypaque e o sedimento hemático. Com auxílio de pipeta de transferência, o anel de PBMCs foi retirado e colocado em outro tubo Falcon para lavagem das células com PBS (pH 7,2) e centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspenso em meio RPMI 1640 com soro fetal bovino e as células foram contadas para análise da viabilidade celular através da contagem de células mononucleares pela câmara de Neubauer, utilizando o azul de Trypan.

Citometria de fluxo para determinação de monócitos, linfócitos Thf e B

As amostras de PBMCs (após análise da viabilidade celular através da contagem de células mononucleares pela câmara de Neubauer, utilizando o azul de trypan) foram descongeladas em banho-maria e colocadas, com pipeta de transferência, em tubos Falcon de 15ml contendo 10ml de RPMI com soro fetal bovino. Elas então foram centrifugadas a 1500rpm (200xg) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em meio RPMI com soro e foi adicionado FITO. Os tubos Falcon referentes a cada amostra foram deixados “overnight” em estufa de 37°C com CO₂. No dia seguinte, foi colocado 2µl de Golgi Stop e os tubos foram colocados novamente na mesma estufa, por 4 horas. Após isso, adicionamos 220µl de EDTA, PBS-Wash até a

marcação de 10ml do tubo e centrifugamos por 200xg por 10 minutos e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ressuspendemos as células em 1ml de PBS-Wash. Adicionamos os anticorpos de superfície, incubamos por 30 minutos e adicionamos 1ml de PBS-Wash. Em seguida, centrifugamos por 200xg, por 10 minutos e temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Fixamos com 100µl de Cytofix (BD Systems) para incubação de 150 minutos em temperatura 4°C no escuro e após isso, será adicionado 1ml de PBS-Wash para lavagem. Centrifugamos novamente por 200xg, por 10 minutos a temperatura ambiente, descartamos o sobrenadante e adicionamos 300µl de PBS-Wash para posterior leitura em citômetro FACSCalibur da BD Systems. As marcações específicas que foram realizadas: CXCR5-AlexaFluor®488 – 2,5 µl, CD4-APC – 2,5µl, PD-1-PeCy7 - 5µl (linfócito T folicular), CD20-PE - 5µl, CD19-PE-Cy™7 - 2,5µl (linfócito B) e CD14-APC - 2,5µl, CD16-AlexaFluor®488 - 5µl (monócitos).

Deteção de citocinas Th2 por Cytometric Bead Array usando citômetro de fluxo

As citocinas IL-4, e IL-10 foram quantificadas em soro dos pacientes selecionados, através de Citometria de fluxo (CBA- Cytometric Bead Array), com o kit BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, seguindo as instruções do fabricante, no citômetro BD FACS Aria III. Esse citômetro é um analisador analógico equipado com dois lasers com a capacidade de análise multicolor padrão (até 4 cores). O laser principal é lido em um comprimento de onda de 488nm, enquanto o laser secundário é lido em 635nm. O kit CBA (BD) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-2, IFN-γ e TNF-α (Th1), IL-4, IL-6 e IL-10 (Th2) e em uma mesma amostra. Sete populações de “beads” com intensidades de fluorescências distintas foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturados para formar o CBA e lidos no canal FL4 do citômetro de fluxo. As populações de cada “bead” foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as beads de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio. Os tubos foram preparados utilizando 25µl da amostra, 30µl da mistura de beads e 25µl do anticorpo de detecção (Human Th1/Th2 – II PE Detection Reagente). O mesmo procedimento

foi utilizado para a obtenção da curva padrão (que continha 10 tubos, incluindo o tubo sem amostra ou padrão, denominado branco). Os tubos foram então, homogeneizados e incubados por 3 horas, em temperatura ambiente, no escuro. Após essa etapa, foi adicionado 0,5ml de Wash Buffer em cada tubo e todos foram centrifugados por 5 minutos em 200g. Os sobrenadantes de cada tubo foram então descartados e foi adicionado 300µl de Wash Buffer para ressuspender o pellet “bead” *bead* de cada tubo. E os resultados foram obtidos através de gráficos e tabelas utilizando o software FCAP.

Análise estatística

O GraphPad Prism, versão 5, foi utilizado para a análise estatística dos dados, considerando $p < 0,05$ como um valor estatisticamente significativo. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos nas dosagens das células B, monócitos e linfócitos Thf e de citocinas. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de gráficos e tabelas, incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mediana.

Os dados relativos aos níveis de linfócitos B, Th folicular e monócitos foram testados quanto à normalidade usando o teste D-Agostino. Quando o pressuposto de normalidade foi observado, utilizamos o teste ANOVA e quando não, os testes utilizados foram Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Também utilizamos o teste Tukey para múltiplas comparações.

Para correlacionar os níveis das células com os de citocinas entre si foi utilizado o teste de Spearman. O coeficiente de correlação de postos de Spearman é denominado pela letra grega ρ (rho) e é usado para análise de dados não-paramétricos (15).

RESULTADOS

Características sócio demográficas, epidemiológicas e parasitológica

A caracterização demográfica e epidemiológica dos pacientes está representada na tabela 1. Vinte e cinco pacientes, moradores do município de Escada – Pernambuco foram incluídos no estudo, sendo a maioria (56%) do sexo masculino. Quanto à idade observou-se que a mediana de 29 anos, com variação

entre 18 e 65 anos, caracterizando uma população jovem. Com relação a quantidade de ovos nas fezes, a mediana encontrada foi de 6 ovos por grama/fezes, antes do tratamento com PZQ. Após tratamento, 30 dias e 6 meses, os ovos não foram mais identificados. Ao classificar esses indivíduos de acordo com faixa etária, encontramos um maior percentual deles entre 18-39 (80%). A maioria dos indivíduos teve contato com águas de rio contaminados no próprio município de origem (84%).

Tabela 1 - Características demográficas e epidemiológicas de pacientes esquistossomóticos do município de Escada

		n	%
Sexo			
	Masculino	14	56.00
	Feminino	11	44.00
Total		25	100
Faixa etária			
	18-39	20	80.00
	40-59	4	16.00
	>60	1	4.00
Total		25	100
Local d banho de rio			
	Escada	21	84.00
	Outros municípios	4	16.00
Total		25	100
Quantidade de ovos (g/fezes) (mediana)		6	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: n= número de pacientes

A ultrassonografia abdominal foi realizada antes do tratamento com PZQ e após seis meses desse tratamento para identificação do padrão de fibrose periportal (tabela 2). Antes do tratamento, o padrão de fibrose predominante era o D (fibrose central) representando 32% dos indivíduos inseridos no estudo (tabela 2). Após seis meses de tratamento, o padrão de fibrose mais encontrado foi o C (52%).

Tabela 2 - Padrão de fibrose periportal dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após seis meses de tratamento com Praziquantel

Padrão de fibrose		Antes PZQ		Após PZQ	
		N	%	N	%
A		4	16.00	5	20.00
B		3	12.00	0	0.00
C		7	28.00	13	52.00
D		8	32.00	7	28.00
E		3	12.00	0	0.00
F		0	0.00	0	0.00
Total		25	100	25	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

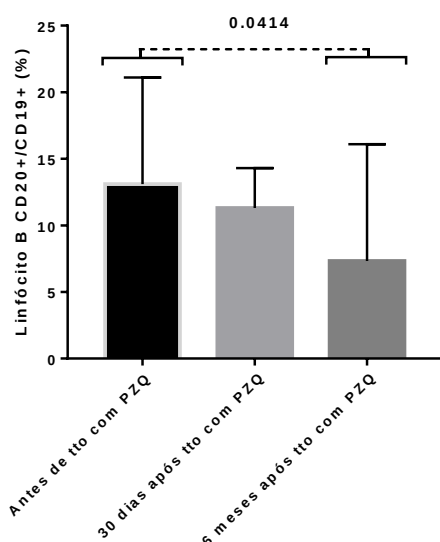
Nota: n=número de pacientes; PZQ= praziquantel; Padrão A= sem fibrose; B= padrão de fibroseduvioso; C= padrão de fibrose periférica; D= padrão de fibrose central; E= padrão de fibrose avançada; F= padrão de fibrose muito avançada

Avaliação dos níveis de linfócitos B, Thf e monócitos em pacientes crônicos esquistossomóticos, antes e após tratamento com praziquantel

Linfócitos B

Foram analisados os níveis de linfócitos B antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento. Identificamos uma diminuição nesses níveis antes e após 6 meses de tratamento, com p estatisticamente significativo de 0,0414 (figura 2).

Figura 2 - Níveis de linfócitos B nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel

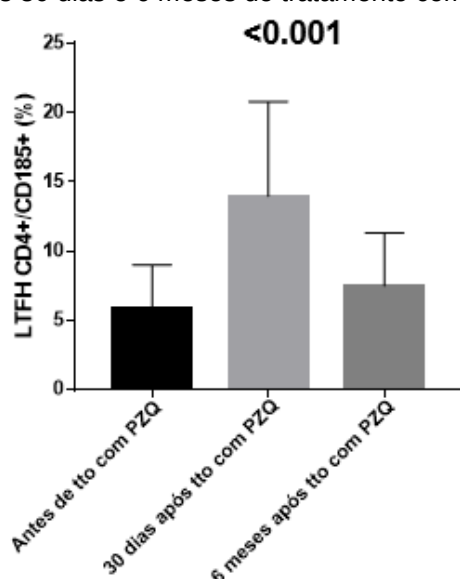


Fonte: Elaborada pelo autor. Teste Mann-Whitney

Linfócitos T helper folicular

A diferença entre os níveis de linfócitos Thf foi estatisticamente significativa quando comparamos os três grupos entre si, quando comparamos antes do PZQ com 30 dias de tratamento e quando comparamos os momentos de coleta após tratamento. Em todos os casos o valor de p foi <0.001 . Os níveis desse perfil celular aumentam após 30 dias de tratamento e diminuem consideravelmente após 6 meses (figura 3).

Figura 3 - Níveis de linfócitos Thf nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel

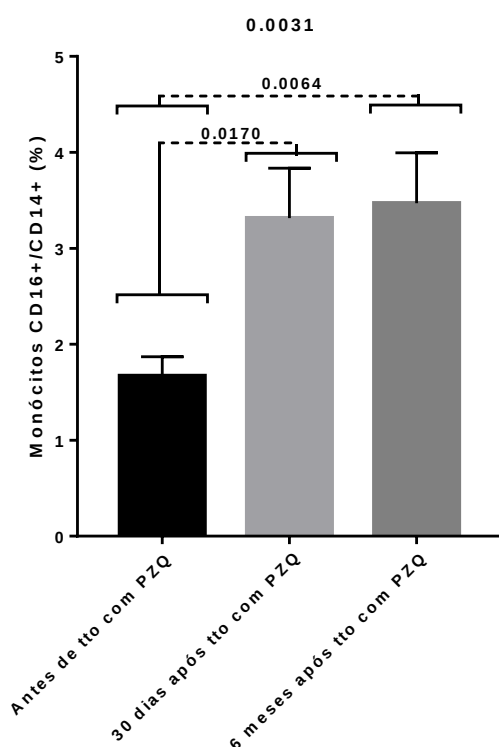


Fonte: Elaborada pelo autor. Teste ANOVA.

Monócitos

Com relação aos níveis de monócitos, identificamos aumento dessa célula quando comparamos os três momentos de coleta entre si, com $p = 0,0031$. Ao avaliarmos antes do tratamento com PZQ, comparando com 30 dias de tratamento ($p = 0,0170$) e com 6 meses de tratamento ($p = 0,0064$), também encontramos diferença, indicando aumento desse perfil celular (figura 4).

Figura 4 - Níveis de monócitos nos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes e após 30 dias e 6 meses de tratamento com Praziquantel



Fonte: Elaborada pelo autor. Teste ANOVA e Tukey.

Realizamos também análise pareada dos níveis dos perfis celulares estudados. Encontramos diferença estatisticamente significativa apenas nos monócitos. A análise comparando os três momentos de coleta obteve valor de $p=0,0171$. Antes e após tratamento (após 30 dias, $p= 0,0098$; após 6 meses, $p= 0,0128$) também foi significativo, indicando aumento nos níveis dessa célula.

Correlação entre a produção de citocinas do perfil Th2 e linfócitos B, Thf e monócitos em pacientes esquistossomóticos antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com praziquantel

A tabela 3 expressa as correlações entre os linfócitos B, Thf e monócitos com as citocinas IL-4 e IL-10. Encontramos correlações positivas estatisticamente significativas entre linfócitos B e IL-4 (antes do tratamento com PZQ; $p= 0.3910$),

linfócitos Thf e IL-10 (após 30 dias de tratamento; $p=0.4234$) e entre monócitos e IL-10 (após 30 dias de tratamento; $p=0.4568$).

Tabela 3 - Correlações de linfócitos B, Th folicular e monócitos com citocinas IL-4 e IL-10 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel

Correlação	Antes PZQ (ρ)	p	Após 30 dias PZQ(ρ)	p	Após 6 meses (ρ)	p
Linf.B x IL-4	0.3910*	0,0441	-0.1602	0,2627	0.2549	0,1985
Linf B x IL-10	0.3690*	0,0547	-0.0165	0,4740	0.0234	0,4700
Linf.Thf x IL-4	0.2883	0,0811	0.1183	0,3200	-0.4371	0,0680
Linf.Thf x IL-10	-0.0446	0,4161	0.4234*	0,0400	-0.1074	0,3630
Mon x IL-4	0.2543	0,1099	0.2522	0,1713	-0.1024	0,3694
Mon x IL-10	0.2964	0,0751	0.4568*	0,0383	-0.0165	0,4801

Nota: ρ = valores de rho da correlação de spearman; * = correlação significativa existente entre as citocinas; PZQ= praziquantel; Linf B= linfócito B; Linf.Thf= linfócito T helper folicular; Mon= monócito

DISCUSSÃO

A formação do granuloma e consequente desenvolvimento de fibrose periportal, em esquistossomose mansônica, podem estar relacionados com diversos fatores, os quais se destacam: idade, carga parasitária e sexo, além de fatores imunológicos e genéticos (16).

Em nosso estudo, identificamos um maior percentual de indivíduos jovens e do sexo masculino. Isso corrobora com os achados de Gomes et al (2016) que também identificou essa prevalência. Isso pode ser explicado devido à baixa procura pelos serviços de saúde e pelas ações preventivas, que muitas vezes acontecem em horários em que eles estão em seus locais de trabalho (17). Novas estratégias de saúde são necessárias para alcançar essa população masculina, além de melhorias na qualidade de vida da população, com melhores condições de saneamento básico e educação (17, 18).

Apesar de não serem estatisticamente significativos, nossos resultados apontam para uma diminuição de padrão de fibrose em pacientes que antes do tratamento apresentavam fibrose avançada e central. Esses dados corroboram com os achados de Nessim e Demerdash (2010), que indicaram atuação mais eficaz do praziquantel em pacientes mais intensamente infectados. A droga, nesses pacientes, foi capaz de reduzir o granuloma hepático (19). O efeito do praziquantel também é

relacionado com diminuição do padrão de fibrose. A fibrose decorrente da infecção pelo parasita é irreversível, porém, regressões nos padrões de fibrose periportal estão sendo encontradas após tratamento (2, 16). Sendo assim, estudo com número maior de pacientes é necessário para melhor compreensão dessa relação.

Além das características demográficas e parasitológicas, a resposta imune tem sido alvo de muitos estudos. Durante a fase aguda da infecção esquistossomótica mansônica, células do sistema imune inato são ativadas a produzirem predominantemente TNF- α , IL-2 e IL-6 (20, 21). Um grande problema causado pelo *S. mansoni* é o desenvolvimento de fibrose periportal (devido formação de granulomas), que leva a uma cronicidade da infecção, predominantemente causada pela resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos do parasita (1). Após as fêmeas liberarem ovos, que passam da corrente sanguínea ficando presos no espaço periportal, o perfil de citocinas muda completamente. Aproximadamente 50% dos ovos são transportados para o fígado, onde ficam presos e estimulam produção de citocinas do perfil Th2 (4).

A fase crônica é caracterizada pelos níveis elevados de IL-4, IL-13 e IL-10, resultando em uma dominante resposta imune celular desse perfil (20, 21). Essa resposta imune desencadeia a formação de granulomas em torno dos ovos presos e impulsiona formação de fibrose em colite ulcerosa e infecções crônicas helmínticas. Em todos esses casos, ocorre acúmulo de macrófagos derivados de monócitos ativados, os quais mudaram fenotipicamente devido a progressão da doença (22). A geração da resposta Th1, na fase crônica, está associada com proteção imune para *Schistosoma mansoni*. Acredita-se que citocinas do perfil Th1 estão envolvidas em um processo de estimulação de macrófagos para produção de óxido nítrico que faz a mediação da morte de esquistossômulo (13).

Estudos vêm demonstrando que macrófagos interferem na resposta Th2 (no recrutamento e ativação desse perfil celular), diminuindo a inflamação e o processo fibrótico envolvido na doença (22). A alta resposta Th2 e a inflamação hepática relacionada normalmente diminuem durante a infecção, porém, no indivíduo não tratado esse processo modulatório pode falhar e acarretar no desenvolvimento da forma hepatoesplênica, relacionada com uma fibrose hepática excessiva, além de acometimento esplênico e hipertensão portal (4). O balanço entre citocinas durante o

início e os posteriores estágios de progressão da doença podem determinar o resultado clínico do indivíduo (20).

Monócitos CD14⁺/CD16⁺ são capazes de se ligar a produtos excretados/secretados por cercárias e ovos, implicando essas células no reconhecimento de *Schistosoma* pelo sistema imune inato. Monócitos são diferenciados em macrófagos ativados alternativamente, os quais protegem de danos hepatocelulares e medeiam a sobrevida durante esquistossomose experimental (20). Fernandes et al (2014) sugerem papel protetor de monócitos CD14⁺/CD16⁺ na imunopatogênese da fibrose periportal, uma vez que essas células expressão altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Nós identificamos elevação desse perfil celular, o que seria indicativo de proteção. KLEPPA et al (2014) demonstraram diminuição de monócitos CD14⁺ após tratamento com PZQ, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esse resultado não corrobora com nossos achados de elevação de monócitos CD14⁺/CD16⁺ após tratamento com PZQ, sendo nosso resultado, estatisticamente significativo.

Tratamento com praziquantel demonstrou estimular funções de macrófagos/monócitos efetivos na contribuição contra danos mais intensos provocados pelo parasita (24). Esse tratamento eleva os níveis de monócitos na tentativa de combater a infecção parasitária (25). Sousa et al (2018) identificaram níveis de monócitos elevados após uso de praziquantel e se mantiveram altos com o passar dos meses. Estudos mostram que células dendríticas derivadas de monócitos, são capazes de produzir IL-4 e desencadear resposta imune Th2 no fígado (20), corroborando com nossos achados de elevação de monócitos e de IL-4 após tratamento.

Em infecções helmínticas, os macrófagos são fontes importantes de IL-10. Essa produção de citocina acontece em diversos ambientes imunológicos e é de fundamental importância para limitação de patogenicidade (26). Apesar da maior produção de IL-10 estar relacionada com linfócitos T CD4⁺, estudos demonstraram que macrófagos são responsáveis pela produção dessa citocina em estágios iniciais de infecção. No entanto, essa produção através de monócitos não é bem caracterizada (26).

IL-10 desempenha papel fundamental na modulação da inflamação durante infecção crônica. Estudos revelam que a infecção crônica com aumento da

morbidade, está associada com bloqueio de receptores de IL-10 (3, 4). Foi demonstrado que IL-10 regula a imunidade humoral hepática e que isso é uma via do sistema imune responsável por iniciar resposta anti-inflamatória essencial para prevenir progressão da doença. Essa resposta anti-inflamatória talvez seja mediada pelos complexos imunológicos em macrófagos derivados de monócitos (3), o que poderia justificar a correlação encontrada entre esse perfil celular com IL-10.

O bloqueio de receptores de IL-10, resultando em progressão da doença, com desenvolvimento de hipertensão portal e acúmulo de ovos parasitários também relacionado à diminuição na produção de células B (3, 4). Fairfax et al (2012) acredita que anticorpos produzidos por células B, são importantes para desencadear produção de fatores anti-inflamatórios, incluindo IL-10, e macrófagos. Porém, aumento dessa citocina pós tratamento pode bloquear a proteção contra uma possível reinfecção (8). Estudos tem identificado níveis baixos de IL-10 após tratamento (2) e isso corrobora com nossos resultados.

A participação de IL-10 e células B na proteção frente a infecção por helmintos tem sido demonstrada. Na ausência de IL-10, inflamação após infecção aumenta. Eles sugerem que linfócitos TCD4+ têm papel importante e significativo na regulação imunológica após exposição à patógeno e especulam se essas células também podem ajudar na manter a função protetora. IL-10 contribui para limitar dano nos tecidos após infecção (27).

Além disso, infecções por *S. mansoni* aumentam níveis de células B indutoras de produção de IL-10 (28). Brindley e Sher (1987) demonstraram, após uso de PZQ, sinergismo entre a droga e a resposta imune. Eles sugerem que os anticorpos produzidos por linfócitos B atuam diretamente contra os patógenos, como consequência da interação da droga. Labuda et al (2013) identificaram elevação nos níveis de linfócitos B após tratamento com praziquantel. Porém, outro estudo, identificou que, após a diminuição da carga parasitária por não ter infecção ativa, os níveis dessas células estariam diminuídos (30). Em nosso estudo, encontramos diminuição nos níveis tanto de células B como de IL-10 após PZQ. Estudo com maior população poderia ter demonstrado correlação significativa entre IL-10 e células B.

Existe correlação entre aumento de IL-4, estimulado pela secreção de células Tfh, e consequentemente aumento de IgG (estimulado pela secreção de linfócitos B). Essa correlação sugere que existe um nível mínimo de IL-4 necessário para ativação

da produção das células B envolvidas na produção dessa imunoglobulina e que as condições necessárias para essa produção de IL-4 não estão presentes antes de 10 semanas de infecção (4). Nós identificamos correlação estatisticamente significativa entre IL-4 e linfócitos B. Apesar de termos identificado elevação de IL-4 pós tratamento, os baixos níveis de células B poderiam ser justificados pelo nível de IL-4 não ser àquele necessário para ativação de produção dessas células.

Linfócitos T helper folicular, subconjunto de células T efectoras, auxiliam linfócitos B frente ao *Schistosoma japonicum*. Essas dependem de CXCR5 para localizar e manter contato com linfócitos B (31). Zhang et al (2013) identificou que na infecção pelo *S. japonicum* houve aumento da indução de produção dos linfócitos Thf e isso contribuiu para melhora da resposta imune humoral, através da ajuda no desenvolvimento de resposta de células B (31).

Células Thf secretam IL-21, para ativação, proliferação e diferenciação de células B (além de gerar células B de memória), e alguns estudos vêm relatando papel dessas células na indução de produção de IL-4 (31). Nós identificamos níveis elevados de IL-4 após PZQ. Estudo com população maior talvez pudesse indicar correlação estatisticamente significativa entre essa citocina com células Thf.

Como linfócitos Thf trabalham em conjunto com linfócitos B, e os níveis desse perfil celular diminuem após uso de praziquantel (30), acreditamos que a queda nos níveis de linfócitos Thf, após 6 meses de tratamento, pode ser justificada pela pouca quantidade de células B. Essa diminuição de Thf (encontrada em nosso estudo), assim como a de linfócitos B, poderiam estar relacionadas a ausência de infecção ativa, indicando uma cura parasitológica da doença. Após 30 dias e 6 meses após tratamento, não identificamos mais ovos nas fezes dos indivíduos. Além disso, apesar de não ser estatisticamente significativo, também identificamos diminuição no padrão de fibrose. Estudo com população maior poderia identificar correlação entre esses fatores demográficos e epidemiológicos com a diminuição dos perfis celulares citada.

Em resumo, estudos atuais vem se concentrando no entendimento da resposta imune que ocorre frente à infecção pelo *S. mansoni*, após tratamento com praziquantel (8). O papel das citocinas Th2, em resposta ao tratamento, vem sendo bastante explorado, porém informações do comportamento de linfócitos B, T helper folicular e monócitos e suas interações com as citocinas não está totalmente

esclarecido (12). Sendo assim, mais estudos são necessários para entendimento dessa resposta imune celular, na esquistossomose mansônica.

REFERENCIAS

1. FERNANDES, J.S. et al. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators of Inflamm.* 2014, p. 1-12.
2. MARTINS-LEITE, P. et al. Effect of Chemotherapy with Praziquantel on the Production of Cytokines and Morbidity Associated with Schistosomiasis Mansoni. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, v.52, p. 2780–2786.
3. FAIRFAX, K.C. et al. IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansoni Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. *PLOS Pathogens*. 2012, v. 8, n. 8.
4. FAIRFAX, K.C. et al. Regulation of the Development of the Hepatic B Cell Compartment During *Schistosoma mansoni* Infection. *J Immunol*. 2013, v.191, n.8.
5. FALLON, P.G et al. Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with cronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect immun.* Washington. 2000, v. 68, n. 10, p. 6005-6011.
6. WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm. *Nat. Rew.*, 2004, v. 4, p. 583-594.
7. MENTINK-KANE, M.M. et al. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R₂. *Gastroenterology.*, 2011, v. 141, p. 2200–2209.
8. NDOMBI, E.M. et al. Effect of four rounds of annual school-wide mass praziquantel treatment for schistosoma mansoni control on schistosomespecific immune responses. *Parasite Immunology*. 2018, v.40.
9. CORREIA, H.S.T. et al. Níveis séricos de globulinas e a intensidade da fibrose hepática em pacientes com esquistossomose mansônica. *Arq. Gastroenterol.*, 2009, v. 46, p. 194-198.
10. ABATH, et al. Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* Sep; 2000, v.86(9), p.745-52.
11. MORAIS, C.N.L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2008, v. 103, n. 6, p. 561-568.

12. NEGRÃO-CORREA, D. et al. Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. *Plos One.*, 2014, v. 9, p. 1-11.
13. EGESA, M. et al. *Schistosoma mansoni* schistosomula antigens induce Th1/Pro- inflammatory cytokine responses. *Parasite Immunology.* 2018, v.40.
14. ANGULO, P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J. Med.* Boston. 2002, v. 346, p. 1221-1231.
15. WAYNE. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Editorial Limusa. 1995.
16. ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* Oxford 2009, v. 31, p.656-663.
17. GOMES, A.C.L., et al. Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2016, v.25, n.2, Brasília.
18. SIL
VA, P.C.V.; LEAL, T.V.; DOMINGUES, A.L.C. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* Rio de Janeiro. 2013, v. 46. n.4, p.472-477.
19. NESSIM, N.G.; DEMERDASH, N.G. Correlation between infection intensity, serum immunoglobulin profile, cellular immunity and the efficacy of treatment with praziquantel in murine schistosomiasis mansoni. *Arzneimittelforschung*, 2000, v.50, n.2, p.173-177.
20. SOUSA, C.O.S. et al. CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis. *Frontiers in immunology.* 2018, v. 9.
21. CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.* Oxford. 2014, p. 1–10.
22. BORTHWICK, L.A. et al. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol.* 2016, v. 9(1): 38–5.
23. KLEPPA, E. et al. Effect of Female Genital Schistosomiasis and Anti-Schistosomal Treatment on Monocytes, CD4+ T-Cells and CCR5 Expression in the Female Genital Tract. *PLOS One.* v.9, n.6, 2014.
24. HRCKOVA, G.; VELEBNÝ, S.; KOGAN, G. Antibody response in mice infected with *Mesocostoides vogae* (syn. *Mesocostoides corti*)

tetrathyridia after treatment with praziquantel and liposomised glucan. *Parasitol res.*, 2007, v.100, n.6.

25. PANIC, G.; RUF, M-T.; KEISER, J. Immunohistochemical Investigations of Treatment with Ro 13-3978, Praziquantel, Oxamniquine, and Mefloquine in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, v.61, n.12.
26. SANIN, D.E.; PRENDERGAST, C.T.; MOUNTFORD, A.P. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *The Journal of Immunology*. 2015.
27. SANIN, D.E. et al. Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4⁺ T Cells That Are Functionally Suppressive. *PLOS Pathogens*. 2015, v.14, p. 1-23.
28. MANGAN, N.E. et al. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-Producing B cells. *J Immunol*. 2004, v.173.
29. LABUDA, L.A. Alterations in Peripheral Blood B Cell Subsets and dynamics of B Cell Responses during Human Schistosomiasis. *PLOS Neglect Trop Dis*, 2013, v.7, p.1-11.
30. BRINDLEY, P.J.; SHER, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *The Journal of immunology*. 1987, V.139, n.1.
31. ZHANG, J. et al. Helminth Protein Vaccine Induced Follicular T Helper Cell for Enhancement of Humoral Immunity against *Schistosoma japonicum*. *BioMed Research International*. 2013.

9 CONCLUSÃO

- Através dos nossos resultados, identificou-se maior percentual de homens jovens infectados pelo parasita, o que ocorre devido à baixa procura pelos serviços de saúde.
- O padrão de fibrose mais observado antes do tratamento foi o D e, após o tratamento, foi o C. Apesar dessa redução no padrão de fibrose não ser estatisticamente significativa, poderia demonstrar a eficácia do tratamento com praziquantel;
- Houve aumento nos níveis de IL-2, quando comparamos antes e após tratamento com PZQ, sugerindo resistência à infecção pelo *S. mansoni*;
- Também identificamos aumento nos níveis de IL-4 e diminuição de IL-10, indicando uma possível proteção contra reinfecção;
- Os níveis de monócitos elevaram após tratamento com PZQ, o que indica proteção contra danos hepatocelulares;
- Houve diminuição nos níveis de linfócitos B, quando comparamos antes e após tratamento com PZQ, devido não ter presença de infecção ativa pós tratamento. Os níveis de linfócitos Thf aumentaram e logo depois diminuíram e isso pode pela pouca quantidade de linfócitos B (já que essas células trabalham em conjunto), sugerindo cura parasitológica pós-terapêutica;
- Estudo com população maior se faz necessário para melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção pelo *S. mansoni*.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperamos que os resultados dessa tese representem informações relevantes sobre o conhecimento da resposta imune celular frente à infecção pelo *S. mansoni*, antes e após o tratamento com praziquantel, e possibilite identificar um potencial biomarcador biológico de cura terapêutica dos pacientes. Além disso, outros estudos com população maior são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABATH, et al. **Characterization of Sm13, a tegumental antigen of Schistosoma mansoni**. Parasitol Res. Sep; v.86(9), p.745-52, 2000.
- AMARAL R.S; TAIUIL, D.D; ENGELS, D. **An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. v. 101, p. 79-85), 2006.
- AMER, A; AMER, M.E. **Enhanced monocyte tissue factor expression in hepatosplenic Schistosomiasis**. Blood Coagul and Fibrinol, v.13, p.:43-7, 2002.
- ANDRADE, Z. A. **Schistosomiasis and liver fibrosis**. Parasite Immunol. Oxford v. 31, p.656-663, 2009.
- ANGULO, P. **Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease**. N Engl J.Med. Boston. v. 346, p. 1221-1231, 2002.
- ANTHONY, B. et al. **Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis**. Parasit Vectors. London. v. 3, n. 60, p. 60-67, 2010.
- APPLEBY et al. **CD16 Expression on Monocytes in Healthy Individuals but Not Schistosome Infected Patients Is Positively Associated with Levels of Parasite-Specific IgG and IgG1**. Plos Neglected tropical diseases, v: 8, 2014.
- BARBOSA et al. **Inquérito malacológico em localidades endêmicas para Esquistossomose em Pernambuco, Brasil**. REAS. v. 11, n.14, 2019.
- BARBOSA et al. **Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil**. Rev. Ambient. Água. v.13, n.3, 2018.
- BARBOSA, C.S.; SILVA, C.B.; BARBOSA, F.S. **Esquistossomose: reprodução e expansão da epidemia no Estado de Pernambuco no Brasil**. Rev Saúde Pública. São Paulo. v. 30, n.6, p.609-616, 1996.
- BARBOSA, F.S.; GONÇALVES, J.F.; de MELO, M.C.V. **Formas Hepatosplênicas da Esquistossomose Mansônica no Interior do Nordeste do Brasil**. Cad Saúde Públ. Rio de Janeiro. v. 11, n.2, p. 325-331, 1995.
- BARRETO et al. **Evaluation of serum levels of il-9 and il-17 in human schistosoma mansoni infection and their relationship with periportal fibrosis**. Immunob. v.221, p;1351-54, 2016.
- BICHLER, K. H. et al. **Schistosomiasis: a critical review**. Curr Opin Urol. London. v. 11, p. 97-101, 2001.

BLACK, C.L. et al. **Increases in schistosome-specific IgE and CD23+ B cells in a cohort of Kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*.** J Infect Dis. Vv.202, n.3, p. 399–405, 2010.

BORTHWICK, L.A. et al. **Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis.** Mucosal Immunol. v. 9(1): 38–5, 2016.

BOURKE, C.D. et al. **Integrated Analysis of Innate, Th1, Th2, Th17, and Regulatory Cytokines Identifies Changes in Immune Polarisation Following Treatment of Human Schistosomiasis.** The Journ. of infect. diseases. v. 208, 159-69, 2013.

BRANDT, C.T. et al. **Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica.** Rev col bras cir. Rio de Janeiro. v. 10, n. 5, p. 333-337, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Brasília. 7ª edição, 2010.

BRINDLEY, P.J; SHER, A. **The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response.** The Journal of immunology. V.139, n.1, 1987.

BURKE, M.L. et al. **Immunopathogenesis of human schistosomiasis.** Parasite Immunol.Oxford. v.31, p.163-176, 2009.

CALDAS, I. R. et al. **Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic of the infection.** Acta Trop. Amsterdam. v. 108, p. 109-117, 2008.

CHEN, D. et al. **Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver.** Immunol., v. 139, p. 523-532, 2013.

CHEN,X. et al. **Follicular Helper T Cells Promote Liver Pathology in Mice during *Schistosoma japonicum* Infection.** PLOS Pathogens., v. 10, p. 1-14, 2014.

CHIARAMONTE, M.G. et al. **IL-13 Is a Key Regulatory Cytokine for Th2 Cell-Mediated Pulmonary Granuloma Formation and IgE Responses Induced by *Schistosoma mansoni* Eggs.** J Immunol. Bethesda. v. 162, p. 920-930, 1999.

CHUAH, C. et al. **Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology.** Trends Parasitol. Oxford. p. 1–10, 2014.

CORREIA, H.S.T. et al. **Níveis séricos de globulinas e a intensidade da fibrose hepática em pacientes com esquistossomose mansônica.** Arq. Gastroenterol., v. 46, p. 194-198, 2009.

Da SILVA, L.F. et al. **Schistosomiasis mansoni in the northeast region of brazil: temporal modeling of positivity, hospitalization, and mortality rates.** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.v.52, 2019.

deMATTOS, A.A.; DANTAS-CORREA, E.B. **Tratado de Hepatologia.** Rio de Janeiro. Ed. Rubio. 2010.

DeOLIVEIRA, E.C.A. et al. **Investigação sobre os casos e óbitos por esquistossomose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, 2005-2013.** Epidemiol. Serv. Saude, v.27, n.4, 2018.

DOMINGUES, A. L. C. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, p. 929-961, 2008.

DOMINGUES, A.L.C.; SILVA P.C.V. **Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil.** Epidemiol. serv. saúde, v. 20 p. 327-336, 2011.

EGESA, M. et al. **Schistosoma mansoni schistosomula antigens induce Th1/ Pro- inflammatory cytokine responses.** Parasite Immunology. v.40, 2018.

ELBAZ, T; ESMAT.G. **Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review.** J of Adv Research. v. 4, p. 445–452, 2013

ERKO, B. et al. **Efficacy and side effects of Praziquantel in the treatment of Schistosomiasis mansoni in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary School, Wondo Genet, Southern Ethiopia.** Asian Pac J Trop Biomed. Singapore. v. 2, n.3, p. 235-239, p. 2012.

FAIRFAX, K.C. et al. **Regulation of the Development of the Hepatic B Cell Compartment During Schistosoma mansoni Infection.** J Immunol. v.191, n.8, 2013.

FAIRFAX, K.C. et al. **IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansonii Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease.** PLOS Pathogens. v. 8, n. 8, 2012.

FALLON, P.G et al. **Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with cronic Schistosoma mansoni infections.** Infect immun. Washington. v. 68, n. 10, p. 6005-6011, 2000.

FERNANDES, J.S. et al. **Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis.** Mediators of Inflamm. v. 2014, p. 1-12, 2014

FERREIRA, M.D. et al. **Cellular immunodeficiency related to chronic dermatophytosis in a patient with Schistosoma mansoni infection: can schistosomiasis induce immunodeficiency?** Rev Soc Bras Med Trop. v.50,n.1, p:141-144, 2017.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. **Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003**. Rev. Patol. Trop.,v. 36, p. 67-74, 2007.

FITTIPALDI J. **Relação entre níveis de imunoglobulinas – IgE e IgG – e a forma clínica da esquistossomose mansônica em pacientes do município de Padre Paraíso, Minas Gerais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 145p, 2006.

FRIEDMAN, S. L. **Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis**. Gastroenterology. Philadelphia. v. 134, p. 1655-69, 2008.

FONTES, G. et al. **Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL**. Rev. Soc Bras Med Trop. Uberaba. v. 36, n.5, p. 625-628, 2003.

GOMES, A.C.L., et al. **Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. Epidemiol. Serv. Saúde, v.25, n.2, Brasília, 2016.

GREENBERG, R.M. **New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes**. Parasitology. London. v. 3, p. 1-13, 2013.

GRYSEELS, B. et al. **Human schistosomiasis**. Lancet.v. 368, p.1106–18, 2006

HALE, J.S; AHMED, R. **Memory T follicular helper CD4 T cells**. Front Immunol. v.2, n.6, 2015

HRCKOVA, G.; VELEBNÝ, S.; KOGAN, G. **Antibody response in mice infected with Mesocostoides vogae (syn. Mesocostoides corti) tetrathyridia after treatment with praziquantel and liposomised glucan**. Parasitol res., v.100, n.6, 2007.

JANEWAY C.A; TRAVERS P; WALPORT M; MURPHY K. **Imunidade Inata**. 7ª ed. Ed. Artmed. São Paulo. Cap. 2, p. 83-86, 2010.

KALANTARI, P et al. **The C-type lectin receptor-driven, Th17 cell-mediated severe pathology in Schistosomiasis: not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated**. Front Immunol, 2019.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. **Esquistossomose, xistosa, barriga d'água**. Ciência e Cultura. São Paulo. v. 55, n. 1, p. 38-43. 2003.

KLEPPA, E. et al. **Effect of Female Genital Schistosomiasis and Anti-Schistosomal Treatment on Monocytes, CD4+ T-Cells and CCR5 Expression in the Female Genital Tract**. PLOS One. v.9, n.6, 2014.

KNOWLES, S.C.L. et al. **Epidemiological interactions between urogenital and intestinal human schistosomiasis in the context of praziquantel treatment across three west african countries.** Plos Neglect Trop Dis. 2015

KONGS A, MARKS G, VERLÉ P, VAN DER STUYFT P. **Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections.** Trop Med Int Health. v.6, p.163-169, 2001.

KUMAR, R. et al. **The Causal Role of IL-4 and IL-13 in *Schistosoma mansoni* Pulmonary Hypertension.** Americ. jour. of resp. and critic. care med. v.192, n.8, 2015.

LABUDA, L.A. **Alterations in Peripheral Blood B Cell Subsets and dynamics of B Cell Responses during Human Schistosomiasis.** PLOS Neglect Trop Dis, v.7, p.1-11, 2013.

LEAL NETO, O.B. et al. **Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil.** Cad. Saúde Pública, v. 29, 2013.

MANGAN, N.E. et al. **Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-Producing B cells.** J Immunol. v.173, 2004.

MANZELLA, A. et al. **Schistosomiasis of the liver.** Abdom Imaging, Oxford. v. 33, n. 2, p.144-150, 2008.

MARTINS-LEITE, P. et al. **Effect of Chemotherapy with Praziquantel on the Production of Cytokines and Morbidity Associated with Schistosomiasis Mansoni.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v.52, p. 2780–2786, 2008.

MELO, A.L; COELHO, P.M.Z. **Schistosoma mansoni e a doença.** v.2005, p.193-212. 2005

MENTINK-KANE, M.M. et al. **Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R₂.** Gastroenterology., v. 141, p. 2200–2209, 2011.

MORAIS, C.N.L. et al. **Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568, 2008.

MOSMANN TR et al. **Differentiation and functions of T cell subsets.** Ciba Found Symp.Amsterdam. v. 204, p. 148-154, 1997.

MUTAPI, F. et al. **Chemotherapy-induced, age-related changes in antischistosome antibody responses.** Parasit. Immunol., v. 25, p. 87-97, 2003.

NADY, S et al. **IL-17 induced the recruitment and functional activity of granulocytes with Schistosoma mansoni and Hepatitis C Virus.** Egypt J Immunology, 2017.

NDOMBI, E.M. et al. **Effect of four rounds of annual school-wide mass praziquantel treatment for schistosoma mansoni control on schistosomespecific immune responses.** Parasite Immunology. v.40, 2018.

NEGRÃO-CORREA, D. et al. **Association of Schistosoma mansoni-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil.** Plos One., v. 9, p. 1-11, 2014.

NESSIM,N.G.; DEMERDASH, N.G. **Correlation between infection intensity, serum immunoglobulin profile, cellular immunity and the efficacy of treatment with praziquantel in murine schistosomiasis mansoni.** Arzneimittelforschung, v.50, n.2, p.173-177, 2000.

NETO O.B.L. et al. **Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil.** Cad Saúde Pública. Rio de Janeiro. v. 29, n. 2, 2013.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana.** São Paulo. 11 ed. São Paulo: Atheneu, Cap.22 ,2006.

OLIVEIRA, S. A. et al. **Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with Schistosoma mansoni.** Parasitol. Res., Berlin, v. 93, p. 30 - 35, 2004.

OLIVEIRA, L.F.A. et al. **Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis Mansoni in Humans.** Infect immun.Washington. v .74, n. 2, p. 1215–1221, 2005.

OLIVEIRA-PRADO. **Cytokine profile, proliferation and phosphorylation of ERK1/2 and Akt in circulating mononuclear cells from individuals during the chronic intestinal phase of Schistosomiasis mansoni infection.** BMC Infectious Diseases. v.12, n.380, 2012.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **The control of schistosomiasis.** Tech Rep Ser v.830, p. 1-85, 1993

PALMERI, M.L.et al. **Quantifying Hepatic Shear Modulus In Vivo Using Acoustic Radiation Force.** Ultrasound Med Biol. April; 34(4): 546–558., 2008.

PANIC, G.; RUF, M-T.; KEISER, J. **Immunohistochemical Investigations of Treatment with Ro 13-3978, Praziquantel, Oxamniquine, and Mefloquine in Schistosoma mansoniInfected Mice.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.61, n.12, 2017.

PEREIRA, A.P.B. et al. **The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community.** Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. v. 105, n.4, 2010.

PORDEUS, L.C. et al. **A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura.** Epidemiol serv saúde Brasília. v.17, n.3, p. 163-175, 2008.

RAMALHO, F.S. et al. **Regeneração hepática. Algumas definições num universo de incertezas.** Acta Cir. Bras. Rio de Janeiro. v.8, p. 177-189. 1993.

RESENDES, A.P.C.; SOUZA, S.R.; BARBOSA, C.S. **Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000.** Cad. Saúde Pública. v. 21, p. 1392 – 1401, 2005.

RICHTER, J. et al. **Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-56, 2001.

SANIN, D.E.; PRENDERGAST, C.T.; MOUNTFORD, A.P. **IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLRDriven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism.** The Journal of Immunology. 2015.

SANIN, D.E. et al. **Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4+ TCells That Are Functionally Suppressive.** PLOS Pathogens. v.14, p. 1-23, 2015.

SILVA, L.C.; CHIEFFI, P.P.; CARRILHO, F.J. **Schistosomiasis mansoni – Clinical feature.** Gastroenterol Hepatol, v. 28, n.1, p. 30-39, 2005.

SILVA, P.C.V.; LEAL, T.V.; DOMINGUES, A.L.C. **Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis.** Rev Soc Bras Med Trop. Rio de Janeiro. v. 46. n.4, p.472-477, 2013.

SOUZA, C.O.S. et al. **CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis.** Frontiers in immunology. v. 9, 2018.

SOUZA, R.P. et al. **Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to Schistosomamansoni Infection.** J. Parasitol. Res., v. 2012, p. 1-10, 2012.

SOUZA, F.P.C. et al. **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural.** Rev bras clin med. São Paulo. v. 9, n.4, p. 300-307, 2011.

TALAAT, R. et al. **Cytokine secretion profile associated with periportal fibrosis in S. mansoni-infected Egyptian patients.** Parasitol Res. Berlin. v. 101, p. 289-299, 2007.

TWEYONFGYERE, et al. **Effect of Maternal Schistosoma mansoni infection praziquantel treatment during pregnancy on Schistosoma mansoni infection and immune responsiveness among offspring at age five years.** PLOS neglect. trop. diseases. v. 7, n.10, 2013.

UTZINGER, J. et al. **Current Progress in the Development and Use of Artemether for Chemoprophylaxis of Major Human Schistosome Parasites.** Curr Med Chem. Schiphol. v.8, p. 1841-1859, 2001.

WANG, W.W.; WANG, L.; LIANG, Y-S. **Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review.** J Parasitol Res. New York. v.111, p. 1871-1877, 2012.

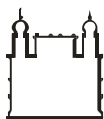
WAYNE. **Bioestadística.** Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Editorial Limusa.1995.

WEERAKOON, K.G.A.D. **Advances in the diagnosis of human schistosomiasis.** Clinical Microbiol rev. 28(4): 939-967. 2015.

WYNN, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest. New Haven. v. 117, n.3, p. 524-529, 2007.

WYNN, T. **Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm.** Nat. Rew., v. 4, p. 583-594, 2004.

ZHANG, J. et al. **Helminth Protein Vaccine Induced Follicular T Helper Cell for Enhancement of Humoral Immunity against Schistosoma japonicum.** BioMed Research International. 2013.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

Eu, _____ declaro que aceito participar do estudo científico: **“ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DE CRITÉRIO DE CURA PÓS TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA”**. Fui informado (a) que esta pesquisa tem como objetivo entender a participação alguns fatores solúveis e células imunológicas e sua relação com a gravidade da esquistossomose. Minha participação nesse estudo não vai me beneficiar diretamente, mas os resultados desta pesquisa poderão contribuir para um melhor acompanhamento no tratamento dos pacientes, além de contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas imunoterapias para os pacientes portadores da doença. Fui informado que a minha participação neste estudo compreenderá exames clínicos e laboratoriais para melhor compreensão da doença. Meus dados coletados serão, registrados, sem expor meu nome ou me identificar garantindo, portanto, meu anonimato. Também fui informado (a) que para dosagem das substâncias que os pesquisadores deste estudo querem analisar, será necessário a coleta de uma amostra de **10 ml** (equivalente a 1 colheres de sopa) **em tubo com EDTA e 5 ml** (equivalente a 1/2 colher de sopa) **tubo seco**, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Os riscos de retirar sangue são dor e formação de hematoma local. Esse material será enviado para o laboratório do CPqAM/FIOCRUZ para a realização dos referidos testes, serão guardados podendo ser utilizados em pesquisas posteriores e eu tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de pressão. Minha participação é voluntária e eu poderei desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem com isso, ter nenhum prejuízo do meu atendimento/ acompanhamento no serviço onde sou atendido (a). Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revistas médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Esse termo de consentimento será feito em duas vias para que uma delas permaneça comigo. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com qualquer uma das pessoas da equipe médica a qualquer momento, pessoalmente ou pelos telefones abaixo:

Dr^a. Clarice N.Lins de Moraes. Fone : (81) 2101-2561Dr^a. Ana Lúcia Coutinho. Fone: (81) 3227-0927

Msc. Anna Lígia de Castro Figueiredo. Fone: (081) 99199-9203

Msc. Ana Virgínia Matos Sá Barreto. Fone: (081) 98811-9716

Recife, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Participante

APÊNDICE B – FICHA DE PACIENTES DE CAMPO

FICHA DE PACIENTES DE CAMPO

Estudo de Marcadores Imunológicos e Moleculares para Morbidade, Diagnóstico e Avaliação de Critério de Cura Pós-Terapêutica em Pacientes com Esquistossomose Mansônica

Nº:

1) Nome do paciente: _____

2) Data de nascimento: _____ 3) Sexo: _____

4) Município de residência: _____

5) Endereço: _____

6) Telefone para contato: _____

7) Histórico Epidemiológico:

Banho em rio, açude, lago, lagoa:	sim ()	não ()
Quando? _____		
Onde? _____		
Cidade de origem: _____		
Já teve esquistossomose antes?	sim ()	não ()
Já tomou praziquantel alguma vez?	sim ()	não ()

8) Exame Parasitológico de fezes:

Kato-Katz: positivo () negativo ()

Quantidade de ovos: _____

Data: _____

9) Tratamento específico com praziquantel 600mg: sim () não ()

Data: _____

11) Hepatite B: sim () não ()

12) Hepatite C: sim () não ()

13) Uso de imunossupressores: sim () não ()

14) Transplante de Fígado: sim () não ()

15) Ingestão de álcool: sim () não ()

16) Doença renal crônica: sim () não ()

17) Data de Retorno: _____

APÊNDICE C – RESULTADOS SUPLEMENTARES

Tabela 1 - Correlações de linfócitos B, Thf e monócitos com citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-6 dos pacientes esquistossomóticos do município de Escada antes, após trinta dias e seis meses de tratamento com Praziquantel

Correlação	Antes		Após 30 dias		Após 6 meses	
	PZQ (ρ)	p	PZQ(ρ)	p	(ρ)	p
Linf.B x IL-2	0.3926*	0,0434	-0.0393	0,4385	-0.0747	0,4037
Linf.B x IFN- γ	0.4013*	0,0397	-0.0268	0,4780	0.3255	0,1374
Linf.B x TNF- α	0.4254*	0,0307	-0.1821	0,2348	0.2152	0,2379
Linf.B x IL-6	0.0090	0,4849	-0.1550	0,2696	0.3691	0,1066
Linf.Thf x IL-2	0.3566*	0,0401	0.3952	0,0523	-0.0912	0,3834
Linf.Thf x IFN- γ	0.0770	0,3571	0.3930	0,0533	-0.3388	0,1278
Linf.Thf x TNF- α	0.1841	0,1892	0.4413*	0,0334	-0.5950	0,0174
Linf.Thf x IL-6	-0.0395	0,4255	-0.0666	0,3964	-0.2669	0,1877
Mon x IL-2	0.2131	0,1532	0.3552	0,0880	-0.1964	0,2587
Mon x IFN- γ	0.2723	0,0939	0.2199	0,2047	-0.0137	0,4837
Mon x TNF- α	0.3901	0,0269	0.3196	0,1128	-0.1983	0,2565
Mon x IL-6	0.1301	0,2677	0.1973	0,2304	-0.6492	0,0094

Nota: ρ = valores de rho da correlação de spearman; * = correlação significativa existente entre as citocinas; PZQ= praziquantel; Linf B= linfócito B; Linf.Tfh= linfócito T helper folicular; Mon= monócito

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Artigo submetido a Immunobiology

Title: Reduction in IL-10 levels in chronic patients with mansonic Schistosomiasis after treatment with Praziquantel: is it a protective factor?

A.L.C. Figueiredo¹, A.V.M. S. Barreto¹, H.V.P.C. Neco¹, R.E. Lima¹, M.P.M. Pontes¹; A.L.C. Domingues²; S.M.L. Montenegro¹ & C.N.L. Morais¹

¹Institute Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil, ²Gastroenterology Outpatients Clinic, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence to:

Clarice N. L. Morais

Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz.

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP: 50670-420.

Email: clarice@cpqam.fiocruz.br

Phone number: +55-81-2101-2561 Fax number: +55-81-3453-1911

Keywords: Schistosomiasis; immunological biomarkers; therapeutic efficacy.

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Disclosures: The authors have no conflict of interests to declare.

ABSTRACT

Introduction and objective: Schistosomiasis is a neglected disease that has a major socioeconomic impact in underdeveloped countries, affecting the health and

productivity of more than 250 million infected individuals. Combined with socioeconomic challenges, which further aggravate the disease problem, the parasitological and immunological diagnosis currently shows low accuracy, being identified through clinical, epidemiological and laboratory associations. Therefore, it is important to develop more effective tools for the diagnosis, prevention and control of the disease. In addition, the cellular immune response against *S. mansoni* antigens is not yet fully understood. Given the above, the main objective of the article was to enable the generation of knowledge and identification of immunological biomarkers (cellular immune response) for diagnosis, morbidity and specific post-therapy cure criteria with praziquantel.

Method: The study design was a cohort type (observational follow-up, with intervention) with comparison before and after treatment with praziquantel. Twenty-five individuals were selected, in the municipality of Escada, according to their epidemiological history. The individuals had blood samples collected at three times: at the first moment before undergoing treatment with praziquantel, one month and six months after this treatment. The tube containing the blood was centrifuged at 1500rpm (200xg) for 15 minutes, at room temperature, to obtain the serum. The supernatant was aliquoted and stored at -20°C until use.

Results: We identified an increase in IL-2, IL-4 and IL-6, and a decrease in IL-10 after treatment with praziquantel. Correlations between the cytokines of the Th1 and Th2 profile were identified.

Conclusion: The results suggest that, after treatment with praziquantel, the reduction in IL-10 levels may be beneficial for individuals with schistosomiasis mansoni, avoiding blockage in the protection against possible reinfection.

INTRODUCTION

Schistosomiasis remains a serious public health problem, being considered a worldwide chronic parasitosis, with high rates of morbidity and mortality (1). Currently, it is estimated that more than 250 million people are infected and 800 thousand are at risk of becoming infected (2, 3, 4). It is classified as one of the 17 neglected tropical diseases because it affects, in the great majority, low-income

populations, having important effects on health, besides leading to social discrimination (2).

In Brazil, it is caused by *Schistosoma mansoni* and is considered endemic in 8 Brazilian federative units, reaching the states from Maranhão to Minas Gerais (5).

The typical lesion of inflammation caused by *S. mansoni* results in a granulomatous reaction around the eggs that are deposited in the intrahepatic portal venous system (6). The formation of these granulomas is initially beneficial, however, due to immunomodulation, it can lead to disease progression, leading to the development of fibrosis in the periportal space, due to an excessive production of extracellular matrix proteins (7, 8). The formation of granuloma and the development of hepatic fibrosis are the main causes of morbidity and mortality associated with schistosomiasis (7, 8).

Both the processes of granuloma formation and fibrosis are mediated by CD4+ T lymphocytes and knowing the mechanisms of cell differentiation of these cells has been the subject of much of the current studies. This is important for understanding the bases that make an immune response beneficial or not to the host in response to pathogens. (9).

Currently, research is focused on understanding the mechanisms involved in the interaction between the formation of these granulomas and liver fibrosis, with the immune response that is directed in these processes (10).

The initial cellular immune response, originating from CD4+ lymphocytes against *Schistosoma mansoni* infection, is of the Th1 type, marked by the production of pro-inflammatory cytokines such as: IFN- γ , TNF- α and IL-1. As the disease progresses, the infection becomes chronic and we find high levels of Th2 cytokines: IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 (11). Studies have revealed that cytokines of the Th2 profile (mainly IL-4 and IL-13) are involved in the progression of the disease, while Th1 cytokines are related to decreased fibrotic process (12, 13, 10). Treatment with praziquantel (PZQ), in addition to reducing prevalence and intensity of infection, can accelerate the development of a protective immune response, increasing resistance to reinfection as well as decreasing parasitic burden (14).

Therefore, due to the importance of *Schistosoma mansoni* infection, especially in areas where it is considered endemic, the aim of our article is to assess, before and after treatment with praziquantel, the levels of Th1 and Th2 profile cytokines in patients with different patterns of hepatic fibrosis and correlate these levels with each other. This can contribute to a greater understanding of the immunological mechanisms involved in the progression of the disease, and consequently, contribute to an improvement in therapeutic monitoring of patients.

MATERIALS AND METHODS

Study design and population

The study design was a cohort type (observational follow-up, with intervention) with comparison before and after treatment with praziquantel. Twenty-five individuals were selected, in the municipality of Escada, according to their epidemiological history.

The individuals had blood samples collected (5 ml in a tube without anticoagulant) in three moments: in the first moment before undergoing treatment with praziquantel, one month and six months after this treatment. The tube containing the blood was centrifuged at 1500rpm (200xg) for 15 minutes, at room temperature, to obtain the serum. The supernatant was aliquoted and stored at -20°C until use. The material was processed in the Laboratory of the Virology Department of the Aggeu Magalhães Institute (IAM) - FIOCRUZ / PE.

Those with a history of alcohol abuse (over 40g per week in females and 60g in males), and/or who had liver steatosis or other liver diseases on ultrasound of the abdomen, in addition to HIV and Hepatitis B or C were excluded (15).

All individuals who agreed to participate in the study signed the informed consent form and the study was sent to the Research Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (IAM-FIOCRUZ/PE), being approved (CAAE: 50950615.9.0000.5190).

Detection of Th1 / Th2 cytokines by Cytometric Bead Array using flow cytometer

The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α were quantified in the serum of selected patients, using flow cytometry (CBA-Cytometric Bead Array), with the BD kit Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, following the manufacturer's instructions, on the BD FACSAria III cytometer. This cytometer is an analog analyzer equipped with two lasers with the ability to standard multicolor analysis (up to 4 colors). The main laser is read at a wavelength of 488nm, while the secondary laser is read at 635nm. The CBA kit (BD) was used to quantify the cytokines IL-2, IFN- γ and TNF- α (Th1), IL-4, IL-6 and IL-10 (Th2) in the same sample. Seven populations of beads with different fluorescence intensities were conjugated with a specific capture antibody for each cytokine, mixed to form the CBA and read in the FL4 channel of the flow cytometer. The populations of each bead were visualized according to their respective fluorescence intensities. In the CBA, the cytokine capture beads are mixed with the detection antibody conjugated to the fluorochrome PE and then incubated with the samples to form the assay. The tubes were prepared using 25 μ l of the sample, 30 μ l of the mixture of beads and 25 μ l of the detection antibody (Human Th1/Th2-II PE Detection Reagent). The same procedure was used to obtain the standard curve (which contained 10 tubes, including the sample-free or standard tube, called white). The tubes were then homogenized and incubated for 3 hours, at room temperature, in the dark. After this step, 0.5 ml of Wash Buffer was added to each tube and all were centrifuged for 5 minutes at 200g. The supernatants from each tube were then discarded and 300 μ l of Wash Buffer was added to resuspend the "pellet bead" of each tube. And the results were obtained through graphs and tables using the FCAP software.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism version 5, considering a value of $p < 0.05$ as statistically significant. A descriptive analysis was carried out to expose the results obtained in the cytokine measurements. The presentation of the measured variables was done through graphs and tables.

Data on cytokine levels were tested for normality using the D-Agostino test. The assumption of normality was not observed and, therefore, the tests used were Mann-Whitney and Kruskal-Wallis.

To correlate the levels of cytokines with each other, the Spearman test was used and is used for the analysis of non-parametric data (16).

RESULTS

Evaluation of Th1 and Th2 cytokine levels in schistosomal patients before, after thirty days and six months of treatment with praziquantel

Cytokines of the Th1 profile (IL-2, IFN- γ and TNF- α)

The levels of IL-2, IFN- γ and TNF- α were analyzed in patients before and after 30 days and 6 months of treatment with PZQ. An increase in IL-2 levels was observed after 6 months of treatment, when the three collection times were compared ($p = 0.0074$) (figure 1). We also identified an increase in this cytokine when comparing levels before and after 6 months of treatment ($p = 0.0091$) and between 30 days of treatment and six months ($p = 0.0014$).

There was no statistically significant difference, before and after treatment with PZQ, in the levels of IFN- γ ($p = 0.4535$) and TNF- α ($p = 0.5525$).

Cytokines of the Th2 profile (IL-4, IL-6 and IL-10)

Regarding the levels of IL-4 produced before and after treatment, an increase in this cytokine was observed after 6 months of having received the PZQ ($p = 0.0404$) when we compared the three collection moments (figure 1). We also found significant statistical value when comparing IL-4 levels after 30 days and 6 months of collection ($p = 0.0080$).

The difference between the levels of IL-6 produced before and after treatment was not statistically significant when we compared the three collection times ($p = 0.0709$) (figure 1). However, when comparing the levels of this cytokine 30 days and 6 months after PZQ, we found a statistically significant difference ($p = 0.0152$).

Regarding the production of IL-10, we can observe, in figure 2, high levels of this cytokine before treatment, when comparing the levels before and after treatment with PZQ (comparison of the three collection moments), with $p = 0.0273$. In addition, when comparing the levels of this cytokine before and after 6 months of PZQ, we also found a statistically significant difference ($p = 0.0085$).

Correlation between Th1 and Th2 cytokine production in schistosomal patients before, after thirty days and six months of treatment with praziquantel

Table 1 shows the correlations between cytokines produced before and after 30 days and 6 months of treatment with praziquantel. The results point to significant positive correlations between the evaluated cytokines.

Before treatment with praziquantel, we highlighted the strong positive correlations between IFN- γ x TNF- α (0.8306), IFN- γ and IL-2 (0.8050) between TNF- α x IL-2 (0.9000). After 30 days of treatment with PZQ, we can highlight the positive correlations between TNF- α x IL-2 (0.9419) and between IL-2 and IL-10 (0.7103).

When analyzing the correlations after 6 months of treatment, we found high values between IFN- γ and TNF- α (0.9195), IFN- γ and IL-2 (0.9128), IFN- γ and IL-4 (0.9369), TNF- α and IL-2 (0.9736), TNF- α and IL-10 (0.9760), IL-2 and IL-4 (0.9677), IL-2 and IL-10 (0.9653) and IL-4 and IL-10 (0.9717).

DISCUSSION

The cellular immune response to *Schistosoma mansoni* has been widely studied. Initially it is of the Th1 type, marked by the production of pro-inflammatory cytokines such as: IFN- γ , TNF- α and IL-2. With the changes that occur in the extracellular matrix, the disease progresses becoming chronic, due to the appearance of periportal fibrosis, and an immunomodulation occurs where we find high levels of Th2 cytokines: IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 (11). Balance between Th1 and Th2 responses is important for reducing the morbidity associated with schistosomiasis (17).

Treatment with praziquantel alters the specific immune response against *S. mansoni*, promoting greater resistance to infection. The effect of this treatment is dependent on the parasite's life stage and the cellular phenotype with which it is

associated. The immune responses Th1, Th2 and Th17 regulate each other during parasitic infection and the interaction between them can influence this resistance (18). This mixed response that develops before and after treatment with PZQ was presented through the strong positive correlations that we find between the cytokines of the Th1 and Th2 profiles.

After treatment with PZQ, we identified an increase in IL-2 and this increase in the pro-inflammatory response is the most observed, suggesting an increase in resistance to infection (18). A wide spectrum of cytokines allows a greater understanding of how the immune response changes as a result of treatment with praziquantel and how they can interact during infection (18). Antigens released by the parasite provide a stimulus to induce a Th1 immune response to the parasite and this can be accelerated by treatment with praziquantel (14).

Protection against reinfection, after treatment, is being associated with an immune response of the Th2 profile, with elevation mainly of IL-4 and IL-5. In IL-4 deficient mice, there was a greater production of IFN- γ and TNF- α , which led to the development of a serious and fatal disease (19). In our results, we did not find significant differences for elevation of IFN- γ and TNF- α , after treatment with praziquantel (and control of the parasitic load) and this may be due to the fact that IL-4 is elevated.

The interaction between the Th1 and Th2 responses results in a mixed response to infection and after treatment (18). We identified strong positive correlations between cytokines of different cell profiles. Furthermore, IL-4 and IL-13 may be acting together, at high levels, in the suppression of some Th1 cytokines (20), which could also justify the absence of statistically significant differences in the levels of IFN- γ , TNF- α before and after treatment.

Although protection against reinfection is related to the Th2 profile, studies show that elevation of IL-10 after treatment is not beneficial. IL-10 is related to the development of immune regulation after chronic helminth infection. It has a well-characterized role in limiting hepatic pathology and in mediating resistance to the chronic stage of schistosomal disease, where released eggs act as a major stimulus. The role of IL-10 in the maintenance of immune homeostasis and in the resolution of inflammation is fundamental for the survival and function of the host and this is well

studied in the pathogenesis of chronic schistosomiasis (21). However, elevation of this post-treatment cytokine can block protection against possible reinfection (14). Martins-Leite et al (2008) identified low levels of IL-10 after PZQ and this is in line with our results, where we also identified a decrease in IL-10 levels after treatment.

The main benefits of treatment with praziquantel are related to decreased morbidity and disease progression (14), and this is currently the most accepted method for identifying disease control. In addition, there is evidence that the treatment has an effect on the individual's immune response, protecting against *Schistosoma* infection, and is not just a transient protection (22).

However, the understanding of immunoregulation after the use of praziquantel is not fully understood, and it is necessary to assess the potential for resistance to future reinfections (14). To better understand the modulation of the immune response after treatment with praziquantel, studies involving a greater number of individuals infected with *Schistosoma mansoni* are necessary (17).

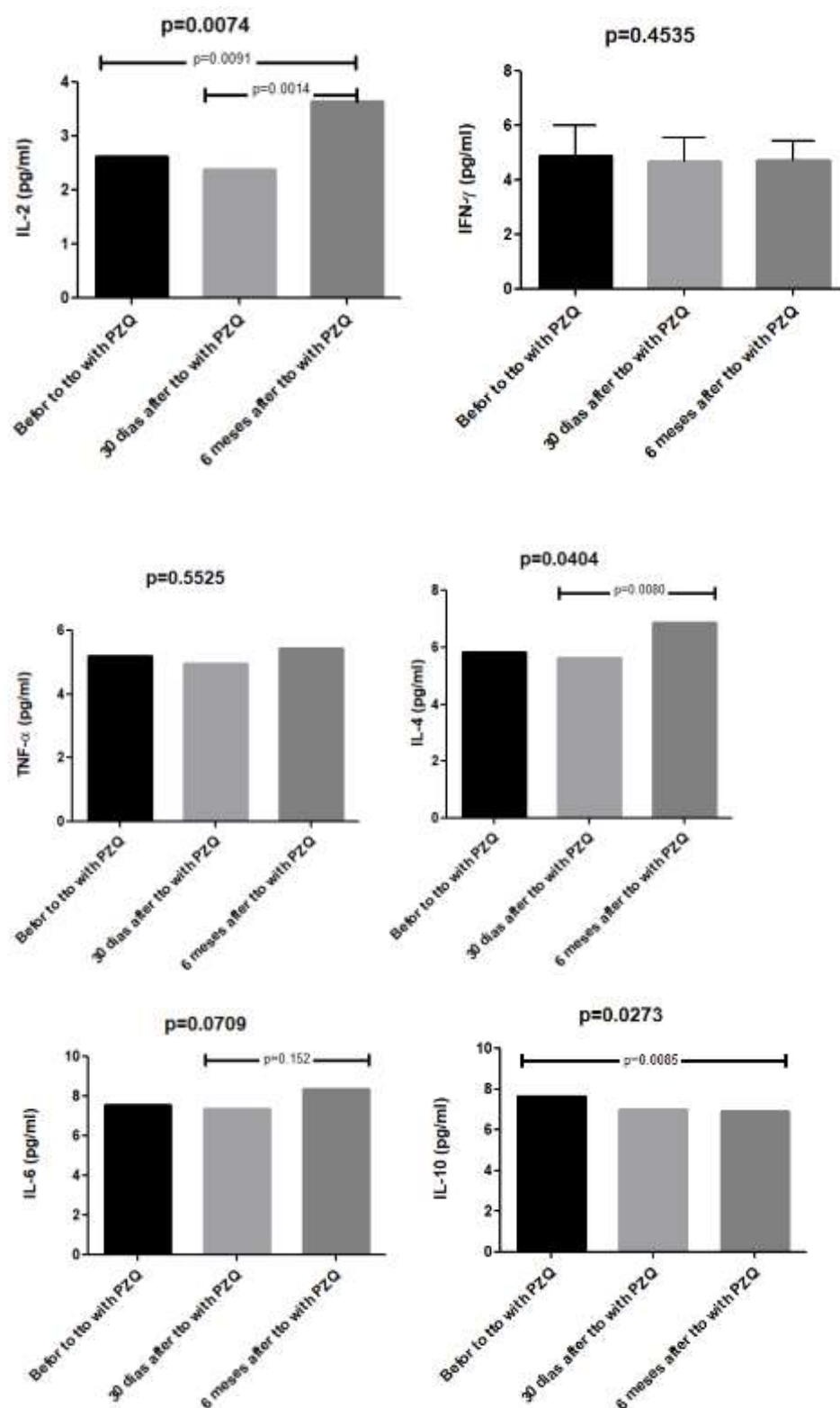
REFERENCES

1. CHEN, D. et al. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunol.*, 2013, v. 139, p. 523-532.
2. PANIC, G.; RUF, M-T.; KEISER, J. Immunohistochemical Investigations of Treatment with Ro 13-3978, Praziquantel, Oxamniquine, and Mefloquine in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, v.61, n.12.
3. KNOWLES, S.C.L. et al. Epidemiological interactions between urogenital and intestinal human schistosomiasis in the context of praziquantel treatment across three west african countries. *Plos Neglet Trop Dis*. 2015
4. ELBAZ, T; ESMAT.G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J of Adv Research*. 2013, v. 4, p. 445–452.
5. NETO O.B.L. et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 20123, Rio de Janeiro. v. 29, n. 2.
6. BRANDT, C.T. et al. Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. *Rev col bras cir*. 2010, Rio de Janeiro. v. 10, n. 5, p. 333-337.

7. FAIRFAX, K.C. et al. IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansonii Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. PLOS Pathogens. 2012, v. 8, n. 8.
8. MORAIS, C.N.L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansonii. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2008, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 561-568.
9. MOSMANN TR et al. Differentiation and functions of T cell subsets. Ciba Found Symp. Amsterdam. 1997, v. 204, p. 148-154.
10. MENTINK-KANE, M.M. et al. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R₂. Gastroenterology., 2011, v. 141, p. 2200–2209.
11. KUMAR, R. et al. The Causal Role of IL-4 and IL-13 in *Schistosoma mansonii* Pulmonary Hypertension. Americ. jour. of resp. and critic. care med. 2015, v.192, n.8.
12. FALLON, P.G et al. Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with cronic *Schistosoma mansonii* infections. Infect immun. 2000, Washington. v. 68, n. 10, p. 6005-6011.
13. WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm. Nat. Rew., 2004, v. 4, p. 583-594.
14. NDOMBI, E.M. et al. Effect of four rounds of annual school-wide mass praziquantel treatment for schistosoma mansonii control on schistosomespecific immune responses. Parasite Immunology. 2018, v.40.
15. ANGULO, P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J. Med. Boston. v. 346, p. 1221-1231, 2002.
16. WAYNE. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Editorial Limusa. 1995.
17. TWEYONFGYERE, et al. Effect of Maternal *Schistosoma mansonii* infection praziquantel treatment during pregnancy on *Schistosoma mansonii* infection and immune responsiveness among offspring at age five years. PLOS neglect. trop. diseases. 2013, v. 7, n.10.
18. BOURKE, C.D. et al. Integrated Analysis of Innate, Th1, Th2, Th17, and Regulatory Cytokines Identifies Changes in Immune Polarisation Following Treatment of Human Schistosomiasis. The Journ. of infect. diseases. 2013, v. 208, 159-69.
19. SOUSA, C.O.S. et al. CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis. Frontiers in immunology. 2018, v. 9.

20. CHIARAMONTE, M.G. et al. IL-13 Is a Key Regulatory Cytokine for Th2 Cell-Mediated Pulmonary Granuloma Formation and IgE Responses Induced by *Schistosoma mansoni* Eggs. *J Immunol. Bethesda*. 1999, v. 162, p. 920-930.
21. SANIN, D.E. et al. Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4⁺ TCells That Are Functionally Suppressive. *PLOS Pathogens*. 2015, v.14, p. 1-23.
22. MARTINS-LEITE, P. et al. Effect of Chemotherapy with Praziquantel on the Production of Cytokines and Morbidity Associated with Schistosomiasis *Mansoni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, v.52, p. 2780–2786.

Figure 1 Levels of Th1 and Th2 cytokines in schistosomal patients in the municipality of Escada before and after 30 days and 6 months of treatment with Praziquantel



Source: Elaborated by the author.

Table 1- Correlations of Th1 / Th2 cytokines of schistosomal patients in the municipality of Escada before, after thirty days and six months of treatment with Praziquantel

Correlation	Befor PZQ (ρ) p		After 30 days PZQ(ρ) p		After 6 months (ρ) p	
IFN- γ x TNF- α	0.8306*	<0.0001	0.5536	0.0050	0.9195*	<0.0001
IFN- γ x IL-2	0.8050*	<0.0001	0.5793	0.0030	0.9128*	<0.0001
IFN- γ x IL-4	0.4252*	0.0341	0.2605	0.2190	0.9369*	<0.0001
IFN- γ x IL-6	0.1304	0.5344	0.1759	0.4110	0.0808	0.7836
IFN- γ x IL-10	0.3026	0.1415	0.2826	0.1809	0.8854*	<0.0001
TNF- α x IL-2	0.9000*	<0.0001	0.9419*	<0.0001	0.9736*	<0.0001
TNF- α x IL-4	0.3789	0.0618	0.4860*	0.0160	0.9771*	<0.0001
TNF- α x IL-6	0.0541	0.7972	0.0952	0.6581	0.1173	0.6897
TNF- α x IL-10	0.3181	0.1213	0.6560*	0.0005	0.9760*	<0.0001
IL-2 x IL-4	0.4343*	0.0301	0.5816*	0.0029	0.9677*	<0.0001
IL-2 x IL-6	0.0144	0.9452	0.0829	0.7000	0.1910	0.5130
IL-2 x IL-10	0.2451	0.2377	0.7103*	0.0001	0.9653*	<0.0001
IL-4 x IL-6	-0.0446	0.8323	-0.0774	0.7191	0.1156	0.6940
IL-4 x IL-10	0.1367	0.5148	0.4414*	0.0308	0.9717*	<0.0001
IL-6 x IL-10	0.0018	0.9930	0.0214	0.9207	0.1693	0.5630

Source: Elaborated by the author

Note: ρ = rho values of the spearman correlation; * = significant correlation between cytokines; PZQ = praziquantel.

APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Artigo submetido a *Parasite immunology*

Title: Evaluation of the cellular immune response of monocytes, B lymphocytes and follicular T helper lymphocytes and their interactions with Th2 profile cytokines in chronic schistosomal patients before and after treatment with praziquantel

A.L.C. Figueiredo¹, A.V.M. S. Barreto¹, H.V.P.C. Neco¹, R.E. Lima¹, M.P.M. Pontes¹; A.L.C. Domingues²; S.M.L. Montenegro¹ & C.N.L. Morais¹

¹Institute Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil, ²Gastroenterology Outpatients Clinic, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence to:

Clarice N. L. Morais

Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz.

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP: 50670-420.

Email: clarice@cpqam.fiocruz.br

Phone number: +55-81-2101-2561 Fax number: +55-81-3453-1911

Keywords: Schistosomiasis; immunological biomarkers; therapeutic efficacy.

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Disclosures: The authors have no conflict of interests to declare.

ABSTRACT

Introduction: Schistosomiasis is a neglected helminthic disease caused by worms of the genus *Schistosoma* spp. Contact with *Schistosoma* (*S.*) *mansoni* infection causes a chronic parasitic disease that progresses to severe liver and gastrointestinal damage and, eventually, can result in the individual's death. This progression is developed due to immunopathological reactions against *S. mansoni* eggs that are deposited by females of the parasite. However, this cellular and humoral immune response is not yet fully understood. Thus, through ultrasound examination and blood collection with subsequent cell marking and quantification, the study aimed to contribute to a better understanding of the immunopathology of inflammation and infection. Potential biomarkers, together, can be applied in clinical and laboratory practice in integrated actions for the control of schistosomiasis in endemic areas, which may result in the identification of markers for therapeutic success.

Methods: Twenty-five patients from the municipality of Escada were selected voluntarily and after signing an informed consent form. The study was a cohort type with observational follow-up, comparing before and after treatment with praziquantel. 15 ml of blood were collected from each patient to obtain the serum and subsequent cell quantification. US was performed before and after six months of treatment in order to assess the Niamey periportal fibrosis classification.

Results: We identified an increase in the levels of monocytes and a decrease in the levels of B lymphocytes. The levels of follicular T helper lymphocytes increase after treatment, however, over the months, it decreases. Correlations between cell profiles and cytokines IL-4 and IL-10 were identified.

Conclusion: This decrease in Thf (found in our study), as well as that of B lymphocytes, could be related to the absence of active infection, indicating a parasitological cure of the disease.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease that affects more than 250 million individuals worldwide (1). It has a wide geographical distribution, being found in Africa, South America and the Caribbean (2).

The hepatic pathology of *S. mansoni* infection results from an immune response in response to the parasite's eggs that are trapped in the periportal portal space. Granuloma forms around the eggs, deposited by the female parasite, acting as a protective barrier to prevent antigenic dispersion. The granuloma formation process is mediated by CD4⁺ T cells and several articles have demonstrated the role of the cellular immune response and cytokines that would be controlling the development of disease progression (2).

However, with the increasing accumulation of eggs, the inflammatory process becomes intense and progresses to periportal fibrosis (1). A major problem of infection caused by *S. mansoni* is the development of this periportal fibrosis, predominantly caused by the host's immune response to the parasite's antigens (3).

Schistosomiasis remains a serious public health problem and demonstrating the immunological mechanisms used by the host to suppress chronic inflammation has been an area of great importance and growth in research, as elucidating this heterogeneity of immunomodulation can help to prevent progression to form more severe and consequent death of the patient with schistosomal disease (3,4).

Studies show that Th1 cytokines are involved with decreased fibrotic process, while Th2 profile cytokines (mainly IL-4 and IL-13) are related to disease progression (5, 6, 7). Treatment with praziquantel (PZQ) is effective in reducing the prevalence of the disease and the intensity of infection, as well as contributing to a faster protective

immune response, increasing resistance to reinfection as well as decreasing parasitic burden (8).

The heterogeneity of the host's immune response to infection is already well documented in some parasitic diseases, especially leishmaniasis, but in relation to schistosomiasis, it still needs to be clarified (9). In summary, it is known that different patterns of immune response are associated with the different clinical forms and morbidity of schistosomal disease (9, 10, 11). However, despite extensive research efforts, the assessment of the adaptive immune response in *S. mansoni* infection is complex and in contrast to the knowledge of the role of cytokines in the formation of granulomas and its association with disease severity, the participation of the interaction of the the response of B lymphocytes (and the production of immunoglobulins), follicular T helper lymphocytes (Thf) and monocytes against *Schistosoma* infection and on the progression of the disease is not yet fully understood (12).

In Pernambuco, schistosomiasis is endemic and due to the importance of the disease in the state and in the northeastern region, the elucidation and understanding of the immune mechanisms that control the process of liver fibrogenesis in humans are of great relevance for this disease and all others where fibrogenesis process is the main cause of morbidity and mortality (13).

Therefore, the objective of this work was to evaluate the interactions of innate immune responses, through the monocyte profile; and cell adaptive, evaluating the phenotypic profile of follicular CD4 + helper T cells, B cells. In addition, we identified levels of Th2 profile cytokines (IL-4 and IL-10) in patients before, 30 days and 6 months after therapy with praziquantel (and correlated with the cell profiles studied) that can be used as a criterion for post-therapeutic parasitological cure of the

disease, which may result in the identification of markers for therapeutic success and infection control.

METHODS

Study design

Twenty-five patients from the municipality of Escada were selected voluntarily and after signing an informed consent form. The study was a cohort type with observational follow-up, comparing before and after treatment with praziquantel.

Criteria related to epidemiological, parasitological history of feces and abdominal ultrasonography (US) were evaluated. The study did not include patients who had a history of alcohol abuse and who had some liver disease at US, in addition to HIV and / or Hepatitis B or C (14).

US was performed before and after six months of treatment to assess the classification of Niamey periportal fibrosis. According to the US, they had confirmation of the presence or absence of periportal fibrosis through the Niamey classification. This classification divides periportal fibrosis into six patterns: A - absence of fibrosis; B - doubtful (starry pattern); C - peripheral; D - central; E - advanced; F - very advanced (figure 1). US was performed before and after 6 months of treatment with PZQ.

Parasitological examination was performed in the three moments of collection to confirm the presence (before treatment) and absence (after treatment with praziquantel) of eggs in feces. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (IAM - FIOCRUZ / PE) (CAAE: 50950615.9.0000.5190).

Blood collection and serum collection

The patients had approximately 15 ml of blood collected, 10 ml in a tube with EDTA and 5 ml in a tube without anticoagulant. The collections were carried out in three moments: before treatment with praziquantel, after 30 days and after 6 months of treatment. Ten ml of blood were used to quantify B lymphocytes, follicular T lymphocytes and monocytes using flow cytometry. Five mL of blood was centrifuged, at 200xg for 15 minutes at room temperature, to obtain the serum, and the supernatant was aliquoted and stored at -20°C until use. The material was processed at the Virology Department Laboratory of the Aggeu Magalhães Institute (IAM) - FIOCRUZ / PE.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

The blood collected in the EDTA tube was mixed, in a Falcon tube, with Ficoll-Hypaque, in a 1: 2 ratio. Then it was centrifuged at 400xg for 30 minutes. We obtained four phases that could be identified in the tube: plasma, PBMC ring, Ficoll-Hypaque and the hematic sediment. With the aid of a transfer pipette, the PBMCs ring was removed and placed in another Falcon tube for washing the cells with PBS (pH 7.2) and centrifugation. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in RPMI 1640 medium with fetal bovine serum and the cells were counted for analysis of cell viability by counting mononuclear cells by the Neubauer chamber, using Trypan blue.

Flow cytometry for the determination of monocytes, Thf and B lymphocytes

PBMC samples (after analyzing cell viability by counting mononuclear cells by the Neubauer chamber, using trypan blue) were thawed in a water bath and placed, with transfer pipette, in 15ml Falcon tubes containing 10ml of RPMI with fetal bovine serum. They were then centrifuged at 1500rpm (200xg) for 10 minutes at room

temperature. After discarding the supernatant, the pellet was resuspended in RPMI medium with serum and FITO was added. Falcon tubes for each sample were left “overnight” in a 37°C greenhouse with CO₂. The next day, 2 µl of Golgi Stop was placed and the tubes were placed again in the same greenhouse for 4 hours. After that, we add 220µl of EDTA, PBS-Wash until the 10ml mark of the tube and centrifuge for 200xg for 10 minutes and at room temperature. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 1 ml of PBS-Wash. We add the surface antibodies, incubate for 30 minutes and add 1ml of PBS-Wash. Then, we centrifuged for 200xg, for 10 minutes and at room temperature and the supernatant was discarded. We fixed with 100µl of Cytofix (BD Systems) for 150 minutes incubation at 4°C in the dark and after that, 1ml of PBS-Wash will be added for washing. We centrifuged again for 200xg, for 10 minutes at room temperature, discarded the supernatant and added 300µl of PBS-Wash for later reading in BD Systems' FACSCalibur cytometer. The specific markings that were performed: CXCR5-AlexaFluor®488 - 2.5 µl, CD4-APC - 2.5 µl, PD-1-PeCy7 - 5 µl (follicular T lymphocyte), CD20-PE - 5 µl, CD19-PE-Cy[™] 7 - 2.5µl (lymphocyte B) and CD14-APC - 2.5µl, CD16-AlexaFluor®488 - 5µl (monocytes).

Detection of Th2 cytokines by Cytometric Bead Array using flow cytometer

The cytokines IL-4, and IL-10 were quantified in the serum of the selected patients, using flow cytometry (CBA- Cytometric Bead Array), with the BD Cytometric Bead Array Human Th1 / Th2 Cytokine Kit II kit, following the instructions of the manufacturer, on the BD FACSARIA III cytometer. This cytometer is an analog analyzer equipped with two lasers with the ability to standard multicolor analysis (up to 4 colors). The main laser is read at a wavelength of 488nm, while the secondary laser is read at 635nm. The CBA kit (BD) was used to quantify the cytokines IL-2,

IFN- γ and TNF- α (Th1), IL-4, IL-6 and IL-10 (Th2) and in the same sample. Seven populations of beads with different fluorescence intensities were conjugated with a specific capture antibody for each cytokine, mixed to form the CBA and read in the FL4 channel of the flow cytometer. The populations of each “bead” were visualized according to their respective fluorescence intensities. In the CBA, the cytokine capture beads are mixed with the detection antibody conjugated to the fluorochrome PE and then incubated with the samples to form the assay. The tubes were prepared using 25 μ l of the sample, 30 μ l of the beads mixture and 25 μ l of the detection antibody (Human Th1 / Th2 - II PE Detection Reagent). The same procedure was used to obtain the standard curve (which contained 10 tubes, including the sample-free or standard tube, called white). The tubes were then homogenized and incubated for 3 hours, at room temperature, in the dark. After this step, 0.5 ml of Wash Buffer was added to each tube and all were centrifuged for 5 minutes at 200g. The supernatants from each tube were then discarded and 300 μ l of Wash Buffer was added to resuspend the pellet “bead” bead of each tube. And the results were obtained through graphs and tables using the FCAP software.

Statistical analysis

GraphPad Prism, version 5, was used for the statistical analysis of the data, considering $p < 0.05$ as a statistically significant value. A descriptive analysis was carried out to expose the results obtained in the measurements of B cells, monocytes and Th1 lymphocytes and cytokines. The presentation of the measured variables was done through graphs and tables, also including the use of some descriptive measures as median.

Data on B lymphocyte, Th follicular and monocyte levels were tested for normality using the D-Agostino test. When the assumption of normality was

observed, we used the ANOVA test and when not, the tests used were Mann-Whitney and Kruskal-Wallis. We also used the Tukey test for multiple comparisons

Spearman's test was used to correlate cell levels with cytokine levels. The Spearman rank correlation coefficient is named after the Greek letter ρ (rho) and is used for the analysis of non-parametric data (15).

RESULTS

Socio-demographic, epidemiological and parasitological characteristics

The demographic and epidemiological characterization of patients is shown in Table 1. Twenty-five patients, living in the municipality of Escada-Pernambuco, were included in the study, the majority (56%) being male. As for age, it was observed that the median of 29 years, ranging from 18 to 65 years, characterizing a young population. Regarding the amount of eggs in the feces, the median found was 6 eggs per gram/feces, before treatment with PZQ. After treatment, 30 days and 6 months, the eggs were no longer identified. When classifying these individuals according to age group, we found a higher percentage of them between 18-39 (80%). Most individuals had contact with contaminated river waters in the municipality of origin (84%).

Abdominal ultrasound was performed before treatment with PZQ and after six months of treatment to identify the pattern of periportal fibrosis (Table 2). Before treatment, the predominant pattern of fibrosis was D (central fibrosis) representing 32% of the individuals included in the study (table 2). After six months of treatment, the most common fibrosis pattern was C (52%).

Evaluation of B, Thf and monocyte lymphocyte levels in chronic schistosomal patients, before and after treatment with praziquantel

B lymphocytes

B lymphocyte levels were analyzed before and after 30 days and 6 months of treatment. We identified a decrease in these levels before and after 6 months of treatment, with a statistically significant p of 0.0414 (figure 2).

Follicular helper T lymphocytes

The difference between the levels of Thf lymphocytes was statistically significant when we compared the three groups with each other, when we compared before the PZQ with 30 days of treatment and when we compare the collection times after treatment. In all cases, the p-value was <0.001 . The levels of this cell profile increase after 30 days of treatment and decrease considerably after 6 months (figure 3).

Monocytes

Regarding monocyte levels, we identified an increase in this cell when we compared the three collection moments with each other, with $p = 0.0031$. When evaluating before treatment with PZQ, comparing with 30 days of treatment ($p = 0.0170$) and with 6 months of treatment ($p = 0.0064$), we also found a difference, indicating an increase in this cell profile (figure 4).

We also performed a paired analysis of the levels of the studied cell profiles. We found a statistically significant difference only in monocytes. The analysis comparing the three moments of collection obtained a value of $p = 0.0171$. Before and after treatment (after 30 days, $p = 0.0098$; after 6 months, $p = 0.0128$) was also significant, indicating an increase in the levels of this cell.

Correlation between the production of Th2 profile cytokines and B, Thf lymphocytes and monocytes in schistosomal patients before, after thirty days and six months of treatment with praziquantel

Table 3 shows the correlations between B, Thf lymphocytes and monocytes with the cytokines IL-4 and IL-10. We found statistically significant positive correlations between B and IL-4 lymphocytes (before treatment with PZQ; $\rho = 0.3910$), Thf and IL-10 lymphocytes (after 30 days of treatment; $\rho = 0.4234$) and between monocytes and IL-10 (after 30 days of treatment; $\rho = 0.4568$).

DISCUSSION

The formation of granuloma and the consequent development of periportal fibrosis, in schistosomiasis mansoni, can be related to several factors, which stand out: age, parasitic load and sex, in addition to immunological and genetic factors (16).

In our study, we identified a higher percentage of young and male individuals. This corroborates the findings of Gomes et al (2016), who also identified this prevalence. This can be explained due to the low demand for health services and preventive actions, which often occur at times when they are at their workplace (17). New health strategies are necessary to reach this male population, in addition to improvements in the population's quality of life, with better conditions for basic sanitation and education (17, 18).

Although not statistically significant, our results point to a decrease in the pattern of fibrosis in patients who had advanced and central fibrosis before treatment. These data corroborate the findings of Nessim and Demerdash (2010), which indicated more effective action of praziquantel in more intensely infected patients. The drug, in these patients, was able to reduce hepatic granuloma (19). The effect of

praziquantel is also related to a decrease in the pattern of fibrosis. Fibrosis resulting from infection by the parasite is irreversible, however, regressions in the patterns of periportal fibrosis are being found after treatment (2,16). Therefore, a study with a larger number of patients is necessary to better understand this relationship.

In addition to demographic and parasitological characteristics, the immune response has been the subject of many studies. During the acute phase of schistosomal mansonic infection, cells of the innate immune system are activated to produce predominantly TNF- α , IL-2 and IL-6 (20, 21). A major problem caused by *S. mansoni* is the development of periportal fibrosis (due to the formation of granulomas), which leads to a chronicity of the infection, predominantly caused by the host's immune response to the parasite's antigens (1). After females release eggs, which pass through the bloodstream and become trapped in the periportal space, the cytokine profile changes completely. Approximately 50% of the eggs are transported to the liver, where they are trapped and stimulate the production of cytokines of the Th2 profile (4).

The chronic phase is characterized by high levels of IL-4, IL-13 and IL-10, resulting in a dominant cellular immune response in this profile (20, 21). This immune response triggers the formation of granulomas around the trapped eggs and drives the formation of fibrosis in ulcerative colitis and chronic helminth infections. In all these cases, there is an accumulation of macrophages derived from activated monocytes, which have changed phenotypically due to disease progression (22). The generation of the Th1 response, in the chronic phase, is associated with immune protection for *Schistosoma mansoni*. It is believed that cytokines of the Th1 profile are involved in a process of stimulation of macrophages for the production of nitric oxide that mediates schistosomule death (13).

Studies have shown that macrophages interfere with the Th2 response (in the recruitment and activation of this cell profile), reducing inflammation and the fibrotic process involved in the disease (22). The high Th2 response and related liver inflammation usually decrease during infection, however, in the untreated individual, this modulatory process can fail and lead to the development of the hepatosplenic form, related to excessive liver fibrosis, in addition to splenic involvement and portal hypertension (4). The balance between cytokines during onset and later stages of disease progression can determine the individual's clinical outcome (20).

CD14⁺/CD16⁺ monocytes are able to bind to products excreted / secreted by cercariae and eggs, implicating these cells in the recognition of *Schistosoma* by the innate immune system. Monocytes are differentiated into alternatively activated macrophages, which protect against hepatocellular damage and mediate survival during experimental schistosomiasis (20). Fernandes et al (2014) suggest protective role of CD14⁺/CD16⁺ monocytes in the immunopathogenesis of periportal fibrosis, since these cells expression high levels of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines. We identified elevation of this cellular profile, which would be indicative of protection. KLEPPA et al (2014) demonstrated decreased monocytes CD14⁺ after treatment with PZQ, but this difference was not statistically significant. This result does not corroborate our CD14⁺/CD16⁺ monocytes elevation findings after treatment with PZQ, and our results are statistically significant.

Treatment with praziquantel has been shown to stimulate functions of macrophages/monocytes effective in contributing against more intense damage caused by the parasite (24). This treatment raises monocyte levels in an attempt to fight parasitic infection (25). Sousa et al (2018) identified high monocyte levels after using praziquantel and remained high over the months. Studies show that monocyte-

derived dendritic cells are capable of producing IL-4 and triggering a Th2 immune response in the liver (20), corroborating our findings of monocyte and IL-4 elevation after treatment.

In helminth infections, macrophages are important sources of IL-10. This cytokine production occurs in several immunological environments and is of fundamental importance for limiting pathogenesis (26). Although the increased production of IL-10 is related to CD4⁺ T lymphocytes, studies have shown that macrophages are responsible for the production of this cytokine in the early stages of infection. However, this production through monocytes is not well characterized (26).

IL-10 plays a key role in modulating inflammation during chronic infection. Studies reveal that chronic infection with increased morbidity is associated with blockade of IL-10 receptors (3, 4). IL-10 has been shown to regulate hepatic humoral immunity and that this is a pathway of the immune system responsible for initiating an essential anti-inflammatory response to prevent disease progression. This anti-inflammatory response may be mediated by immunological complexes in monocyte-derived macrophages (3), which could explain the correlation found between this cell profile and IL-10.

The blocking of IL-10 receptors, resulting in disease progression, with the development of portal hypertension and accumulation of parasitic eggs also related to the decrease in the production of B cells (3, 4). Fairfax et al (2012) believes that antibodies produced by B cells are important to trigger the production of anti-inflammatory factors, including IL-10, and macrophages. However, an increase in this post-treatment cytokine may block protection against possible reinfection (8). Studies have identified low levels of IL-10 after treatment (2) and this corroborates our results.

The participation of IL-10 and B cells in protection against helminth infection has been demonstrated. In the absence of IL-10, inflammation after infection increases. They suggest that TCD4 + lymphocytes play an important and significant role in immune regulation after exposure to the pathogen and speculate whether these cells may also help maintain protective function. IL-10 helps to limit tissue damage after infection (27).

In addition, *S. mansoni* infections increase levels of IL-10 production in B cells (28). Brindley and Sher (1987) demonstrated, after using PZQ, synergism between the drug and the immune response. They suggest that antibodies produced by B lymphocytes act directly against pathogens as a consequence of the interaction of the drug. Labuda et al (2013) identified an increase in B lymphocyte levels after treatment with praziquantel. However, another study identified that after the decrease in parasitic load because it did not have active infection, the levels of these cells would be decreased (30). In our study, we found a decrease in levels of both B cells and IL-10 after PZQ. A study with a larger population could have demonstrated a significant correlation between IL-10 and B cells.

There is a correlation between an increase in IL-4, stimulated by the secretion of Tfh cells, and consequently an increase in IgG (stimulated by the secretion of B lymphocytes). This correlation suggests that there is a minimum level of IL-4 necessary to activate the production of B cells involved in the production of this immunoglobulin and that the necessary conditions for this production of IL-4 are not present before 10 weeks of infection (4). We identified a statistically significant correlation between IL-4 and B lymphocytes. Although we identified elevation of IL-4 after treatment, the low levels of B cells could be justified by the level of IL-4 not being that necessary for activation of production of these cells.

Follicular helper T lymphocytes, a subset of effector T cells, assist B lymphocytes against *Schistosoma japonicum*. These depend on CXCR5 to locate and maintain contact with B lymphocytes (31). Zhang et al (2013) identified that in the infection by *S. japonicum* there was an increase in the induction of production of Thf lymphocytes and this contributed to the improvement of the humoral immune response, through the help in the development of B cell response (31).

Thf cells secrete IL-21, for activation, proliferation and differentiation of B cells (in addition to generating memory B cells), and some studies have reported the role of these cells in inducing IL-4 production (31). We identified high levels of IL-4 after PZQ. A study with a larger population could perhaps indicate a statistically significant correlation between this cytokine and Thf cells.

As Thf lymphocytes work in conjunction with B lymphocytes, and the levels of this cell profile decrease after the use of praziquantel (30), we believe that the drop in Thf lymphocyte levels, after 6 months of treatment, can be justified by the small amount of B cells. This decrease in Thf (found in our study), as well as that of B lymphocytes, could be related to the absence of active infection, indicating a parasitological cure of the disease. After 30 days and 6 months after treatment, we no longer identified eggs in the subjects' feces. In addition, despite not being statistically significant, we also identified a decrease in the fibrosis pattern. A study with a larger population could identify a correlation between these demographic and epidemiological factors with the decrease in cell profiles mentioned.

In summary, current studies have focused on understanding the immune response that occurs against infection by *S. mansoni*, after treatment with praziquantel (8). The role of Th2 cytokines in response to treatment has been widely explored, but information on the behavior of B lymphocytes, follicular T helper and

monocytes and their interactions with cytokines is not fully understood (12). Therefore, further studies are needed to understand this cellular immune response in schistosomiasis mansoni.

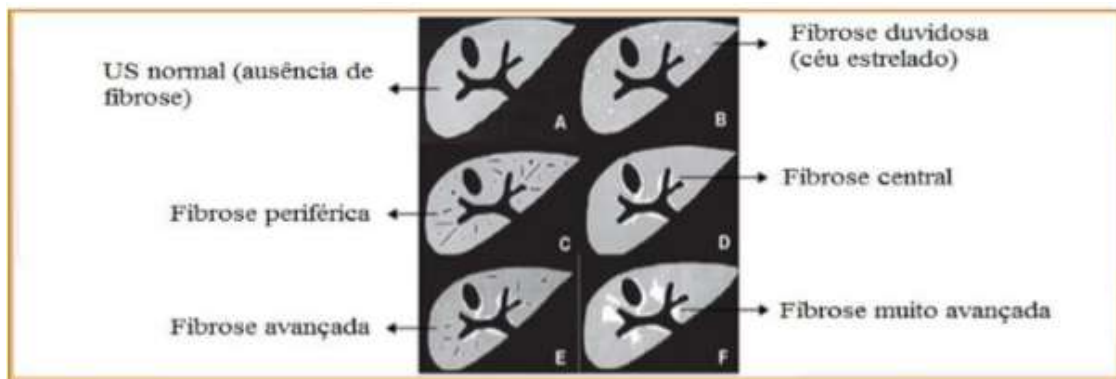
REFERENCES

1. FERNANDES, J.S. et al. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators of Inflamm.* 2014, p. 1-12.
2. MARTINS-LEITE, P. et al. Effect of Chemotherapy with Praziquantel on the Production of Cytokines and Morbidity Associated with Schistosomiasis Mansoni. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, v.52, p. 2780–2786.
3. FAIRFAX, K.C. et al. IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansoni Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. *PLOS Pathogens*. 2012, v. 8, n. 8.
4. FAIRFAX, K.C. et al. Regulation of the Development of the Hepatic B Cell Compartment During *Schistosoma mansoni* Infection. *J Immunol*. 2013, v.191, n.8.
5. FALLON, P.G et al. Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect immun.* Washington. 2000, v. 68, n. 10, p. 6005-6011.
6. WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/ Th2 paradigm. *Nat. Rev.*, 2004, v. 4, p. 583-594.
7. MENTINK-KANE, M.M. et al. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R₂. *Gastroenterology*., 2011, v. 141, p. 2200–2209.
8. NDOMBI, E.M. et al. Effect of four rounds of annual school-wide mass praziquantel treatment for *schistosoma mansoni* control on schistosomespecific immune responses. *Parasite Immunology*. 2018, v.40.
9. CORREIA, H.S.T. et al. Níveis séricos de globulinas e a intensidade da fibrose hepática em pacientes com esquistossomose mansônica. *Arq. Gastroenterol.*, 2009, v. 46, p. 194-198.
10. ABATH, et al. Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* Sep; 2000, v.86(9), p.745-52.

- 11.MORAIS, C.N.L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008, v. 103, n. 6, p. 561-568.
- 12.NEGRÃO-CORREA, D. et al. Association of Schistosoma mansoni-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. Plos One., 2014, v. 9, p. 1-11.
- 13.EGESA, M. et al. Schistosoma mansoni schistosomula antigens induce Th1/ Pro- inflammatory cytokine responses. Parasite Immunology. 2018, v.40.
- 14.ANGULO, P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J.Med. Boston. 2002, v. 346, p. 1221-1231.
- 15.WAYNE. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Editorial Limusa.1995.
- 16.ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. Parasite Immunol. Oxford 2009, v. 31, p.656-663.
- 17.GOMES, A.C.L., et al. Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. Epidemiol. Serv. Saúde, 2016, v.25, n.2, Brasília.
18. SILVA, P.C.V.; LEAL, T.V.; DOMINGUES, A.L.C. Treatment and education reduce the severity of schistosomiasis periportal fibrosis. Rev Soc Bras Med Trop. Rio de Janeiro. 2013, v. 46. n.4, p.472-477.
- 19.NESSIM,N.G.; DEMERDASH, N.G. Correlation between infection intensity, serum immunoglobulin profile, cellular immunity and the efficacy of treatment with praziquantel in murine schistosomiasis mansoni. Arzneimittelforschung, 2000, v.50, n.2, p.173-177.
- 20.SOUSA, C.O.S. et al. CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis. Frontiers in immunology. 2018, v. 9.
- 21.CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. Trends Parasitol. Oxford. 2014, p. 1–10.
- 22.BORTHWICK, L.A. et al. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. Mucosal Immunol. 2016, v. 9(1): 38–5.
- 23.KLEPPA, E. et al. Effect of Female Genital Schistosomiasis and Anti-Schistosomal Treatment on Monocytes, CD4+ T-Cells and CCR5 Expression in the Female Genital Tract. PLOS One. v.9, n.6, 2014.

24. HRCKOVA, G.; VELEBNÝ, S.; KOGAN, G. Antibody response in mice infected with *Mesocostoides vogae* (syn. *Mesocostoides corti*) tetrathyridia after treatment with praziquantel and liposomal glucan. *Parasitol res.*, 2007, v.100, n.6.
25. PANIC, G.; RUF, M-T.; KEISER, J. Immunohistochemical Investigations of Treatment with Ro 13-3978, Praziquantel, Oxamniquine, and Mefloquine in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, v.61, n.12.
26. SANIN, D.E.; PRENDERGAST, C.T.; MOUNTFORD, A.P. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *The Journal of Immunology*. 2015.
27. SANIN, D.E. et al. Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4⁺ T Cells That Are Functionally Suppressive. *PLOS Pathogens*. 2015, v.14, p. 1-23.
28. MANGAN, N.E. et al. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-Producing B cells. *J Immunol*. 2004, v.173.
29. LABUDA, L.A. Alterations in Peripheral Blood B Cell Subsets and dynamics of B Cell Responses during Human Schistosomiasis. *PLOS Neglect Trop Dis*, 2013, v.7, p.1-11.
30. BRINDLEY, P.J.; SHER, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *The Journal of immunology*. 1987, V.139, n.1.
31. ZHANG, J. et al. Helminth Protein Vaccine Induced Follicular T Helper Cell for Enhancement of Humoral Immunity against *Schistosoma japonicum*. *BioMed Research International*. 2013.

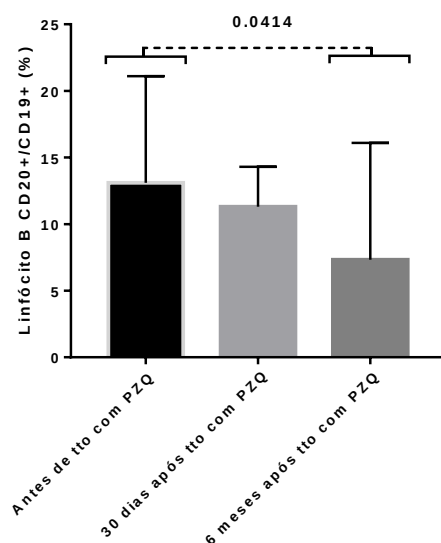
Figure 1- Ultrasound representation of the liver according to the different patterns of periportal fibrosis, according to the Niamery classification



Source: adapted from RICHTER et al., 2001

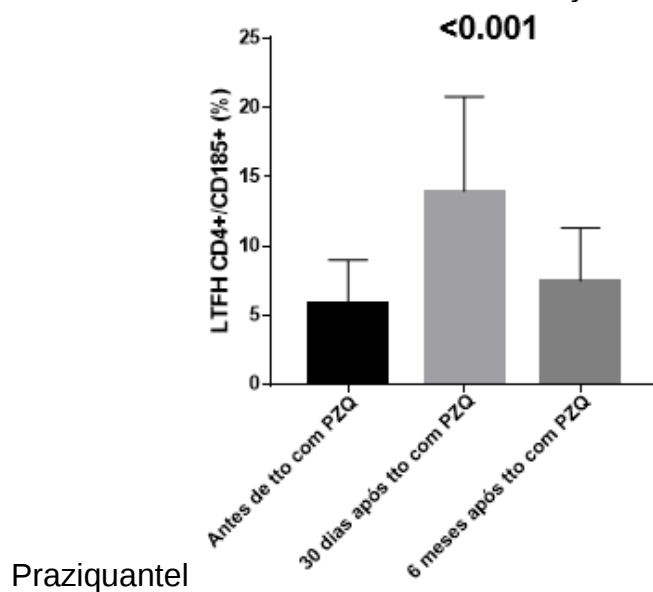
Caption: US: ultrasound; A = fibrosis pattern A; B = fibrosis pattern B; C = fibrosis pattern C; D = fibrosis pattern D; E = fibrosis pattern E; F = fibrosis pattern F

Figure 2- Levels of B lymphocytes in schistosomal patients in the municipality of Escada before and after 30 days and 6 months of treatment with Praziquantel



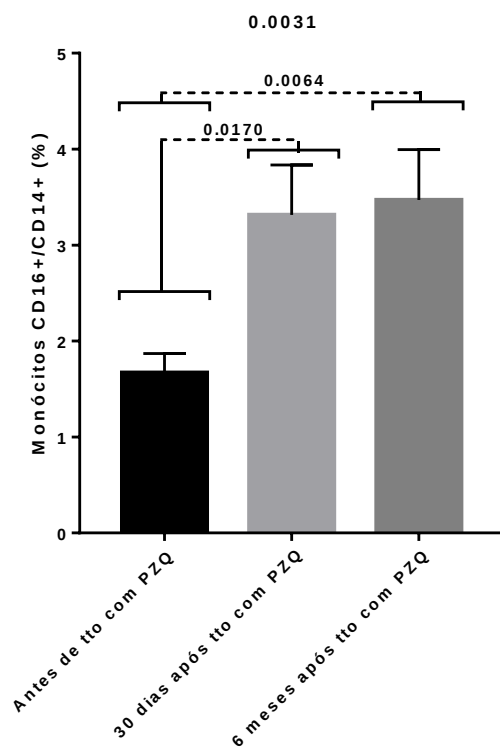
Source: Elaborated by the author.

Figure 3- Levels of Thf lymphocytes in schistosomal patients in the municipality of Escada before and after 30 days and 6 months of treatment with



Source: Elaborated by the author.

Figure 4- Monocyte levels in schistosomal patients in the municipality of Escada before and after 30 days and 6 months of treatment with Praziquantel



Source: Elaborated by the author.

Table 1

Demographic and epidemiological characteristics of schistosomal patients in the municipality of Escada

		n	%
Sex			
	Male	14	56.00
	Female	11	44.00
Total		25	100
Age range			
	18-39	20	80.00
	40-59	4	16.00
	>60	1	4.00
Total		25	100
River bathing place			
	Escada	21	84.00
	Other municipalities	4	16.00
Total		25	100
Quantity of eggs (g/feces) (median)		6	-

Source: Elaborated by the author.

Note: n = number of patients

Table 2

Periportal fibrosis pattern of schistosomal patients in the municipality of Escada before and after six months of treatment with Praziquantel

		Before PZQ		After PZQ	
		N	%	N	%
Fibrosis pattern	A	4	16.00	5	20.00
	B	3	12.00	0	0.00
	C	7	28.00	13	52.00
	D	8	32.00	7	28.00
	E	3	12.00	0	0.00
	F	0	0.00	0	0.00
	Total	25	100	25	100

Source: Elaborated by the author.

Note: n = number of patients; PZQ = praziquantel; Pattern A = without fibrosis; B = pattern of fibroseduvids; C = peripheral fibrosis pattern; D = central fibrosis pattern; E = advanced fibrosis pattern; F = very advanced fibrosis pattern

Table 3- Correlations of lymphocytes B, Th follicular and monocytes with cytokines IL-4 and IL-10 of schistosomal patients in the municipality of Escada before, after thirty days and six months of treatment with Praziquantel

Correlation	Before PZQ (ρ)	p	Ater 30 days PZQ(ρ)	p	After 6 months (ρ)	p
Linf.B x IL-4	0.3910*	0.0441	-0.1602	0.2627	0.2549	0.1985
Linf B x IL-10	0.3690*	0.0547	-0.0165	0.4740	0.0234	0.4700
Linf.Thf x IL-4	0.2883	0.0811	0.1183	0.3200	-0.4371	0.0680
Linf.Thf x IL-10	-0.0446	0.4161	0.4234*	0.0400	-0.1074	0.3630
Mon x IL-4	0.2543	0.1099	0.2522	0.1713	-0.1024	0.3694
Mon x IL-10	0.2964	0.0751	0.4568*	0.0383	-0.0165	0.4801

Note: ρ = rho values of the spearman correlation; * = significant correlation between cytokines; PZQ = praziquantel; Lymph B = lymphocyte B; Lymph.Thf = follicular helper T lymphocyte; Mon = monocyte

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO MUNICÍPIO DE ESCADA

SECRETARIA MUNICIPAL
DE SAÚDE SUSTENTÁVEL



CARTA DE ANUÊNCIA

Pelo presente, a Secretaria Municipal de Escada, sediada na rua Fausto Pontual, 148, CEP 55500-000 – Centro, Escada, Estado de Pernambuco, aqui representada por Ana Cecilia Amorim de Souza, atualmente exercendo a função de Secretária Executiva de Saúde, declara ter conhecimento das atividades a serem realizadas na sede da instituição em função do projeto de pesquisa intitulado **"ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA MORBIDADE, DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE CRITÉRIO DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA"** que tem por responsável a pesquisadora Dra. Clarice N. Lins de Moraes Fonseca, a qual pretende estudar componentes do sangue envolvidos na morbididade e diagnóstico da esquistossomose e critérios de cura para os pacientes adultos antes e após 30 dias, 3 e 6 meses do tratamento com praziquantel. O mesmo está vinculado ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

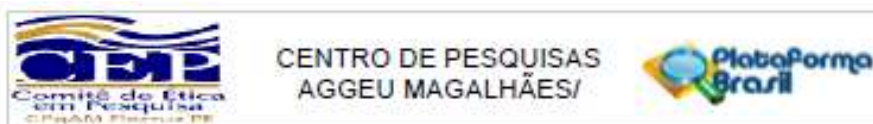
Atenciosamente,

Escada, 19 de Maio de 2017.

Ana Cecilia Amorim de Souza
Secretaria Executiva de Saúde Município de Escada/PE

SECRETARIA DE SAÚDE
secretariasaudefscada@hotmail.com
Av. Coronel José Pereira, 2 Trav. 3/II
Escada - PE CEP: 55500-000 - (011) 35344138

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA MORBIDADE, DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE CRITÉRIO DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.

Pesquisador: Clarice Neuenschwander Iins de Moraes Fonseca

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50950615.9.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.589.391

Apresentação do Projeto:

Projeto apresentado com linguagem clara, concisa e bem referenciado.

O projeto na íntegra (brochura) está estruturado no formato exigido pelo edital de financiamento.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar marcadores imunológicos e moleculares para morbidade, diagnóstico e critério de cura pós-terapêuticos em pacientes com esquistossomose mansônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Consta uma descrição sucinta em "Informações Básicas do Projeto" e no TCLE. Como benefícios está declarado que os resultados desta pesquisa poderão contribuir para um melhor acompanhamento no tratamento dos pacientes, além de contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas imunoterapias para os pacientes portadores da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa considerada relevante e apresenta no projeto todas as informações necessárias para sua

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº		CEP: 50.670-420
Bairro: Cidade Universitária		
UF: PE	Município: RECIFE	
Telefone: (81)2101-2639	Fax: (81)2101-2639	E-mail: comiteetosa@cpqam.fiocruz.br