

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação parasitológica e de parâmetros celulares e humorais da resposta imune associados à infecção e reinfeção pelo *Schistosoma mansoni* nas linhagens murinas C57BL/6 e BALB/c.

por

Clarice Carvalho Alves

Belo Horizonte

Fevereiro/2011

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação parasitológica e de parâmetros celulares e humorais da resposta imune associados à infecção e reinfeção pelo *Schistosoma mansoni* nas linhagens murinas C57BL/6 e BALB/c.

por

Clarice Carvalho Alves

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

**Belo Horizonte
Fevereiro/2011**

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

A474
2011

Alves, Clarice Carvalho.

Avaliação parasitológica e de parâmetros celulares e humorais da resposta imune associados à infecção e reinfeção pelo *Schistosoma mansoni* nas linhagens murinas C57BL/6 e BALB/c / Clarice Carvalho Alves. – Belo Horizonte, 2011.

xix, 91 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 100 – 110

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Camundongos BALB-c/imunologia 4. Camundongos C57BL-6/imunologia I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação parasitológica e de parâmetros celulares e humorais da resposta imune associados à infecção e reinfeção pelo *Schistosoma mansoni* nas linhagens murinas C57BL/6 e BALB/c.

por

Clarice Carvalho Alves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (Presidente)

Profa. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Profa. Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti

Suplente: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2011

DEDICATÓRIAS

Aos meus amados pais, Maria Lúcia e Welerson, pelo apoio incondicional, sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre!!!

À minha querida orientadora, Kika, que desde o primeiro momento colocou seus conhecimentos à disposição da minha formação, muito obrigada!!!

Ao Dr. Paulo, que tanto inspira nos alunos iniciantes o gosto pela ciência, obrigada.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Esquistossomose, Ana Karine, Áureo, Babá, Cíntia, Carol, Eliz, Flávia, Gardênia, Juliano, Juju, Lili, Lud, Lucila, Dr. Naftale, Neusa, Daisy, Pati, Rafa, Suedaly, Tati, Vandinha, Vanessa, D. Vera, Wander e Watson, obrigada pelos momentos agradáveis; pelos preciosos conselhos; pelas inúmeras ajudas e pela companhia nas *marmitas*. A convivência com vocês é maravilhosa!

Aos meus amados pais e irmãos, obrigada pelo incansável incentivo e pelas palavras de alento nos momentos mais difíceis. Obrigada ao meu lindo sobrinho, Gabriel, que chegou na etapa final desta caminhada trazendo muita alegria e paz nos momentos de mais ansiedade.

Ao Kennedy, meu amor, obrigada pela presença e participação constantes nesses dois anos de mestrado.

Às minhas queridas avós, obrigada pelas orações e afetuoso encorajamento.

Aos meus familiares e amigos, sempre um apoio, obrigada!

À Patrícia Parreiras, pela disposição em fazer parte do trabalho, pela enorme ajuda nos experimentos e pelas valiosas sugestões, obrigada!

À Biblioteca do CPqRR por fornecer acesso à informação técnico-científica e pela catalogação e normalização desta dissertação, obrigada.

Aos funcionários do CPqRR que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, obrigada.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA FINANCIADORA

Agradeço ao CPqRR/POM, número de processo 1201.8315.0204.0042, pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao CPqRR/FIOCRUZ pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A Esquistossomose.....	20
1.2 Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	21
1.3 Estratégias para o controle da Esquistossomose.....	23
1.4 A imunopatologia da Esquistossomose	24
1.5 Camundongos como modelos experimentais no estudo da Esquistossomose.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Animais	36
4.2 Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i>	36
4.3 Grupos experimentais	36
4.4 Infecção dos animais.....	39
4.5 Tratamento dos animais.....	39
4.6 Obtenção de antígenos	40
4.6.1 SEA e AWA	40
4.6.2 Antígeno de esquistossômulo.....	41
4.7 Avaliação parasitológica.....	41
4.7.1 Número de vermes recuperados	41
4.7.2 Número de ovos	42
4.7.2.1 HPJ	42
4.7.2.2 Eclosão de Miracídeos	42

4.7.2.3 Número de ovos contidos no fígado e intestino	43
4.7.2.4 Oograma	43
4.7.3 Acompanhamento do peso dos animais	43
4.8 Avaliação do perfil de imunoglobulinas	44
4.9 Avaliação do perfil de citocinas	45
4.10 Análise estatística	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação parasitológica e acompanhamento do peso	47
5.2 Avaliação do perfil de imunoglobulinas	51
5.3 Avaliação do perfil de citocinas	72
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO.....	98
8 ANEXOS	99
8.1 Anexo 1 – Licença do CEUA.....	99
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O ciclo de vida do parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 2 - Desenho experimental dos ensaios relacionados à avaliação imunológica (A) e à avaliação parasitológica (B).....	38
Figura 3 - Acompanhamento do peso corporal dos animais BALB/c e C57BL/6 infectados.....	47
Figura 4 - Número de vermes recuperados nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 após infecção/reinfecção.	48
Figura 5 - Exames de fezes HPJ (A) e Ecloração de Miracídeos (B).....	49
Figura 6 – Número de ovos presentes nos tecidos dos camundongos infectados/reinfectados das linhagens BALB/c e C57BL/6.....	50
Figura 7 – Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	53
Figura 8 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	55
Figura 9 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	57
Figura 10 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	59
Figura 11 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	61
Figura 12 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	63
Figura 13 - Produção da imunoglobulina IgG1 nos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfecção.....	64
Figura 14 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	66
Figura 15 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	68
Figura 16 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6.....	70

Figura 17 - Produção da imunoglobulina IgG2c nos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfecção.....	71
Figura 18 – Produção da citocina IFN- γ após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.	74
Figura 19 - Produção da citocina TNF- α após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	77
Figura 20 - Produção da citocina IL-13 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	80
Figura 21 - Produção da citocina IL-4 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	83
Figura 22 - Produção da citocina IL-10 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	86
Figura 23 - Produção da citocina IL-17 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais	37
--	-----------

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Citocinas produzidas pelos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfeção pelo <i>S. mansoni</i>	90
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

Ag: Antígeno

ELISA: Ensaio de absorção imunoenzimático, do inglês: Enzyme linked immunosorbent assay

HPJ: Hoffman - Pons e Janer

IFN-γ: Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

KOH: Hidróxido de Pótássio

NaCl: Cloreto de Sódio

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico, do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS: Tampão salina-fosfato, do inglês: Phosphate-buffered saline

PBST₂₀: Tampão salina-fosfato, do inglês: Phosphate-buffered saline and Tween 20

RPMI: Roosevelt Park Memorial Institute

SEA: Antígeno solúvel de ovo, do inglês: Soluble Egg Antigen

AWA: Preparado de antígeno I de verme adulto, do inglês: Adult Worm Antigens

Th1: Subpopulação de células T auxiliaries do tipo 1, do inglês: T helper cells type 1

Th2: Subpopulação de células T auxiliaries do tipo 2, do inglês: T helper cells type 2

TMB: Tetrametilbenzidina, do inglês: Tetramethylbenzidine

TNF-α: Fator de necrose tumoral α, do inglês: tumor necrose factor α

RESUMO

Com o objetivo de gerar novos conhecimentos acerca da interação parasito-hospedeiro, o presente trabalho avaliou parâmetros parasitológicos e imunológicos associados ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo após a infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, nas linhagens murinas BALB/c e C57BL/6. Para tanto, a avaliação dos parâmetros parasitológicos foi realizada utilizando animais das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados e reinfectados. Os animais infectados e reinfectados, 50 dias pós-infecção/reinfecção foram perfundidos para avaliação da carga parasitária. Dois dias antes da perfusão foi realizado o exame de fezes utilizando as metodologias HPJ e Ecloração de Miracídeos. O número de ovos presentes no intestino e no fígado dos animais foram determinados através da digestão dos órgãos utilizando KOH 10%. Além disso, o peso dos animais foi avaliado durante todo o período de infecção, tratamento e reinfecção. Para realizar a avaliação da resposta celular, o baço de camundongos, de ambas as linhagens, infectados, infectados/tratados e reinfectados, bem como de camundongos não infectados, foram retirados nos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 pós-infecção/reinfecção para a obtenção e cultura de esplenócitos que foram estimulados, ou não, com SEA, extrato de verme adulto (AWA) e Ag. de Esquistossômulo. Os sobrenadantes das culturas dos esplenócitos foram coletados após 24 (para a quantificação das citocinas IL-4 e TNF- α) e 72 horas (para as citocinas IL-10, IL-17, IL-13, IFN- γ) de incubação. Os soros dos animais infectados e reinfectados, e de seus controles, foram obtidos nos dias 3, 7, 15, 30, 60 e 110 pós-infecção/reinfecção para a avaliação da resposta humoral. Foram dosados os anticorpos IgG total, e seus subtipos IgG1 e IgG2c, específicos para SEA, AWA e Ag. de esquistossômulo, através da técnica de ELISA. Quanto à avaliação parasitológica, não foi possível observar diferença significativa em relação à carga parasitária pós-infecção/reinfecção em camundongos de mesma linhagem, bem como, entre os animais de linhagens diferentes. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de ovos/miracídeos nas fezes de camundongos pós-infecção ou pós-reinfecção em ambas as linhagens. Em relação ao número de ovos retidos nos órgãos, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas no fígado. Nesse órgão, os animais BALB/c reinfectados

apresentaram um reduzido número de ovos em relação aos animais BALB/c infectados e aos C57BL/6 reinfectedos. Quanto à produção das imunoglobulinas, os camundongos C57BL/6 reinfectedos apresentaram maior produção de IgG2c e os animais BALB/c reinfectedos maior produção de IgG1. Camundongos C57BL/6 apresentaram um perfil misto de produção de citocinas do tipo 1/tipo 2, com produção das citocinas IL-10 e IL-13 ao longo de toda a infecção/reinfecção, sendo também considerável a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α . Os animais BALB/c produziram as citocinas IL-13 e IL-10 ao longo de toda a infecção/reinfecção, porém foram os únicos a produzirem a citocina IL-4 durante todo o tempo de infecção e reinfecção. Os resultados do nosso trabalho puderam apontar as principais diferenças imunológicas e parasitológicas entre as linhagens murinas BALB/c e C57BL/6 durante a infecção e/ou reinfecção pelo *Schistosoma mansoni* contribuindo para a geração de novos conhecimentos acerca dos mecanismos imunológicos desencadeados em resposta ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo tanto durante infecção quanto reinfecção.

ABSTRACT

In order to generate knowledge about the parasite-host interaction, this study assessed parasitological and immunological parameters associated with the parasite development within the definitive host, after infection and reinfection with *S. mansoni*, in the murine BALB/c and C57BL/6 strains. The evaluation of parasitological parameters was performed using infected and reinfected BALB/c and C57BL/6 mice. Fifty days after infection/reinfection, these mice were perfused for evaluation of worm burden. Two days before perfusion, a stool examination was performed using HPJ and Miracidia Ecllosion methodologies. The intestine and liver of these mice were removed during the perfusion, weighed and digested with 10% KOH to assess the number of eggs present in those organs. Moreover, the weight of the animals was monitored throughout the period of infection, treatment and reinfection. In order to evaluate the cellular immune response, the spleens of infected and reinfected mice from both strains, as well as from uninfected mice (control group) were removed on days 3, 7, 15, 30, 60, 110 and 155 post-infection/reinfection to perform splenocyte cultures, stimulated or not with SEA, adult worm antigen preparation (AWA) and schistosomula antigen. The supernatants of the cultures were collected after 24 (for quantification of IL-4 and TNF- α) and 72 hours (for IL-10, IL-17, IL-13, IFN- γ) post stimulation. Sera from infected and reinfected mice, as well as from their controls, were obtained on days 3, 7, 15, 30, 60 and 110 post-infection/reinfection to assess the humoral response. Total IgG, and its subtypes IgG1 and IgG2c, specific for SEA, AWA and schistosomula antigen, were measured by ELISA. Regarding the parasite evaluation, no significant difference was found in worm burden recovered from infected and reinfected mice in the same mice strain, as well as between animals from different strains. There was also no statistically significant difference in the number of eggs/miracidia in the stools of both strains of mice post-infection or post-reinfection. Regarding the number of eggs retained in the organs, there was a statistically significant difference in the number of eggs trapped in the liver. Reinfected BALB/c mice showed a reduced number of eggs in this organ when compared to infected BALB/c and C57BL/6 reinfected mice. Significant levels of specific antibodies were detected in reinfected animals of both strains. It was observed some difference in the immunoglobulins IgG1 and IgG2c production, and

C57BL/6 reinfected mice showed higher production of IgG2c whereas BALB/c reinfected mice showed higher production of IgG1. C57BL/6 mice showed a mixed type 1/type 2 cytokine profile, with production of IL-10 and IL-13 throughout the infection/reinfection, and a considerable production of cytokines IFN- γ and TNF- α , after infection and reinfection. Similarly, BALB/c mice produced IL-13 and IL-10 cytokines throughout the infection / reinfection. Furthermore, BALB/c mice were the only ones to produce IL-4 cytokine during the period of infection and reinfection. The results of our study pointed the major immunological and parasitological differences between BALB/C and C57BL/6 murine strains during *Schistosoma mansoni* infection and/or reinfection contributing to generate new knowledge about the immune mechanisms triggered in response to the development of the parasite in the definitive host during infection and reinfection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Esquistossomose

A Esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos digenéticos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, e que apresenta um grande impacto para a saúde pública mundial. Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a esquistossomose se destaca por apresentar uma alta taxa de morbidade e mortalidade sendo que, somente na África, a doença causa a morte de 200 mil pessoas por ano. (Hotez, et al., 2006) Em escala mundial, 207 milhões de pessoas são afetadas pela doença e mais de 700 milhões estão em risco de contraí-la (WHO, 2010). O custo para os indivíduos infectados pelo *Schistosoma*, em todo o mundo, pode representar 10,4 milhões de DALY (Disability Adjusted Life Years) (PAHO/WHO, 2007).

Dentre as espécies de *Schistosoma*, cinco parasitam o sistema circulatório dos seres humanos: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. haematobium*. A patologia associada às quatro primeiras espécies supracitadas está relacionada à formação de uma fibrose hepato-intestinal crônica nas pessoas infectadas. Já a espécie *S. haematobium* caracteriza uma doença que afeta o trato urinário dos indivíduos doentes (Blanchard, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2007), a distribuição geográfica da esquistossomose abrange 74 países, distribuídos nos continentes africano, americanos (sul e central) e asiático. Dentre essas regiões, a África Subsaariana é a mais afetada pela doença, compreendendo 85% de todos os casos de esquistossomose.

Causadora da esquistossomose mansoni, a espécie *S. mansoni* é a única do gênero (*Schistosoma*) que pode ser encontrada no Brasil. No país, as áreas endêmicas para a esquistossomose mansoni abrangem territórios do Maranhão até Minas Gerais. Alguns focos isolados da doença se encontram nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Coura e Amaral, 2004).

Nessas áreas endêmicas, a transmissão da doença ocorre através da contaminação de coleções de água, por fezes de indivíduos doentes, em locais onde

se encontra o hospedeiro intermediário do parasito. Nas áreas endêmicas para a doença, vários fatores econômicos, sociais e ecológicos têm contribuído para a contínua transmissão da mesma ao longo dos anos. As precárias condições de saneamento básico, o baixo poder socioeconômico dos moradores das áreas endêmicas, os hábitos de vida (principalmente associados às atividades econômicas de pesca e agricultura), a migração populacional, a presença dos hospedeiros intermediários do parasito e o clima, são exemplos de condições que permitem a permanência da transmissão da doença no Brasil (Kloos, et al., 2008; Kloos, et al., 2010; Loureiro, 1989).

1.2 Ciclo de vida do *S. mansoni*

O parasito da espécie *Shistosoma mansoni* possui um ciclo de vida complexo, o qual apresenta uma fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e uma de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem ou pequenos mamíferos).

A larva do *Schistosoma mansoni*, denominada cercária, quando presente em coleções hídricas, entra em contato com o hospedeiro vertebrado e, através de uma série de eventos, consegue se fixar, invadir e migrar através da pele do hospedeiro.

A fixação das cercárias na pele é auxiliada pela presença de L-arginina e pelo calor proveniente do hospedeiro (Haas et al., 1976; Haas et al., 1997), permitindo um contato prolongado entre parasita e hospedeiro, e assim, facilitando a penetração das cercárias através da pele. A partir daí, as cercárias iniciam a invasão da pele através da ação vibratória da cauda e da secreção das glândulas pré-acetabulares, as quais possuem proteases (Haas et al., 1997). Esse processo de invasão da pele pelo parasito resulta em perda da cauda e em alterações morfofisiológicas, desencadeadas pelas mudanças de temperatura e osmolaridade, transformando as cercárias em esquistossômulos (Stirewalt, 1974). Os esquistossômulos, então, já transformados, invadem a corrente sanguínea e são levados até os pulmões e daí, chegam até as veias do sistema porta-hepático, local em que sofrerão maturação em vermes adultos (Miller e Wilson, 1980). Estudos avaliando a migração do *S. mansoni*, em camundongos, mostram que os esquistossômulos podem permanecer na pele do hospedeiro até o quarto dia pós-

infecção, antes de serem levados aos pulmões. A presença de esquistossômulos nos pulmões e no sistema porta hepático, por sua vez, já é detectada a partir do terceiro e oitavo dia pós-infecção, respectivamente. Estes dados revelam que a migração do parasita, no hospedeiro definitivo, é do tipo assincrônica, se baseando na capacidade individual de cada parasito (Barbosa et al., 1978).

Acredita-se que a maturação dos vermes ocorra no sistema porta-hepático, dentre outros motivos, pela presença de altos níveis de nutrientes no sangue porta-hepático (Khammo et al., 2002; Wilson et al, 1978). O amadurecimento sexual também ocorre nesta fase, sendo o acasalamento entre os vermes macho e fêmea fundamental para o amadurecimento sexual desta última (Erasmus, 1986).

Os vermes adultos, acasalados, migram, contra a corrente sanguínea, até as vênulas do mesentério do intestino e iniciam a deposição dos ovos 30-40 dias pós-infecção. Esses poderão ser carregados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos, ficando retido nestes, promovendo a formação de uma reação inflamatória granulomatosa ao redor dos mesmos, ou poderão atravessar a mucosa do intestino caindo na luz intestinal. Deste modo, os ovos poderão ser eliminados juntamente com as fezes. Quando encontram o meio aquático, os miracídios, larvas presentes em ovos maduros, eclodem devido à diferentes fatores ambientais, tais como temperatura e luminosidade. Os miracídios livres no meio aquático encontram com o hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, e iniciam a penetração nestes moluscos com o auxílio de secreções glandulares do terebratorium e movimentos rotatórios. Os miracídios, então, iniciam numerosos processos de multiplicação das células germinativas originando os chamados esporocistos primários. Esses, por sua vez, se transformam em esporocistos secundários, na segunda semana após a penetração dos miracídios. Os esporocistos, então, migram até a região das glândulas digestivas, local onde ocorre a liberação das cercárias recém produzidas pelos esporocistos secundários (Pan, 1965). As cercárias liberadas ganham o meio aquático, podendo infectar o hospedeiro definitivo, fechando, assim, seu ciclo.

A figura a seguir (figura 1) resume o ciclo do *Schistosoma mansoni*.

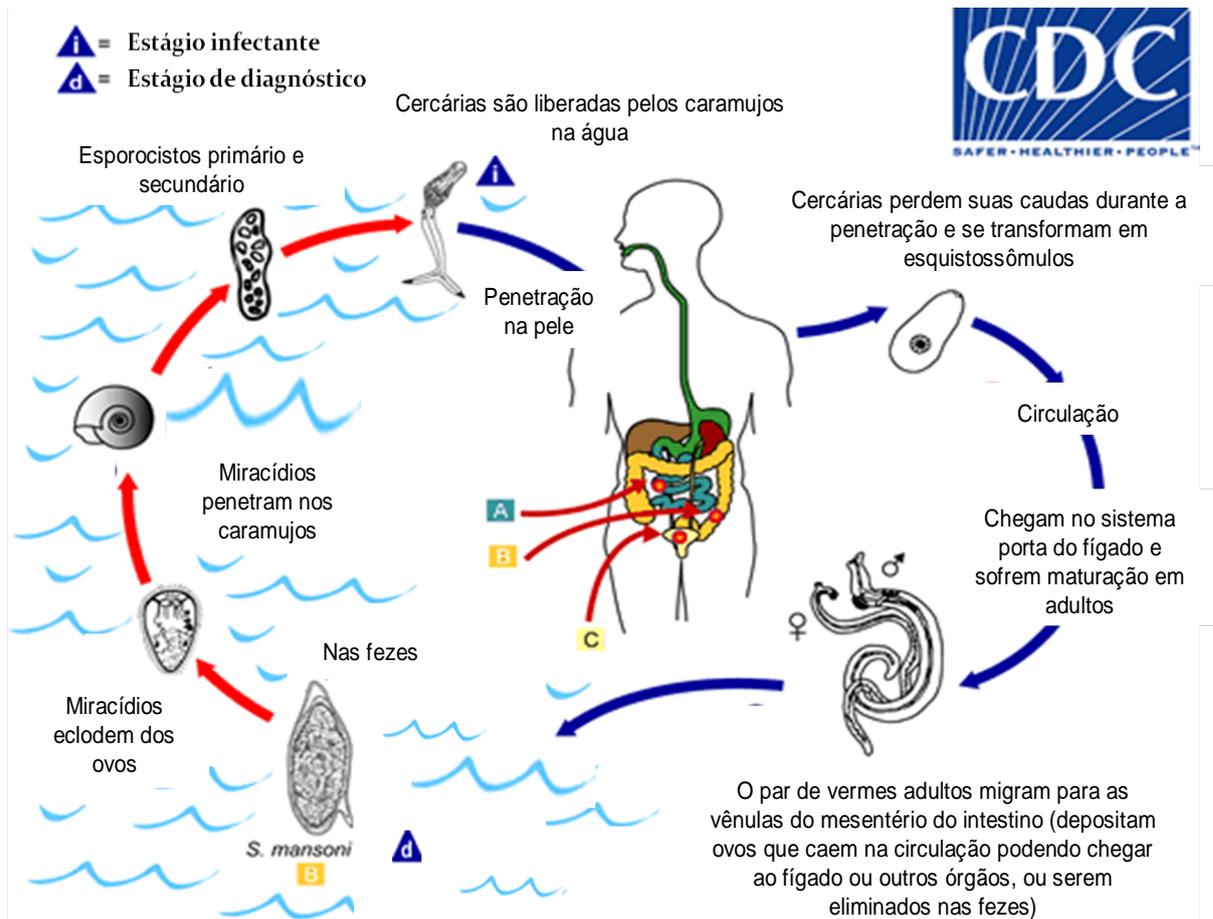


Figura 1 - O ciclo de vida do parasita *Schistosoma mansoni*. O esquema representa o complexo ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, evidenciando a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem). Fonte: adaptado de CDC: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>>.

1.3 Estratégias para o controle da Esquistossomose

Para o controle da esquistossomose, a adoção de medidas de saneamento básico seria o método profilático ideal, o qual impediria, não só a transmissão da esquistossomose *mansoni*, como também a de outras doenças relacionadas à água contaminada por fezes. Gray e colaboradores (2010) acreditam que os programas de controle para a esquistossomose devem abranger múltiplos componentes, associando o uso de quimioterápicos, ao uso de moluscidas, à educação e promoção da saúde e à melhoria no saneamento básico. Porém, o precário padrão sócioeconômico dos países endêmicos para a doença e a falta de interesse político dificulta a adoção destas medidas profiláticas. Por isso, o método largamente usado para controlar a esquistossomose é a quimioterapia.

O Praziquantel é o medicamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde, sendo o seu mecanismo de ação resultante da interação entre o sistema imune do hospedeiro e o fármaco (Brindley e Sher, 1987). Além disso, o medicamento também se mostra eficiente na redução da morbidade em pacientes com fibrose grave. (Martins-Leite et al., 2008) Porém, nas áreas endêmicas, a falta de saneamento básico, resulta em constantes reinfecções dos indivíduos residentes nessas áreas. Tal situação não pode ser evitada pela administração da droga. Além disso, a possibilidade de se selecionar parasitas resistentes ao fármaco é uma grande preocupação atual, já que existem relatos de indução de resistência do parasita ao Praziquantel e Oxaminiquina, em experimentos realizados em camundongos. (Fallon e Doenhoff, 1994)

Por isso, acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina teria um grande impacto, auxiliando os quimioterápicos no controle da esquistossomose (Oliveira et al. 2008). A presença de indivíduos resistentes à infecção por *S. mansoni*, em áreas endêmicas, denominados “normais endêmicos” (Correia-Oliveira et al., 1989), e a evidência de resistência adquirida, ao longo do tempo, pelas constantes infecções/tratamentos de indivíduos destas regiões, (Caldas et al., 2000) sugerem que o desenvolvimento da vacina é possível.

1.4 A imunopatologia da Esquistossomose

No curso da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, indivíduos infectados podem apresentar duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, as quais diferem entre si em relação às características clínicas e imunológicas.

A fase aguda é o estágio inicial da doença que pode ser caracterizada por mal-estar, febre, tosse, emagrecimento, dor abdominal e diarreia. A resposta imune nessa fase é marcada pela produção de altos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α em pacientes recém infectados, além de induzir um quadro de eosinofilia (de Jesus, et al., 2002).

Em geral, tanto em modelos experimentais, quanto em humanos, a resposta imune nessa fase é similar. A mesma é marcada por um balanço na expressão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2. No começo da infecção, a resposta do tipo 1 é predominante, com produção de IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6. Após o desenvolvimento do parasito em verme adulto e o começo da produção de ovos, a resposta do tipo 1

começa a declinar, enquanto a resposta do tipo 2 (produção de IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (Pearce e MacDonald, 2002; Burke, et al., 2009).

Nos indivíduos residentes em áreas endêmicas, a fase aguda da doença não é comum. A ausência dessa fase pode ser explicada pelo fato de os indivíduos dessas regiões serem sensibilizados pelo *Schistosoma*, ainda no útero, pela transferência materna de antígenos solúveis, através da placenta, para o feto (Carlier et al, 1980). Assim, a pré-existência de um padrão ou resposta do tipo 2, em crianças de áreas endêmicas pré-sensibilizadas no útero, pode fazer com que elas sejam menos susceptíveis ao desenvolvimento do quadro inflamatório, característico da fase aguda da doença, quando houver infecção (Pearce e MacDonald, 2002).

Na fase crônica, distintas manifestações clínicas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. Na maioria dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas, a doença se apresenta assintomática, sendo esta considerada a forma intestinal da doença. A mesma se caracteriza pelo aparecimento de episódios de fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia. Uma pequena percentagem da população, porém, desenvolve formas clínicas mais graves da doença, as quais são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Os indivíduos portadores destas formas clínicas mais graves apresentam hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia, variados graus de fibrose periportal, hipertensão portal e conseqüente desenvolvimento de varizes esofágicas (Prata e Bina, 1968).

Fatores que determinam o aparecimento das diferentes manifestações clínicas ainda não são completamente entendidos. Sabe-se que a intensidade da infecção está diretamente relacionada ao aparecimento de formas clínicas mais graves da doença, sendo que uma elevada carga parasitária implica no desenvolvimento da forma hepatoesplênica da doença (Bina e Prata, 2003). Porém, a intensidade da infecção não é o único fator responsável por determinar a gravidade da doença, já que em áreas hiperendêmicas a percentagem de indivíduos com formas graves é pequena (Bina e Prata, 2003).

Essas diferentes manifestações clínicas se desenvolvem em decorrência da presença dos ovos das fêmeas do verme nos tecidos do hospedeiro, principalmente fígado e intestino, que irão induzir a formação de granulomas ao redor destes ovos (Caldas et al, 2008). O granuloma é caracterizado por ser uma reação inflamatória focal, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros

tipos celulares, dispostos de forma organizada (Lenzi et al., 1998). Um hospedeiro imunocompetente monta uma resposta contra os ovos do parasita com o desenvolvimento de uma vigorosa reação granulomatosa ao redor dos ovos. Essa resposta sequestra os antígenos produzidos pelos ovos, sendo, portanto, benéfica para o hospedeiro, mas, por outro lado, promove uma intensa reação inflamatória, podendo levar a uma grave fibrose hepática e hipertensão porta.

No clássico trabalho, realizado por Lenzi e colaboradores (1998), utilizando camundongos *Swiss*, foi possível descrever de forma detalhada as diferentes fases do granuloma, bem como suas características. De acordo com o estudo, são dois os estágios do granuloma: o estágio pré-granulomatoso e o estágio granulomatoso. O estágio pré-granulomatoso, é caracterizado pelo preparo do espaço, ao redor do ovo do parasita, para o estabelecimento e organização da reação granulomatosa, com destruição focal das paredes dos vasos envolvidos e/ou parênquima adjacente e presença abundante de eosinófilos e macrófagos. Tal estágio pode ser subdividido em: estágio pré-granulomatoso de reatividade fraca ou inicial e estágio pré-granulomatoso exsudativo. Já o estágio granulomatoso é subdividido em três fases: exsudativo-produtivo, produtivo e involucional (involucional com dissociação das fibras colágenas, involucional com camada de colágeno espessa, involucional com camada de colágeno fina e involucional com pigmento macrofágico). Ao longo da evolução do granuloma, através destas fases, células, tais como, macrófago, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, fibroblastos, células epitelióides, células gigantes e linfócitos, se dispõem ao redor do ovo em diferentes zonas, envoltas por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, as quais, no início estão dispostas em malha e que, com o desenvolvimento do granuloma se dispõem de forma concêntrica. No estágio involucional ocorre a degradação da matriz extracelular.

Após uma breve análise dos trabalhos relacionados ao estudo da resposta imune, frente à infecção pelo *S. mansoni*, é curioso notar que o padrão da resposta imune pode ser bem variado entre os indivíduos, de acordo com as manifestações clínicas. Gazzinelli e colaboradores (1987), demonstraram que a resposta imune de pacientes em fase aguda apresentam alta reatividade contra antígeno solúvel de ovo (SEA) e baixa reatividade contra antígeno solúvel de verme adulto (SWAP). O contrário ocorre em pacientes crônicos intestinais, os quais apresentam fraca reatividade contra SEA. Esta perda de reatividade aos antígenos do SEA ao longo da infecção, está relacionada à mecanismos supressores desenvolvidos durante a

fase crônica. Porém, pacientes portadores das formas hepatointestinal e hepatoesplênica compensada, apresentam altos níveis de resposta ao SEA, enquanto que pacientes apresentando a forma hepatoesplênica descompensada apresentam uma reduzida resposta ao SEA. Dessa forma, a patologia grave é encontrada em pacientes incapazes de modular a resposta imune contra antígenos do SEA.

O padrão de produção de citocinas ao longo da infecção pelo *S. mansoni* também pode ser diversificado, de acordo com as formas clínicas da doença. Um estudo realizado por Teixeira-Carvalho e colaboradores (2008), o qual avaliou a resposta imune de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença demonstrou que as PBMC desses indivíduos, quando estimuladas por SEA, produziam um padrão de citocinas diferenciado. Indivíduos apresentando a forma intestinal produziram níveis significativos de IL-4 e IL-5 em relação aos pacientes hepatoesplênicos. Além disso, esses mesmos indivíduos produziram maiores níveis de IL-10 do que os pacientes fibróticos e hepatoesplênicos. Estes resultados reforçaram o já descrito papel imunoregulador da citocina IL-10.

Uma revisão realizada por Burke e colaboradores (2009) dos vários estudos desenvolvidos com esquistossomose humana evidencia esta afirmativa. Pacientes com esquistossomose intestinal apresentam uma resposta mista do tipo1/tipo2 com altos níveis de IL-4 em comparação aos indivíduos com doença aguda. Pacientes com fibrose hepática exibem um aumento crescente no número de células T produzindo IL-4 e IL-5, mas apresentam uma diminuição da produção de IL-10 por células T em relação aos pacientes crônicos intestinais. Em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica são produzidos altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10.

Estudos em modelos experimentais e humanos indicam que a interleucina-13 (IL-13) desempenha um importante papel no desenvolvimento da fibrose, estimulando a formação do colágeno, enquanto o interferon- γ (IFN- γ) exerce um efeito contrário ao da IL-13, por inibir a síntese e a deposição do colágeno, sendo, portanto, uma citocina antifibrogênica (Martins-Leite et al., 2008; Caldas et al, 2008). A regulação da fibrose durante a esquistossomose é complexa. Pacientes com fibrose grave apresentam altos níveis de TNF- α , IL-5, IL-10 e IL-13, enquanto pacientes que apresentam pouca fibrose produzem altos níveis de IFN- γ . (de Jesus et al, 2004; Henri, et al., 2002). Um estudo feito por Moraes e colaboradores (2008),

em pacientes com esquistossomose aguda e crônica, demonstrou que os níveis de IFN- γ em pacientes agudos foram menores, em relação aos indivíduos crônicos hepatoesplênicos. Os autores acreditam que o aumento do IFN- γ , na fase crônica, não está relacionado à causa da gravidade da doença, mas sim, ao controle da progressão da doença em formas mais graves.

Outra citocina que tem sido associada à formação da fibrose hepática é a interleucina IL-17. Estudos em modelos murinos demonstraram que após a neutralização da IL-17, há numa redução significativa da inflamação hepática. Camundongos CBA infectados, que desenvolvem naturalmente uma grave patologia, produzem níveis elevados da citocina IL-17.(Rutitzky & Stadecker, 2006)

Outra citocina importante na infecção pelo *S. mansoni* é a IL-10. Ao contrário das citocinas IL-13 e IL-17 que são responsáveis pelos quadros graves da esquistossomose, a IL-10 tem um papel importante na modulação da resposta imune, impedindo o agravamento da doença. Vários estudos já comprovaram o papel regulador da citocina IL-10. Um trabalho realizado por Araújo e colaboradores (1996) demonstra que em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados moradores de áreas endêmicas quando adicionada a citocina IL-10, houve supressão da proliferação de linfócitos e da produção de IFN- γ , em resposta ao SWAP, indicando o papel regulador da IL-10. Outro trabalho realizado por Malaquias e colaboradores (1997), estudou o papel da IL-10 na resposta proliferativa de PBMC de pacientes infectados, utilizando SWAP e SEA. O mesmo pôde demonstrar que bloqueando a ação da IL-10, pela adição de anticorpos monoclonais anti-IL-10, a resposta proliferativa de PBMC aumenta em indivíduos com esquistossomose crônica intestinal. O contrário acontece com indivíduos em fase aguda ou portadores de doença crônica com complicações hepatoesplênicas, em que não se observa nenhum efeito após adição de anti IL-10 na cultura de PBMC. Isso sugere que a IL-10 é importante na modulação da resposta do tipo 2 em pacientes assintomáticos crônicos. Mais tarde, em um estudo realizado pelo mesmo grupo, foi avaliado o papel da IL-10 na formação do granuloma *in vitro* utilizando PBMC de pacientes de diferentes formas clínicas incubados com *beads* recobertas por SEA. Os resultados demonstraram que a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-10 na cultura de PBMC de indivíduos agudos não resultou em alteração significativa do tamanho do granuloma, porém, na cultura de PBMC de indivíduos com a forma crônica intestinal houve um aumento do tamanho do granuloma, demonstrando que

a citocina IL-10 tem importante papel no controle da morbidade da doença (Falcão et al., 1998)

Acredita-se que a IL-10 diminua a proliferação celular por inibir a expressão da molécula de MHC de classe II ou da molécula coestimuladora B7 (Mahanty e Nutman, 1995). Além disso, um estudo feito por Sadler e colaboradores (2003) com camundongos deficientes em IL-10 mostrou que a citocina tem papel fundamental na transição da fase aguda da doença para a crônica, já que a mesma desencadeia a transição entre o estado de grande proliferação celular e produção de citocinas (fase aguda), para um estado hiporresponsivo (fase crônica). Uma vez estabelecida essa situação, outros fatores podem contribuir para a manutenção desse estado. Portanto, na fase crônica, a resposta do tipo 2, tanto em murinos quanto em humanos, é modulada pela IL-10 (Abath et al, 2006).

Indivíduos moradores de áreas endêmicas, constantemente, são afetados por novas infecções pelo *S. mansoni*, por isso o estudo da resposta imune decorrente da reinfecção pelo parasito é importante para ampliar o conhecimento da imunobiologia da doença. Nesse sentido, Farah e colaboradores (2000) estudaram a resposta imune em camundongos primoinfectados e tratados, após uma segunda infecção, avaliando a produção de citocinas e imunoglobulinas, e o tamanho dos granulomas formados. Os autores observaram uma redução importante da morbidade da doença durante a reinfecção, além disso, o perfil de citocinas produzidos por esplenócitos após a reinfecção, quando estimulados com SEA, foi influenciado pelos padrões da exposição primária de cercárias: camundongos previamente infectados com uma única grande dose de cercária e, em seguida, tratados, desenvolveram uma resposta do tipo 1 dominante, com elevada produção de IFN- γ . Em contrapartida, camundongos expostos a pequenas doses de cercárias na infecção anterior, desenvolvem uma elevada resposta do tipo 2, principalmente pela produção de IL-5.

Trabalhos relacionados à resposta imunológica frente à reinfecção pelo parasita, em humanos e camundongos, indicam que a resposta do tipo 2 está associada com a resistência à reinfecção pelo *Schistosoma* (Caldas et al, 2008; Farah et al., 2000). Do mesmo modo, altos níveis de IgE, específico para antígenos do parasita, estão associados aos casos de resistência à reinfecção. Foi observado que os níveis de IgE anti SWAP, aumentam após tratamento (Walter et. al., 2006). Nas áreas endêmicas, onde as reinfecções são constantes, os indivíduos adultos apresentam maior resistência à estas reinfecções do que as crianças, já que

apresentam um maior nível de IgE (Walter et. al., 2006; Dunne et. al, 1992). Um importante mecanismo envolvido na eliminação do parasita é mediado por IgE e eosinófilos. Na presença de IgE, eosinófilos podem matar e eliminar larvas de *S. mansoni* pelo processo de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) (Nutten et. al.,1997). Diferentemente de IgE, o isotipo IgG4 bloqueia a ADCC independente do estado de ativação de eosinófilos e, por isso, o mesmo tem sido associado à suscetibilidade a reinfecção (Khalife et. al.,1989). Os níveis de IgG4 contra SEA é maior em indivíduos com fibrose, se comparado aos indivíduos com esquistossomose menos grave (Silveira et. al., 2002).

A diversidade de tipos de respostas imunológicas encontradas nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* reflete a complexidade do ciclo de vida do parasito. O desenvolvimento do *S. mansoni* é caracterizado pela presença de diferentes formas evolutivas do parasita, os quais ocupam diferentes nichos dentro do hospedeiro definitivo. Esse processo implica na formação de uma, também, complexa e diversificada resposta imune por parte do hospedeiro em resposta à presença do parasito. Nesse sentido, os trabalhos voltados à avaliação da resposta imune frente à infecção pelo *S. mansoni*, se mostram de grande importância para o melhor entendimento dessa complexa relação parasito-hospedeiro o que, por sua vez, poderá trazer importantes informações acerca do controle da infecção.

1.5 Camundongos como modelos experimentais no estudo da Esquistossomose

Estudos realizados com o objetivo de se entender as peculiaridades que perfazem a biologia do *Schistosoma mansoni* e sua complexa interação com seus hospedeiros, requerem, inevitavelmente, o uso de animais experimentais. Características anatomopatológicas, patofisiológicas e imunológicas decorrentes da infecção por *S. mansoni* foram, e são, intensamente estudadas utilizando animais de laboratório, principalmente, roedores e primatas, já que diversas questões éticas e metodológicas impedem o uso de seres humanos em estudos acerca de tais características (Cheever et al., 2002; Farah et al., 2001).

Os roedores, principalmente camundongos isogênicos (*inbred*), têm sido os animais de escolha para o estudo da esquistossomose experimental, pois são de

fácil obtenção, reproduzem-se facilmente e são susceptíveis à infecção experimental (Cheever et al., 2002).

A linhagem C57BL/6 é a mais usada dentre as linhagens isogênicas e foi a primeira a ter seu genoma sequenciado. É utilizada em várias áreas da pesquisa, incluindo a biologia cardiovascular, diabetes, obesidade, neurobiologia, genética e imunologia. As características da linhagem compreendem: uma alta suscetibilidade à obesidade induzida por dieta, diabetes tipo 2 e aterosclerose; baixa densidade óssea; haplótipo MHC do tipo H-2^b e perda tardia de audição. Em relação às doenças infecciosas, a linhagem C57BL/6 apresenta resistência ao desenvolvimento da cardiopatia crônica após infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, e às infecções por *Leishmania* e *Herpes simplex* vírus, e apresenta alta suscetibilidade ao *Plasmodium berghei* e à hepatite murina (vírus tipo 3) (The Jackson Laboratory, 1998).

A linhagem BALB/c também representa uma das linhagens *inbred* mais utilizadas na pesquisa. A mesma é bem conhecida pela produção de plasmacitomas, após injeção de óleo mineral, os quais formam a base da produção de anticorpos monoclonais. Dentre as características gerais da linhagem estão: a presença do haplótipo MHC do tipo H-2^d e o desenvolvimento de cânceres de pulmão e renal no final da vida. Os camundongos BALB/c ainda apresentam relativa resistência por infecções naturais por helmintos intestinais e pela infecção por *Plasmodium berghei*, e é suscetível ao desenvolvimento da cardiopatia crônica em decorrência da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, e às infecções por *Leishmania* e hepatite murina (vírus tipo 3) (The Jackson Laboratory, 1998).

Em relação à infecção pelo *S. mansoni*, os camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentam uma moderada patologia, com leves lesões granulomatosas (Stadecker et al., 2004). Apesar de possuírem várias semelhanças com os seres humanos em relação às características da inflamação granulomatosa e da resposta imune frente à infecção por *S. mansoni*, os camundongos apresentam várias diferenças que necessitam ser consideradas. (Abdul-Ghani e Hassan, 2010)

Para Abath e colaboradores (2006) e Cheever e colaboradores (2002), dentre essas diferenças, estão as características relacionadas à cronicidade da doença, quantidade e qualidade da infecção e fatores genéticos. A intensidade da infecção na esquistossomose experimental é, em geral, muito alta, e feita em uma única exposição ao parasito, ao contrário da maioria das infecções humanas que é adquirida, gradualmente, através dos anos. Além disso, o tempo e a dose da

infecção são bem determinados nos modelos experimentais, fato difícil de definir nos humanos. A cronicidade da doença nos humanos também não pode ser bem reproduzida na maioria dos modelos experimentais. Mesmo que uma ou duas semanas de vida em camundongos possa representar um ano de vida em humanos, o cálculo de equivalência não é certo. Outra diferença é que o *background* genético da população humana é extremamente heterogêneo, ao contrário dos animais utilizados nos experimentos, os quais, em sua maioria, são animais *inbred*. Além disso, a maioria dos humanos expostos ao parasito nasce de mães que já tiveram ou estão com esquistossomose, o que é incomum nos modelos experimentais.

Apesar das diferenças, o uso de modelos experimentais, principalmente camundongos, é extremamente necessário ao contínuo processo de busca por novos conhecimentos sobre a esquistossomose, principalmente, aqueles ligados ao controle da doença, à pesquisa por novas drogas e ao desenvolvimento de vacinas.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no entendimento da imunobiologia da esquistossomose, o controle da doença ainda é um constante desafio para as instituições de saúde de países onde a doença é endêmica. Excluindo os fatores socioeconômicos, as dificuldades no controle da doença podem estar relacionadas à complexa natureza do *Schistosoma mansoni* e à sua, ainda mais complexa, interação com o hospedeiro. O *Schistosoma mansoni*, quando presente no hospedeiro definitivo, passa por diferentes estágios de desenvolvimento até chegar à fase adulta. Tais estágios ocupam diferentes nichos dentro do hospedeiro.

Os esquistossômulos, primeira fase presente no hospedeiro definitivo, após saírem da pele, migram para os pulmões, e de lá, para o sistema porta-hepático. Nesse último, os esquistossômulos se desenvolvem em vermes adultos, e, então, migram para as veias mesentéricas, onde ocorre a deposição dos ovos do parasito, os quais, através da corrente sanguínea, se direcionam para outros órgãos. Assim, as três fases de desenvolvimento do parasito, esquistossômulo, verme adulto e ovo, ocupam múltiplos sítios anatômicos, os quais apresentam específicas características morfológicas, e induzem a uma variada resposta imunológica.

Com o propósito de alcançar o conhecimento dos fatores que permeiam esta complexa interação parasito-hospedeiro e os mecanismos pelos quais o parasito consegue evadir o sistema imune para sua sobrevivência, muitos estudos têm sido realizados. Em tais estudos, o uso de modelos experimentais se mostra essencial, na medida em que as limitações éticas e metodológicas impedem a utilização de seres humanos. Desta maneira, modelos experimentais, principalmente camundongos, frequentemente têm sido utilizados em pesquisas na área da esquistossomose. Semelhanças entre a esquistossomose murina e experimental, relacionadas às características da inflamação granulomatosa e da resposta imune, legitimam o uso destes animais em tais pesquisas.

Além do estudo dos fatores relacionados à infecção pelo *S. mansoni*, é de grande relevância a avaliação dos fatores imunobiológicos decorrentes da reinfecção pelo parasito, já que nas áreas endêmicas, a presença constante do *S. mansoni* torna, os moradores destas regiões, suscetíveis à diversas reinfecções ao

longo da vida. Assim, os estudos destinados a avaliação da reinfecção se faz importante para transpor a realidade vivida por essas populações na esquistossomose experimental.

Com base nas discussões apresentadas, é de extrema relevância o estudo da resposta imunológica desencadeada pela infecção e reinfecção pelo *S. mansoni* em modelos experimentais de distintas linhagens, a fim de identificar diferenças entre as linhagens capazes de justificar a escolha de cada uma delas em estudos de imunidade induzida por vacina ou de terapêutica com drogas. Nesse sentido, o presente trabalho objetiva estudar a resposta imune na infecção e reinfecção pelo *S. mansoni* em duas linhagens murinas distintas, rotineiramente utilizadas na pesquisa: BALB/c e C57BL/6.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros celulares e humorais da resposta imune, bem como os parâmetros parasitológicos, associados ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo após a infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, nas linhagens murinas BALB/c e C57BL/6.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a carga parasitária resultante da infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, através da determinação do número de vermes recuperados por perfusão e número de ovos nas fezes, no fígado e intestino, das linhagens BALB/c e C57BL/6.

- Avaliar o perfil de imunoglobulinas, através de LISA, produzidas em resposta à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, utilizando soro de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c nos tempos 3, 7, 15, 30, 60, 110 dias pós-infecção/reinfecção.

- Avaliar o perfil de citocinas, produzidos por esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6, 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 dias após infecção e reinfecção pelo *Schistosoma mansoni*.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6, BALB/c e Swiss webster provenientes do Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), com aproximadamente, 6 semanas de idade, para as linhagens C57BL/6 e BALB/c, e 8 semanas para os camundongos Swiss. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do CPqRR.

Os procedimentos utilizados neste projeto que requereram o uso de camundongos foram licenciados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, sob a licença nº LW-17/09 (anexo 1).

4.2 Cepa de *Schistosoma mansoni*

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) de *S. mansoni*. A mesma foi fornecida pelo Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), onde é mantida por passagem em caramujo *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss ou Balb-c. As cercárias foram obtidas através da exposição de caramujos infectados à luz por 1 a 2 horas, a fim de permitir a liberação das mesmas.

4.3 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos experimentais: A e B (tabela 1). Os animais pertencentes ao grupo A foram utilizados para os estudos da resposta imune, frente à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*. Já os animais do grupo B foram utilizados para os estudos parasitológicos nas situações de infecção e reinfecção pelo parasito. A figura a seguir (figura 2) demonstra o delineamento experimental.

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupo	Subgrupo	Infeção 30 cercárias	Tratamento Praziquantel 400mg/Kg	Reinfecção 30 cercárias	Nº de animais
A	CNI – Camundongos C57BL/6 não infectados	—	—	—	35
	CI – Camundongos C57BL/6 infectados	X	—	—	35
	CIT – camundongos C57BL/6 infectados e tratados	X	X	—	35
	CRI – Camundongos C57BL/6 reinfectedados	X	X	X	35
	BNI – Camundongos Balb/c não infectados	—	—	—	35
	BI – Camundongos BALB/c infectados	X	—	—	35
	BIT – camundongos BALB/c infectados e tratados	X	X	—	35
	BRI – Camundongos BALB/c reinfectedados	X	X	X	35
B	CI – Camundongos C57BL/6 infectados	X	—	—	15
	CRI – Camundongos C57BL/6 reinfectedados	X	X	X	15
	BI – Camundongos BALB/c infectados	X	—	—	15
	BRI – Camundongos BALB/c reinfectedados	X	X	X	15

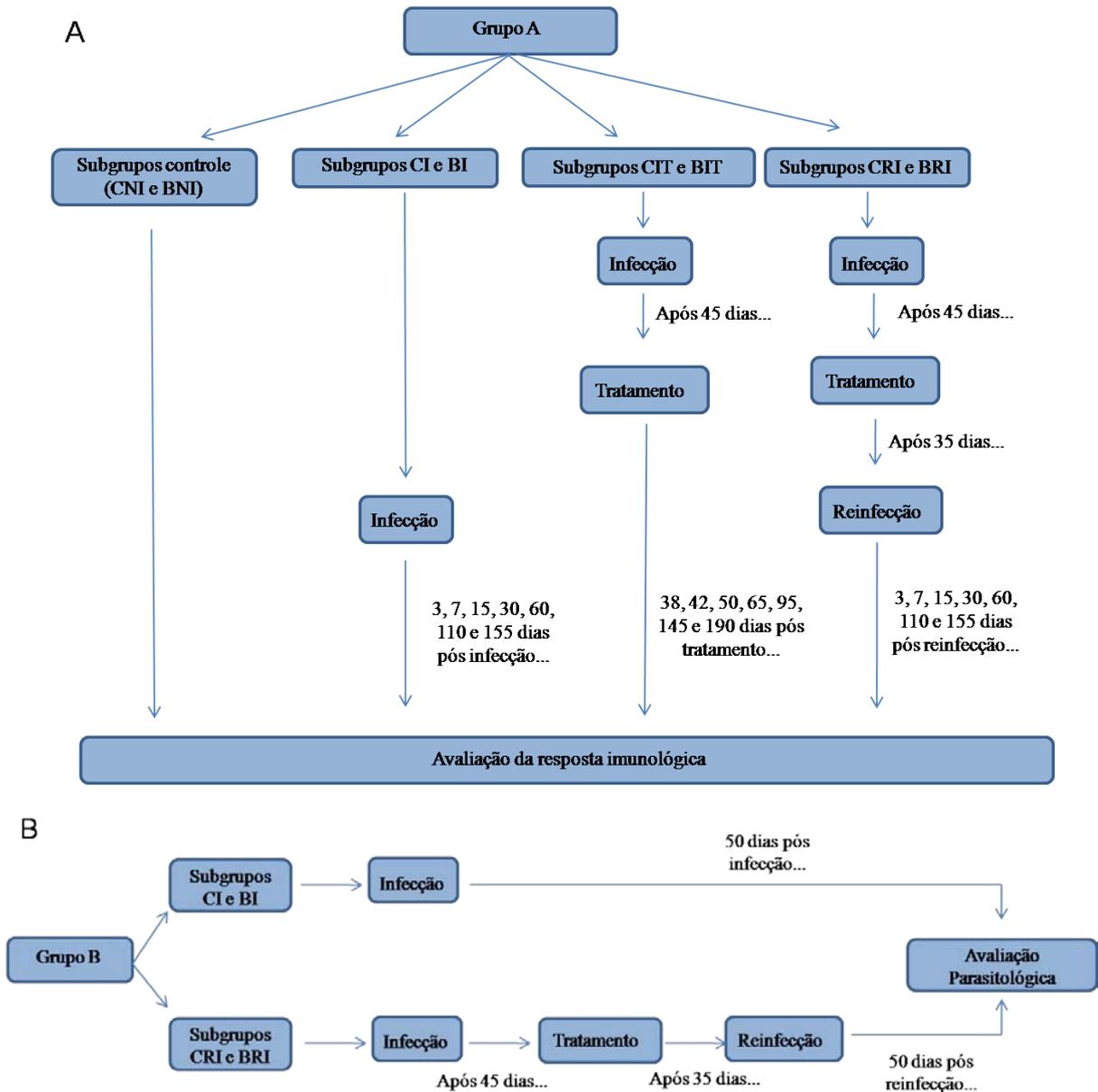


Figura 2 -Desenho experimental dos ensaios relacionados à avaliação imunológica (A) e à avaliação parasitológica (B). Os animais dos subgrupos CI e BI (C57BL/6 e BALB/c infectados), do grupo A, foram infectados, e nos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 pós-infecção foram utilizados para avaliação imunológica. Os subgrupos CRI e BRI (C57BL/6 e BALB/c reinfecção) foram infectados, tratados (45 dias pós-infecção) e reinfecção (35 dias pós-tratamento), para serem avaliados quanto as características imunológicas nos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 pós-reinfecção. Já os subgrupos CIT e BIT (C57BL/6 e BALB/c infectados e tratados) foram infectados e tratados 45 dias pós-infecção, sendo a avaliação imunológica realizada nos dias 38,42, 50, 65, 95, 145 e 190 pós-tratamento (correspondente aos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 pós-reinfecção dos subgrupos CRI e BRI). No grupo B, os animais dos subgrupos CI e BI foram infectados e avaliados quanto às características parasitológicas, 50 dias pós-infecção. Já os animais dos subgrupos CRI e BRI, do grupo B, foram infectados, tratados (45 dias pós-infecção) e reinfecção (35 dias pós-tratamento), para a realização da avaliação parasitológica.

4.4 Infecção dos animais

A infecção dos grupos de camundongos, descritos em 4.3, foi realizada pela via percutânea cuja escolha se justifica pois a mesma mimetiza a via de infecção em seres humanos. Para realização da infecção percutânea, um dia antes da infecção, os camundongos tiveram os pelos da região abdominal removidos com o auxílio de uma gilete. Após a remoção dos pelos, os camundongos foram mantidos em gaiolas sem maravalha, contendo uma grade que os separava do fundo da gaiola onde ficam depositadas as fezes e urina dos mesmos. No momento da infecção, os animais foram anestesiados com uma mistura dos anestésicos Cloridrato de Xilasina (na dosagem de 10mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (115mg/Kg), via intraperitoneal, e imobilizados com as patas presas à mesa, com auxílio de esparadrapo. Em seguida, foi colocado sobre o abdômen dos animais uma placa de acrílico perfurada no centro onde foi depositado 200ul de uma solução contendo, aproximadamente, 30 cercárias de *S. mansoni* da cepa LE. Após o período de 1 hora, foram retirados o esparadrapo e a placa de acrílico, e os camundongos colocados de volta na gaiola sobre a grade de metal, conforme descrito anteriormente. Apenas no dia seguinte os camundongos foram colocados em gaiolas contendo maravalha.

4.5 Tratamento dos animais

Decorridos 45 dias da infecção, os animais descritos em 4.3, selecionados para receber tratamento, foram tratados com dose única de 400mg/kg de peso de Praziquantel. Os comprimidos de Praziquantel foram pesados e, posteriormente, foi realizado o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente). Com ajuda de pistilo, os comprimidos foram macerados e diluídos em água. A droga foi administrada com auxílio de uma seringa de insulina acoplada a uma agulha especial para gavagem, em aço inox, com 3 cm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro, permitindo que o líquido fosse injetado diretamente no estômago do animal.

4.6 Obtenção de antígenos

Antígenos de diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni* no hospedeiro definitivo: ovo (SEA), esquistossômulo (Ag. de esquistossômulo) e verme adulto (AWA), foram preparados para serem utilizados, nos experimentos de avaliação imunológica, como estímulos nos experimentos de cultura de esplenócitos e nos ELISAs dos camundongos do grupo A, descritos em 4.3.

4.6.1 SEA e AWA

Foram utilizados 300 camundongos Swiss fêmeas de 8 semanas, as quais foram infectadas com 100 cercárias do *S. mansoni*, por via subcutânea. Para essa infecção, as cercárias obtidas como descrito em 4.2, foram contadas e ajustadas para que em 200 μ L de solução fossem encontradas, aproximadamente, 100 cercárias. A inoculação foi realizada no dorso dos camundongos com auxílio de uma seringa de vidro acoplada a uma agulha de 21 G. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados por descolamento cervical, e foi realizada a perfusão do sistema porta hepático, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Resumidamente, a perfusão é realizada expondo o conteúdo visceral e separando fígado e mesentério pela secção da ligadura da veia renal e a veia porta. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), solução salina 0,85% heparinizada foi injetada na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes. Durante a perfusão, também foram retirados os fígados dos camundongos contendo ovos de *S. mansoni*. Os vermes adultos recuperados na perfusão foram processados para a obtenção do antígeno AWA. Em resumo, a técnica de obtenção do AWA consiste em triturar os vermes adultos para obtenção dos antígenos. Os vermes foram triturados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Virtiz) por trinta segundos por trinta e seis vezes, alternando com descanso no gelo por sessenta segundos. A suspensão então foi centrifugada (4°C/1h/340g) e o sobrenadante dialisado (salina 0,9%, por 48h/4°C). Após a diálise o material foi novamente centrifugado (4°C/15 min./1258g) e o sobrenadante, contendo os antígenos foi recolhido para ser esterilizado e dosado. Já os fígados dos animais, contendo ovos, foram utilizados para a obtenção do

antígeno SEA, segundo Carter e Colley (1978). Neste processo os fígados foram triturados com salina (0,85%) em liquidificador, sendo que a massa obtida foi passada em 4 peneiras com poros de diferentes espessuras e lavada com salina, através de processo de sedimentação, até que restassem somente ovos no sedimento. Logo após, os ovos foram triturados, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Virtiz) por quarenta minutos, no gelo, e centrifugados (4°C/1h/340g). Após centrifugado, o sobrenadante, contendo o SEA, foi dialisado (salina 0,9%, por 48h/4°C), esterilizado e dosado. Ambos os antígenos (AWA e SEA) foram esterilizados através de filtração por filtro de seringa de 0,22µm e dosados através do método de Bradford (1976).

4.6.2 Antígeno de esquistossômulo

Para o preparo do antígeno de esquistossômulo, cercárias foram obtidas conforme a descrição em 4.2, e processadas para que as mesmas pudessem transformar em esquistossômulos, pelo método descrito por Ramalho-Pinto e colaboradores (1974). Após a transformação, o antígeno de esquistossômulo foi preparado através da mesma técnica utilizada para a obtenção do antígeno AWA, conforme descrição em 4.6.1. O antígeno foi esterilizado através de filtração por filtro de seringa de 0,22 µm e dosado através do método de Bradford (1976).

4.7 Avaliação parasitológica

A fim de comparar aspectos parasitológicos, quanto ao número de vermes recuperados, número de ovos nas fezes e tecidos e alterações no peso corporal dos animais, após a infecção e reinfecção pelo *S. mansoni* nas linhagens Balb-c e C57BL-6, foram utilizados os animais do grupo B, descrito em 4.3.

4.7.1 Número de vermes recuperados

Cinquenta dias após a infecção/reinfecção, os camundongos foram eutanasiados por descolamento cervical, e foi realizada a perfusão do sistema porta hepático desses animais, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira

(1956). Os vermes recuperados foram contados com auxílio de uma lupa, separando-os em machos e fêmeas.

4.7.2 Número de ovos

4.7.2.1 HPJ

Este método, descrito por Hoffman, Pons e Janner (1934), consiste em avaliar o número de ovos presentes nas fezes dos camundongos. Fezes frescas dos animais do grupo B, descritos em 4.3, foram colhidas no dia do exame, sendo utilizados 0,5g de fezes para cada subgrupo. As fezes foram colocadas em um cálice contendo água desclorada e formol 10%. As mesmas foram trituradas com o auxílio de um bastonete de alumínio e coadas em uma gaze dobrada 4 vezes. O volume do cálice foi completado com água desclorada e formol 10%, e deixado por uma hora para a sedimentação dos ovos. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e novamente, ao recipiente, foi adicionado água desclorada e formol 10%, deixando sedimentar por mais 40 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e a contagem do número de ovos, de todo o sedimento, foi realizada ao microscópio de luz.

Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos, antes da perfusão realizada para a recuperação de vermes presentes no sistema porta hepático, descrita em 4.7.1.

4.7.2.2 Eclosão de Miracídios

Fezes frescas dos animais do grupo B, descritos em 4.3, foram colhidas no dia do exame, sendo utilizados 0,5g de fezes para cada subgrupo. Este procedimento foi realizado segundo a técnica descrita por Juberg e colaboradores (2008), no qual as fezes foram trituradas com o auxílio de um bastonete de alumínio e colocadas em um cálice contendo água desclorada. Essa mistura, então, foi transportada para um Kitasato, sendo, o volume do mesmo, completado com água desclorada a 28°C. Esse recipiente foi exposto à luz por quinze minutos. Após esse período, o Kitasato foi colocado em uma caixa de madeira própria, totalmente vedada, a fim de evitar a entrada de luz por qualquer outro lugar que não fosse

apenas o *container* coletor. A caixa contendo o KITASATO foi exposta à luz por duas horas para que os miracídios eclodidos pudessem se direcionar ao *container* coletor, onde foram acondicionados. Os miracídios, então, foram coletados por pipetagem e depositados em uma placa escavada (placa de Kline) e contados na lupa.

Esse procedimento foi realizado juntamente com o método de HPJ, descrito em 4.7.2.1.

4.7.2.3 Número de ovos contidos no fígado e intestino

Durante a perfusão, descrita em 4.7.1, também foi retirado o fígado e o intestino de cada camundongo. Esses órgãos foram pesados e acondicionados em um béquer com KOH 10% overnight a 4°C. No dia seguinte, os mesmos foram incubados a 37°C durante meia hora em banho-maria. Os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 395g, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por três vezes. Após a última centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos foi contado com o auxílio de um microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 10 µL da solução de cada órgão a fim de se determinar o número de ovos por grama de tecido.

4.7.2.4 Oograma

Após a perfusão para recuperação dos vermes adultos, descrita em 4.7.1, fragmentos do intestino (íleo terminal) de cada animal foram retirados e limpos. Os mesmos fragmentos foram colocados entre uma lâmina de vidro e uma lamínula de plástico e prensados em uma prensa de ferro. As lâminas então foram levadas ao microscópio de luz a fim de se verificar a presença dos ovos e determinar os estádios de desenvolvimento dos mesmos, em cada subgrupo de camundongos.

4.7.3 Acompanhamento do peso dos animais

Após a infecção dos camundongos BALB/c e C57BL/6, do grupo B, descrito em 4.3, o peso dos animais foi acompanhado ao longo da infecção nos 3º, 9º, 21º, 39º dias pós-infecção. Quarenta e cinco dias após infecção, os animais foram

tratados, segundo metodologia descrita em 4.5, sendo realizadas três pesagens após o tratamento nos 13^o, 22^o e 29^o dias pós-tratamento (58^o, 67^o, 74^o dias pós-infecção). Decorridos trinta dias do tratamento, os animais foram reinfecção e foram pesados nos 15^o, 22^o, 32^o, 39^o, 41^o dias pós-reinfecção (90^o, 97^o, 107^o, 114^o e 116^o dias pós-infecção).

4.8 Avaliação do perfil de imunoglobulinas

Nos dias referentes à cultura de esplenócitos, 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o e 110^o dias, pós-infecção/reinfecção, foram selecionados, aleatoriamente, 10 camundongos de cada subgrupo dos grupos A, descritos em 4.3, para a coleta de amostras de sangue. Foram coletados, aproximadamente, 200 µL de sangue, através do plexo retro orbital com o auxílio de uma pipeta pasteur de vidro. Estas amostras foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, e, então, centrifugadas (3220g/5min.) para a obtenção do soro. Os soros foram congelados em freezer e, posteriormente, foram utilizados em ensaios de ELISA para determinação da cinética da resposta humoral frente à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*. Foram dosados os anticorpos anti-IgG total, e seus subtipos anti-IgG1 e anti-IgG2c, específicos para SEA, AWA e Ag. de esquistossômulo, através da técnica de ELISA.

Para a realização do ELISA, placas de microensaio de 96 poços (Nunc-Maxsorp) foram sensibilizadas com 5 µg/mL de SEA, AWA e antígeno de esquistossômulo, em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12 a 16 horas à 4°C. As placas, então, foram bloqueadas, por 2 horas à 37°C (para a dosagem dos anticorpos IgG total e IgG1) ou por 20 horas à 4°C (para o isotipo IgG2c), com 300 µL por poço de PBST₂₀ (phosphate-buffered saline e Tween 20) acrescentado por 2,5% de leite Mólico. Depois de bloqueadas, foram adicionadas às placas as amostras de soros, diluídos a 1:40 em PBST₂₀, em duplicata. Cem microlitros dos soros diluídos foram pipetados em cada poço e as placas foram encubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Logo após, 100 µL por poço dos anticorpos IgG (Southern Biotech) , IgG1 (Southern Biotech) e IgG2c (Southern Biotech), conjugados à peroxidase, diluídos em PBST₂₀, respectivamente, a 1: 15000, 1:20000, 1:4000 foram adicionados às placas. A reação de revelação das placas foi iniciada com a adição de 100 µL/ poço do substrato TMB (single solution-Invitrogen)

e parada com 50 µL/ poço de ácido sulfúrico a 5%. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA.

4.9 Avaliação do perfil de citocinas

A fim de avaliar a resposta celular sistêmica, frente à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, foram realizadas culturas de esplenócitos de camundongos infectados, infectados/tratados e reinfetados, e do grupo controle (camundongos não infectados), para obtenção de sobrenadante, o qual foi utilizado para quantificação das citocinas produzidas.

Os baços dos camundongos do grupo A, descrito em 4.3, foram retirados para obtenção de esplenócitos em diferentes dias pós-infecção e pós-reinfecção. Foram escolhidos os dias referentes ao 3º, 7º, 15º, 30º, 60º, 110º e 155º dia pós-infecção/reinfecção, para avaliar as diferentes fases de desenvolvimento do parasito e da doença, ao longo da infecção/reinfecção.

A cultura dos esplenócitos dos animais dos subgrupos controle (CNI e BNI) e infectado/tratado (CIT e BIT) foram realizadas concomitantemente com os subgrupos infectados (CI e BI) e reinfetados (CRI e BRI). Nos sete dias escolhidos para a realização da cultura, foram eutanasiados 5 camundongos/subgrupo, do grupo A, em cada dia de análise, para retirada do baço.

O baço de cada camundongo foi retirado em capela de fluxo laminar e depositado em salina estéril gelada. Os baços, então, foram macerados, centrifugados (4°C, 10 min., 394g) e as hemácias lisadas pela adição de água apirogênica e posteriormente, PBS 10x. Os esplenócitos foram lavados com salina estéril, novamente centrifugados e ressuspensos com 1 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 3% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina). Os esplenócitos de cada camundongo foram contados em Câmara de Neubauer, sendo a viabilidade das células observadas pelo uso do corante azul de tripan (0,4%).

As células, então, foram distribuídas em placas de cultura com fundo em "U" de 96 poços em uma concentração de 1×10^6 células/poço e submetidas a diferentes estímulos: SEA, AWA e Ag. de Esquistossômulo (5µg/poço), e os controles: positivo - Concanavalina A (1µg/poço), e negativo - meio de cultura. As placas foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Os sobrenadantes das culturas de

esplenócitos foram coletados após 24 (para a quantificação das citocinas IL-4 e TNF- α) e 72 horas (para as citocinas IL-10, IL-17, IL-13, IFN- γ) de incubação, utilizando Kits da R&D System (TNF- α , IL-10 e IL-13) e e-bioscience (IL-4, IFN- γ e IL-17), através de ELISA “sanduíche”, conforme protocolo do fabricante.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 3.03 (San Diego, Ca, USA). Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando: análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey, quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste T de student foi empregado quando comparadas somente duas variáveis, sendo considerado significativa as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal, foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O test Mann-Whitney foi empregado quando comparadas somente duas variáveis. Para tais testes foi considerado significativa as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação parasitológica e acompanhamento do peso

Na avaliação parasitológica, realizada com o objetivo de comparar aspectos parasitológicos tanto após a infecção quanto após a reinfecção pelo *S. mansoni*, nas linhagens BALB/c e C57BL/6, foi determinado o número de vermes recuperados dos animais infectados/reinfectados, o número de ovos presentes nas fezes e tecidos, bem como, foi realizado o acompanhamento do peso corporal dos animais acometidos pela infecção pelo parasito.

Os resultados obtidos através do acompanhamento do peso dos animais demonstraram algumas alterações durante a infecção/tratamento/reinfecção pelo parasito (figura 3).

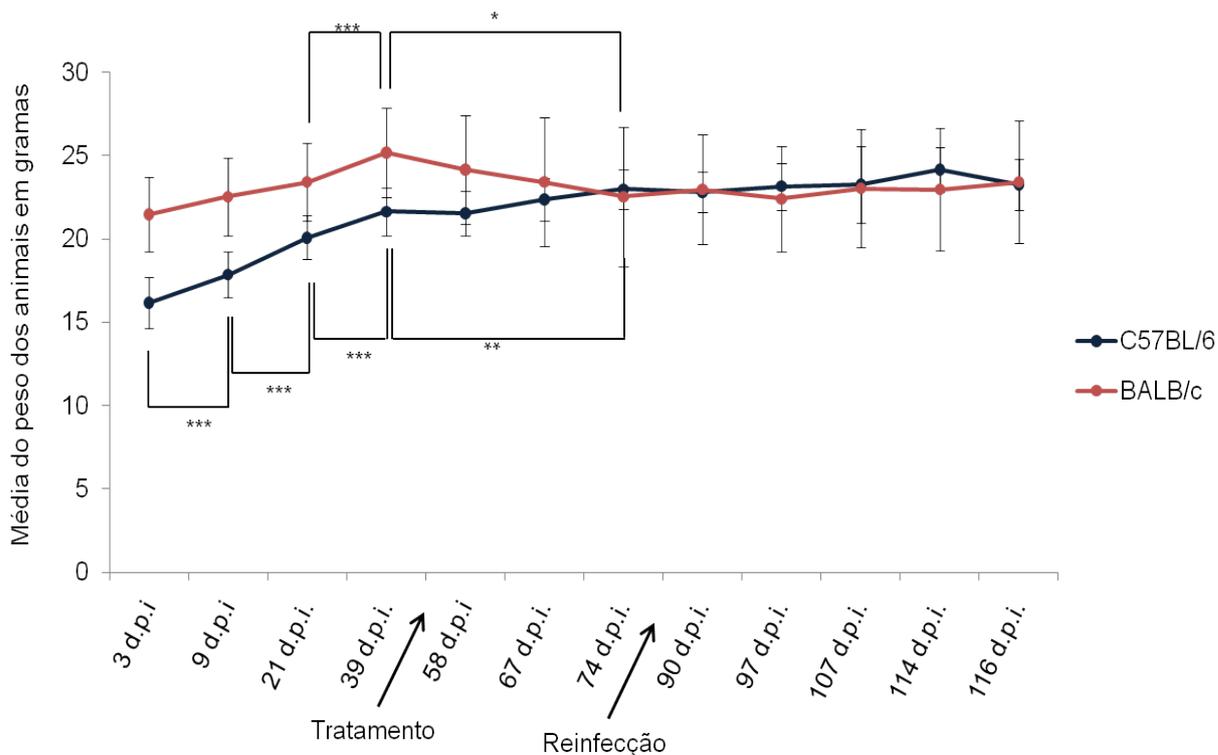


Figura 3 - Acompanhamento do peso corporal dos animais BALB/c e C57BL/6 infectados. Os animais infectados foram submetidos a repetidas pesagens ao longo do tempo de infecção, tratamento e reinfecção pelo *S. mansoni*. Foram realizadas quatro pesagens (3, 9, 21 e 39 d.p.i.) anteriores ao tratamento, três pesagens após o tratamento (58, 67 e 74 d.p.i.) e cinco pesagens pós-reinfecção (90, 97, 107, 114 e 116 d.p.i.). As linhas representam a média + desvio padrão do peso dos

animais. D.p.i.= dias pós-infecção. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$)

Os resultados revelam que ao longo da infecção os camundongos C57BL/6 apresentaram um significativo ganho de peso até o 39º dia pós-infecção. Durante o tratamento, o ganho de peso foi menos evidente, sendo significativo apenas entre os 39º e o 74º dias pós-infecção. Após a reinfecção, o peso destes animais não apresentou alterações significativas. Nos camundongos BALB/c, houve um significativo ganho de peso entre os 21º e o 39º dias pós-infecção. Após o tratamento, observou-se uma redução na média dos pesos dos animais, sendo esta significativa entre os 39º e o 74º dia pós-infecção. Durante a reinfecção, assim como nos camundongos C57BL/6, os animais da linhagem BALB/c não apresentaram alterações significativas no peso corporal.

Em relação ao número de vermes recuperados nos camundongos BALB/c e C57BL/6, após infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de fêmeas, machos e total de vermes entre os animais de mesma linhagem infectados e reinfectedados, ou entre os camundongos das duas linhagens BALB/c e C57BL/6 (figura 4).

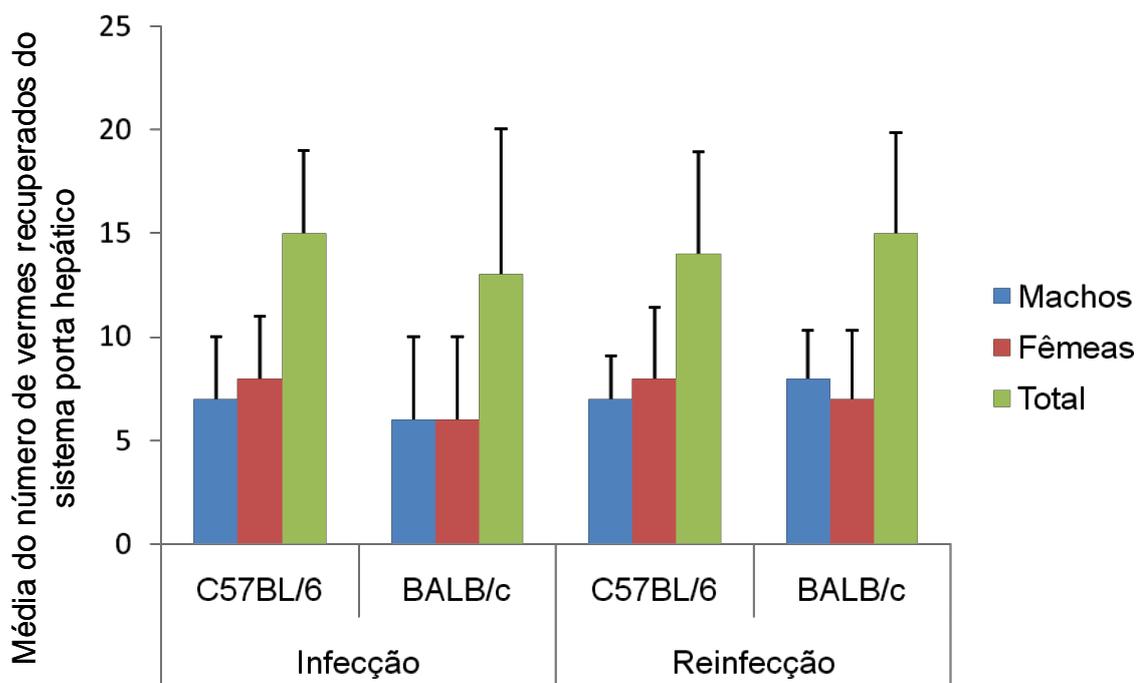


Figura 4 - Número de vermes recuperados nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 após infecção/reinfecção. Quinze animais de cada grupo (grupo de camundongos BALB/c infectados, grupo de camundongos BALB/c reinfectedados, grupo de camundongos C57BL/6 infectados e grupo de camundongos C57BL/6 reinfectedados) foram perfundidos, cinquenta dias após infecção/reinfecção, para recuperação dos vermes presentes no sistema porta hepático de cada

animal. As barras representam a média + desvio padrão do número de vermes recuperados de cada grupo.

O número de ovos e miracídeos presentes nas fezes foi determinado através dos exames de HPJ (figura 5A) e Ecloração de Miracídeos (figura 5B), respectivamente. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre as linhagens quando infectadas ou reinfecadas, ou entre a infecção e reinfecção em uma mesma linhagem.

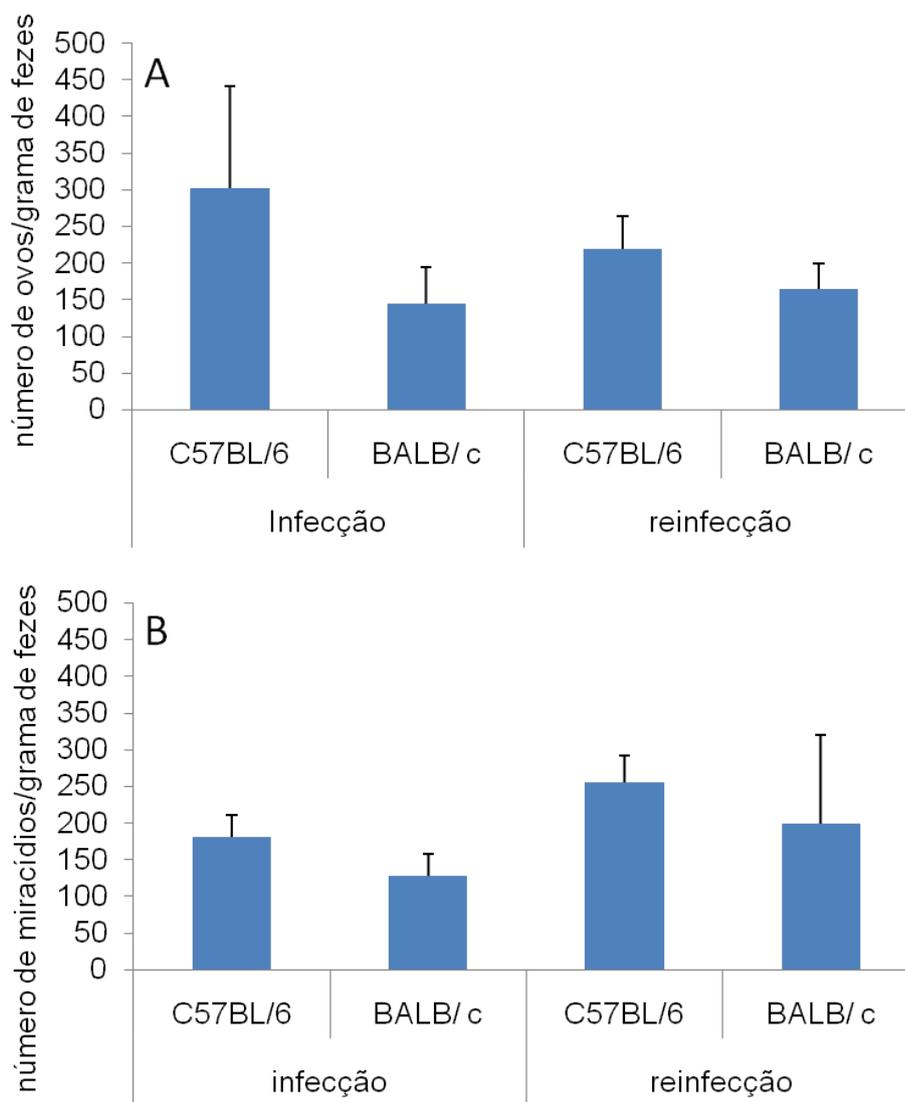


Figura 5 - Exames de fezes HPJ (A) e Ecloração de Miracídeos (B). Fezes de quinze animais de cada grupo (grupo de camundongos BALB/c infectados, grupo de camundongos BALB/c reinfecados, grupo de camundongos C57BL/6 infectados e grupo de camundongos C57BL/6 reinfecados) foram coletadas para a realização dos exames HPJ e Ecloração de Miracídeos. Os exames foram realizados nos dois dias anteriores, e no dia da perfusão e foi determinado o nº de ovos/miracídeos por grama de fezes. As barras representam a média + desvio padrão do número de ovos/miracídeos por grama de fezes.

Quanto ao número de ovos retidos nos órgãos dos camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados ou reinfectedos, os resultados indicam que não houve diferença significativa no número de ovos encontrados no intestino dos animais entre as linhagens e entre as infecções (infecção/reinfecção).

No fígado dos animais BALB/c reinfectedos, o número de ovos se mostrou reduzido em relação aos animais BALB/c infectados, o que se refletiu na redução do total de ovos (fígado + intestino) presentes nos camundongos reinfectedos em relação aos infectados da linhagem BALB/c. Além disso, também houve redução significativa no número de ovos no fígado dos animais BALB/c reinfectedos em relação aos animais C57BL/6 reinfectedos (figura 6).

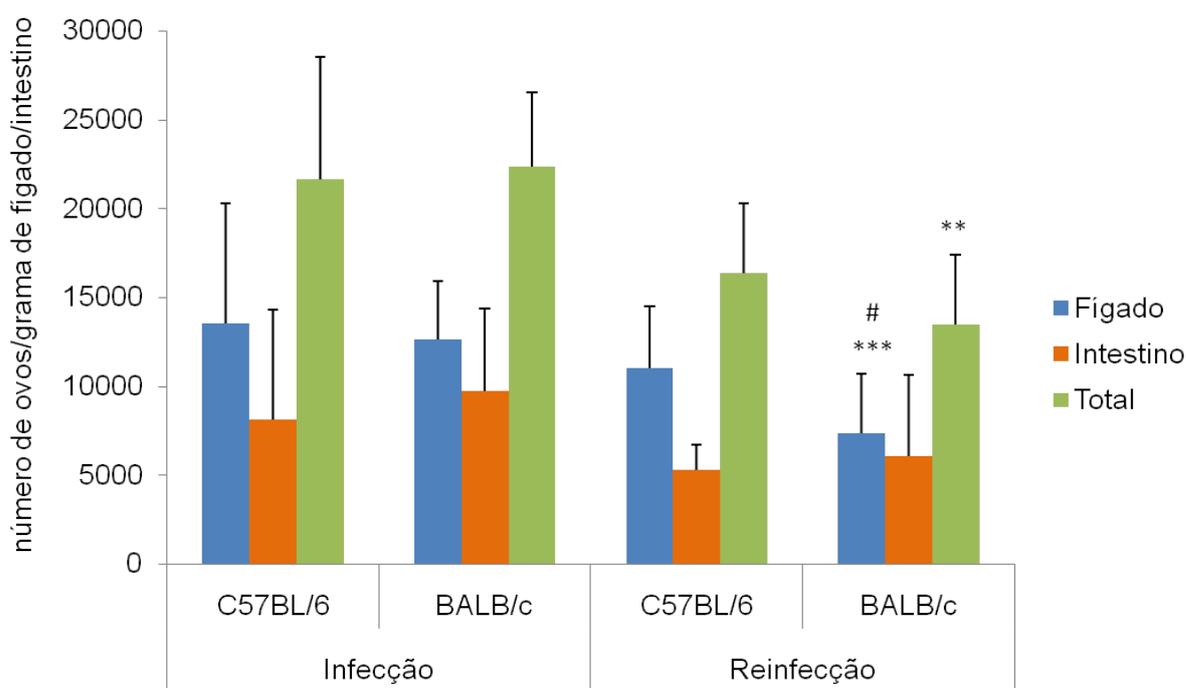


Figura 6 – Número de ovos presentes nos tecidos dos camundongos infectados/reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. Durante a perfusão dos animais de cada grupo (grupo de camundongos BALB/c infectados, grupo de camundongos BALB/c reinfectedos, grupo de camundongos C57BL/6 infectados e grupo de camundongos C57BL/6 reinfectedos) o intestino e o fígado de cada animal foi retirado, pesado e digerido com KOH 10%. O número dos ovos foi contado com o auxílio de um microscópio de luz. As barras representam a média + desvio padrão do número de ovos/grama de fígado (barras azuis), intestino (barras laranjas) ou total (fígado + intestino) (barras verdes). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre a infecção e reinfecção de uma mesma linhagem: ** ($P < 0,01$), *** ($p < 0,001$). # - representa diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens

Em relação aos resultados do oograma foi possível verificar a presença de todos os estádios de desenvolvimento dos ovos no intestino dos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados e reinfectedados, não apresentando, assim, nenhuma alteração no exame (dados não mostrados).

5.2 Avaliação do perfil de imunoglobulinas

A avaliação do perfil de imunoglobulinas produzidas em resposta à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni* foi realizada nos 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o dias pós-infecção/reinfecção. As imunoglobulinas avaliadas foram IgG total, IgG1 e IgG2 específicas para os antígenos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA.

De modo geral, os resultados do perfil de produção de IgG total, IgG1 e IgG2c mostraram que camundongos reinfectedados apresentaram maiores níveis de produção de imunoglobulinas do que os infectados (figuras 7 a 17). Além disso, a produção da imunoglobulina IgG total apresentou poucas ou nenhuma diferença entre os camundongos das duas linhagens infectadas ou reinfectedadas (dados não mostrados). Já a produção de IgG1 foi mais significativa nos camundongos reinfectedados da linhagem BALB/c do que nos animais C57BL/6 reinfectedados (figura 13). O contrário foi observado quando avaliada a produção de IgG2c, já que a produção da imunoglobulina foi mais significativa nos camundongos C57BL/6 reinfectedados do que nos BALB/c reinfectedados (figura 17).

Os resultados da avaliação de IgG total, específica para Ag. de esquistossômulo, na linhagem BALB/c mostrou uma produção ligeiramente maior desta imunoglobulina em camundongos infectados em relação aos camundongos não infectados, sendo que no 110^o dia pós-infecção esta diferença se apresentou estatisticamente significativa. Os camundongos BALB/c infectados/tratados apresentaram produção significativa de IgG total em relação aos camundongos não infectados nos dias 3^o, 15^o, 30^o, 60^o e 110^o pós-infecção/reinfecção, sendo que nos dias 3^o, 15^o, 30^o, 60^o a diferença também foi significativa em relação aos camundongos infectados. Durante a reinfecção, os camundongos BALB/c reinfectedados produziram níveis de IgG significativamente maiores em relação aos camundongos infectados. Da mesma forma, a produção de IgG entre os camundongos reinfectedados e não infectados foi significativa durante todo o tempo

avaliado. Além disso, nos dias 7 e 110 os camundongos reinfectedos produziram níveis significativos de IgG em relação aos animais infectados e tratados (figura 7A).

A avaliação dos níveis de IgG, específico para Ag. de esquistossômulo, na linhagem C57BL/6, mostrou uma produção estatisticamente superior desta imunoglobulina, nos 60^o e 110^o dias pós-infecção, nos camundongos infectados em relação aos não infectados. Camundongos infectados/tratados produziram níveis significativos de IgG em relação aos animais não infectados durante todo o período avaliado, sendo que nos dias 3, 7, 15 e 30 esta diferença foi significativa também em relação aos camundongos infectados. Os animais reinfectedos também apresentaram níveis significativos de IgG em relação aos não infectados durante todo o curso da reinfecção. Em todos os dias avaliados, os animais reinfectedos produziram níveis significativamente maiores da imunoglobulina em relação aos camundongos infectados. Quando comparado com os camundongos infectados/tratados, os animais reinfectedos apresentaram produção significativa de IgG anti antígeno de esquistossômulo nos dias 60 e 110 pós-reinfecção (figura 7B).

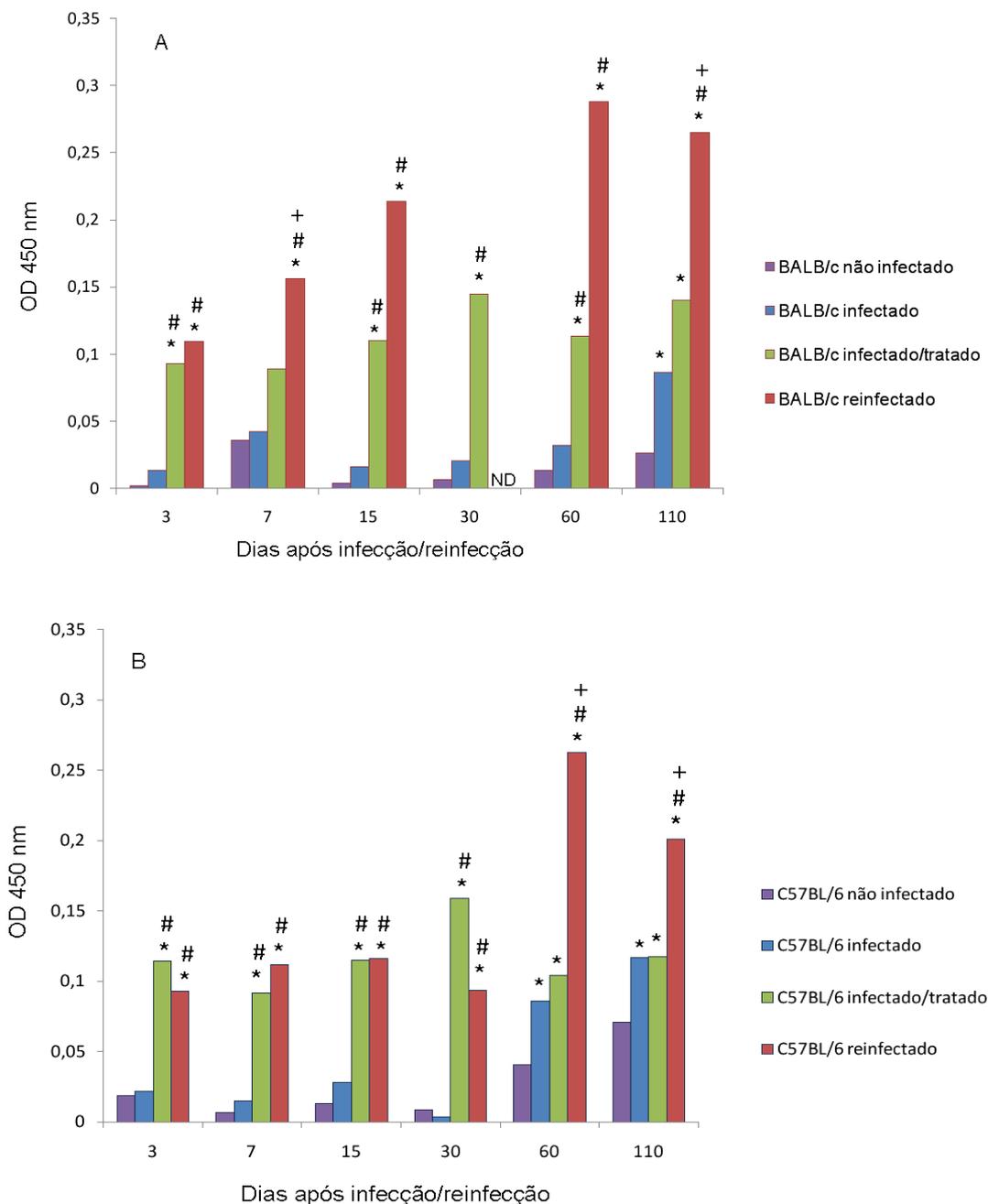


Figura 7 – Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecção. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados. ND = não determinado.

Quando avaliado o nível de IgG total, específico para AWA (figura 8), os camundongos infectados BALB/c e C57BL/6 produziram níveis significativos da imunoglobulina apenas no 110º dia pós-infecção, em relação aos camundongos controle, BALB/c não infectados e C57BL/6 não infectados, respectivamente. Durante todo o período avaliado os animais BALB/c reinfecção, bem como, os

animais da mesma linhagem infectados/tratados apresentaram produção significativa de IgG específico para AWA, tanto em relação aos animais não infectados, como em relação aos camundongos infectados. Além disso, nos dias 15 e 110 pós-reinfecção, animais BALB/c produziram níveis significativos deste anticorpo em relação aos camundongos infectados/tratados (figura 8A).

Os animais C57BL/6 infectados/tratados nos dias 3, 7, 15, 30 e 110 produziram níveis significativos de IgG anti-AWA em relação aos animais não infectados, sendo que nos dias 3, 7, 15 e 30 esta diferença também foi significativa em relação aos animais infectados. Os animais reinfectedados C57BL/6 produziram níveis estatisticamente significativos desta imunoglobulina em relação aos animais não infectados durante toda a reinfecção, sendo que nos dias 60 e 110 a produção também foi significativa em relação aos animais infectados/tratados (figura 8B).

Além disso, durante todo o período avaliado, os animais reinfectedados das duas linhagens apresentaram níveis significativamente maiores da imunoglobulina, se comparado aos animais da mesma linhagem infectados (figura 8).

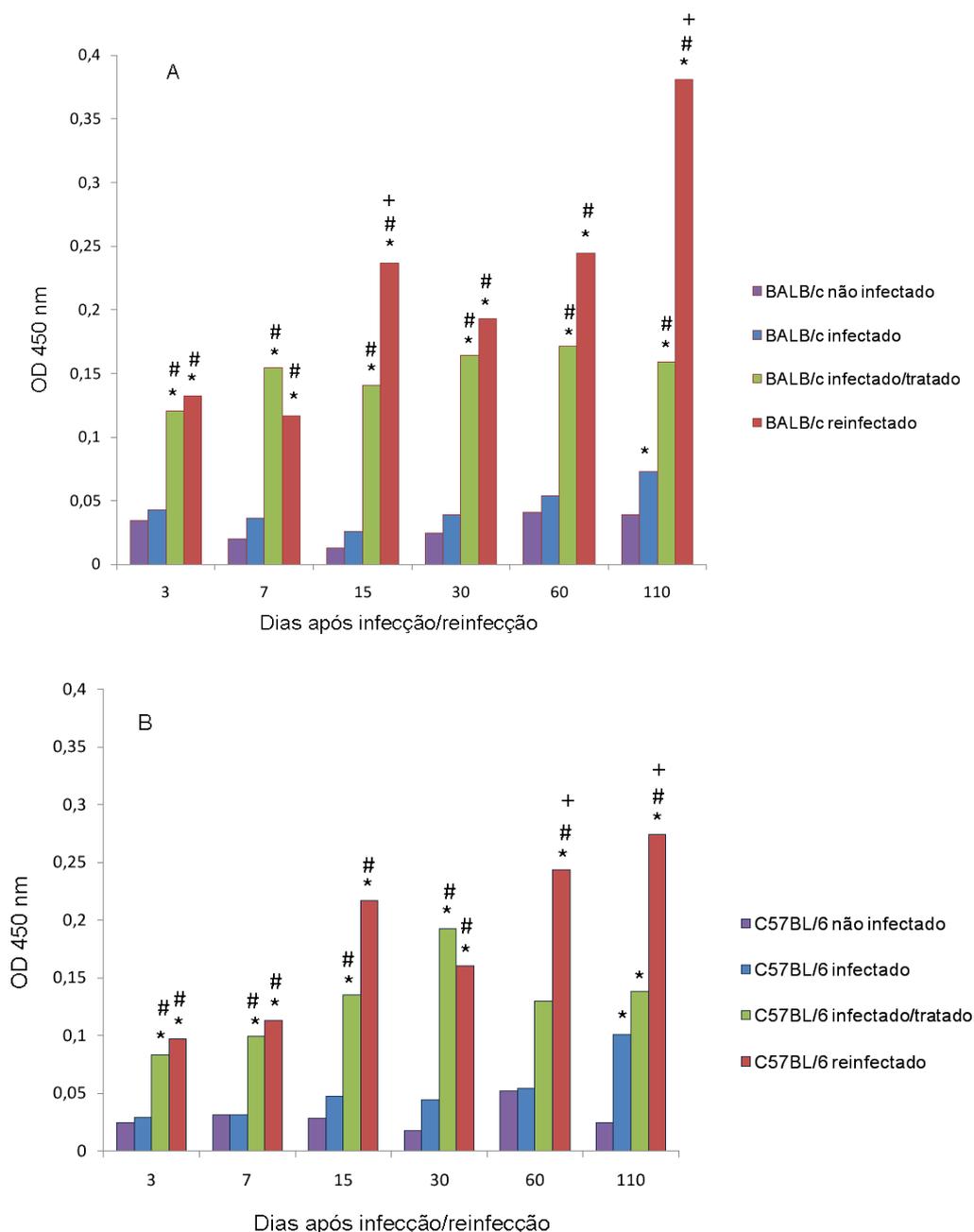


Figura 8 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfectados. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados.

Os resultados da avaliação dos níveis de IgG total, específico para SEA (figura 9), mostraram que os animais infectados da linhagem BALB/c apresentaram níveis significativos da imunoglobulina nos 30^o, 60^o e 110^o dias pós-infecção, se comparados aos animais do grupo controle. Os camundongos infectados/tratados,

quando comparado aos animais não infectados, apresentaram produção significativa desta imunoglobulina ao longo de todo o período avaliado, sendo que nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 pós infecção/reinfecção a produção foi significativa também em relação aos animais infectados. Os animais reinfecção, por sua vez, apresentaram produção significativa, em relação aos animais não infectados, nos seis pontos avaliados. Além disso, no 110^o dia este grupo também apresentou produção significativa em relação aos animais infectados/tratados (figura 9A).

Os resultados observados na linhagem C57BL/6 mostraram a produção de níveis significativos desta imunoglobulina no 110^o dia pós-infecção, nos camundongos infectados em relação aos não infectados. Os animais infectados/tratados C57BL/6, nos 3^o, 7^o, 15^o, 30^o e 60^o dias, apresentaram produção significativa de IgG anti-SEA, quando comparado aos grupos controle e infectado. Além disso, os animais reinfecção C57BL/6 apresentaram uma significativa produção de IgG total, contra SEA, se comparado aos animais não infectados e infectados, da mesma linhagem, ao longo de todo o tempo avaliado, sendo que no 110^o dia a produção foi significativamente maior também em relação aos animais infectados/tratados (figura 9B).

Em ambas as linhagens a produção do anticorpo foi significativamente maior em animais reinfecção do que nos infectados.

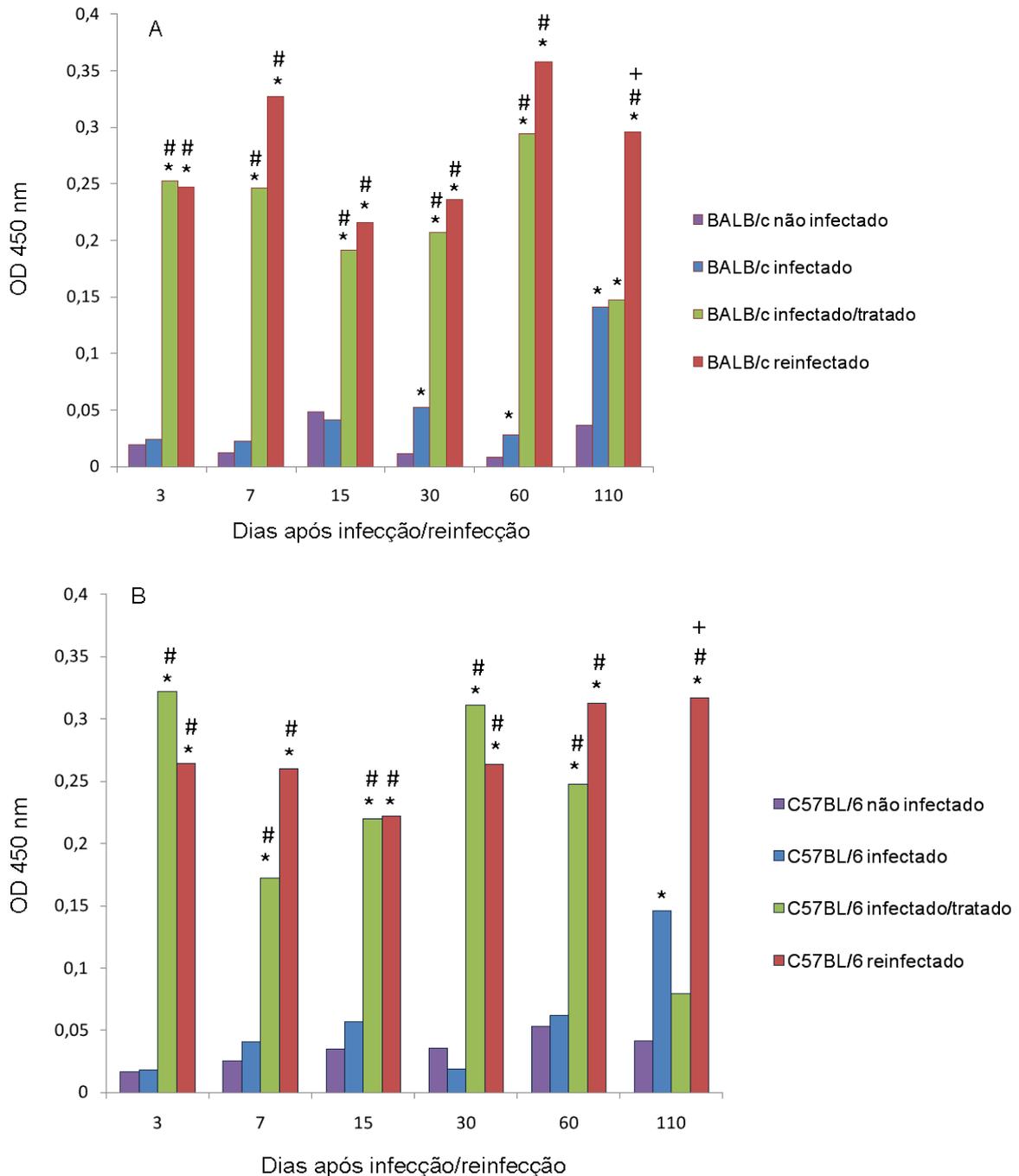


Figura 9 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorvância para imunoglobulinas IgG produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecados. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados

Diferenças entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 infectadas ou reinfecadas também foram avaliadas quanto a produção da imunoglobulina IgG total. Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IgG total entre as linhagens

BALB/c e C57BL/6 infectadas ou entre os animais BALB/c e C57BL/6 reinfectedados (dados não mostrados).

A presença das imunoglobulinas do isotipo IgG1, específicas para os antígenos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA, no soro de camundongos infectados, infectados/tratados e reinfectedados também foi avaliada (figuras 10, 11, 12 e 13).

A produção de IgG1, específica para Ag. de esquistossômulo, em camundongos BALB/c, foi significativamente maior nos camundongos infectados em relação ao seu grupo controle, nos 60^o e 110^o dias pós-infecção. Os camundongos BALB/c infectados/tratados, ao longo dos seis dias avaliados produziram quantidades significativas da imunoglobulina, em comparação aos animais do grupo controle, sendo que no 3^o, 7^o, 15^o, 30^o e 60^o dias, esta diferença também foi significativa em relação aos animais infectados. Os animais reinfectedados da mesma linhagem produziram níveis significativos desta imunoglobulina durante toda a reinfecção, se comparado aos níveis encontrados nos camundongos não infectados. Os camundongos reinfectedados também produziram níveis significativos de IgG1, anti-ag. de esquistossômulo, em relação aos animais infectados, nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 pós-reinfecção. Quando comparado aos animais infectados/tratados, camundongos reinfectedados apresentaram níveis significativos desta imunoglobulina no 3^o, 60^o, 110^o dias (figura 10A).

Nos animais da linhagem C57BL/6 infectados a produção de IgG1 anti-ag. de esquistossômulo, foi significativa no 15^o, 60^o e 110^o dias pós-infecção, em relação ao grupo controle, sendo que no 110^o dia, os níveis de produção foram significativos também em relação aos animais infectados/tratados. Os camundongos infectados/tratados, por sua vez, apresentaram significativa produção desta imunoglobulina, em relação aos animais não infectados, durante todo o período avaliado, sendo que no 3^o, 7^o, 15^o e 30^o dias a produção também foi significativa em relação aos animais infectados. Já nos camundongos C57BL/6 reinfectedados, a produção foi significativa durante todos os dias avaliados, em comparação com o grupo de animais não infectados da linhagem, sendo que nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 a produção foi significativa também em relação aos animais infectados. Além disso, camundongos reinfectedados, no 60^o e 110^o dias pós-reinfecção, a produção foi significativamente maior quando comparado com os animais infectados/tratados (figura 10B).

Tanto os camundongos BALB/c quanto C57BL/6 reinfetados produziram níveis significativos desta imunoglobulina em relação aos animais infectados nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 pós-infecção/reinfecção.

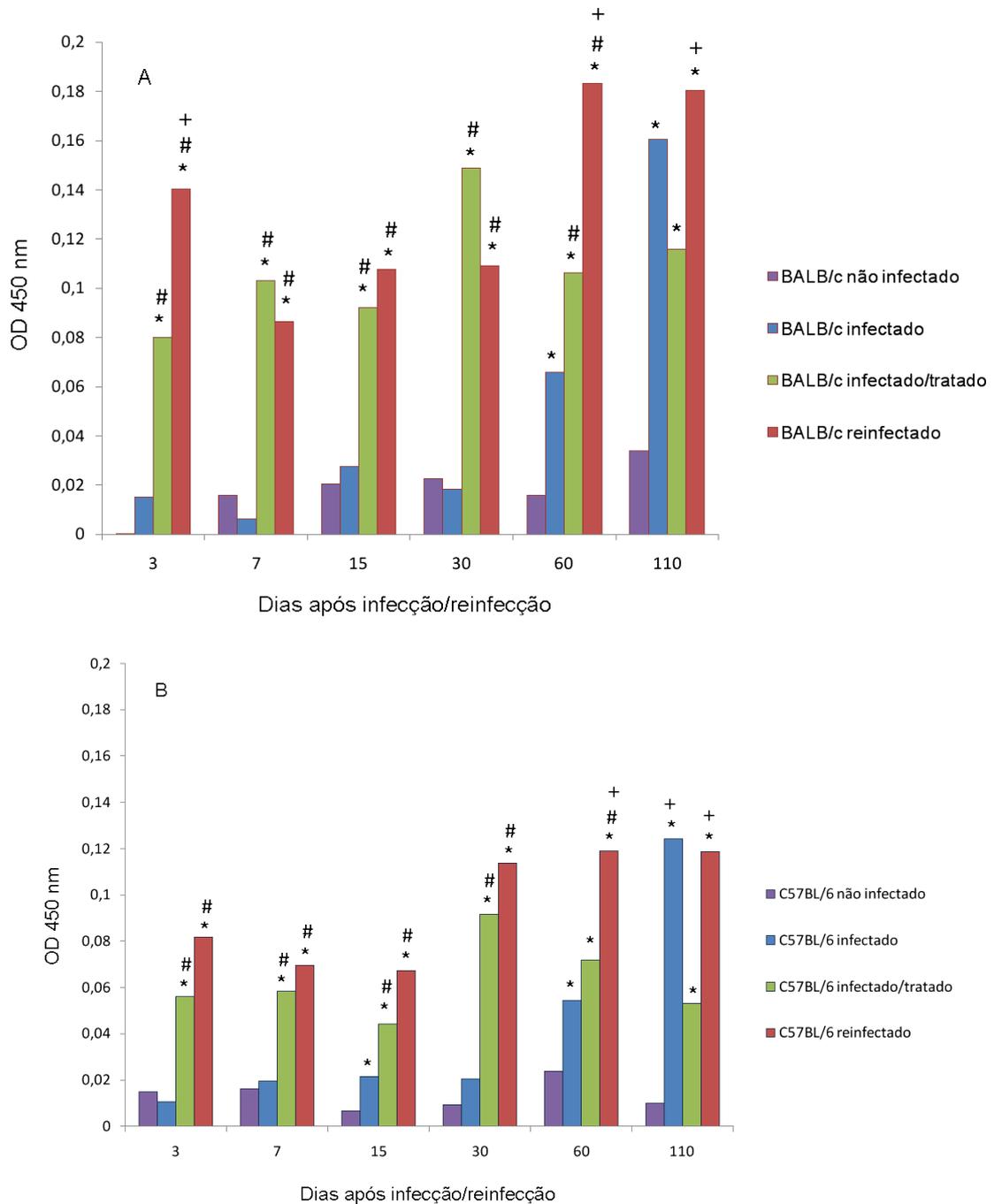


Figura 10 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG1 produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfetados. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados

Quando avaliado o nível de IgG1, específico para AWA (figura 11), os camundongos BALB/c infectados produziram níveis significativos desta imunoglobulina nos dias 15, 60 e 110 pós-infecção, em relação ao controle negativo, sendo que no 110º dia pós-infecção a produção foi significativa também em relação aos animais infectados/tratados. Os animais infectados/tratados, por sua vez, apresentaram produção significativa desta imunoglobulina, em relação aos animais não infectados, ao longo de todo o período avaliado, sendo que nos dias 3, 7, 15, e 30 a produção foi significativa também em relação aos animais infectados. Camundongos BALB/c reinfected produziram níveis significativos de IgG1 anti-AWA, em comparação com os camundongos não infectados, ao longo dos seis dias pós-reinfecção avaliados. Além disso, os camundongos reinfected também produziram níveis significativos desta imunoglobulina nos dias 3, 7, 15, 30 e 60, quando comparados com os animais infectados, e no 110º dia em relação aos animais infectados/tratados (figura 11A). Os animais C57BL/6 infectados produziram níveis significativos de IgG1, específicos para AWA, nos dias 15, 30, 60 e 110 pós-infecção em relação aos animais do grupo controle, sendo que nos dias 60 e 110, a produção foi significativa também em relação aos animais infectados/tratados. Já os animais C57BL/6 infectados/tratados apresentaram produção significativa desta imunoglobulina nos dias 3, 7, 15, e 30, tanto em relação aos animais não infectados, quanto em comparação com os camundongos infectados. Os animais C57BL/6 reinfected apresentaram produção significativa de IgG1 anti-AWA nos dias 3, 7, 15 e 30 pós-reinfecção, em relação aos animais não infectados e infectados, e nos dias 60 e 110, em relação aos animais não infectados e infectados/tratados (figura 11B).

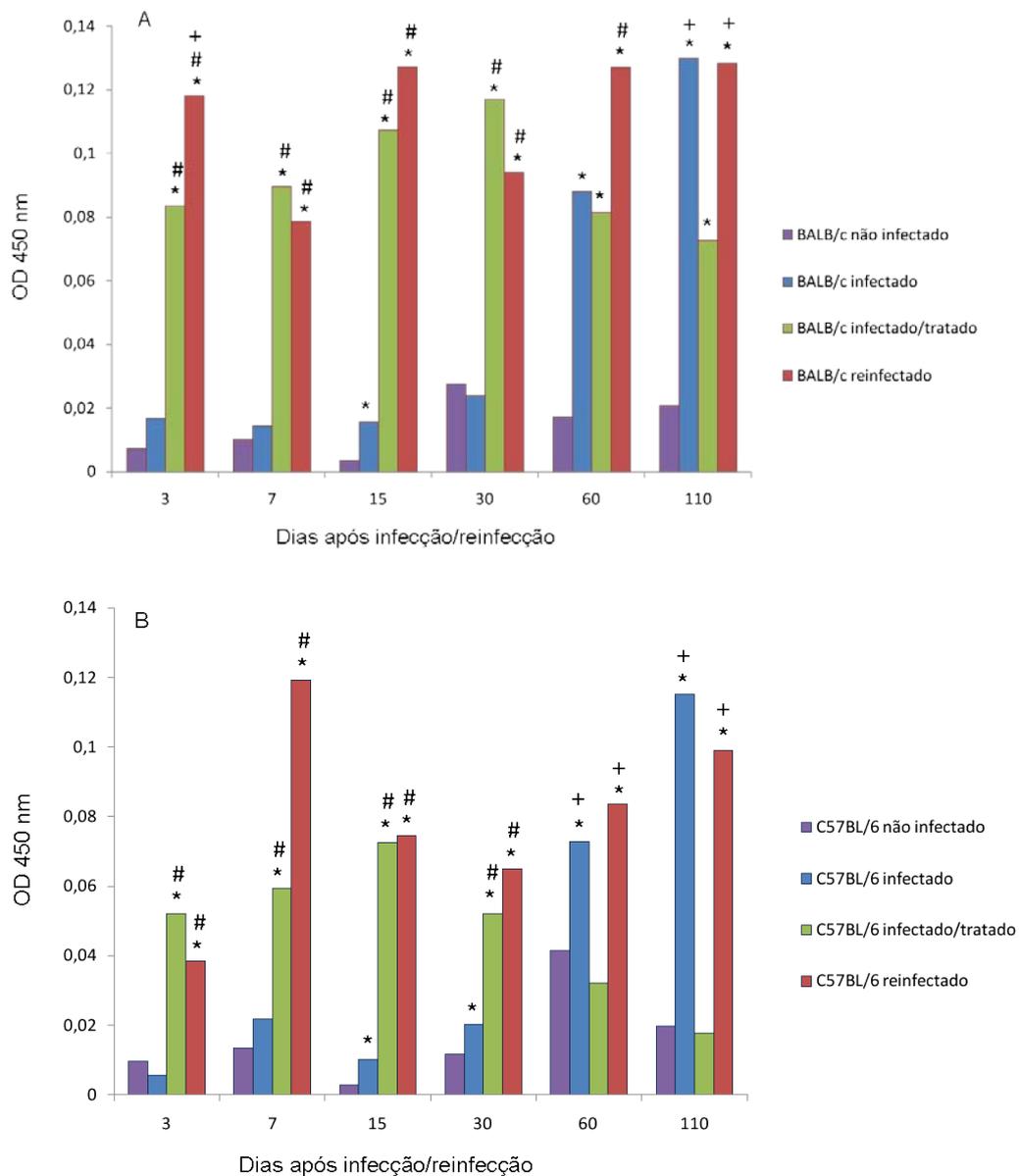


Figura 11 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG1 produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecção. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativa em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados.

Os resultados da avaliação dos níveis de IgG1, específico para SEA (figura 12), mostraram que os animais infectados da linhagem BALB/c apresentaram níveis significativos desta imunoglobulina nos dias 30, 60 e 110 pós-infecção, se comparados aos animais do grupo controle, sendo que no 110º dia a diferença foi significativa também em relação aos animais infectados/tratados. Camundongos infectados/tratados apresentaram maior produção de IgG1 em relação aos animais

não infectados em todos os dias avaliados, sendo que nos dias 7^o, 15^o, 30^o e 60^o, os níveis da imunoglobulina também foram significativos em relação aos animais infectados. Os animais reinfectedos desta linhagem apresentaram produção significativa de IgG1 em relação aos animais não infectados, em todo o período avaliado, sendo que nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 pós-reinfecção os níveis desta imunoglobulina também foram significativos em relação aos animais infectados. Além disso, nos dias 60 e 110 pós-reinfecção a produção de IgG1 anti-SEA também foi estatisticamente maior nos animais reinfectedos em relação aos infectados/tratados (figura 12A).

Os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram níveis significativos de IgG1 no 7^o e no 110^o dia pós-infecção em relação aos animais do grupo controle, sendo que no 110^o dia, a produção foi significativa também em relação aos animais infectados/tratados. Camundongos infectados/tratados apresentaram níveis significativos de IgG1 anti-SEA, em relação aos animais não infectados no 7^o, 30^o e 110^o dias. Já os camundongos C57BL/6 reinfectedos, apresentaram produção significativa desta imunoglobulina nos dias 3, 7, 30, 60 e 110 pós-reinfecção, quando comparado aos animais controle negativo ou quando comparado aos animais infectados, sendo que nos dias 60 e 110 a produção foi significativa também em relação aos animais infectados/tratados (figura 12B).

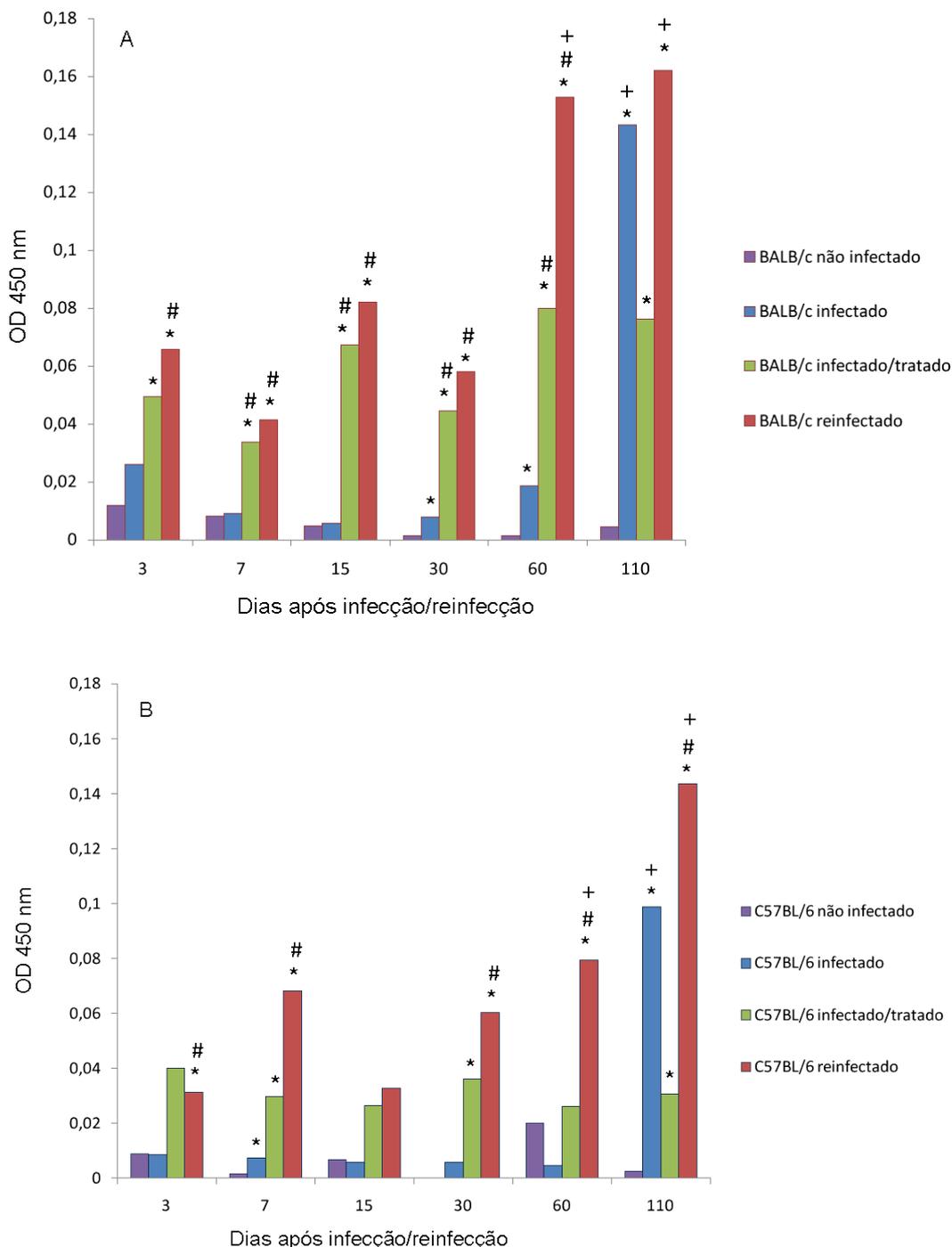


Figura 12 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG1, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG1 produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecção. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativa em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados.

Os resultados das diferenças na produção de IgG1 entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 infectadas ou reinfecção mostraram que os animais infectados e reinfecção da linhagem BALB/c apresentaram uma maior produção de IgG1, se

comparado aos animais C57BL/6 (figura 13). Essa diferença se mostrou estatisticamente significativa nos 3^o, 15^o, 60^o e 110^o dias pós-reinfecção, com produção elevada de IgG1 contra Ag. de esquistossômulo e AWA (3^o dia), AWA (15^o dia), Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA (60^o dia), e Ag. de esquistossômulo e AWA (110^o dia).

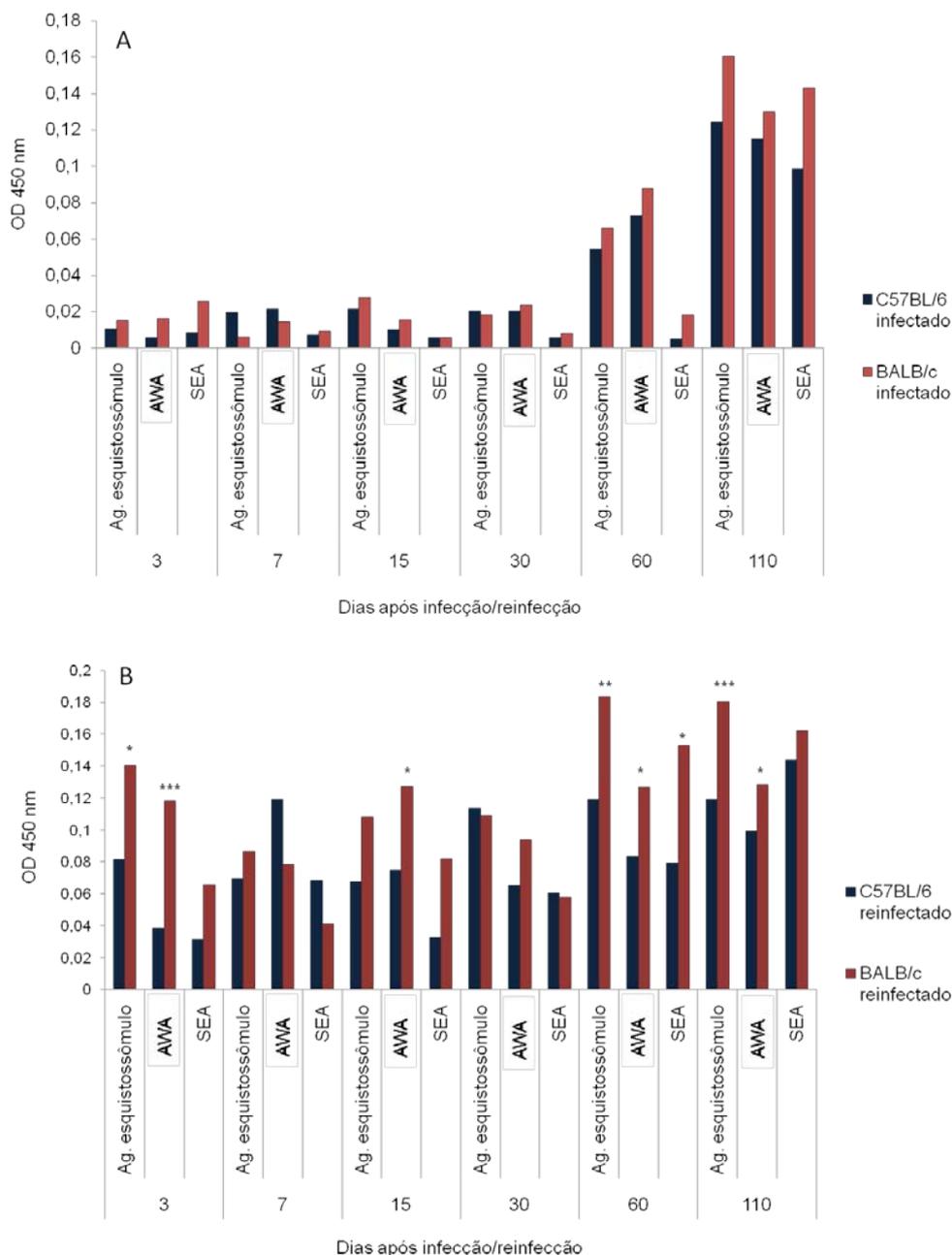


Figura 13 - Produção da imunoglobulina IgG1 nos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfecção. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulina IgG1 produzida por camundongos infectados das linhagens BALB/c e C57BL/6 (A), e por camundongos reinfectedos de ambas linhagens (B). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, infectadas ou reinfectedas. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

A presença das imunoglobulinas do isotipo IgG2c, no soro de camundongos infectados, infectados/tratados e reinfectedos, específicas para os antígenos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA, também foi avaliada (figuras 14, 15, 16, 17)

A produção de IgG2c, específica para Ag. de esquistossômulo, em camundongos BALB/c, foi significativamente maior nos camundongos infectados em relação ao seu grupo controle nos dias 30 e 110 pós-infecção. Os animais BALB/c infectados/tratados apresentaram significativa produção desta imunoglobulina, em relação aos animais não infectados, apenas no 3º dia.

Os animais BALB/c reinfectedos produziram níveis significativos de IgG2c, em relação aos camundongos não infectados, nos dias 3, 60 e 110 pós-infecção, sendo que no 3º dia a produção foi significativa também em relação aos animais infectados. (figura 14A).

Nos animais da linhagem C57BL/6 infectados, a produção de IgG2c anti-ag. de esquistossômulo também foi significativa nos dias 30 e 110 pós-infecção, em relação aos animais não infectados. Os animais infectados/tratados apresentaram significativa produção desta imunoglobulina nos dias 7, 30 e 110 em relação aos animais não infectados. Além disso, os camundongos infectados/tratados ainda apresentaram níveis significativos de IgG2c em relação aos animais infectados nos dias 3 e 7. Os animais C57BL/6 reinfectedos apresentaram maiores níveis de IgG2c, nos dias 3, 7, 30, 60 e 110, pós-reinfecção em relação ao grupo controle, sendo que nos dias 3, 7, 30 e 60 a diferença foi significativa também em relação aos animais infectados (figura 14B).

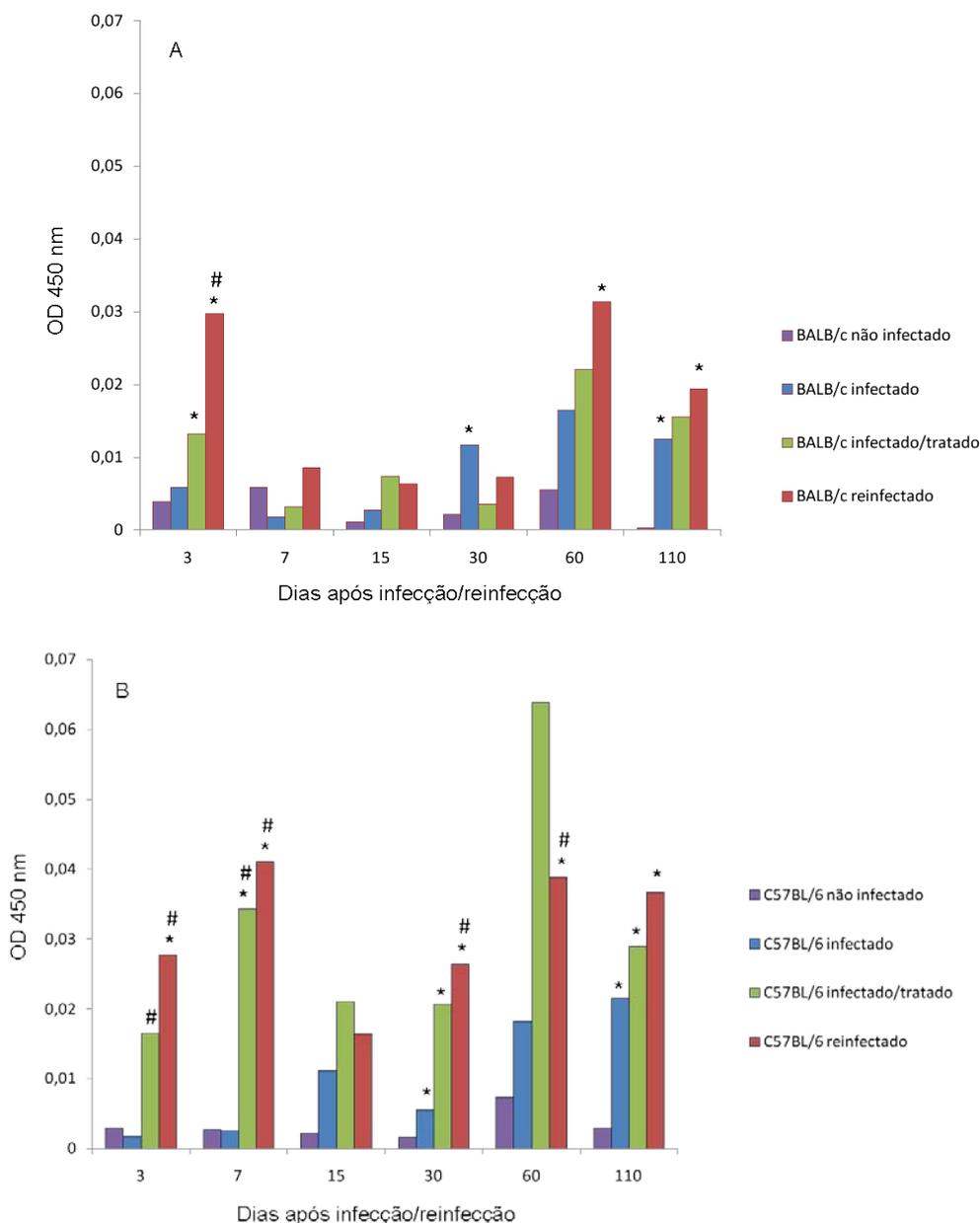


Figura 14 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para Ag. de esquistossômulo, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG2c produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecção. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados.

Os resultados da avaliação dos níveis de IgG2c, específico para AWA, mostraram que os animais infectados da linhagem BALB/c apresentaram níveis significativos desta imunoglobulina no 60º dias pós-infecção, se comparados aos animais do grupo controle. Os animais infectados ainda apresentaram produção significativa desta imunoglobulina nos dias 7, 30 e 60 em relação aos animais

infectados/tratados. Os animais BALB/c reinfectados apresentaram produção significativa, quando comparados aos animais infectados/tratados no 30º dia (figura 15A).

Os animais C57BL/6 infectados apresentaram níveis significativos de IgG2c em relação aos não infectados, no 110º dia pós-infecção. Já os animais reinfectados produziram significativos níveis desta imunoglobulina nos dias 30 e 110 pós-reinfecção, quando comparados ao grupo controle. Os animais infectados/tratados produziram níveis significativos de IgG2c anti-AWA no 30º dia pós-infecção em relação aos animais não infectados (figura 15B).

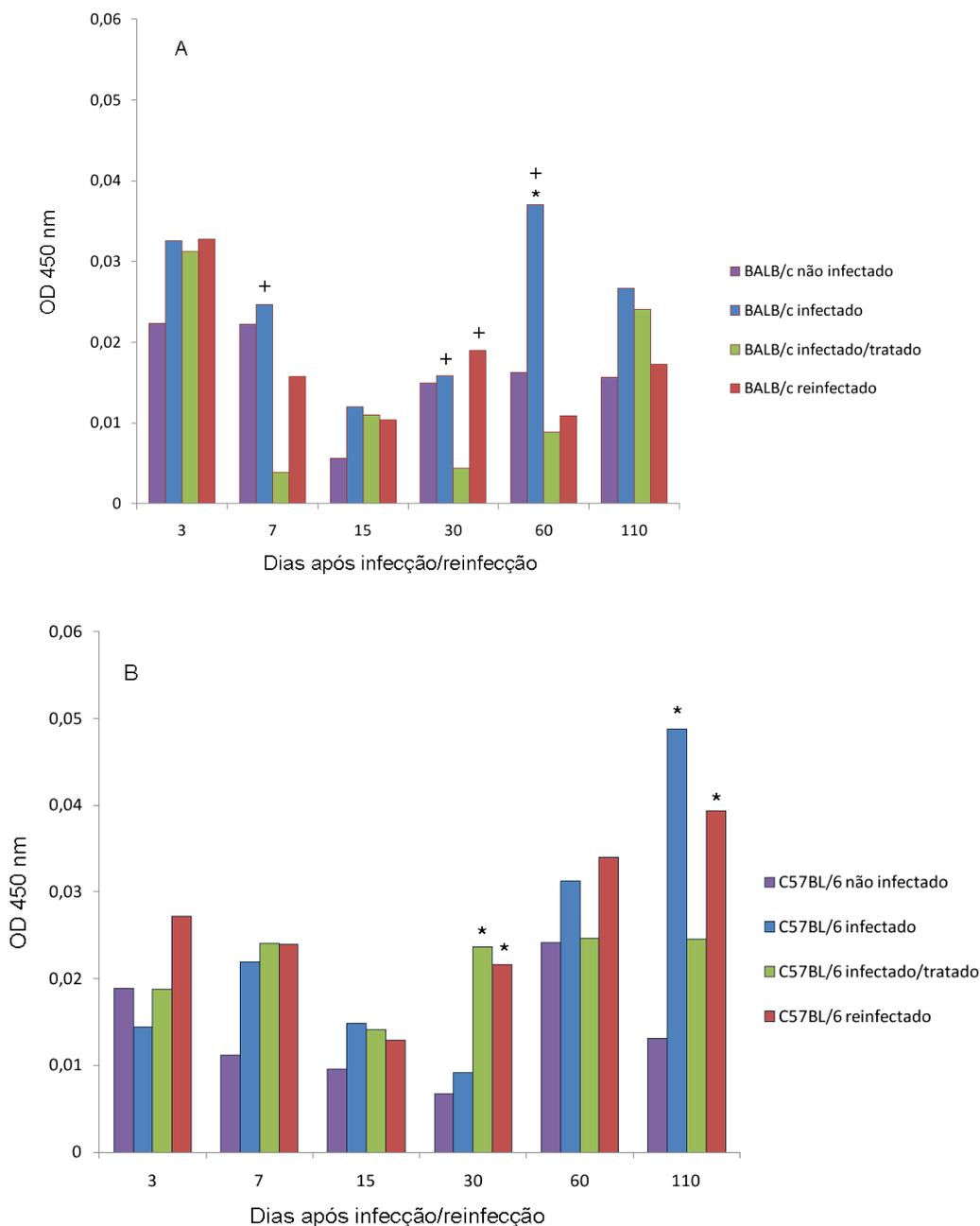


Figura 15 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para AWA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG2c produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfecção. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados.

Quando avaliado o nível de IgG2c, específico para SEA, os camundongos BALB/c não produziram níveis significativos desta imunoglobulina pós-infecção. Os animais infectados/tratados apresentaram níveis significativos desta imunoglobulina no 15º dia, em relação aos animais infectados. Os camundongos reinfecção apresentaram níveis significativos de IgG2c anti-SEA nos dias 3 e 60 pós-reinfecção

em relação aos camundongos infectados/tratados, e no 110º dia em relação aos animais infectados (figura 16A) .

Os camundongos C57BL/6 também não produziram níveis significativos de IgG2c anti-SEA pós-infecção. Comparado ao grupo controle, animais C57BL/6 reinfectados produziram níveis significativos desta imunoglobulina nos 7º, 15º, 30º e 110º dias pós-reinfecção. Além disso, camundongos C57BL/6 reinfectados apresentaram significativa produção desta imunoglobulina, quando comparado aos animais infectados, nos 7º, 15º e 30º dias pós-reinfecção. Os animais infectados/tratados apresentaram produção significativa de IgG2c nos dias 7º e 15º, tanto em relação aos camundongos não infectados, quando em relação aos animais infectados (figura 16B).

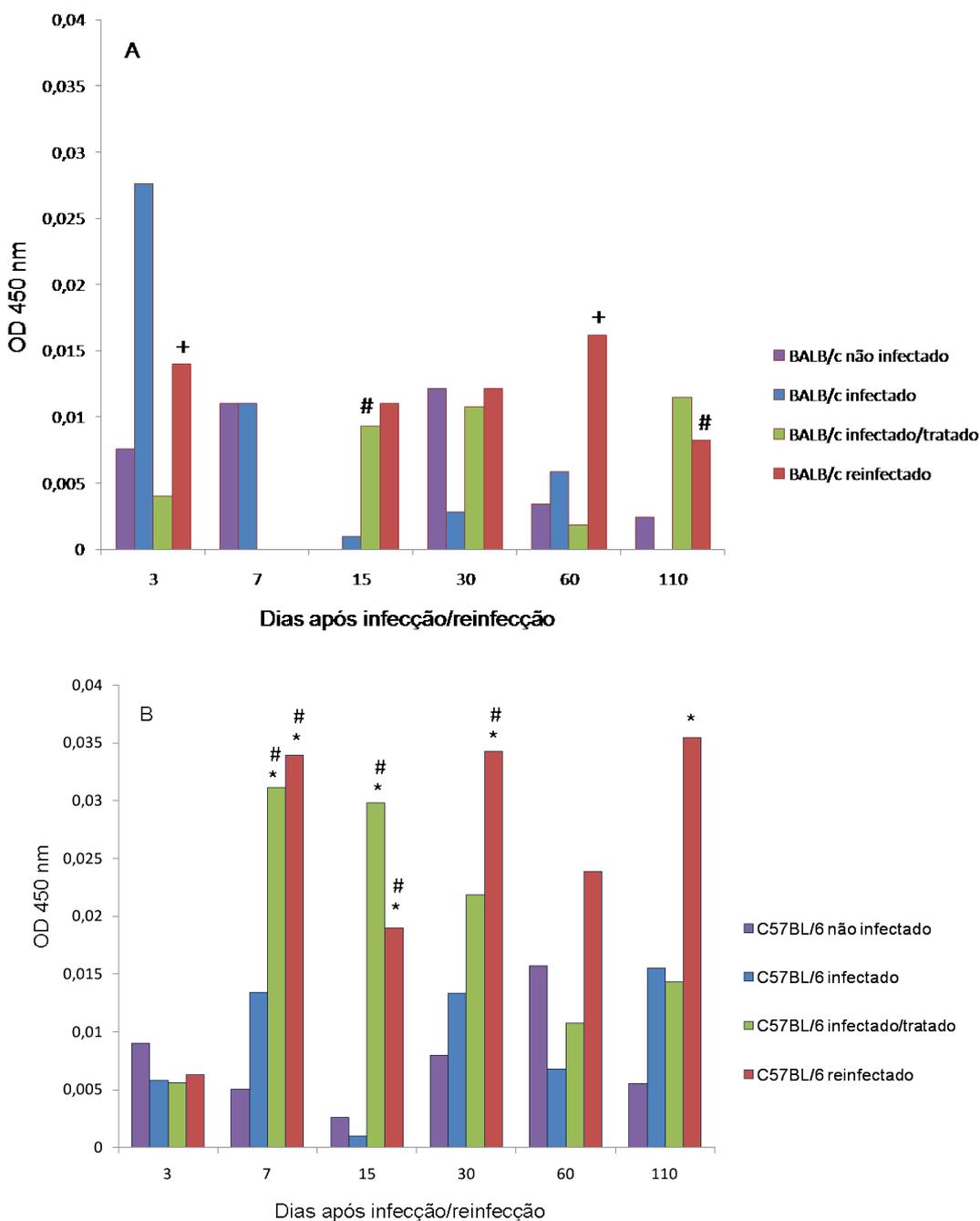


Figura 16 - Cinética da produção da imunoglobulina IgG2c, específica para SEA, nos camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam a média da absorbância para imunoglobulinas IgG2c produzidas por camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados, infectados, infectados/tratados e reinfectados. * - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais não infectados; # - representa diferenças estatisticamente significativa em relação aos camundongos infectados; + - representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos infectados/tratados.

Ao comparar a produção da imunoglobulina IgG2c entre as linhagens, quando infectadas ou quando reinfectadas, pôde-se observar que durante a infecção dos animais não houve diferença significativa na produção de IgG2c, específica para Ag de esquistossômulo, AWA ou SEA, nos animais BALB/c se comparado à linhagem

C57BL/6 infectada (figura 17A). Durante a reinfecção a linhagem C57BL/6 produziu maiores níveis de IgG2c em relação aos animais da linhagem BALB/c reinfectedados, sendo significativos no 7º dia (contra SEA), 30º (contra Ag. de esquistossômulo e SEA), 60º (contra AWA) e 110º (contra AWA e SEA) pós-reinfecção (figura 17B).

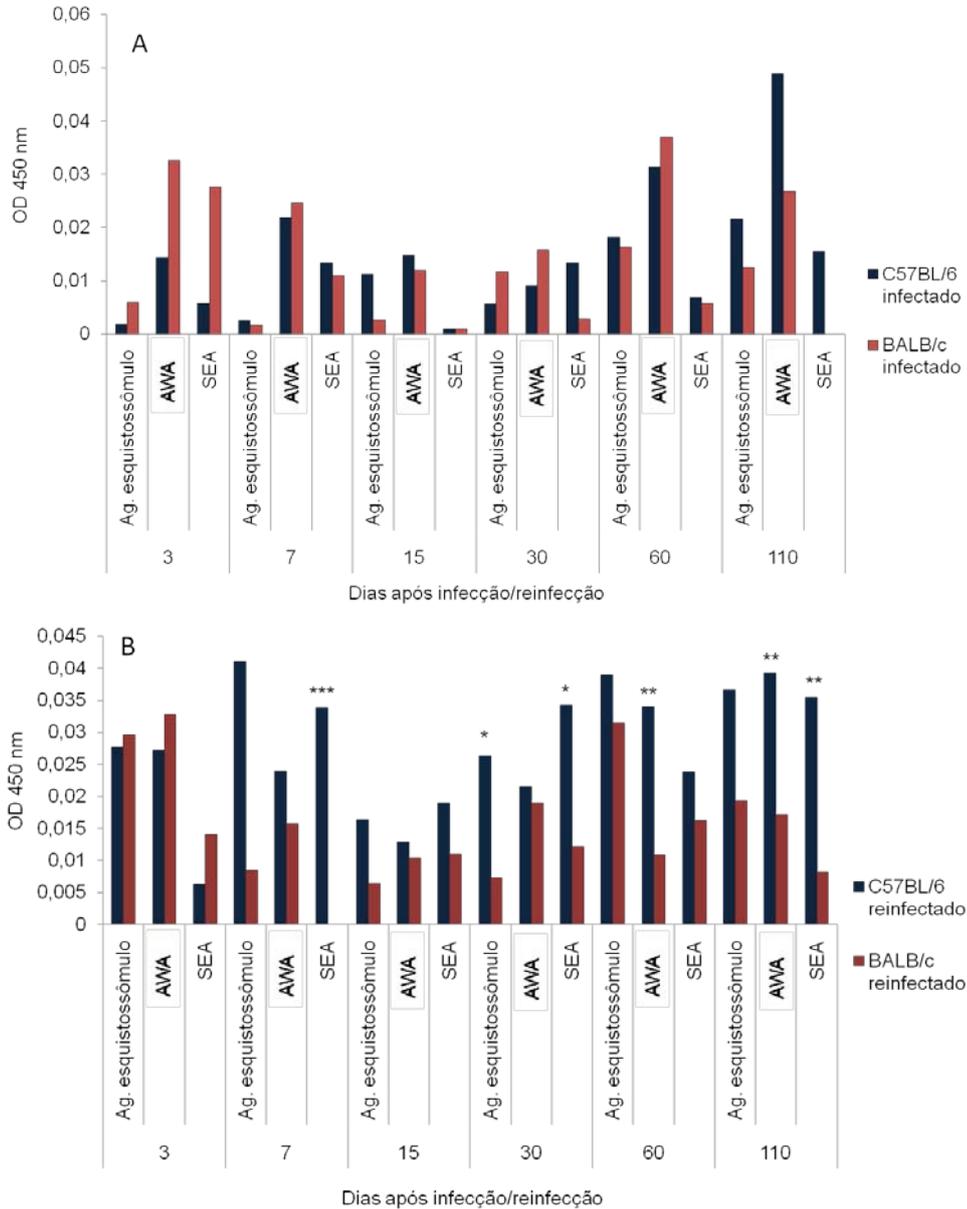


Figura 17 - Produção da imunoglobulina IgG2c nos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfecção. As barras representam a média da absorbância da imunoglobulina IgG2c produzida por camundongos infectados das linhagens BALB/c e C57BL/6 (A), e por camundongos reinfectedados de ambas linhagens (B). Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens infectadas ou reinfectedadas. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

5.3 Avaliação do perfil de citocinas

Foram avaliadas a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-10, IL-17, e, após infecção, infecção/tratamento e reinfecção dos camundongos BALB/c e C57BL/6 pelo *S. mansoni*. Os esplenócitos de camundongos infectados, infectados/tratados e reinfecção, bem como do grupo controle, camundongos não infectados, foram cultivados na ausência ou presença dos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA, nos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110, 155 pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dias pós-tratamento).

Os resultados das culturas dos esplenócitos dos animais BALB/c e C57BL/6 mostram uma produção diferencial dos níveis das citocinas produzidas ao longo da infecção/reinfecção (figuras 18 a 23). De modo geral, durante a infecção/ reinfecção, as citocinas produzidas em maior quantidade foram IL-13, INF- γ e IL-10, em ambas as linhagens, apresentando variações ao longo do tempo. As citocinas IL-17 e TNF- α , porém, foram detectadas em baixos níveis nas duas linhagens durante a infecção/reinfecção. Além disso, apenas os camundongos BALB/c infectados/reinfecção produziram níveis significativos de IL-4, em relação aos animais não infectados.

Os resultados da produção de citocinas pelos animais BALB/c e C57BL/6 infectados/tratados, de maneira geral, apresentaram perfil semelhante ao dos animais reinfecção.

Ao longo da infecção, quando avaliada a produção da citocina IFN- γ , pôde-se observar que os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram uma significativa produção desta citocina no 60^o dia pós-infecção, em resposta ao Ag. de esquistossômulo e ao SEA, quando comparado aos animais controle da mesma linhagem. No mesmo dia, também houve produção significativa desta citocina nos animais C57BL/6 infectados em relação aos BALB/c infectados, quando estimulados por AWA. Nos animais BALB/c infectados houve produção significativa de IFN- γ , em comparação aos BALB/c não infectados, no 7^o dia, em resposta ao SEA, e no 15^o em resposta aos três diferentes estímulos do parasito, utilizados no ensaio. Quando comparados os animais C57BL/6 e BALB/c infectados, essa última linhagem apresentou uma produção superior, significativa, de IFN- γ , no 15^o (quando

estimulados por Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA), e no 30º dia pós-infecção (em resposta ao Ag. de esquistossômulo e AWA) (figura 18A).

Nos animais C57BL/6 infectados/tratados a produção de IFN- γ foi significativa nos dias 38º e 19º pós-tratamento em relação aos animais não infectados, em resposta ao AWA e Ag. de esquistossômulo, respectivamente. Os camundongos BALB/c infectados/tratados apresentaram produção significativa desta citocina apenas no 3º dia pós-reinfecção, frente ao estímulo Ag. de esquistossômulo, em comparação aos animais BALB/c não infectados e aos C57BL/6 infectados/tratados (figura 18B).

Em relação aos níveis de IFN- γ , produzidos durante a reinfecção, pôde -se observar que os animais C57BL/6 reinfectedos apresentaram expressivos níveis dessa citocina no 3º dia (pelo estímulo de Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA) e no 60º dia pós-infecção (em resposta ao SEA), em comparação à produção desta citocina nos animais não infectados dessa linhagem. Os animais C57BL/6 reinfectedos ainda produziram níveis significativos desta citocina em relação aos animais infectados/tratados (no 3º dia pós-reinfecção, em resposta ao AWA e no 30º dia na presença de AWA e SEA). Além disso, os animais C57BL/6 reinfectedos ainda apresentaram produção significativa de IFN- γ , em relação aos animais BALB/c reinfectedos, nos 3º e 60º dias pós-reinfecção (em resposta ao SEA), e no 7º dia pós-reinfecção (em resposta ao AWA). Nos camundongos BALB/c, por sua vez, houve produção significativa de IFN- γ , no 3º dia pós-reinfecção, (pelo estímulo AWA e SEA), em relação aos animais de mesma linhagem não infectados, e no 60º dia pós-reinfecção (frente ao estímulo Ag. de esquistossômulo), em relação aos animais C57BL/6 reinfectedos (figura 18C).

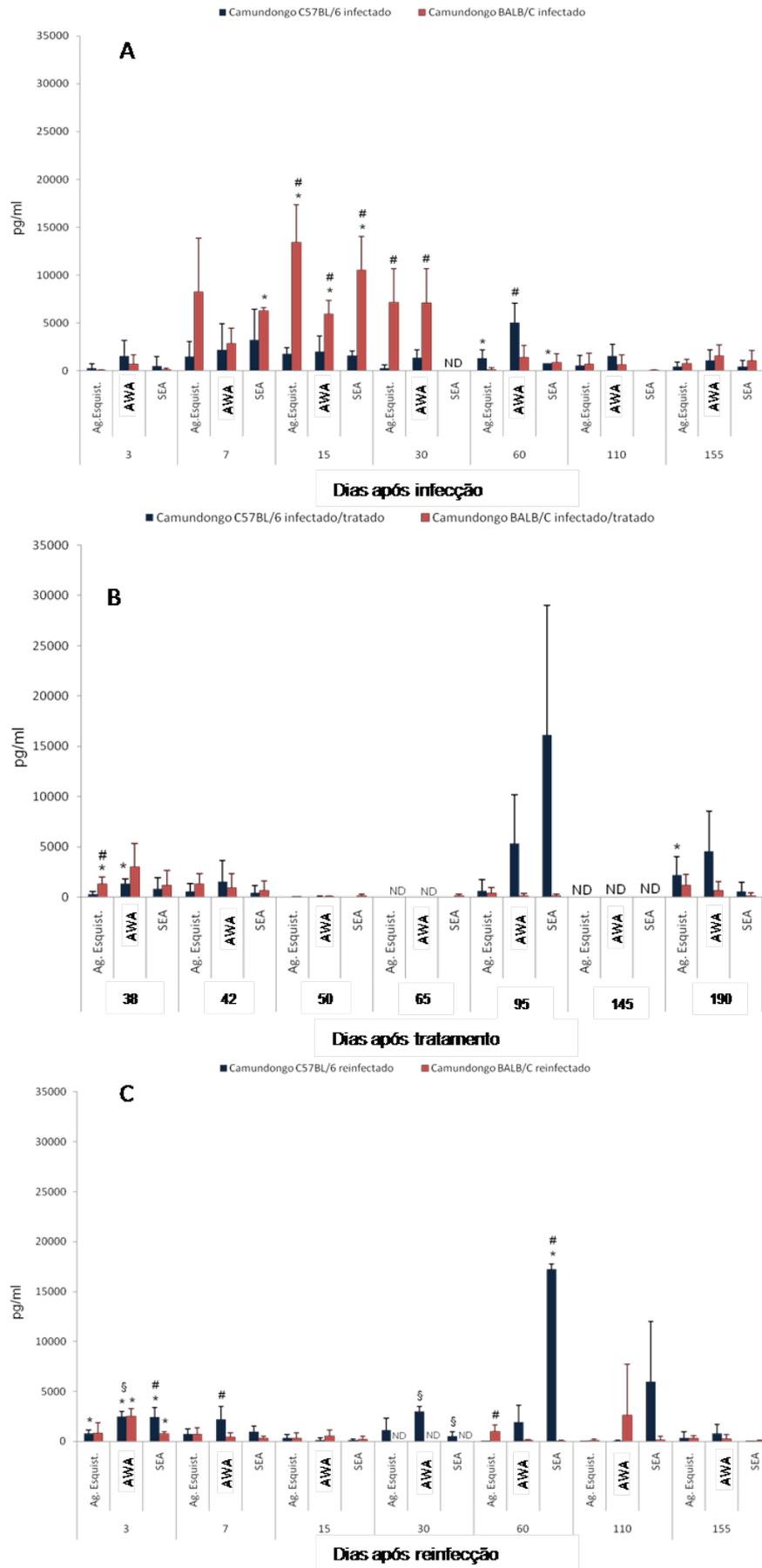


Figura 18 – Produção da citocina IFN- γ após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina IFN- γ foi avaliada após a cultura de esplenócitos de

camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3, 7, 15, 30, 60, 110 e 155 pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dia pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$. ND = não determinado.

Quanto à produção da citocina TNF- α , durante a infecção, foram observadas poucas diferenças significativas, tanto entre as linhagens infectadas, quanto entre os animais infectados e não infectados de mesma linhagem. Além disso, os níveis de TNF- α produzidos foram os menores dentre as citocinas avaliadas durante a infecção (figura 19). Os animais BALB/c infectados apresentaram significativa produção de TNF- α no 7^o (frente ao estímulo AWA) e no 30^o dia (depois de estimulados por SEA), se comparado aos animais C57BL/6 infectados. Já os animais C57BL/6 infectados apresentaram níveis significativos da citocina nos 110^o e 155^o dias, em resposta ao AWA, em relação aos camundongos BALB/c infectados e C57BL/6 não infectados, respectivamente (figura 19A).

Os animais infectados/tratados da linhagem BALB/c produziram níveis significativos de TNF- α no 42^o dia pós-tratamento, em resposta ao Ag. de esquistossômulo (em relação aos animais não infectados) ao AWA e ao SEA (tanto em relação aos animais não infectados, quanto em comparação aos animais reinfectedos), e no 95^o dia pós-tratamento frente ao estímulo Ag. de esquistossômulo (em relação aos animais C57BL/6 infectados/tratados), AWA (em comparação com os animais BALB/c não infectados, BALB/c reinfectedos e C57BL/6 infectados/tratados) e SEA (em relação aos animais BALB/c não infectados e C57BL/6 infectados/tratados). Já os animais C57BL/6 infectados/tratados, apresentaram produção significativa de TNF- α no 42^o pós-tratamento em relação aos animais não infectados, em resposta aos estímulos AWA e SEA, no 65^o dia, após estimulação por SEA, em relação aos animais C57BL/6 reinfectedos, no 95^o dia em resposta ao SEA, em comparação aos animais não infectados e reinfectedos C57BL/6, e 190^o dia pós-tratamento, em relação aos animais não infectados, frente ao estímulo SEA (figura 19B).

Quanto à produção de TNF- α , ao longo da reinfecção, foi possível observar que camundongos BALB/c reinfectedos apresentaram uma produção significativa

dessa citocina, em relação aos animais BALB/c não infectados, nos 3^o e 7^o dias (em resposta aos estímulos AWA e SEA), 15^o (frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo e SEA), e 110^o dia pós-reinfecção (na presença de SEA). Em relação aos animais C57BL/6 reinfecados, a linhagem BALB/c reinfecada produziu níveis significativos de TNF- α nos 3^o, 30^o e 60^o dias pós-reinfecção (em resposta ao SEA), e no 110^o dia pós-reinfecção (na presença do estímulo AWA) (figura 19C).

Nos animais C57BL/6 reinfecados, a produção de TNF- α foi significativa nos dias 7 e 155 (frente aos estímulos AWA e SEA), 110 pós-reinfecção (em resposta ao SEA), quando comparado ao grupo controle. Em comparação aos animais BALB/c reinfecados, os animais reinfecados da linhagem C57BL/6 apresentaram níveis significativos de TNF- α no 155^o dia pós-reinfecção, na presença de SEA. Tanto os animais C57BL/6 quanto BALB/c reinfecados produziram níveis significativos de TNF- α , em relação aos animais infectados/tratados de mesma linhagem, no 3^o dia pós-reinfecção em resposta aos antígenos AWA e SEA, respectivamente (figura 19C).

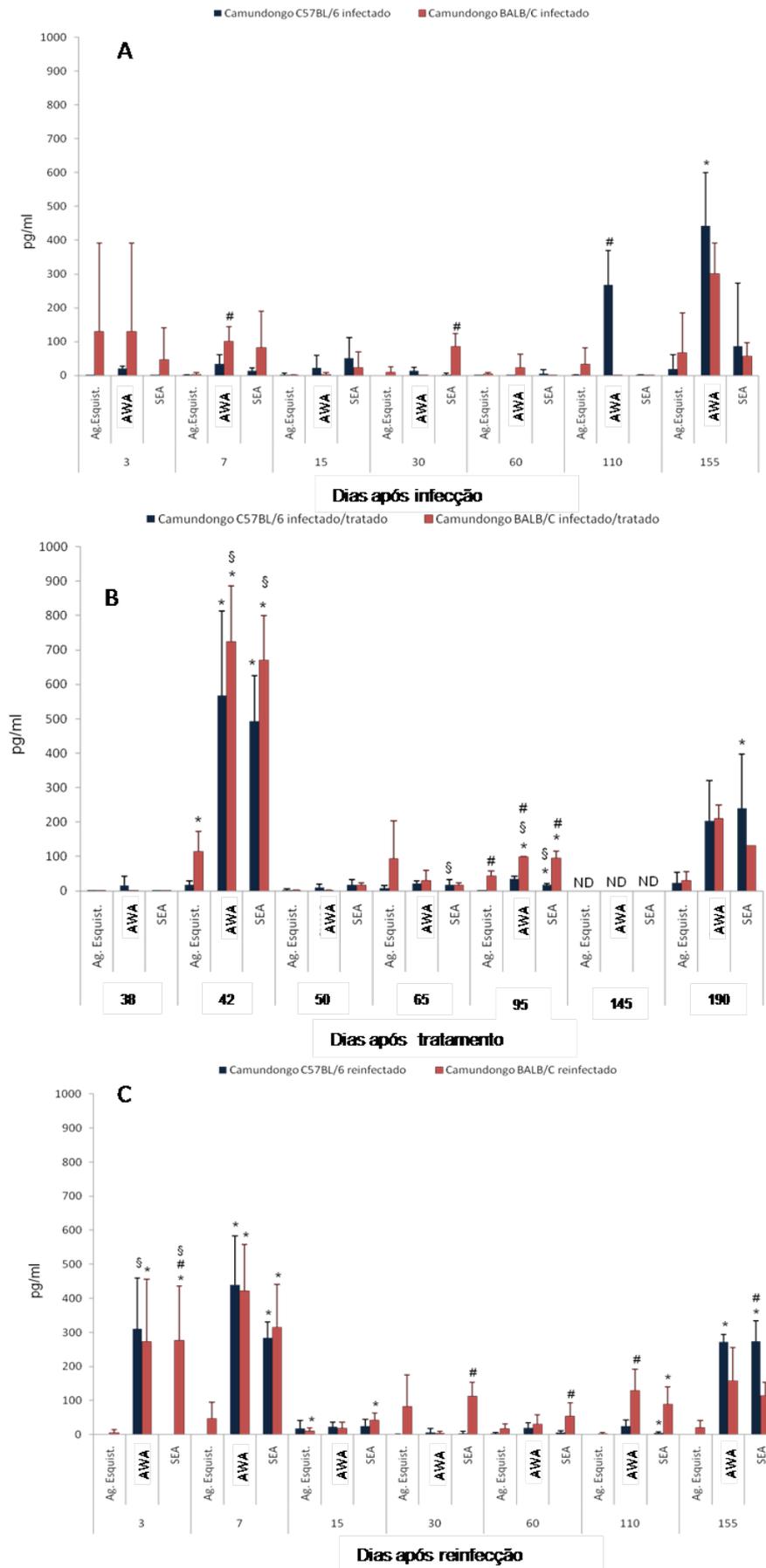


Figura 19 - Produção da citocina TNF- α após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina TNF- α foi avaliada após a cultura de esplenócitos de

camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dia pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dia pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$.

Ao longo da infecção, níveis significativos de IL-13 foram detectados durante todo o período avaliado. Os camundongos BALB/c infectados produziram quantidades significativas de IL-13, em relação aos BALB/c não infectados no 3^o dia pós-infecção (em resposta ao Ag. de esquistossômulo), e nos 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção (frente aos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA). Também em resposta aos três estímulos, os animais C57BL/6 infectados produziram níveis significativos dessa citocina, nos 7^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção, em relação aos C57BL/6 não infectados. Além disso, os esplenócitos de animais C57BL/6 infectados apresentaram produção significativa de IL-13 no 15^o dia pós-infecção, em resposta ao Ag. de esquistossômulo, quando comparados aos camundongos da mesma linhagem não infectados, e também em resposta ao SEA, quando comparados aos animais C57BL/6 não infectados e aos BALB/c infectados. Os camundongos BALB/c infectados ainda apresentaram significativa produção dessa citocina, em relação aos animais C57BL/6 infectados, nos 3^o e 30^o dias (frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo e AWA), 7^o dia (em resposta aos três antígenos), e 155^o dia (quando estimulados com AWA) pós-infecção (figura 20A).

Animais BALB/c infectados/tratados apresentaram níveis significativos de IL-13, em relação aos camundongos não infectados, no 38^o dia pós-tratamento, na presença de Ag. de esquistossômulo e SEA, e nos dias 42^o e 50^o pós-tratamento, frente aos três antígenos do parasito. Além disso, no 190^o dia pós-tratamento, em resposta ao Ag. de esquistossômulo e AWA, a produção desta citocina também foi significativa em relação aos camundongos controle. Em relação aos camundongos C57BL/6 infectados/tratados, os animais BALB/c infectados/tratados apresentaram produção significativa de IL-13 nos dias 50^o (em resposta aos três antígenos do parasito), 65^o (após estimulação por SEA) e 190^o pós-tratamento (na presença de Ag. de esquistossômulo e AWA). Os animais BALB/c infectados/tratados ainda apresentaram significativa produção desta citocina, em relação aos animais

reinfectados, no 90^o dia pós-tratamento em resposta ao Ag. de esquistossômulo. Quanto aos animais C57BL/6 infectados/tratados, observaram-se níveis significativos de IL-13, em relação aos animais não infectados, nos dias 38^o, 42^o e 95^o pós-tratamento em resposta aos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA, além de também ser detectadas esta citocina no 50^o dia na presença de Ag. de esquistossômulo e SEA, e no 190^o dia, quando estimulados por SEA. Além disso, os animais C57BL/6 infectados/tratados ainda produziram significativos níveis de IL-13 em relação aos animais C57BL/6 reinfectados no 95^o dia pós-tratamento, em resposta ao Ag. de esquistossômulo (figura 20B).

No decorrer da reinfecção, a produção da citocina IL-13, frente aos estímulos, foi significativa na maioria dos dias avaliados em camundongos reinfectados quando comparados aos não infectados (figura 20C). Camundongos C57BL/6 reinfectados apresentaram significativa produção de IL-13, em relação ao grupo controle, nos 7^o, 15^o e 110^o dias pós-reinfecção, em resposta aos três antígenos do parasita, e nos 3^o (na presença de Ag. de esquistossômulo e SEA) e 60^o dias pós-reinfecção (em resposta ao Ag. de esquistossômulo e AWA). Os animais C57BL/6 ainda apresentaram produção significativa de IL-13 em relação aos animais infectados/tratados no 7^o e 60^o dia pós-reinfecção em resposta ao antígeno de esquistossômulo e SEA, respectivamente. Além disso, os camundongos reinfectados C57BL/6 produziram níveis significativamente maiores de IL-13 em comparação aos níveis desta citocina produzidos por camundongos BALB/c reinfectados no 110^o dia pós-reinfecção frente a presença de Ag. de esquistossômulo. Quanto aos animais BALB/c, a produção de IL-13 foi significativa nos 3^o, 7^o, 15^o, 30^o e 60^o dias pós-reinfecção, na presença dos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA e nos 110^o (em resposta à AWA) e 155^o dias pós-reinfecção (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo e AWA). Os animais BALB/c reinfectados também produziram níveis significativos de IL-13, em relação aos animais C57BL/6 reinfectados, no 15^o (em resposta ao Ag. de esquistossômulo e SEA), 30^o (na presença de AWA), 60^o (quando estimulados pelos três antígenos do parasito) e 155^o dias pós-reinfecção (em resposta ao SEA) (figura 20C).

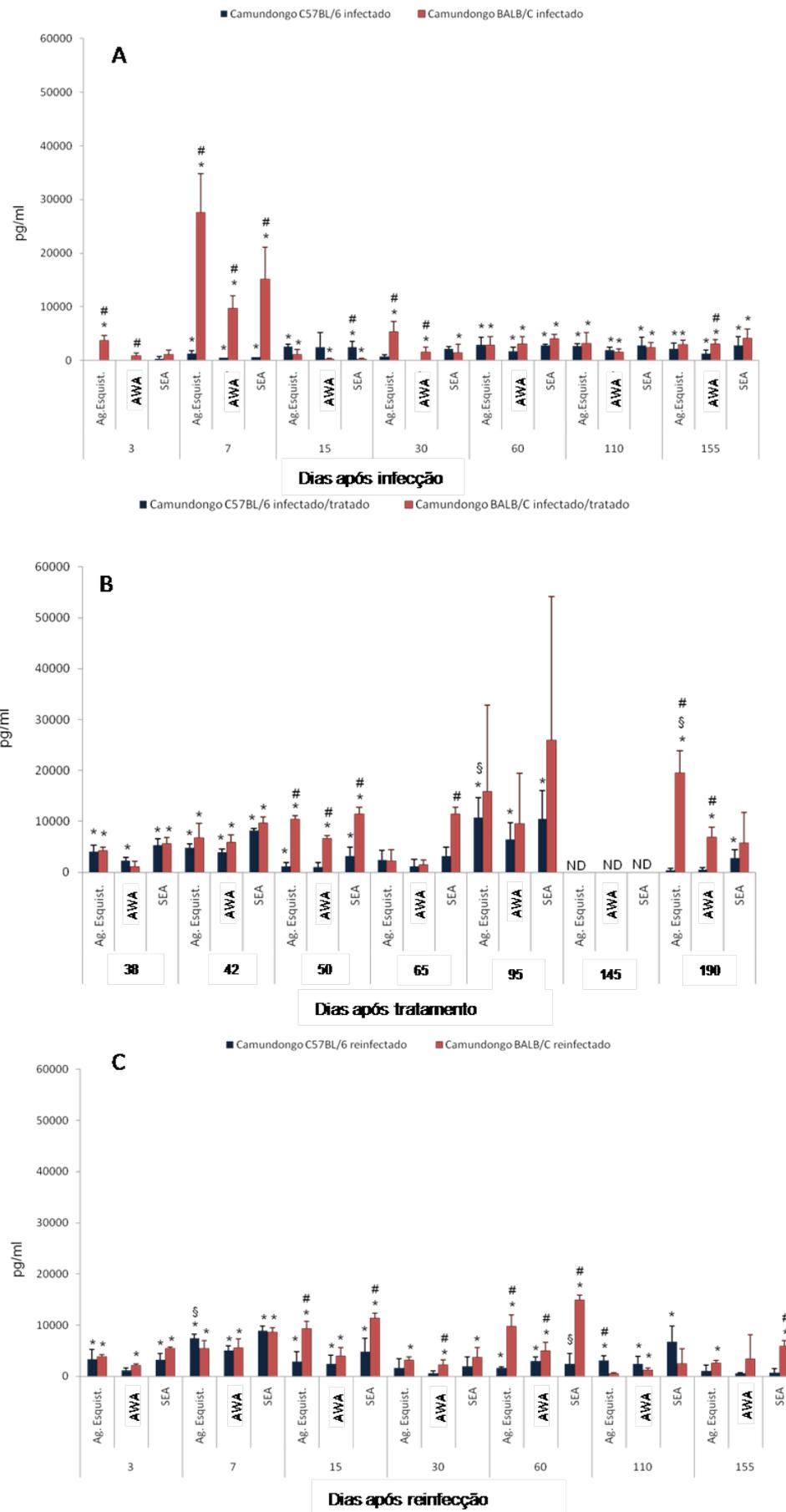


Figura 20 - Produção da citocina IL-13 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina IL-13 foi avaliada após a cultura de esplenócitos de camundongos

BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dias pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$.

Quanto à citocina IL-4, durante a infecção, apenas os animais da linhagem BALB/c produziram níveis significativos dessa citocina (figura 21A). Os camundongos BALB/c infectados apresentaram significativa produção de IL-4, em relação aos animais da mesma linhagem não infectados, nos 15^o e 110^o dias (em resposta ao Ag. de esquistossômulo), e nos 30^o, 60^o e 155^o dias pós-infecção (frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA). Em relação aos camundongos C57BL/6 infectados, os animais BALB/c infectados produziram níveis significativos dessa citocina no 15^o dia (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo e AWA), 30^o dia (quando estimulados por AWA), 60^o e 155^o dias pós-infecção (frente aos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA) (figura 21A). Camundongos BALB/c infectados/tratados produziram quantidade significativa de IL-4, em relação ao grupo controle nos 38^o e 42^o dias pós-tratamento, em resposta ao SEA, no 95^o dia, na presença de Ag. de esquistossômulo e SEA, e no 190^o dia pós-tratamento, quando estimulados pelos três antígenos do parasita. Além disso, a citocina IL-4 também foi produzida de modo significativo, por BALB/c infectados/tratados, em relação aos animais C57BL/6 infectados/tratados, no 38^o dia pós-tratamento (em resposta ao Ag. de esquistossômulo), nos dias 42^o e 95^o pós-tratamento (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo e SEA). Os animais C57BL/6 infectados/tratados, apresentaram níveis de IL-4, em relação aos animais não infectados, no 38^o dia pós-tratamento, quando estimulados por SEA, e no 190^o pós-tratamento, em resposta aos três antígenos do parasita. Os camundongos C57BL/6 infectados/tratados ainda apresentaram produção significativa desta citocina, em relação aos animais de mesma linhagem reinfectedos, nos dias 65^o e 190^o pós-tratamento, após estimulação por SEA, e no 95^o dia pós-tratamento, em resposta ao Ag. de esquistossômulo. (figura 21B).

Níveis significativos da citocina IL-4, ao longo da reinfecção, assim como durante a infecção, foram observados nos camundongos BALB/c reinfectedos sendo

que apenas no 110^o dia pós-reinfecção, houve significativa produção dessa citocina nos camundongos C57BL/6 reinfectedados em relação ao grupo controle (figura 21C). Os animais BALB/c reinfectedados produziram quantidades significativas de IL-4, em relação aos animais do grupo controle, nos 3^o e 30^o dias (em resposta aos três antígenos do parasito), no 15^o dia (na presença de AWA e SEA), no 60^o dia (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo e SEA) e 155^o dia pós-reinfecção (em resposta ao Ag. de esquistossômulo). Em relação aos animais C57BL/6 reinfectedados, os camundongos BALB/c reinfectedados apresentaram significativos níveis de IL-4 nos 3^o, 30^o e 60^o dias pós-reinfecção (na presença de Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA), no 7^o dia (em resposta ao Ag. de esquistossômulo e ao SEA) e no 155^o dia pós-reinfecção (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo). Além disso, os animais BALB/c reinfectedados produziram significativos níveis de IL-4 em relação aos animais infectados/tratados na presença de Ag. de esquistossômulo e AWA, no 3^o dia pós-reinfecção (figura 21C).

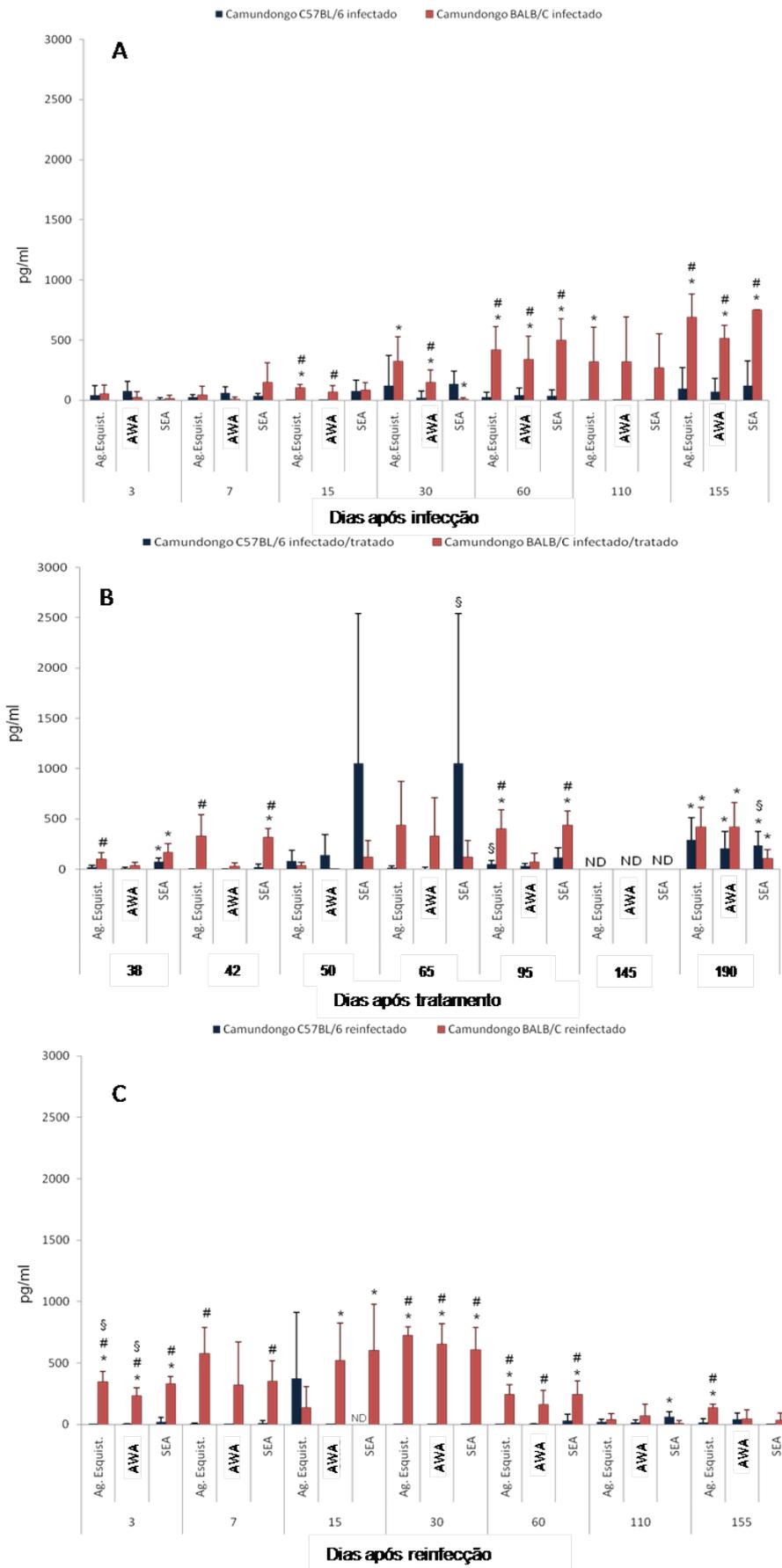


Figura 21 - Produção da citocina IL-4 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina IL-4 foi avaliada após a cultura de esplenócitos de camundongos

BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dias pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$.

Em relação à produção de IL-10 durante a infecção, foi observado que os esplenócitos dos animais BALB/c infectados apresentaram produção significativa de IL-10, em relação aos animais BALB/c não infectados nos 7^o e 30^o dias pós-infecção, após serem estimulados por Ag. de esquistossômulo, no 110^o dia pós-infecção, em resposta ao Ag. de esquistossômulo e SEA, e no 15^o e 60^o dia pós-infecção, quando estimulados por Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA (figura 22A). Os animais BALB/c infectados ainda produziram significativos níveis dessa citocina quando comparados aos animais infectados C57BL/6, no 15^o dia pós-infecção, em resposta ao Ag. de esquistossômulo. Quanto à produção de IL-10 pelos esplenócitos de animais C57BL/6 infectados, a mesma foi significativa no 7^o dia pós-infecção (depois de estimulados por Ag. de esquistossômulo), no 30^o dia pós-infecção (frente ao Ag. de esquistossômulo e AWA), no 60^o dia pós-infecção (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA), e no 110^o dia pós-infecção, em resposta ao Ag. de esquistossômulo e SEA). Além disso, os animais C57BL/6 infectados ainda apresentaram uma significativa produção de IL-10, em relação aos BALB/c infectados, nos 60^o e 110^o dias pós-infecção, depois de serem estimulados por SEA e AWA, respectivamente (figura 22A).

Os camundongos C57BL/6 infectados/tratados apresentaram níveis significativos de IL-10 em relação aos animais de mesma linhagem não infectados no 38^o dia pós-tratamento na presença de Ag. de esquistossômulo e SEA, e nos dias 42^o, 65^o e 95^o pós-tratamento em resposta aos três antígenos do parasito. Animais C57BL/6 infectados/tratados ainda apresentaram produção significativa desta citocina, em relação aos animais C57BL/6 reinfectedos no 65^o dia pós tratamento frente aos três antígenos do parasita e no 95^o dia pós-tratamento, em resposta ao AWA. Em relação aos animais BALB/c infectados/tratados, os animais C57BL/6 infectados e tratados apresentaram produção significativa desta citocina no 65^o dia pós-tratamento na presença de Ag. de esquistossômulo e AWA (figura 22B). Os

animais BALB/c infectados/tratados, por sua vez, apresentaram produção significativa de IL-10, em relação aos animais BALB/c não infectados, no 38º dia pós-tratamento em resposta ao Ag. de esquistossômulo e SEA, nos dias 42º e 95º pós-tratamento, na presença de Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA, e no 50º dia pós-tratamento frente o estímulo SEA. Além disso, a produção de IL-4 também foi significativa em relação aos animais C57BL/6 infectados/tratados (nos dias 50º e 65º pós-tratamento, em resposta ao SEA), e em relação aos animais BALB/c reinfectedos (no 95º dias pós-tratamento quando estimulados pelos três antígenos do parasito (figura 22B).

Em relação à produção de IL-10, no decorrer da reinfecção, foi possível observar que os animais BALB/c reinfectedos apresentaram níveis significativos de IL-10, em comparação aos animais não infectados, nos 3º, 7º, 15º, e 60º dias pós-reinfecção, na presença de Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. Quanto aos animais C57BL/6 reinfectedos, em comparação ao grupo controle, houve significativa produção de IL-10 nos 3º e 7º dias pós-reinfecção (em resposta aos três estímulos do parasito), no 60º dia (quando estimulados por Ag. de esquistossômulo e SEA) e no 110º dia pós-reinfecção (na presença de Ag. de esquistossômulo). Ao longo da reinfecção foram observados maiores níveis de IL-10 produzidos nos animais BALB/c reinfectedos em relação aos C57BL/6 reinfectedos no 15º dia pós-reinfecção frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. Já os animais C57BL/6 reinfectedos, no 60º dia (na presença de Ag. de esquistossômulo e AWA) e no 110º dia (em resposta aos Ag. de esquistossômulo) pós-reinfecção, apresentaram produção significativa de IL-10, em relação aos animais BALB/c reinfectedos. Além disso, os animais C57BL/6 reinfectedos, no 7º dia pós-reinfecção, apresentaram produção significativa desta citocina em resposta ao Ag. de esquistossômulo e AWA (figura 22C).

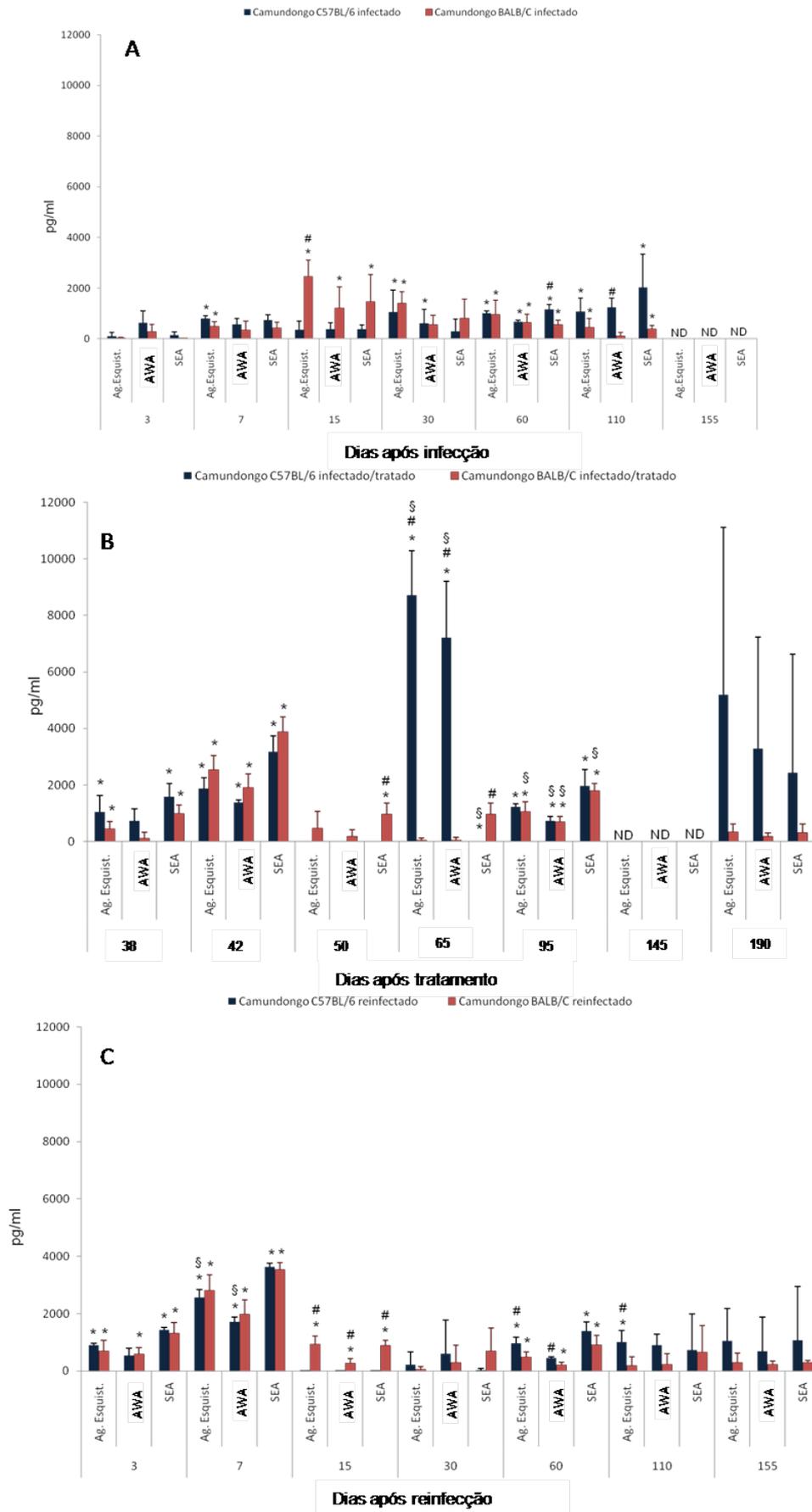


Figura 22 - Produção da citocina IL-10 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina IL-10 foi avaliada após a cultura de esplenócitos de camundongos

BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dias pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$.

Em relação à produção da citocina IL-17 durante a infecção não foram observadas diferenças significativas entre os animais infectados e não infectados de ambas as linhagens. Somente no 30^o dia pós-infecção, em resposta ao AWA, os animais BALB/c infectados apresentaram uma significativa produção de IL-17, em relação aos camundongos C57BL/6 infectados (figura 23A).

Os animais BALB/c infectados/tratados apresentaram produção significativa de IL-17, tanto em relação aos animais não infectados quanto em relação aos animais reinfectedos da mesma linhagem, no 42^o dia pós-tratamento em resposta ao AWA. Além disso, os animais BALB/c infectados/tratados ainda apresentaram produção significativa desta citocina, em relação aos animais C57BL//6 infectados/tratados no 190^o dia pós-tratamento frente ao SEA. Os animais C57BL/6 infectados/tratados apresentaram níveis significativos de IL-17 apenas em relação aos animais C57BL/6 não infectados no 42^o dia pós-tratamento, na presença de AWA (figura 23B).

A produção da citocina IL-17, durante a reinfecção, foi significativa no 3^o dia pós-infecção nos animais C57BL/6 reinfectedos em relação aos animais C57BL/6 não infectados. A produção dessa citocina também foi significativa no 7^o dia pós-reinfecção, em resposta ao AWA, nos animais BALB/c e C57BL/6 reinfectedos em relação aos grupos controle. (figura 23C).

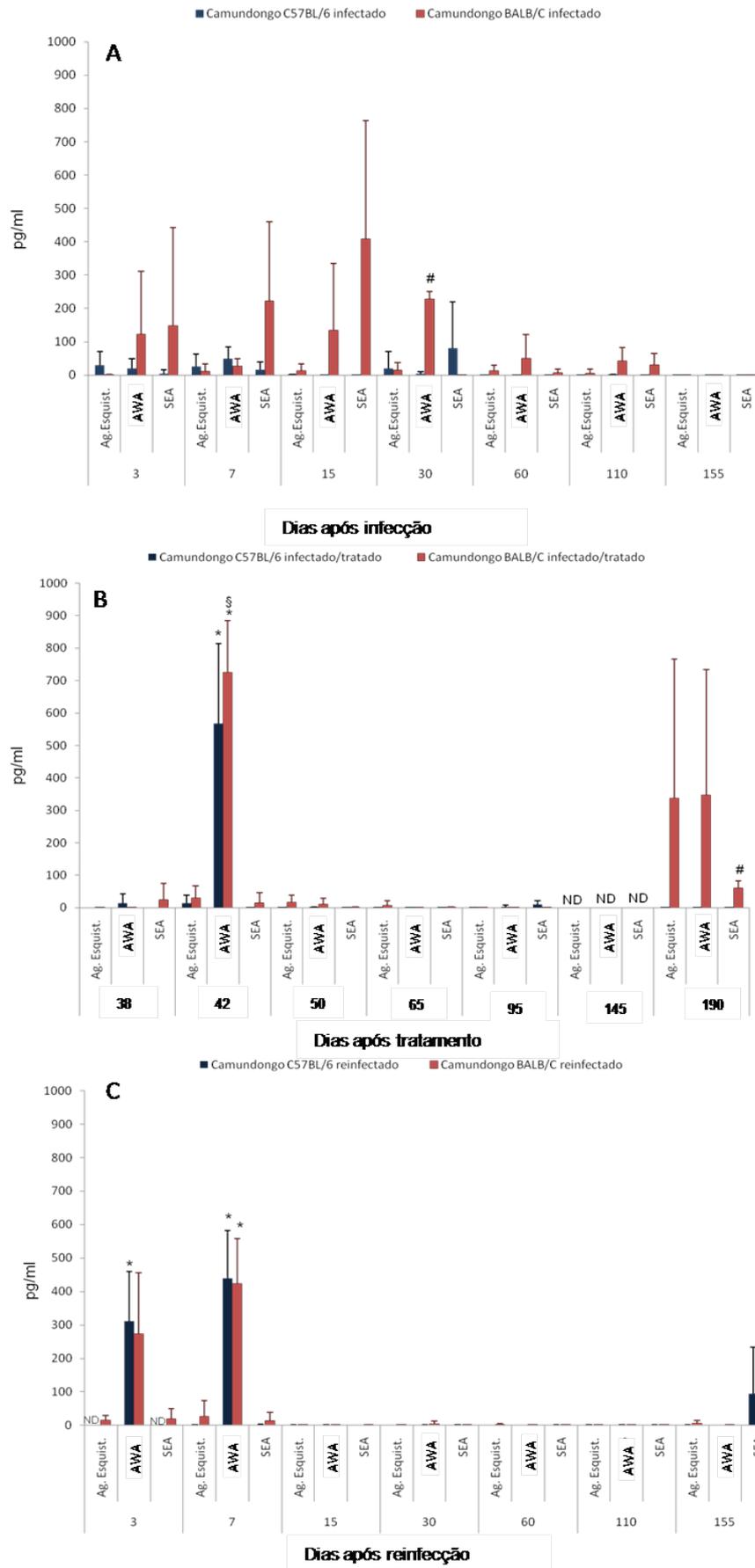


Figura 23 - Produção da citocina IL-17 após cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6. A produção da citocina IL-17 foi avaliada após a cultura de esplenócitos de camundongos

BALB/c e C57BL/6 infectados, infectados/tratados, reinfectedos e não infectados nos dias 3^o, 7^o, 15^o, 30^o, 60^o, 110^o e 155^o dias pós-infecção/reinfecção (ou 38^o, 42^o, 50^o, 65^o, 95^o, 145^o, 190^o dias pós-tratamento), frente aos estímulos Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA. As barras representam a média + desvio padrão de pg/mL das citocinas produzidas nos animais infectados(A), infectados/tratados (B) e reinfectedos (C). Os dados dos animais não infectados de cada linhagem não foram mostrados para uma melhor visualização dos resultados. * - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos e seu grupo controle (camundongos não infectados) dentro de uma mesma linhagem. # - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados, infectados/tratados ou reinfectedos das linhagens BALB/c e C57BL/6. § - representam as diferenças estatisticamente significativas entre camundongos infectados/tratados e reinfectedos de mesma linhagem. ND = não determinado. Diferença estatística = $p < 0,05$.

O quadro a seguir resume a dinâmica da produção das citocinas avaliadas, durante a infecção e reinfecção, pelos animais das linhagens BALB/c e C57BL/6 pelo *S. mansoni*, quando comparados ao grupo controle não infectado de cada linhagem.

Quadro 1– Citocinas produzidas pelos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção e reinfeção pelo *S. mansoni*.

Dias pós infecção/ reinfeção	Antígenos	Infectados		Reinfectados	
		BALB/c	C57BL/6	BALB/c	C57BL/6
3	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13	-	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-4 ↑ IL-13 ↑ IFN - γ ↑ IL-10
	SWAP	-	-	↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ TNF- α ↑ IFN - γ	↑ IL-17 ↑ IFN - γ
	SEA	-	-	↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ IFN - γ	↑ IL-4 ↑ TNF- α ↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ IFN - γ
7	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10
	SWAP	↑ IL-13	↑ IL-13	↑ IL-13 ↑ IL-17 ↑ IL-10 ↑ TNF- α	↑ IL-13 ↑ IL-17 ↑ IL-10 ↑ TNF- α
	SEA	↑ IL-13 ↑ IFN- γ	↑ IL-13	↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ TNF- α	↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ TNF- α
15	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10 ↑ IFN- γ	↑ IL-13	↑ IL-13 ↑ IL-10 ↑ TNF- α	↑ IL-13
	SWAP	↑ IL-13 ↑ IFN - γ ↑ IL-10	-	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13
	SEA	↑ IL-13 ↑ IFN- γ ↑ IL-10	↑ IL-13	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10 ↑ TNF- α	↑ IL-13
30	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-4	-
	SWAP	↑ IL-13 ↑ IL-4	↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-4	-
	SEA	↑ IL-13 ↑ IL-4	-	↑ IL-13 ↑ IL-4	-
60	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IFN - γ ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10
	SWAP	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13
	SEA	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IFN - γ ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-10 ↑ IFN - γ
110	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	-	↑ IL-13 ↑ IL-10
	SWAP	↑ IL-13	↑ IL-13	↑ IL-13	↑ IL-13
	SEA	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ IL-13 ↑ IL-10	↑ TNF- α	↑ IL-13 ↑ IL-4 ↑ TNF- α
155	Ag de esquistossômulo	↑ IL-13 ↑ IL-4	↑ IL-13	↑ IL-13 ↑ IL-4	-
	SWAP	↑ IL-13 ↑ IL-4	↑ IL-13 ↑ TNF- α	-	↑ TNF- α
	SEA	↑ IL-13 ↑ IL-4	↑ IL-13	↑ IL-13	↑ TNF- α

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande importância mundial que causa significativa morbidade nos indivíduos infectados. Visando a um melhor conhecimento da doença e da interação parasito-hospedeiro, bem como à busca por estratégias de controle, diversos estudos são realizados em modelos experimentais, principalmente em camundongos. O presente estudo demonstrou padrões de resposta imunológica distintos, em resposta à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* em camundongos BALB/c e C57BL/6.

Um dos padrões avaliados em camundongos infectados/reinfectados pelo *S. mansoni* foi a alteração no peso corporal. Pôde-se observar que, tanto os animais BALB/c, quanto C57BL/6, durante a infecção, apresentaram ganho de peso. Estudos prévios, os quais avaliaram o efeito da infecção no peso corporal, mostram que os animais infectados pelo *S. mansoni* tendem a apresentar perda de peso (Andrews et al., 1980; Fiore et al., 1996). Essa diferença, entre os resultados encontrados no nosso estudo e os resultados encontrados na literatura, pode ser explicada pelo tempo de infecção analisado. Nosso trabalho acompanhou o peso dos animais até 39 dias após a infecção, porém, nos trabalhos de Andrews e colaboradores, e Fiore e colaboradores, os pesos foram avaliados após 18 e 8 semanas, respectivamente. O ganho de peso corporal, durante essa fase, pode ser explicado pelo desenvolvimento natural dos camundongos, já que, no início dos experimentos, os camundongos apresentavam 6 semanas de vida, período no qual, segundo Chorilli e colaboradores (2007), os animais ainda se encontram na fase da puberdade.

Nos camundongos BALB/c foi observada uma perda de peso significativa após o tratamento. Esse fato pode estar associado a algum efeito do medicamento, Praziquantel. Cioli e Pica-Mattoccia (2003) relataram que dentre as reações adversas mais comuns causadas pelo uso do Praziquantel em humanos, estão: dor de cabeça, vômitos, dores abdominais, diarreia, febre, sonolência e anorexia.

Quanto à avaliação parasitológica, após infecção ou reinfecção das linhagens BALB/c e C57BL/6, não foi possível observar diferença significativa na carga parasitária detectada pós-infecção e reinfecção em uma mesma linhagem, bem como, entre os animais infectados ou reinfectados de linhagem diferente. Não foram

detectadas, ainda, diferenças significativas no número de ovos/miracídios eliminados junto às fezes entre as diferentes linhagens ou entre infecção e reinfecção em uma mesma linhagem de camundongo. Porém, no fígado dos animais BALB/c reinfectedos, o número de ovos se mostrou reduzido em relação aos animais BALB/c infectados. Também foi observada uma redução significativa no número de ovos no fígado dos animais BALB/c reinfectedos em relação aos animais C57BL/6 reinfectedos.

A diferença do número de ovos presentes no fígado dos animais BALB/c reinfectedos em relação aos BALB/c infectados e C57BL/6 reinfectedos pode ser explicada por uma interferência no desenvolvimento do parasito ou na fecundidade das fêmeas de vermes adultos do *S. mansoni*. Essa ocorrência é causada pelo perfil de resposta imunológica desenvolvido nesses camundongos, em resposta à reinfecção pelo parasito. Como não houve diferença entre os camundongos, em relação ao número de ovos presentes nas fezes e no intestino dos animais, e como no oograma foram observados ovos de todos os estádios de desenvolvimento, concluímos que a fecundidade das fêmeas não foi alterada, e por isso, acreditamos que a maturação das mesmas tenha sido afetada. Ao longo da infecção/reinfecção, uma parte dos ovos depositados pelas fêmeas do parasito tende a ficar retida e se acumular no fígado do hospedeiro. Desta forma, quando comparado o número de ovos acumulados no fígado de animais infectados/reinfectedos pelo *S. mansoni*, num mesmo instante, esse número deverá ser semelhante entre os animais, desde que o tempo de desenvolvimento das fêmeas tenha sido similar.

Sabe-se que fatores ligados à presença de vermes machos, bem como relacionados ao sistema imune do hospedeiro, influenciam na maturação das fêmeas em desenvolvimento dentro do hospedeiro. Um trabalho realizado por Davies e colaboradores (2001), utilizando camundongos deficientes em linfócitos T e B, demonstrou a importância do sistema imunológico do hospedeiro na maturação das fêmeas do verme, já que o processo de desenvolvimento das mesmas se mostrou comprometido nestes animais. Mais tarde, foi descoberto que sinais do sistema imune do hospedeiro influenciam no desenvolvimento dos machos, que, por sua vez, estimulam a maturação das fêmeas (Hernandez et al., 2004). Vários trabalhos voltados à investigação dos fatores do sistema imune do hospedeiro que influenciam no desenvolvimento dos vermes apontam a importância do TNF- α , TGF- β e IL-7, neste contexto. Acredita-se que a citocina TNF- α , além de auxiliar na

formação do granuloma, apresente um importante papel na indução da oviposição (Amir et al, 1992). Já o fator de transformação do crescimento $-\beta$ (TGF- β), através de suas vias de sinalização, se mostra importante no pareamento dos vermes macho e fêmea (Loverde, et al., 2007). A IL-7, por sua vez, tem um efeito indireto no desenvolvimento do verme por causa de sua função na homeostase de células T. (Wolowczuk et al., 1999; Blank, et al., 2006).

Nesse sentido, a diferença encontrada, em nosso estudo, no número de ovos presentes no fígado dos animais BALB/c reinfectedados, em relação aos BALB/c infectados e C57BL/6 reinfectedados, pode estar relacionada a algum fator da resposta imune dos animais BALB/c, quando reinfectedados. Essa situação influenciaria na maturação das fêmeas, e, por consequência, no atraso do começo da postura dos ovos pelas fêmeas do verme. Nossos resultados mostram que no período pré-patente, a não ser pela significativa produção de IL-4 pelos animais BALB/c reinfectedados, não houve uma clara diferença na produção de citocinas entre os grupos BALB/c reinfectedados e BALB/c infectados ou C57BL/6 reinfectedados. Como não há dados na literatura que relacionam a IL-4 com o desenvolvimento do parasito, outros fatores do sistema imune, os quais não foram investigados nesse trabalho, poderiam explicar essa diferença encontrada entre os grupos.

Em relação ao perfil de imunoglobulinas produzidas pelos camundongos das duas linhagens, foi possível observar que os animais C57BL/6 e BALB/c, quando infectados ou reinfectedados, foram capazes de produzir os anticorpos IgG, IgG1 e IgG2c contra os antígenos das três fases do parasito, presentes no hospedeiro definitivo (esquistossômulo, verme adulto e ovo). De modo geral, os níveis dos anticorpos avaliados aumentaram ao longo da infecção, alcançando uma maior produção no último dia avaliado (110º dia pós-infecção). Já os animais reinfectedados apresentaram maior produção dos anticorpos avaliados em relação aos camundongos infectados.

Nos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados/tratados a produção de imunoglobulinas específicas para Ag. de esquistossômulo, AWA e SEA apresentou níveis significativos se comparado aos animais não infectados e infectados de uma mesma linhagem, principalmente em relação às imunoglobulinas IgG total e IgG1, entre os dias 3º e 60º pós-infecção.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação do Praziquantel sobre o *Schistosoma mansoni* porém, já foi evidenciado que a droga induz paralisia da

musculatura do parasito (decorrente de um influxo de cátions de cálcio no interior do verme) e degeneração do tegumento do verme (Pax et al., 1978; Becker et al., 1980). Além disso, o Praziquantel possibilita a liberação de antígenos do verme, os quais não estavam expostos ao sistema imunológico anteriormente, devido à morte do mesmo ou dano nos tecidos (Harnett e Kusel, 1986). Assim, a liberação de novos antígenos pode ser capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro induzindo a produção de anticorpos contra o parasita. Nossos dados demonstram um aumento significativo na produção de anticorpos pós-tratamento quando comparado o grupo infectado, nos dias 3, 7, 15, 30, 60 e 110 pós-infecção, com o grupo infectados/tratado, nos dias 38, 42, 50, 65, 95, 145, 190 pós-tratamento, respectivamente. Porém, não observamos diferenças estatísticas entre o soro de camundongos infectados com 110 dias de infecção e o soro de camundongos infectados e tratados no dia 38º pós-tratamento (que corresponde ao dia 83 pós-infecção). Assim, não conseguimos, no tempo avaliado, observar um aumento no nível de anticorpos em decorrência do tratamento.

A detecção de reatividade do soro de camundongos infectados ao AWA e ao SEA, antes mesmo das fases de desenvolvimento do parasito estar presente no hospedeiro, foi uma interessante característica observada em nosso trabalho. A existência de epitopos compartilhados entre as diferentes fases de desenvolvimento do parasito pode ser a explicação para este fato. Além disso, a presença desses epitopos também justifica a crescente produção das imunoglobulinas (anti-ag. de esquistossômulo, AWA e SEA), ao longo da infecção pelo parasito. Avaliando a base de dados do genoma do *S. mansoni* (schistodb), observamos que as três fases de desenvolvimento do parasito, esquistossômulo, verme adulto e ovo, possuem 3306 proteínas em comum, o que indica a alta presença de epitopos compartilhados. Um trabalho desenvolvido por Omer Ali e colaboradores (1988), que analisou a produção de anticorpos contra antígenos da superfície de esquistossômulo, em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, mostrou que a maioria dos anticorpos antiesquistossômulo produzidos se liga à antígenos de superfície do ovo do parasito. Assim sendo, o ovo seria o principal imunógeno responsável pela produção de anticorpos antiesquistossômulo durante infecção crônica. O aumento da produção de anticorpos antiesquistossômulo, imediatamente após a produção dos ovos corrobora esta observação.

Quando comparada a produção de IgG1 e IgG2c entre as duas linhagens reinfectedas, foi observado que os camundongos C57BL/6 reinfectedados tendem a uma maior produção de IgG2c, se comparado aos animais BALB/c reinfectedados. Esses, por sua vez, apresentam uma tendência maior em produzirem IgG1 em relação aos animais reinfectedados da linhagem C57BL/6. Sabe-se que a troca de isotipo das imunoglobulinas, dentre outros fatores, está diretamente ligada à presença de citocinas específicas. Assim, a produção dos isotipos IgG1 e IgG2c esta relacionada com a presença de IL-4 e IFN- γ , respectivamente, e por isso, o aparecimento destes isotipos pode inferir o direcionamento de uma resposta imune Th1 (IFN- γ – IgG2c) ou Th2 (IL-4 – IgG1) (Barr, et al., 2009; Stavnezer, 1996).

Nesse contexto, é interessante notar que apenas os animais BALB/c, independentemente de serem infectados ou reinfectedados, produziram níveis significativos de IL-4. Como foi dito, a citocina IL-4 é um importante fator na indução do desenvolvimento de células Th2 e de células B produtoras de IgG1 e IgE (Abbas et al., 1996). Dessa maneira, a maior produção de IgG1 em animais BALB/c está relacionada à maior produção de IL-4. Diante desses resultados, podemos concluir que a linhagem BALB/c possui uma maior tendência em apresentar uma resposta Th2 frente à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*. Esta característica da linhagem BALB/c já foi explorada por Hsieh e colaboradores (1995), os quais demonstraram que as células desses animais, sobre condições neutras de diferenciação, *in vitro*, tendem a desenvolverem um fenótipo Th2.

Durante todo o tempo de infecção e reinfecção, pudemos observar tanto na linhagem BALB/c, quanto na linhagem C57BL/6, produção de níveis significativos de IL-13 e IL-10. A presença destas citocinas do tipo 2 já era esperada, já que, assim como outras infecções helmínticas, a infecção pelo *S. mansoni*, resulta na indução de uma resposta do tipo 2, caracterizada pela produção de IgE e eosinofilia (Scott et al, 1989).

Estudos da resposta imune de camundongos associada à infecção pelo *S. mansoni* demonstram um balanço entre as respostas do tipo1 e do tipo 2, sendo que os estágios iniciais da doença induzem à formação de uma resposta do tipo 1, seguida pela produção de citocinas do tipo 2, após o início da deposição dos ovos do parasita (Pearce e MacDonald, 2002). Diferentemente desses estudos, nossos resultados demonstraram uma produção significativa de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-10), anterior à deposição dos ovos. Esse fato corrobora com os achados de

Oliveira Fraga e colaboradores (2010), os quais identificaram a indução de uma resposta do tipo 2, acompanhada pela produção de IL-4 e imunoglobulina IgE, antes da oviposição dos parasitos.

A presença da citocina IL-13, nas duas linhagens BALB/c e C57BL/6 infectadas, no período pré-patente, foi uma intrigante observação. Sabe-se que, na fase crônica da esquistossomose, essa citocina apresenta um papel importante na reconstituição do tecido lesado no granuloma, promovendo a formação da fibrose através da indução da produção de colágeno pelos fibroblastos e macrófagos (Wynn, 2001). Porém, nas fases iniciais da infecção, a função da citocina IL-13 ainda não foi bem explorada. Dessein e colaboradores (2004) acreditam que a IL-13, no começo da infecção, desempenhe um papel protetor na infecção, principalmente relacionada à eosinófilos. A IL-13 é a principal citocina envolvida no recrutamento de eosinófilos para os tecidos, pois ela aumenta a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 nas células endoteliais, e, assim, aumenta o recrutamento de eosinófilos através da interação VCAM-1- $\alpha 4\beta 1$. Além disso, a IL-13 aumenta a expressão de CD69 nos eosinófilos e a produção de GM-CSF por várias células, inclusive células epiteliais (Dessein et al. 2004). Sendo assim, a IL-13 pode desempenhar um papel importante na proteção contra a infecção: recrutar os eosinófilos para os locais de entrada e migração do parasito, prolongando a sobrevivência dos eosinófilos, aumentando os receptores para ADCC e iniciando a resposta Th2 contra antígenos da larva do parasito.

No período pós-patente, fase em que ocorre a postura dos ovos dos vermes e a indução da formação da reação granulomatosa, foi observada uma produção significativa de TNF- α e IFN- γ , nos camundongos C57BL/6 em relação aos animais BALB/c. Sabe-se que a citocina TNF- α possui uma importante função na formação do granuloma. Em camundongos SCID (deficientes em células T eB), a formação do granuloma foi reconstituída após a injeção de rTNF- α (Amiri et al. 1992). Além disso, em estudos em humanos, altos níveis de TNF- α estão associados ao aumento do risco de fibrose (Henri et al, 2002; Booth et al., 2004). Ao contrário, a citocina IFN- γ tem sido associada a uma função anti-fibrogênica (Czaja et al. 1989). Assim, indivíduos apresentando altos níveis de TNF- α e baixos níveis de IFN- γ , apresentam maior risco de desenvolver fibrose (Henri et al, 2002; Booth et al., 2004). Nossos resultados mostraram significativos níveis de TNF- α e IFN- γ em camundongos

C57BL/6, porém, a relação destas citocinas com a morbidade da doença não pôde ser observada já que os granulomas teciduais não foram avaliados.

Um interessante fato observado durante a infecção/reinfecção pelo parasito, foi a baixa produção da citocina IL-17 em ambas as linhagens, BALB/c e C57BL/6. Sabe-se que a IL-17 está ligada à gravidade da doença, sendo que em animais com grave patologia, é encontrado altos níveis de IL-17 (Rutitzky & Stadecker, 2006). A patologia menos grave, característica dos camundongos BALB/c e C57BL/6 (Stadecker et al., 2004), pode explicar a falta de produção significativa dessa citocina.

Em relação à produção de citocinas pós-tratamento, vários estudos em humanos mostram que a quimioterapia influencia na produção de citocinas. Joseph e colaboradores (2004), mostraram que há um aumento de produção de citocinas do tipo 2 após tratamento. Em resposta aos antígenos Teg (tegumento externo do parasito), SWAP, SEA, estes autores observaram aumento na produção de IL-10 após tratamento, sendo que em resposta ao Teg e SWAP a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 estava aumentada, sete semanas pós-tratamento. Diferentemente do trabalho citados, nossos resultados mostram que a produção de citocinas nos camundongos infectados/tratados em relação aos animais infectados apresentou apenas diferenças significativas pontuais. Tais diferenças foram observadas em relação à produção das citocinas do tipo 2, IL-13, IL-10, IL-4, em ambas linhagens, sendo que também foi observada produção significativa de TNF- α .

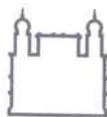
Nosso trabalho, ao avaliar os parâmetros parasitológicos e imunológicos da infecção e reinfecção, pelo *S. mansoni*, em camundongos de duas linhagens diferentes, BALB/c e C57BL/6, permitiu a geração de novos conhecimentos acerca da interação parasito-hospedeiro e dos importantes mecanismos imunológicos envolvidos na infecção e reinfecção pelo parasita. Espera-se que os nossos resultados possam auxiliar nos estudos destinados ao controle da esquistossomose, em relação ao desenvolvimento de novas drogas e vacinas.

7 CONCLUSÃO

Através dos nossos resultados podemos concluir que as linhagens BALB/c e C57BL/6 não apresentam diferenças em relação à carga parasitária, ao número de ovos nas fezes e ao número de ovos no intestino, tanto quando foram infectados ou após serem infectados, tratados e reinfectados. Apesar disso, os camundongos de ambas as linhagens apresentaram diferenças em relação à produção de imunoglobulinas e citocinas. Os animais reinfectados de ambas as linhagens apresentaram diferenças em relação à produção das imunoglobulinas IgG1 e IgG2c, sendo que os camundongos C57BL/6 reinfectados apresentaram maior produção de IgG2c e os animais BALB/c reinfectados maior produção de IgG1. Camundongos C57BL/6 apresentaram um perfil misto de produção de citocinas do tipo 1/tipo 2, com produção das citocinas IL-10 e IL-13, ao longo de toda a infecção/reinfecção, sendo também significativa a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , tanto durante a infecção, quanto durante a reinfecção. Assim, como os camundongos C57BL/6, os animais BALB/c produziram as citocinas IL-13 e IL-10 ao longo de toda a infecção/reinfecção, no entanto, a linhagem BALB/c produziu a citocina IL-4 durante todo o tempo de infecção e reinfecção.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Licença do CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-17/09

Certificamos que o protocolo (P-48/09-2), intitulado "Avaliação dos parâmetros imunológicos associados à infecção e re-infecção pelo *Schistosoma mansoni* em linhagens murinas distintas", sob a responsabilidade de **CRISTINA TOSCANO FONSECA**, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 09/11/2013 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 170 fêmeas de C57BL/6, idade: 6 semanas.

Mus musculus

- 170 fêmeas de BALB/c, idade: 6 semanas.

Mus musculus

- 300 fêmeas de Swiss webster, idade: 8 semanas.

Rio de Janeiro, 09 de novembro de 2009.


Dr^a. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.

Abath FG, Morais CN, Montenegro CE, Wynn TA, Montenegro SM. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol*. 2006 Feb;22(2):85-91. Epub 2005 Dez 27.

Abdul-Ghani RA, Hassan AA. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. *Parasitol Res*. 2010 Jun;107(1):1-8. Epub 2010 Abr 6.

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadick M, Rector E, Ritter D, et al. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*. 1992 Apr 16;356(6370):604-7.

Andrews P, Dycka J, Frank G. Effect of praziquantel on clinical-chemical parameters in healthy and schistosome-infected mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 1980 Apr;74(2):167-77.

Araújo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol*. 1996 Jun;26(6):1399-403.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PM, Sampaio IB. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978 May-Jun;20(3):121-32.

Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1005-12. Epub 2009 Jun 19.

Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H, Eckert J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. *Z Parasitenkd.* 1980;63(2):113-28.

Bina JC, Prata A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Mar-Apr;36(2):211-6. Epub 2003 Jun 10.

Blanchard TJ. Schistosomiasis. *Travel Med Infect Dis.* 2004 Feb;2(1):5-11.

Blank RB, Lamb EW, Tocheva AS, Crow ET, Lim KC, McKerrow JH, et al. The common gamma chain cytokines interleukin (IL)-2 and IL-7 indirectly modulate blood fluke development via effects on CD4+ T cells. *J Infect Dis.* 2006 Dec 1;194(11):1609-16. Epub 2006 Oct 23.

Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1295-303.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol.* 1987 Jul 1;139(1):215-20.

Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009 Apr;31(4):163-76.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* 2008 Nov-Dez;108(2-3):109-17. Epub 2008 Jun 5.

Caldas IR, Correia-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, Colley DG, et al. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2000

Carlier Y, Nzeyimana H, Bout D, Capron A. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-infected African parturients and their newborn children. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Jan;29(1):74-81.

Carter CE, Colley DG. An electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen preparation. *J. Parasitol.* 1978 Jun;64(3):285-90.

Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Out;97(7):917-40.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.11-23, 2007. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/revista_pdfs/vol28n1/trab2.pdf>. Acesso em Jan. 2011

Cioli D, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. *Parasitol Res.* 2003 Jun;90 Supp 1:S3-9. Epub 2002 Nov 22.

Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcão PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):171-7.

Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Nov-Dec;83(6):798-804.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(5 Suppl 1):13-9. Epub 2004 Oct 13.

Czaja MJ, Weiner FR, Takahashi S, Giambrone MA, van der Meide PH, Schellekens H, et al. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* 1989 Nov;10(5):795-800.

Davies SJ, Grogan JL, Blank RB, Lim KC, Locksley RM, McKerrow JH. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1358-61.

Dessein A, Kouriba B, Eboumbou C, Dessein H, Argiro L, Marquet S, et al. Interleukin-13 in the skin and interferon-gamma in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:180-90.

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Ouma JH, Sturrock RF. Human IgE responses to *Schistosoma mansoni* and resistance to reinfection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87 Suppl 4:99-103.

Durães FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett.* 2009 Jun 30;125(1):72-7. Epub 2009 Jun 17.

Erasmus, DA. Structural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. *J Chem Ecol.* 1986. Aug;12(8): 1755-64

Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol.* 1998 Oct;20(10):447-54.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Jul;51(1):83-8.

Farah IO, Johansson M, Lövgren-Bengtson K, Hau J. *Schistosoma mansoni* in mice: the pattern of primary cercarial exposure determines whether a secondary infection post-chemotherapy elicits a T helper 1- or a T helper 2-associated immune response. *Scand J Immunol.* 2000 Mar;51(3):237-43.

Farah IO, Kariuki TM, King CL, Hau J. An overview of animal models in experimental schistosomiasis and refinements in the use of non-human primates. *Lab Anim.* 2001 Jul;35(3):205-12.

Fiore M, Moroni R, Alleva E, Aloe L. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. *Exp Parasitol.* 1996 Jun;83(1):46-54.

Gazzinelli G, Montesano MA, Corrêa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS, et al. Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987;82 Suppl 4:95-100.

Gray DJ, McManus DP, Li Y, Williams GM, Bergquist R, Ross AG. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. *Lancet Infect Dis.* 2010 Oct;10(10):733-6. Epub 2010 Aug 10.

Haas, W. The attachment response of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Influence of natural substrates and temperature. *Z Parasitenkd.* 1976 Mar 31;49(1):63-72.

Haas W, Diekhoff D, Koch K, Schmalfuss G, Loy C. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. *J Parasitol.* 1997 Dec;83(6):1079-85.

Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):929-36.

Hernandez DC, Lim KC, McKerrow JH, Davies SJ. *Schistosoma mansoni*: sex-specific modulation of parasite growth by host immune signals. *Exp Parasitol.* 2004 Jan-Feb;106(1-2):59-61.

Harnett W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology.* 1986 Oct;93 (Pt 2):401-5.

Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Publ Hlth.* 1934.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* 2006 Jan;3(5):e102.

Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med.* 1995 Feb 1;181(2):713-21.

Jackson Laboratory, The. *Mouse Genome Informatics.* University of Leicester, UK, 1998. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/>>. Acesso em: Out. 2010.

de Jesus AR, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, de Jesus AA, et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3391-7.

de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida RP, et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 2002 Jan 1;185(1):98-105. Epub 2001 Dez 14.

Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, et al. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *J Infect Dis.* 2004 Aug 15;190(4):835-42. Epub 2004 Jul 12.

Jurberg AD, Oliveira AA, Lenzi HL, Coelho PM. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Feb;103(1):112-4. Epub 2008 Jan 31.

Khalife J, Dunne DW, Richardson BA, Mazza G, Thorne KJ, Capron A, et al. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1989 Jun 15;142(12):4422-7.

Khammo N, Bartlett A, Clothier RH, Whitfield PJ. The attachment of *Schistosoma mansoni* cercariae to human skin cells. *Parasitology.* 2002 Jan;124(Pt 1):25-30.

King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet.* 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1561-9.

Kloos H, Correa-Oliveira R, Oliveira Quites HF, Caetano Souza MC, Gazzinelli A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. *Acta Trop.* 2008 Nov-Dec;108(2-3):194-201. Epub 2008 Jul 23.

Kloos H, Correa-Oliveira R, dos Reis DC, Rodrigues EW, Monteiro LA, Gazzinelli A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Jul;105(4):578-86.

Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93 Suppl 1:141-51.

Loureiro, S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. 1989, vol.84, suppl.1, pp. 124-133. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/mioc/v84s1/vol84\(fsup1\)_136-145.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v84s1/vol84(fsup1)_136-145.pdf)> Acesso em: out. 2010

Loveerde PT, Osman A, Hinck A. Schistosoma mansoni: TGF-beta signaling pathways. Exp Parasitol. 2007 Nov;117(3):304-17. Epub 2007 Jun 16.

Mahanty S, Nutman TB. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10. Parasite Immunol. 1995 Aug;17(8):385-92.

Malaquias LC, Falcão PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, et al. Cytokine regulation of human immune response to Schistosoma mansoni: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. Scand J Immunol. 1997 Oct;46(4):393-8.

Martins-Leite P, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Gazzinelli A, Malaquias LC, Correa-Oliveira R, et. al. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug;52(8):2780-6. Epub 2008 Jun 2.

Melo AL, Coelho PMZ. Shistosoma mansoni e a Doença In: Neves DP. Parasitologia Humana. 10. Ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 174-193.

Miller P, Wilson RA. Migration of the schistosomula of Schistosoma mansoni from the lungs to the hepatic portal system. Parasitology. 1980 Apr;80(2):267-88.

Morais CN, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Domingues AL, et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Set;103(6):561-8.

Nutten S, Trottein F, Gounni AS, Papin JP, Capron A, Capron M. From allergy to schistosomes: role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92 Suppl 2:9-14.

Oliveira Fraga LA, Torrero MN, Tocheva AS, Mitre E, Davies SJ. Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. J Infect Dis. 2010 Feb 1;201(3):464-72.

Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP, Leite LC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. Acta Trop. 2008 Nov-Dec;108(2-3):256-62. Epub 2008 Jun 5.

Omer Ali P, Smithers SR, Bickle Q, Phillips SM, Harn D, Simpson AJ. Analysis of the anti-Schistosoma mansoni surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. J Immunol. 1988 May 1;140(9):3273-9.

Pan American Health Organization. Regional Office of the World Health Organization. Report: PAHO/WHO Preparatory Meeting On Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean. St. George: PAHO/WHO, 2007 Dec. 13-14. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/resources/PAHO_report_Schistosomiasis_caribbean.pdf>. Acesso em: Jan. 2011.

Pan, CT. Studies on the host-parasite relationship between Schistosoma mansoni and the snail Australorbis glabratus. Am J Trop Med Hyg. 1965 Nov;14(6):931-76

Pax R, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1978 Oct;304(3):309-15.

Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jul;2(7):499-511.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. Bras. Malariol Doenças Trop.* 1956

Prata A, Bina JC. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). *Gaz. Med. Bahia* 1968 vol. 68 , p. 49 – 60.

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol.* 1974 Dez;36(3):360-72.

Rutitzky LI, Stadecker MJ. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Set;101 Suppl 1:327-30.

Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol.* 2003 Abr;33(4):880-8.

Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev.* 1989 Dec;112:161-82.

Silveira AM, Bethony J, Gazzinelli A, Kloos H, Fraga LA, Alvares MC, et al. High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Mai;66(5):542-9.

Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev.* 2004 Out;201:168-79.

Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol.* 1996 Apr;8(2):199-205.

Stirewalt MA. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. *Adv Parasitol.* 1974;12:115-82.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LC, Oliveira LF, et al. Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Trop.* 2008 Nov-Dec;108(2-3):139-49. Epub 2008 Apr 18.

Walter K, Fulford AJ, McBeath R, Joseph S, Jones FM, Kariuki HC, et al. Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. *J Immunol.* 2006 Oct 15;177(8):5490-8.

Wilson RA, Draskau T, Miller P, Lawson JR. *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitology.* 1978 Aug;77(1):57-73

Wolowczuk I, Nutten S, Roye O, Delacre M, Capron M, Murray RM, et al. Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 1999 Aug;67(8):4183-90.

World Health Organization. Media Centre: Schistosomiasis: fact sheet n° 115, february 2010. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: maio. 2011.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56. Epub 2001 Dec 19.