



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



JAMILLE SOUZA FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE MONÓCITOS DE
PACIENTES COM FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA À
ESQUISTOSSOMOSE**

Salvador, BA
2013

JAMILLE SOUZA FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE MONÓCITOS DE
PACIENTES COM FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA
A ESQUISTOSSOMOSE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ilma A. Santos Araujo
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso

Salvador, BA
2013

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.**

F363 Fernandes, Jamille Souza
Caracterização fenotípica de monócitos de pacientes com
fibrose periportal secundária à esquistossomose / Jamille Souza
Fernandes – Salvador, 2013.
93 f.
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Ilma Andrade Santos Araujo
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciana Santos Cardoso


Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.


1. Esquistossomose. 2. Fibrose Periportal. 3. Monócitos. I.
Araujo, Maria Ilma Andrade Santos. II. Cardoso, Luciana
Santos. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.


CDU 616.995.122


ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA **JAMILLE SOUZA FERNANDES**


Aos vinte e sete dias do mês de março do ano de dois mil e treze às quatorze horas no Auditório III do 2º andar no Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. **Maria Ilma Andrade Santos Araujo**, Orientadora, Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus, Dr. Régis de Albuquerque Campos se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA A ESQUISTOSSOMOSE**" da Mestranda **Jamille Souza Fernandes**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação **Aprovada**, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora, pelo Mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Salvador, 27 de março de 2013.


Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo
Orientadora


Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Banca Examinadora


Dr. Régis de Albuquerque Campos
Banca Examinadora


Jamille Souza Fernandes
Mestranda


Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Coordenador do PPGIm ICS-UFBA
em Exercício

Dedico este trabalho a Deus,
meus pais e meus irmãos pelo amor,
força e apoio durante todo esse trajeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Profa Luciana Cardoso pela sua inteira dedicação ao trabalho, apoio, compreensão, ensinamentos e carinho. Sou infinitamente grata por tudo Lú.

A Profa Ilma pela paciência, atenção, pessoa que é exemplo de profissionalismo e dedicação. Querida Profa agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, apoio e confiança.

Aos colegas do laboratório Alergia e Helminíase: Aline Báfica, Andréia Barreto, Luciane Lima, Robson Paixão, Joanemile Pacheco, Ricardo Riccio, Tarcísio Vila Verde agradeço por contribuir através de opiniões, sugestões e pelo companheirismo.

A Rafael Jabar, Giuseppe Tittoni e Dorival Araújo pelo suporte na área endêmica.

Aos meus amigos Diego Lopes, Natayme Tartaglia, Cinthia Vila Nova, Patrícia Benedet, Verena Nery, Kelly Pedroza e Tamires Brasil pela atenção, apoio, amizade e por estarem sempre presentes.

Ao Prof Edgar Carvalho pelos ensinamentos e colaboração.

A todos os pesquisadores e funcionários do Serviço de Imunologia, sempre muito prestativos e atenciosos.

A Dilcéia Reis, Sônia Costa e Giovane Machado pela paciência e por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Aos pacientes pela receptividade e por ter permitido a realização deste estudo.

A agente de saúde, Irene de Jesus, por todo apoio prestado na área endêmica.

A toda minha família, meus pais (Melquiades e Joana), irmãos (Diego e Bruno), minha avó (Maria de Lourdes) pelo amor, força, confiança e por acreditar sempre em mim. E aos meus sobrinhos, Daniel e Douglas, por me mostrarem nos pequenos detalhes a simplicidade da vida.

A vida nem sempre segue o nosso querer,
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser!

Chico Xavier

RESUMO

Cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* evoluem para a forma grave da doença, caracterizada por fibrose periportal. A patogênese da esquistossomose é predominantemente causada pela resposta imune do hospedeiro aos antígenos do ovo e estudos têm enfatizado o papel de monócitos na progressão da fibrose em modelos experimentais. O objetivo deste estudo foi caracterizar as subpopulações de monócitos e o seu grau de ativação em indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. Participaram do estudo quarenta indivíduos da área endêmica em esquistossomose Água Preta, Bahia, Brasil. Monócitos foram obtidos através de células mononucleares do sangue periférico e avaliados *ex vivo* ou na presença do antígeno solúvel do ovo (SEA). Os monócitos foram classificados em: clássicos, intermediários e não-clássicos. A expressão de moléculas co-estimulatórias, citocinas e receptores de citocinas foram avaliadas usando a técnica de citometria de fluxo. De um modo geral, a frequência dos monócitos clássicos foi maior em relação às demais subpopulações. A expressão de HLA-DR foi maior nos monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave comparando com os indivíduos sem fibrose ou com fibrose incipiente. Quanto a expressão do receptor α de IL-4 (IL-4R α) e de IL-10 (IL-10R) foi maior nos monócitos de indivíduos sem fibrose e com fibrose moderada a grave. A expressão de IL-6, TNF- α e TGF- β foi maior nos monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave, enquanto que a expressão de IL-12 foi menor nos monócitos desses indivíduos. Este estudo mostrou que os monócitos dos indivíduos com fibrose periportal, independente da subpopulação, participam na imunopatogênese da doença, uma vez que expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas e baixos níveis de citocinas anti-fibróticas.

Palavras-chave: esquistossomose, fibrose periportal, monócitos

ABSTRACT

About 5 to 10% of individuals infected with *Schistosoma mansoni* progress to the severe form of the disease, characterized by periportal fibrosis. The pathogenesis of schistosomiasis is caused predominantly by the host immune response to egg antigens and studies have emphasized the role of monocytes in the progression of fibrosis in experimental models. The aim of this study was to characterize the subpopulations of monocytes and their status of activation in individuals with different degrees of periportal fibrosis secondary to schistosomiasis. The study included forty subjects from an endemic area of schistosomiasis, Água Preta, Bahia, Brazil. Monocytes were obtained from peripheral blood mononuclear cells and evaluated *ex vivo* or in the presence of soluble egg antigen (SEA). Monocytes were classified in: classical, intermediate and non-classical. The expression of co-stimulatory molecules, cytokines and cytokine receptors were assessed using the flow cytometry technique. In general, the frequency of classical monocytes was higher than the other monocytes subpopulations. The expression of HLA-DR was higher in monocytes from individuals with moderate to severe fibrosis compared to individuals without fibrosis or with incipient fibrosis. In relation to the expression of the α receptor of IL-4 (IL-4R α) and the IL-10 receptor (IL-10R), they were higher expressed in monocytes from individuals without fibrosis and with moderate to severe fibrosis. The expression of IL-6, TNF- α and TGF- β was higher in monocytes of individuals with moderate to severe fibrosis, while the expression of IL-12 was lower in monocytes from these individuals. This study showed that monocytes of individuals with moderate to severe periportal fibrosis, regardless of the subpopulation, participate in the immunopathogenesis of the disease, since they express high levels of proinflammatory and profibrotic cytokines and low levels of anti-fibrotic cytokines.

Keywords: schistosomiasis, periportal fibrosis, monocytes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. A: vermes adultos pareados. B: ovos (da esquerda para a direita, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*). C: miracídio ciliado. D: caramujo hospedeiro intermediário (esquerda para a direita, *Oncomelania*, *Biomphalaria*, *Bulinus*). E: cercárias. **Fonte:** Gryseels, Polman *et al.* "Human schistosomiasis". Lancet, 2006.....19

Figura 2: Resposta imune ao *Schistosoma mansoni*. **Fonte:** Adaptado de Dunne e Cooke. "A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease". Nat Rev Immunol, 2005.....21

Figura 3: Granuloma esquistossomótico hepático fibrótico. Foto gentilmente cedida pelo Prof Moyses Sadigursky – Serviço de Patologia – HUPES – UFBA.....23

Figura 4: Cinética da regeneração tecidual e formação de cicatriz fibrótica. **Fonte:** Adaptado de Wynn, T. A. "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases". J Clin Invest, 2007.....25

Figura 5: Localização do município de Gandu - Bahia. Fonte: Wikipédia, 2013.....34

Figura 6: Habitantes de Água Preta utilizando a água do rio, única fonte hídrica desta região.....35

Figura 7: (A) Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando a população de monócitos, região 1 (G1). (B) Subpopulações de monócitos a partir da expressão de CD14 e CD16. (C) Histograma de expressão de CD14 nas subpopulações de monócitos.....39

Figura 8: Tamanho do fígado (A), considerando a medida pela linha médio-clavicular e tamanho do baço (B) considerando o maior diâmetro do órgão medido por USG nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (* $p < 0,005$ ANOVA).....43

Figura 9: Frequência das subpopulações de monócitos: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) (A), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) (B) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (C) nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com 10µg/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis).....44

Figura 10: Frequência dos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) em CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. **p<0,005 (Kruskal Wallis).....45

Figura 11: Expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com 10µg/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).....46

Figura 12: Expressão de HLA-DR (A) e das moléculas co-estimulatórias CD80 (B) e CD86 (C) nas subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).....47

Figura 13: Frequência das moléculas co-estimulatórias CD80 (A) e CD86 (B) nas subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,0001 (Kruskal Wallis).....49

Figura 14: Expressão das moléculas pró-inflamatórias IL-6 (A-C) e TNF-α (D-F) e pró-fibróticas TGF-β (G-I) e IL-4Rα (J-L) nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas 10µg/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).....52

Figura 15: Frequência (A) e expressão (B) do receptor α de IL-4 na subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).....55

Figura 16: Expressão das moléculas anti-fibrótica IL-12 (A-C) e reguladoras IL-10 (D-F) e IL-10R (G-I) nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com 10µg/mL de SEA(barra cinza) e sem estímulo (barra branca). *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).....57

Figura 17: Frequência (A) e expressão (B) do receptor de IL-10 na subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,0001 (Kruskal Wallis).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da população de estudo.....42

Tabela 2: Frequência de subpopulações de monócitos expressando moléculas pró-inflamatórias e pró-fibróticas nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.....54

Tabela 3: Frequência de subpopulações de monócitos expressando moléculas anti-fibróticas e regulatórias nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Fração V de albumina bovina
CD	Do inglês “cluster of differentiation”
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
IL-	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MHC II	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MMP	Metaloproteinase da matriz
PDGF	Fator de crescimento e diferenciação plaquetário
PBS	Tampão fosfato-salina
RPMI	Do inglês “Roswell Park Memorial Institute medium”
SEA	Antígeno solúvel do ovo do <i>Schistosoma mansoni</i>
TGF- β	Fator beta de transformação de crescimento
TIMP	Inibidor tecidual da metaloproteinase
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	Do inglês “T helper”
VEGF	Fator de crescimento do epitélio vascular

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão da literatura	18
2.1 Ciclo biológico e resposta imune ao <i>Schistosoma mansoni</i>	18
2.2 Imunopatogênese da esquistossomose crônica	21
2.2.1 Características do granuloma periovular e fibrose periportal	21
2.2.2 Papel das moléculas pró-fibróticas na fibrose	26
2.2.3 Papel das moléculas pró-inflamatórias na fibrose	28
2.2.4 Papel das moléculas anti-fibróticas e reguladoras na fibrose hepática.	29
2.2.5 Participação dos monócitos na patogênese da fibrose hepática	31
3. Objetivos e Hipótese	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. Metodologia.....	34
4.1 Seleção de indivíduos na área endêmica em esquistossomose e desenho do estudo	34
4.2 Desenho do estudo e cálculo amostral	35
4.3 Critérios de inclusão.....	35
4.4 Critérios de não inclusão.....	36
4.5 Exame parasitológico de fezes	36
4.6 Ultrassonografia de abdome superior - USG	36
4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	37
4.8 Avaliação do fenótipo dos monócitos ex vivo	37
4.9 Análise da expressão de citocinas intracelulares	39
4.10 Análise estatística	40
4.11 Considerações éticas	41
5. Resultados	42
5.1 Características da população de estudo	42
5.2 Caracterização fenotípica dos monócitos estimulados com o antígeno solúvel do ovo (SEA) e <i>ex vivo</i> nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose	43
5.2.1 Frequência das subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.	43
5.2.2 Estado de ativação das subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.	45

5.2.3 Expressão de moléculas pró-inflamatórias e pró-fibróticas nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.	49
5.2.4 Expressão de moléculas anti-fibróticas e regulatórias nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.	56
6.Discussão.....	62
7.Resumo dos resultados.....	72
8.Conclusão	73
9. Perspectivas.....	73
10.Referências.....	74
11. Anexos	89
11.1 Ficha de avaliação ultrassonográfica – USG	89
11.2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participar do estudo	91
11.3 Parecer do comitê de ética em pesquisa	93

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que acomete mais de 200 milhões de pessoas no mundo e estima-se que 700 milhões vivem em áreas de risco de infecção (IAROTSKI e DAVIS, 1981; STEINMANN *et al.*, 2006; OMS, 2012). Ela assume o segundo lugar em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública, sendo prevalente em áreas tropicais e subtropicais (OMS, 2012). Alguns dos gêneros do *Schistosoma* são responsáveis por causar no homem a esquistossomose intestinal, que pode acometer o fígado e o baço (*Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma malayensis*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*), enquanto que o *Schistosoma haematobium* acomete nas vias urinárias (OMS, 2012).

Originária da África, a esquistossomose foi trazida para o Brasil, possivelmente, durante o tráfico de escravos africanos que eram portadores tanto do *S. mansoni* quanto do *S. haematobium*, porém, somente o *S. mansoni* resistiu por ter encontrado condições ambientais semelhantes às regiões de origem e hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* (PRATA, 1984).

No Brasil, antes da implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), a esquistossomose atingia entre dez e doze milhões de pessoas (PROGRAMA ESPECIAL DE CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE, 1977). Atualmente, estima-se que cerca de 2,5 a 6 milhões de indivíduos estejam infectados e 25 milhões vivem em áreas de risco de infecção (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE, 2007; BRASIL., 2009). A distribuição da esquistossomose ocorre em 19 estados numa faixa contínua ao longo do litoral, desde o Rio Grande do Norte até a Bahia, na região Nordeste, Espírito Santo e Minas Gerais, no Sudeste. A Bahia é um dos principais estados atingidos pela doença (BRASIL., 2009).

Entre os indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, cerca de 5-10% evoluem para a forma grave da doença, caracterizada por fibrose hepática e hipertensão portal, ascite e varizes esofágicas e gástricas, que podem complicar com hemorragias digestivas e levar a morte (HENRI *et al.*, 2002; BINA e PRATA, 2003).

As células mononucleares estão envolvidas em quase todos os aspectos de doenças crônicas do fígado, especialmente naqueles que levam a fibrogênese. Os monócitos, por exemplo, participam no desenvolvimento da fibrose através de vários mecanismos, incluindo secreção de citocinas e geração de produtos relacionados ao estresse oxidativo (MARRA *et al.*, 2009). Dependendo do seu estado de diferenciação e de sinais locais, monócitos e macrófagos são capazes de secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas, anti-inflamatórias, além de fatores de crescimento (BATALLER e BRENNER, 2005). Recentemente, os monócitos humanos foram classificados em três subpopulações de acordo com a expressão de CD14 e CD16: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Entretanto, na literatura ainda não existem trabalhos caracterizando esses monócitos nos indivíduos com fibrose periportal secundária à esquistossomose. Desse modo, para o entendimento da patogênese associada à doença, este estudo visa caracterizar essas três subpopulações de monócitos quanto ao seu grau de ativação e expressão de moléculas pró-inflamatórias, anti- e pró-fibróticas e reguladoras nos indivíduos com diferentes graus de fibrose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ciclo biológico e resposta imune ao *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* tem um ciclo de vida complexo que inclui estágios de vida livre, aquáticos, além de fases parasitárias no caramujo, hospedeiro intermediário, e no mamífero, hospedeiro definitivo (Figura 1). As cercárias, larvas multicelulares, evadem do hospedeiro intermediário em ambientes aquáticos e utilizam uma variedade de estímulos ambientais para encontrar seu hospedeiro definitivo, através da locomoção, contraste claro-escuro e gradientes químicos e térmicos (HAAS *et al.*, 1997). A infecção se inicia com a penetração das cercárias na pele do hospedeiro, após a perda da sua cauda, as larvas resultantes, denominadas esquistossômulos, migram através da circulação sanguínea para o coração, através das veias pulmonares, e para o fígado, onde amadurecem em 4-6 semanas em vermes adultos no sistema porta intra-hepático. Os vermes adultos migram acasalados para as veias mesentéricas inferiores, onde fazem a ovoposição. Os ovos depositados aparecem nas fezes após passarem pelos tecidos da mucosa intestinal ou ganham a circulação porto-hepática e alcançam os espaços porta, induzindo uma forte resposta granulomatosa. Posteriormente, fibrose e hipertensão portal podem desenvolver, que são as principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos infectados.

A fase aguda da doença, também conhecida como síndrome toxêmica ou síndrome de Katayama, inicia-se seis a oito semanas após a primeira exposição ao *S. mansoni* (BOGLIOLO, 1965). Em muitos casos, as infecções agudas são assintomáticas. No entanto, os sintomas que se manifestarem, acredita-se ser resultado de uma reação alérgica durante a migração larval e ovoposição precoce por vermes adultos, e podem variar em termos de gravidade dependendo das espécies infectantes (COOKE *et al.*, 1999; BOTTIEAU *et al.*, 2006). O início da doença é geralmente súbito, produzindo muitos sintomas não-específicos, tais como febre, fadiga, mialgia, dor de cabeça, mal-estar, tosse não produtiva e urticária (GELFAND *et al.*, 1981; FARID *et al.*, 1989). Além disso, lesões focais na mucosa e submucosa intestinal coincidem com o início da

postura dos ovos, ocasionando dor abdominal e diarreia. A fase aguda sintomática é raramente observada em pessoas residentes em áreas endêmicas, e mais comuns em indivíduos expostos pela primeira vez à infecção. Uma explicação para esta diferença é que a sensibilização *in-utero* e infecções prévias pode diminuir a gravidade dos sintomas comuns da síndrome de Katayama em indivíduos que são cronicamente expostos (MALHOTRA *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998).

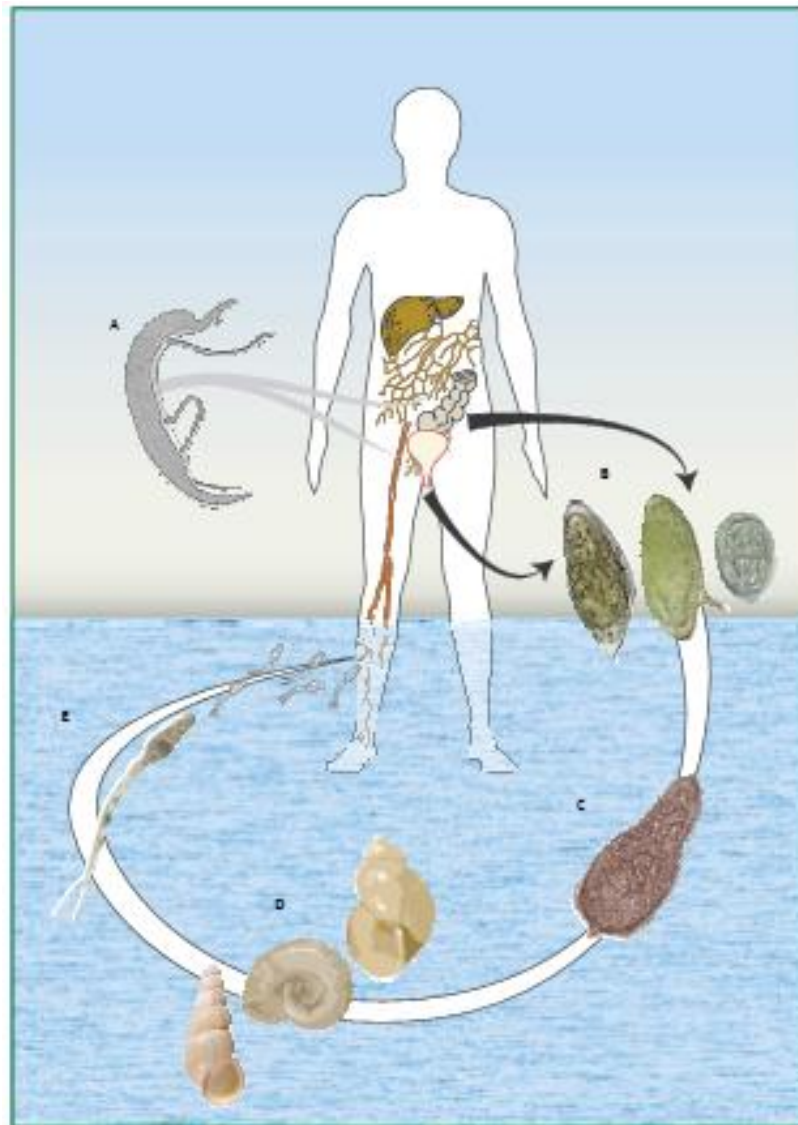


Figura 1: Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. A: vermes adultos pareados. B: ovos (da esquerda para a direita, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*). C: miracídio ciliado. D: caramujo hospedeiro intermediário (esquerda para a direita, *Oncomelania*, *Biomphalaria*, *Bulinus*). E: cercárias.

Fonte: Gryseels *et al.* "Human schistosomiasis". Lancet, 2006.

No curso da infecção pelo *S. mansoni*, a resposta imune progride através de três fases (Figura 2). Na primeira fase, 3-5 semanas após o início da infecção, a resposta é predominante do tipo Th1/inflamatória, com produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1. Essa resposta tem sido associada à destruição de esquistossômulos no pulmão com ativação de macrófagos pelo IFN- γ (LAMBERTUCCI *et al.*, 1997; WYNN *et al.*, 1998; DE JESUS *et al.*, 2002). Conforme os parasitas amadurecem e iniciam a ovoposição, entre a 5ª e a 6ª semanas, a resposta é polarizada para o tipo Th2 e regulatória, que é caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e com baixos níveis de IFN- γ (GAZZINELLI e COLLEY, 1992; ARAUJO *et al.*, 1996; CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1998). Na fase crônica da doença, por volta da 12ª semana, no qual os vermes continuam com a produção de ovos (~300 ovos por dia), a resposta Th2 é modulada (PEARCE e MACDONALD, 2002). Estudos têm mostrado que essa resposta Th2 é induzida principalmente por produtos secretados pelo ovo de *S. mansoni*, tais como, as glicoproteínas ômega-1 e IPSE/alfa-1 (CASS *et al.*, 2007; MATHIESON e WILSON, 2010), uma vez que esses produtos secretados são as primeiras moléculas que entram em contato com as células do sistema imunológico do hospedeiro e são, assim, prováveis de apresentar propriedades imunomodulatórias do ovo de *Schistosoma* (SCHRAMM e HAAS, 2010). Em contrapartida, as proteínas estruturais do ovo tornam-se acessíveis para as células do sistema imunológico, apenas quando os ovos estão morrendo e se desintegrando.

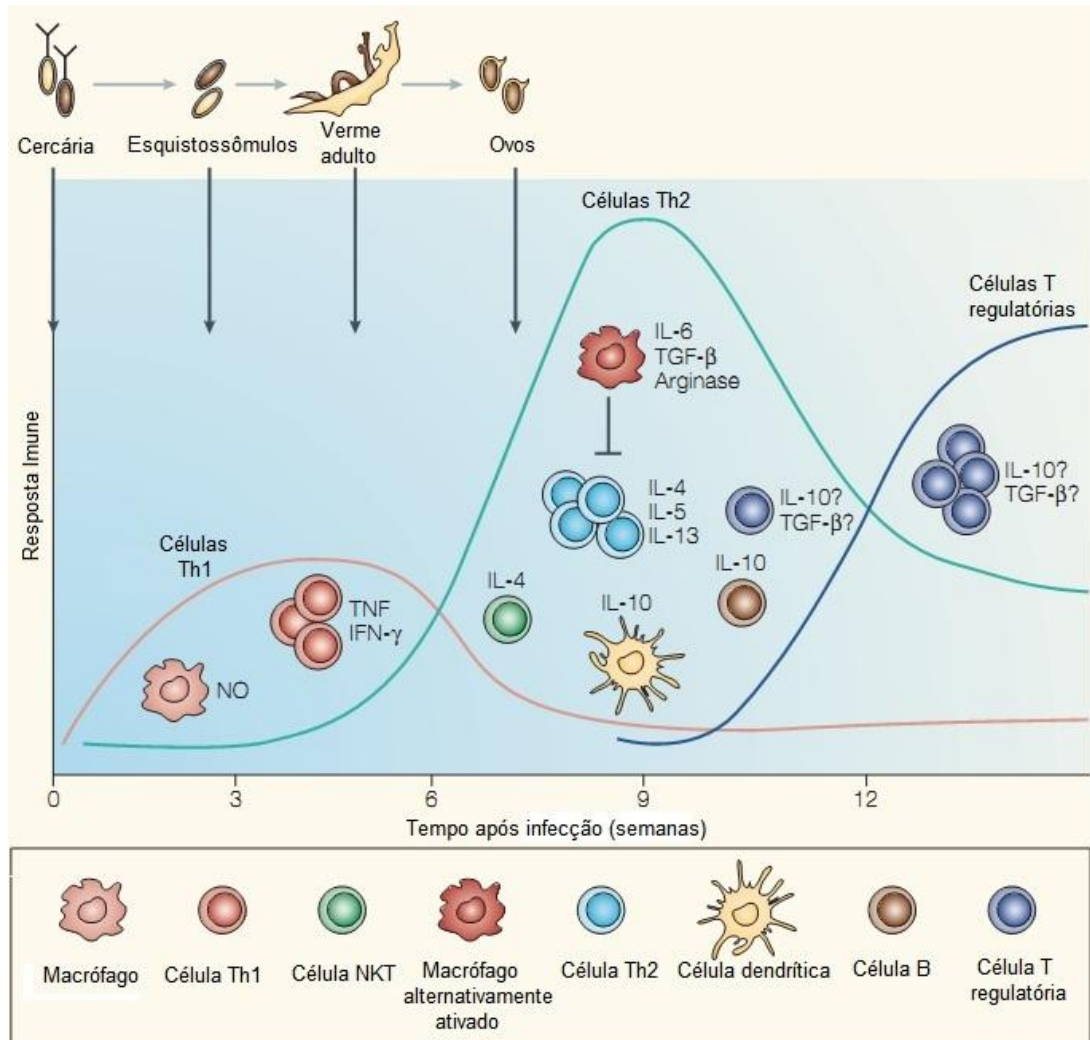


Figura 2: Resposta imune ao *Schistosoma mansoni*

Fonte: Adaptado de Dunne e Cooke. "A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease". Nat Rev Immunol, 2005.

2.2 Imunopatogênese da esquistossomose crônica

2.2.1 Características do granuloma periovular e fibrose periportal

A imunopatogênese nas fases aguda e crônica da doença é bastante distinta (LAMBERTUCCI, 1993; DE JESUS *et al.*, 2002; BURKE *et al.*, 2009). Três formas clínicas na fase crônica são bem caracterizadas: intestinal e hepatointestinal (menos grave), e a forma mais grave denominada hepatoesplênica (BINA, 1997; BINA e PRATA, 2003). A hepatoesplenomegalia crônica na esquistossomose é encontrada com mais frequência em pacientes que residem em áreas endêmicas, o que mostra que as altas taxas de transmissão da doença e o nível de sua ocorrência tem sido associado com a

intensidade da infecção (GRYSEELS, 1991). A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, descrita por Symmers (1904) (SYMMERS, 1904).

A patogênese da infecção pelo *S. mansoni* é predominantemente causada pela resposta imune do hospedeiro aos antígenos do ovo (WARREN, 1968; BICA *et al.*, 2000; CHIARAMONTE *et al.*, 2003). Vários estudos têm mostrado que a gravidade da doença é uma consequência da fibrose causada pela reação granulomatosa em torno dos ovos de *S. mansoni* que estão presos nos pequenos vasos do fígado (Figura 3). Quando o ovo emerge do verme fêmea é imaturo e não provoca nenhuma reação nos tecidos. Cerca de 5-6 dias o miracídio diferencia-se e inicia a eliminação de secreções líticas e antigênicas através de microporos presentes na casca de ovo (ANDRADE, 2009). Estas secreções são compostas por proteínas, enzimas proteolíticas, hidrolíticas e polissacarídeos. Consequentemente, os granulomas formados funcionam como barreiras que previnem a dispersão dos antígenos dos ovos do *S. mansoni*. Entretanto, com a chegada contínua dos ovos, o processo inflamatório pode evoluir para fibrose grave, o que leva à interrupção do fluxo sanguíneo normal do sistema venoso para os sinusóides resultando em hipertensão portal, que é seguido pela hepatoesplenomegalia, formação de varizes esofágicas e gástricas, que podem romper espontaneamente e levar a óbito por anemia aguda (BAPTISTA e ANDRADE, 2005; WYNN, 2007). Embora os sinais e sintomas de hipertensão portal são dominantes na esquistossomose, o parênquima hepático é preservado e a insuficiência hepatocelular é visivelmente ausente, o que difere com a situação na cirrose (ANDRADE, 2004; 2009).

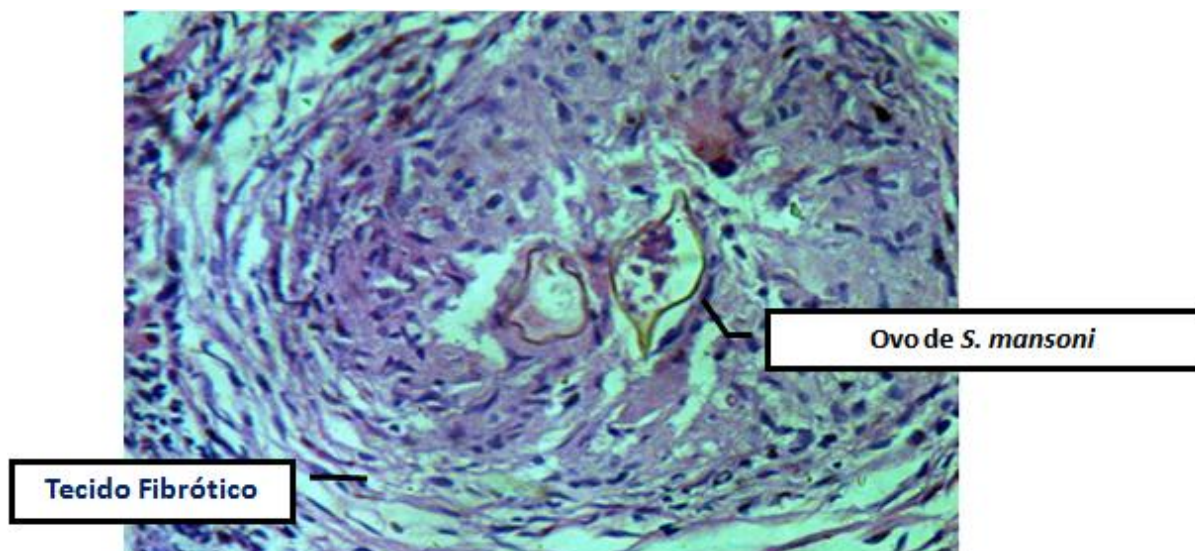


Figura 3: Granuloma esquistossomótico hepático fibrótico. Foto gentilmente cedida pelo Prof Moyses Sadigursky – Serviço de Patologia – HUPES - UFBA

A fibrose geralmente resulta de reações inflamatórias crônicas, definidas como respostas que persistem por várias semanas ou meses (WYNN, 2007). A maioria dos distúrbios fibróticos crônicos tem em comum uma irritação tecidual persistente, a qual contribui para a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e fibrogênicos, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, que em conjunto estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que progressivamente remodelam e destroem a arquitetura do tecido normal (TOMASEK *et al.*, 2002; WYNN, 2007; FRIEDMAN, 2008).

As células endoteliais estão presentes em grandes números dentro do granuloma periovular (LENZI *et al.*, 1988). Estudos *in vitro* têm demonstrado que antígenos solúveis do ovo do *S. mansoni* (SEA) induzem a proliferação de células endoteliais e também regulam a produção de fator de crescimento do epitélio vascular (VEGF) e a angiogênese (FREEDMAN e OTTESEN, 1988; LOEFFLER *et al.*, 2002; BAPTISTA e ANDRADE, 2005). Após a lesão tecidual, essas células liberam mediadores inflamatórios que iniciam a cascata de coagulação antifibrinolítica (KUMAR, 2005). As plaquetas são ativadas e se agregam, formando tampões que contribuem para a hemostasia. As células epiteliais e/ou endoteliais produzem metaloproteinase da matriz (MMP), que rompe a membrana basal, permitindo um recrutamento eficiente de células inflamatórias para o local da lesão, como também secretam fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas que recrutam e ativam neutrófilos,

macrófagos, células B, células T, e eosinófilos, que são componentes importantes do reparo tecidual.

Os macrófagos e neutrófilos são importantes no processo de eliminação de debris celulares, restos tissulares e também de microrganismos invasores, como também participam na produção de citocinas e quimiocinas que amplificam a resposta cicatricial. Posteriormente, as células T são ativadas e secretam citocinas pró-fibróticas, a exemplo da IL-13 e do TGF- β (WYNN, 2003; LI *et al.*, 2006), que por sua vez, ativam os macrófagos e fibroblastos. Os fibroblastos ativados podem evoluir para miofibroblastos (secretores de colágeno), que são derivados de células mesenquimais locais ou recrutados da medula óssea (WYNN, 2003; PARSONS *et al.*, 2007). Após a ativação, os miofibroblastos promovem a contração da lesão, processo no qual a borda da lesão desloca-se em direção ao centro e, finalmente, as células epiteliais e endoteliais se dividem e migram para regenerar o tecido danificado. Porém, no caso de lesões teciduais crônicas, o processo de cicatrização normal é interrompido. Inflamação persistente, necrose tecidual e infecção conduzem a uma ativação crônica de miofibroblastos e acumulação excessiva de proteínas da matriz extracelular (MEC), especialmente colágenos tipo I e III, bem como, o aumento de outros constituintes como o ácido hialurônico, fibronectina, proteoglicanos, laminina que contribuem para a formação de cicatriz fibrótica permanente (GUTIERREZ-RUIZ *et al.*, 2002; WYNN, 2008). A degradação das proteínas da matriz extracelular é regulada pela MMP (BENYON e ARTHUR, 2001), a fibrose, então, ocorre quando há um desequilíbrio entre fibrogênese e fibrólise, ou seja, quando há uma redução da expressão da MMP e um aumento do TIMP (inibidor tecidual da metaloproteinase) (KERSHENOBICH STALNIKOWITZ e WEISSBROD, 2003; ISSA *et al.*, 2004; ANDRADE, 2009). Desta forma, na fase de remodelamento, a síntese de colágeno por fibroblastos excede a taxa de sua degradação, trazendo como consequência a deposição excessiva desta proteína, culminando na formação de cicatriz fibrótica (Figura 4).

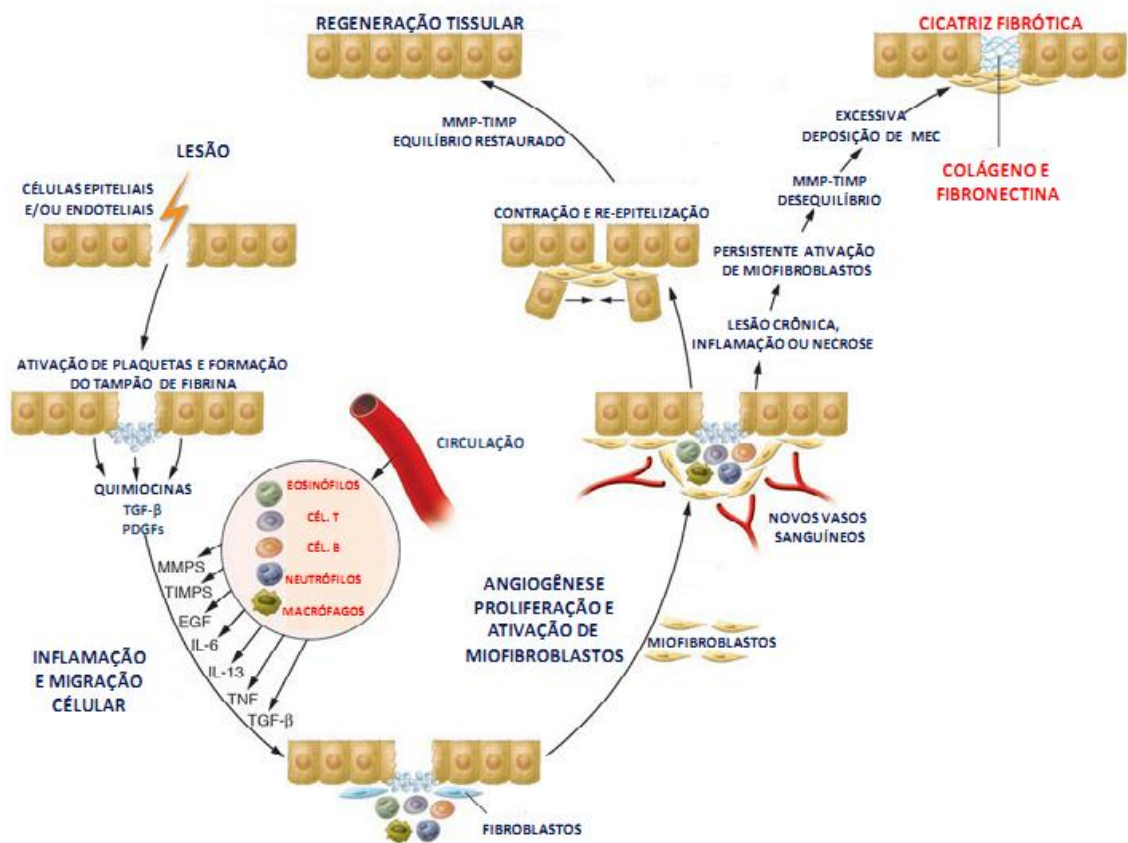


Figura 4: Cinética da regeneração tecidual e formação de cicatriz fibrótica.

Fonte: Adaptado de Wynn, T. A. "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases". J Clin Invest, 2007.

2.2.2 Papel das moléculas pró-fibróticas na fibrose

Moléculas de caráter pró-fibróticas, tais como o receptor de IL-4 (IL-4R α) e o TGF- β podem ser cruciais para o desenvolvimento da fibrose. O receptor de IL-4 é expresso na maioria dos tipos de células, incluindo células hematopoiéticas, endotelial, muscular e neural (NELMS *et al.*, 1999). O IL-4R α pode combinar com a cadeia gama comum - γ_c (IL-4R tipo I) ou com IL-13R α 1 (IL-4R tipo II) para ligar-se a IL-4 sozinho, ou a ambos IL-4 e IL-13, respectivamente (MILLOUX *et al.*, 1997; LAPORTE *et al.*, 2008; GORDON e MARTINEZ, 2010; ALLEN e MAIZELS, 2011). A sinalização através deste receptor induz a transcrição do gene dependente de STAT6 que polariza a imunidade do hospedeiro para a resposta do tipo Th2 (MCKENZIE *et al.*, 1999; MURATA *et al.*, 1999; ANDREW *et al.*, 2002). Os monócitos/macrófagos, no entanto, adquirem um fenótipo alternativamente ativado quando estimulados por essas citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-13), as quais induzem nessas células a expressão de arginase, enzima responsável pela conversão de L-arginina em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, portanto, pode contribuir no desenvolvimento da fibrose (HESSE *et al.*, 2001). Embora a arginase-1 (*ARG1*) é um marcador clássico de macrófagos alternativamente ativados em camundongos, a sua expressão em monócitos/macrófagos humanos não é bem definida (ROUZAUT *et al.*, 1999; OCHOA *et al.*, 2001; MUNDER, *et al.*, 2005; RAES *et al.*, 2005). Estudo de Badu *et al.* (2009) mostraram que monócitos de pacientes com filariose assintomática exibiram aumento da expressão do RNA mensageiro da *ARG1*, bem como aumento dos níveis de TGF- β e IL-10, caracterizando os monócitos com um fenótipo alternativamente ativado imunorregulador (BABU *et al.*, 2009).

Macrófagos alternativamente ativados induzidos por helmintos têm mostrado ser importantes em três diferentes processos: controle da inflamação tipo Th1, reparo tecidual e expulsão do verme (KREIDER *et al.*, 2007). Em modelo experimental, os macrófagos alternativamente ativados dependente de IL-4R α podem regular a inflamação induzida pelo *S. mansoni* durante a fase aguda da doença através da produção de citocinas imunossupressoras IL-10 e

TGF- β (HERBERT *et al.*, 2008). Em contrapartida, na fase crônica da doença induz fibrose hepática debilitante (WYNN *et al.*, 2004).

Vários outros estudos têm demonstrado que a sinalização via IL-4R α é essencial para formação do granuloma e sobrevivência do hospedeiro, em modelo experimental de esquistossomose (JANKOVIC *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HERBERT *et al.*, 2004; HERBERT *et al.*, 2008).

Outra molécula importante é a citocina TGF- β responsável por múltiplos processos biológicos tais como inflamação, fibrose, reparo tecidual, homeostasia, controle do ciclo celular (MASSAGUE, 1998; MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1998; BLOBE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006).

O dano tecidual ocorre frequentemente durante as respostas imunes patológicas devido à inflamação, em que os neutrófilos entram no local da lesão para remover agentes patogênicos e tecidos danificados através de fagocitose, e os macrófagos aparecem para continuar o processo e secretam mais fatores de crescimento, incluindo TGF- β , o qual auxilia na cicatrização (LI *et al.*, 2006). Esta citocina induz proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, a sua produção é aumentada no local da fibrose, o que sugere seu papel potencial no estabelecimento da fibrose (FINE e GOLDSTEIN, 1987; LEROY *et al.*, 1990; BORDER e NOBLE, 1994; VERRECCHIA e MAUVIEL, 2007).

Evidência adicional de apoio do papel profibrótico TGF- β *in vivo* são os dados que mostram que camundongos deficientes em TGF- β exibem o estágio de reparação tecidual gravemente prejudicada, incluindo diminuição da re-epitelização e deposição de colágeno, em comparação com os camundongos controle, no entanto, os camundongos deficientes em TGF- β também mostraram uma síndrome debilitante grave acompanhada por uma pronunciada resposta inflamatória generalizada e necrose dos tecidos, resultando em falha do órgão e morte (KULKARNI e KARLSSON, 1993; BOTTINGER *et al.*, 1997).

Em indivíduos com fibrose periportal secundária à esquistossomose, alguns autores não encontraram influência do TGF- β no agravamento do quadro (DE JESUS, *et al.*, 2004; DE SOUZA, *et al.*, 2012).

2.2.3 Papel das moléculas pró-inflamatórias na fibrose

A produção de proteínas da matriz extracelular no local de uma inflamação é parte do processo de reparação normal. Esse processo é iniciado por moléculas liberadas pelos tecidos e regulado por uma série de citocinas importantes, entre elas IL-6 e TNF- α (POLI, 2000).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, a qual é produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos, células endoteliais, fibroblastos e alguns tipos de células tumorais (AKIRA *et al.*, 1993).

A IL-6 é uma citocina que exerce papéis importantes na resposta inflamatória de fase aguda e crônica, autoimunidade, disfunção da célula endotelial e na fibrogênese, uma vez que também induz a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno, bem como a síntese do inibidor de metaloproteinase 1 (TIMP-1) (DUNCAN e BERMAN, 1991; LOTZ e GUERNE, 1991; MIHARA *et al.*, 1996; BARNES *et al.*, 2011). Diversos trabalhos envolvendo modelo experimental têm demonstrado que a administração *in vivo* de IL-6 induziu inflamação hepática e fibrose (CHOI *et al.*, 1994), outros também mostraram que a ausência de IL-6 tornou a reparação tecidual prejudicada (Gallucci, *et al.*, 2000; 2006). No entanto, Yang *et al.* (2012) mostraram que a ausência desta citocina não teve efeito significativo no desenvolvimento da fibrose (YANG *et al.*, 2012).

Em modelo experimental de esquistossomose, alguns autores observaram um aumento da produção de IL-6 durante o curso da infecção pelo parasito, como também na formação do granuloma hepático (KHALIL *et al.*, 1996) e outros relataram que o antígeno solúvel do ovo (SEA) estimulou a produção de IL-6 em culturas de macrófagos isolados de granulomas (CHENSUE *et al.*, 1994).

Quanto ao TNF- α , é uma citocina proinflamatória que desempenha papel importante em diversos eventos celulares. A ligação do TNF- α com seu receptor desencadeia na produção de citocinas inflamatórias ou na apoptose (AGGARWAL, 2003; MUPPIDI *et al.*, 2004). Produzido por neutrófilos, linfócitos ativados, células NK, células endoteliais, mastócitos e monócitos, o TNF- α há muito tempo têm sido conhecido por possuir habilidade anti-fibróticas (JOSEPH e BOROS, 1993; ABRAHAM *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2002), além de ser um

potente indutor da síntese de MMPs (AMIRI *et al.*, 1992). Entretanto, o TNF- α também é considerado uma citocina pró-fibrótica em alguns estudos, sendo o seu papel e mecanismo de ação não bem definidos. Esta citocina pode estar envolvida na regeneração hepática quando o hospedeiro entra em contato com agentes que possam danificar o fígado estimulando a regeneração (KUBO *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1997). Alguns estudos têm mostrado que TNF- α desempenha um papel crucial na formação do granuloma esquistossomótico e que altos níveis desta citocina estão associados com a presença de fibrose periportal (MWATHA *et al.*, 1998; HASEEB *et al.*, 2001; HENRI *et al.*, 2002; BOOTH *et al.*, 2004). Em outros trabalhos, no entanto, têm demonstrado que TNF- α pode ser fundamental para a redução do granuloma e da fibrose hepática em modelo experimental (HOFFMANN *et al.*, 1998).

2.2.4 Papel das moléculas anti-fibróticas e reguladoras na fibrose hepática.

A IL-12 é produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e entre outros tipos de células. É uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto designadas p35 e p40 (GATELY *et al.*, 1991; TRINCHIERI e SCOTT, 1999). Quando coexpressadas na mesma célula, essas subunidades formam o heterodímero p70 biologicamente ativo (GUBLER, *et al.*, 1991).

Uma das principais ações de IL-12 é a sua indução de outras citocinas, particularmente IFN- γ , inicialmente nas células T e NK. O IFN- γ estimula a atividade bactericida de células fagocíticas e, portanto, aumenta a resposta imune inata (WATFORD *et al.*, 2003). Os macrófagos classicamente ativados, no entanto, surgem em resposta ao IFN- γ , os quais secretam citocinas pró-inflamatórias e produzem intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio que causam dano tecidual oxidativo (GORDON e TAYLOR, 2005; O'SHEA e MURRAY, 2008).

A IL-12 participa de um ciclo de *feedback* positivo por promover a secreção de IFN- γ que, por sua vez, potencializa os monócitos e polimorfonucleares para produzirem mais IL-12 (YOSHIDA *et al.*, 1994; MA *et al.*, 1996). Assim, a IL-12

também é responsável por direcionar a respostas imune adaptativas, polarizando as células T CD4 naives para o fenótipo Th1 (HSIEH *et al.*, 1993).

Por favorecer respostas do tipo Th1, estudos têm mostrado que a IL-12 pode ser capaz de reduzir a inflamação granulomatosa e a fibrose hepática em camundongos infectados pelo parasito por substituir o padrão de citocinas Th2, que é característica da infecção por *S. mansoni*, por citocinas do tipo Th1 (WYNN *et al.*, 1994; WYNN *et al.*, 1995). Considerando, assim, esta citocina como anti-fibrótica por inibir a síntese de colágeno em fibroblastos (WYNN *et al.*, 1995). O desvio dessa resposta têm sido caracterizado pelo aumento da expressão de RNA mensageiro de IFN- γ , IL-12 e TNF- α no granuloma hepático, as quais foram demonstradas ser necessárias para a manutenção da resposta Th1 e para redução do tamanho do granuloma e fibrose hepática (HOFFMANN *et al.*, 1998).

Vários estudos têm também relatado o papel protetor de IL-10 durante a esquistossomose (BOSSHARDT *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 2000; BOOTH *et al.*, 2004). A IL-10 é uma citocina importante produzida por uma variedade de tipos de células, incluindo células T, monócitos/macrófagos, mastócitos, queratinócitos, eosinófilos e várias células tumorais (MOORE *et al.*, 1993).

A IL-10 tem sido bem estudada em modelo murino de infecção pelo *S. mansoni* e mostrou controlar resposta excessiva Th1 ou Th2, suprimir ativação de macrófagos e células dendríticas e limitar a hepatotoxicidade induzida pelos ovos do parasito durante a fase aguda da infecção (OSWALD *et al.*, 1992; HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004). Entretanto, parece não ser fundamental no processo de imunomodulação na fase crônica da infecção (WYNN *et al.*, 1998). Falcão *et al.* (1998) demonstraram que a IL-10 desempenha um papel principal na regulação *in vitro* da formação do granuloma e que pode ser uma citocina importante no controle da morbidade na infecção pelo *S. mansoni* (FALCAO *et al.*, 1998).

O papel de IL-10 no desenvolvimento da fibrose permanece controverso, com alguns estudos demonstrando um papel profibrótico para IL-10 (BARBARIN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2011) e outros identificando papéis inibitórios (LOUIS *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 1998; NELSON *et al.*, 2000).

Trabalhos envolvendo modelo experimental em esquistossomose têm mostrado que a fibrose foi consistentemente aumentada em camundongos deficientes em IL-10 e IL-12 simultaneamente, sugerindo que ambas citocinas interagem de forma colaborativa para inibir o desenvolvimento de fibrose (HOFFMANN *et al.*, 2000; MENTINK-KANE *et al.*, 2011). Outros estudos têm demonstrado que administração de anticorpos monoclonais anti-IL-10R em camundongos infectados pelo *S. mansoni* aumentou significativamente a produção de IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-17 em aproximadamente sete semanas após infecção, como também aumentou o tamanho do granuloma hepático e lesões hepatocelulares (HERBERT *et al.*, 2008).

2.2.5 Participação dos monócitos na patogênese da fibrose hepática

Os monócitos contribuem para a defesa do hospedeiro na imunidade inata e adquirida, como também, no remodelamento tecidual. As características de macrófagos humanos e camundongos são parcialmente correspondentes (MOSSER e EDWARDS, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2009; MURRAY e WYNN, 2011), mas a infecção pelo *S. mansoni* causa resposta imune e patologia semelhantes em ambos os hospedeiros (CHEEVER *et al.*, 2002; PEARCE e MACDONALD, 2002; WYNN *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários estudos têm enfatizado o papel importante de monócitos infiltrantes para a progressão da inflamação e fibrose hepática em modelos experimentais (DUFFIELD *et al.*, 2005; KARLMARK *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2009), como também na regressão da fibrose uma vez que podem também degradar proteínas da matriz extracelular e exercer ações anti-inflamatórias (ZIMMERMANN e TACKE, 2011; FALLOWFIELD *et al.*, 2007). Esses monócitos participam no desenvolvimento da fibrose através de vários mecanismos, incluindo secreção de citocinas e geração de produtos relacionados ao estresse oxidativo (MARRA *et al.*, 2009). Dependendo do seu estado de diferenciação e de sinais locais, monócitos e macrófagos são capazes de secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas, anti-inflamatórias e fatores de crescimento (BATALLER e BRENNER, 2005).

Os monócitos humanos têm sido segregados em duas subpopulações de acordo com a expressão de CD14 e CD16 (CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺) por mais de duas décadas (PASSLICK *et al.*, 1989; FRANKENBERGER *et al.*, 1996; ANCUTA *et al.*, 2003; GEISSMANN *et al.*, 2003; GORDON e TAYLOR, 2005; TACKE e RANDOLPH, 2006; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007; AUFRAY *et al.*, 2009). Entretanto, uma nova nomenclatura foi aprovada e definem os monócitos humanos em três subpopulações, a maior população dos monócitos humanos (90%) com alta expressão de CD14 e nenhuma expressão para CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻) são denominados de monócitos clássicos, enquanto a menor população (10%) de monócitos humanos é subdividida em intermediários, com alta expressão de CD14 e baixa para CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺) e em não-clássicos com alta expressão de CD16, mas com expressão relativamente baixa de CD14 (CD14⁺CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010).

Em um estudo de Wong et al (2011) foram avaliadas as características dos monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos através do perfil de expressão gênica. Observou que os monócitos clássicos expressaram genes envolvidos na angiogênese, cicatrização e coagulação, implicando em funções de reparo tecidual, além da alta expressão de genes pró-inflamatórios; os monócitos intermediários com alta expressão de MHC de classe II que indica funções de célula apresentadora de antígeno e estimulatórias de células T (WONG *et al.*, 2011) e quanto aos monócitos não-clássicos com genes envolvidos no rearranjo do citoesqueleto o que pode ser responsável por sua alta motilidade observada *in vivo* (CROS *et al.*, 2010). O estudo de Liaskou *et al* (2013) mostrou evidências que implicam os monócitos intermediários na patogênese da fibrose hepática causada por doenças inflamatórias crônicas (LIASKOU *et al.*, 2013).

Existem poucos dados na literatura quanto a caracterização das subpopulações de monócitos e o papel destas células na patogênese da fibrose periportal secundária à esquistossomose. Desta forma, a fim de entender de que maneira as subpopulações de monócitos estariam participando na imunopatogênese na fibrose periportal, moléculas de caráter pró-inflamatórias, pro- e anti-fibróticas e reguladoras expressas nessas células foram avaliadas neste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o fenótipo dos monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose mansônica.

3.2 Objetivos Específicos

Nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose mansônica:

1. Caracterizar as subpopulações dos monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) através da expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16;
2. Avaliar o grau de ativação dos monócitos, através da expressão de HLA-DR, CD80 e CD86;
3. Avaliar a expressão de moléculas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF), pro-fibróticas (IL-4R α e TGF- β), anti-fibrótica (IL-12) e regulatórias (IL-10R e IL-10) por diferentes subpopulações de monócitos.

HIPÓTESE

Monócitos com perfil pró-fibrótico e pró-inflamatório estão associados ao desenvolvimento da fibrose periportal secundária à esquistossomose mansoni.

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção de indivíduos na área endêmica em esquistossomose e desenho do estudo

Neste estudo foram avaliados indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, apresentando diferentes graus de fibrose hepática secundárias à infecção por este helminto, desde manifestações intestinais até as formas mais graves da doença, como a fibrose periportal. O estudo foi desenvolvido no povoado de Água Preta, município de Gandu, Bahia, localizado no Litoral Sul, a 280 km de Salvador (Figura 5). O povoado de Água Preta compreende uma comunidade residente na vila principal e moradores de fazendas da vizinhança, totalizando cerca de 1000 habitantes.

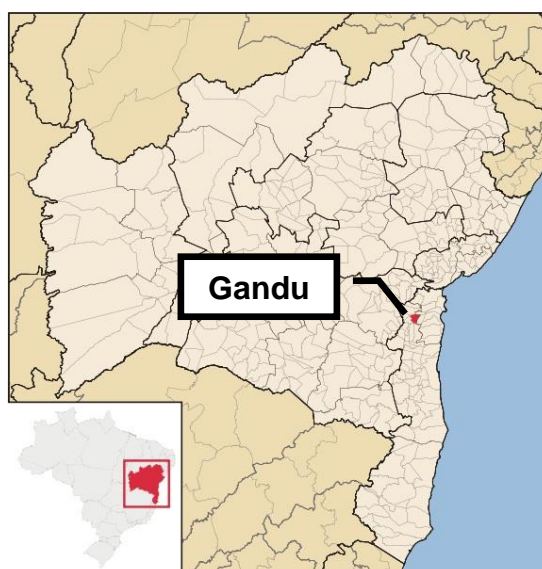


Figura 5: Localização do município de Gandu - Bahia. Fonte: Wikipédia, 2013

As condições sanitárias da região são precárias, colocando os moradores sob alto risco de infecções parasitárias. A principal fonte de renda da população é a agricultura e a água do rio é utilizada para banho, lavagem de roupas e utensílios, além do lazer (Figura 6). O acesso da população aos Serviços de Saúde é difícil e existem apenas relatos de tratamentos prévios esporádicos com anti-helmínticos.



Figura 6: Habitantes de Água Preta utilizando a água do rio, única fonte hídrica desta região.

4.2 Desenho do estudo e cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado baseado no estudo de De Jesus *et al* (2004), no qual foi demonstrado que os níveis de citocina IL-13 têm sido diferentes entre indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose (Grau I= $24 \pm 11,4$ pg/ml e Grau III= $116 \pm 120,9$ pg/ml) (DE JESUS *et al.*, 2004). Desta forma, um tamanho mínimo de 15 indivíduos em cada grupo seria suficiente para detectar diferenças significativas. Levou-se em consideração um poder de 80% e erro α de 0,05.

4.3 Critérios de inclusão

- Ambos os sexos;
- Idade entre 10 a 60 anos, para a avaliação imunológica;
- Indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, sem fibrose periportal (Grau 0), para compor o grupo I ;
- Indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* com fibrose periportal incipiente (Grau I), para compor o grupo II;
- Indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* com fibrose periportal moderada a grave (Graus II e III), para comporem o grupo III.

Os indivíduos com fibrose periportal moderada e grave foram incluídos no mesmo grupo por causa da baixa frequência de ocorrência da fibrose grave (ALVES OLIVEIRA *et al.*; 2006).

4.4 Critérios de não inclusão

Não foram admitidos no estudo:

- Indivíduos com idade inferior a 10 anos e superior a 60 anos;
- Gestantes;
- Indivíduos com histórico de alcoolismo crônico;
- Indivíduos portadores de doenças que possam interferir com os resultados da avaliação da resposta imune, a exemplo das hepatites B e C, diabetes melitus, HTLV-I e HIV;
- Indivíduos que estejam em uso de imunossupressores ou em tratamento quimioterápico de qualquer natureza.

Crianças menores de dez anos e adultos maiores de 60 não foram incluídos no estudo de avaliação imunológica devido a maior frequência da fibrose em indivíduos com idade superior a 10 anos (DE SOUZA *et al.*, 2012) e à possibilidade de apresentarem alterações da resposta imune depois dos 60 anos.

4.5 Exame parasitológico de fezes

As análises coproparasitológicas foram realizadas através da técnica de sedimentação espontânea – Hoffmann-Pons-Janer ou método de Lutz, para a determinação da infecção parasitária e através da técnica de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1970) para a determinação da carga parasitária dos helmintos.

4.6 Ultrassonografia de abdome superior - USG

A ultrassonografia representa uma importante ferramenta no diagnóstico das diferentes formas clínicas da esquistossomose bem como na avaliação do grau de fibrose periportal. O espessamento fibroso periportal constitui-se em

alteração que permite identificar a doença, sendo caracterizada pela USG como área de hiperecogenicidade periportal. Esse espessamento acomete principalmente a veia porta no hilo hepático, estendendo-se também para os ramos intra-hepáticos do sistema porta e para a região perivesicular (MACHADO, 2002). A USG dos indivíduos de água preta foi realizada em clínica de diagnóstico por imagem na cidade de Gandu-Ba, sendo alguns exames reavaliados em clínica de diagnóstico por imagem em Salvador-Ba. Para a determinação do grau da fibrose hepática foram utilizados os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (ABDEL-WAHAB et al., 1992). Essa classificação leva em consideração o valor médio do diâmetro dos quatro espaços periportais após a primeira divisão dos ramos direito e esquerdo da veia porta, sendo considerado o grau de fibrose zero (Grau 0) o valor menor do que 3,0 mm, grau de fibrose I (Grau I) entre 3,0 a 4,9 mm; grau de fibrose II (Grau II) entre 5,0 a 7,0 mm e grau de fibrose III (Grau III) se o diâmetro for superior a 7,0 mm.

4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Foram coletados 20 mL de sangue dos indivíduos e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 3×10^5 células/mL em RPMI 1640, contendo 10% de soro humano AB⁺ normal inativado, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100µL/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). As células foram estimuladas com 10 µg do antígeno solúvel do ovo (SEA). Para avaliação da expressão de receptores e produção de citocinas as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ em placas de cultura de 96 poços por 16h. Após a incubação, as células foram marcadas por anticorpos conjugados com fluorocromos e adquiridos por citometria de fluxo.

4.8 Avaliação do fenótipo dos monócitos ex vivo

Foram realizadas marcações das células com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular, conjugados com fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e “cycrhome” (CY),

“Allophycocyanin”(APC), utilizando citometria de fluxo. Os anticorpos monoclonais incluem os marcadores de monócitos, marcadores de ativação e receptores: CD14 (clone 61D3, eBioscience), CD16 (clone CB16, eBioscience), CD80 (clone 2D10, eBioscience), CD86 (clone 2331(FUN-1), BD Pharmigen), HLA-DR (clone LN3, eBioscience), IL-4R α (clone hIL-4R-M57, BD Pharmigen) e IL-10R (policlonal, R&D System).

Foram adicionadas 30 μ l da solução contendo as células a 1×10^7 células/ml em cada poço da placa de 96 poços com fundo em “U”. Em seguida foram acrescentados 20 μ l da solução contendo os anticorpos específicos diluídos em solução de diluição de anticorpos (tampão salina fosfato - PBS 1x, azida 1M e fração V de albumina bovina - BSA) e as placas foram incubadas, protegidas da luz por 20 minutos a 4°C. Foram feitas 3 lavagens sucessivas utilizando PBS 1x e solução de lavagem (PBS 1x, azida 1M e BSA) para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal e as células foram ressuspensas em 200 μ l de formaldeído 2%. As placas foram mantidas a 4°C, protegido da luz até o momento da aquisição em FACSCanto (Becton Dickinson).

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa “Flow Jo”. As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, foi feita a seleção das populações de monócitos por janelas nesta população. Foi delimitada uma região específica no gráfico: região 1 (G1), correspondente a janela na área de monócitos (Figura 7). Portanto, para a análise das características fenotípicas e expressão de receptores e citocinas intracelulares em monócitos foi utilizada a região G1.

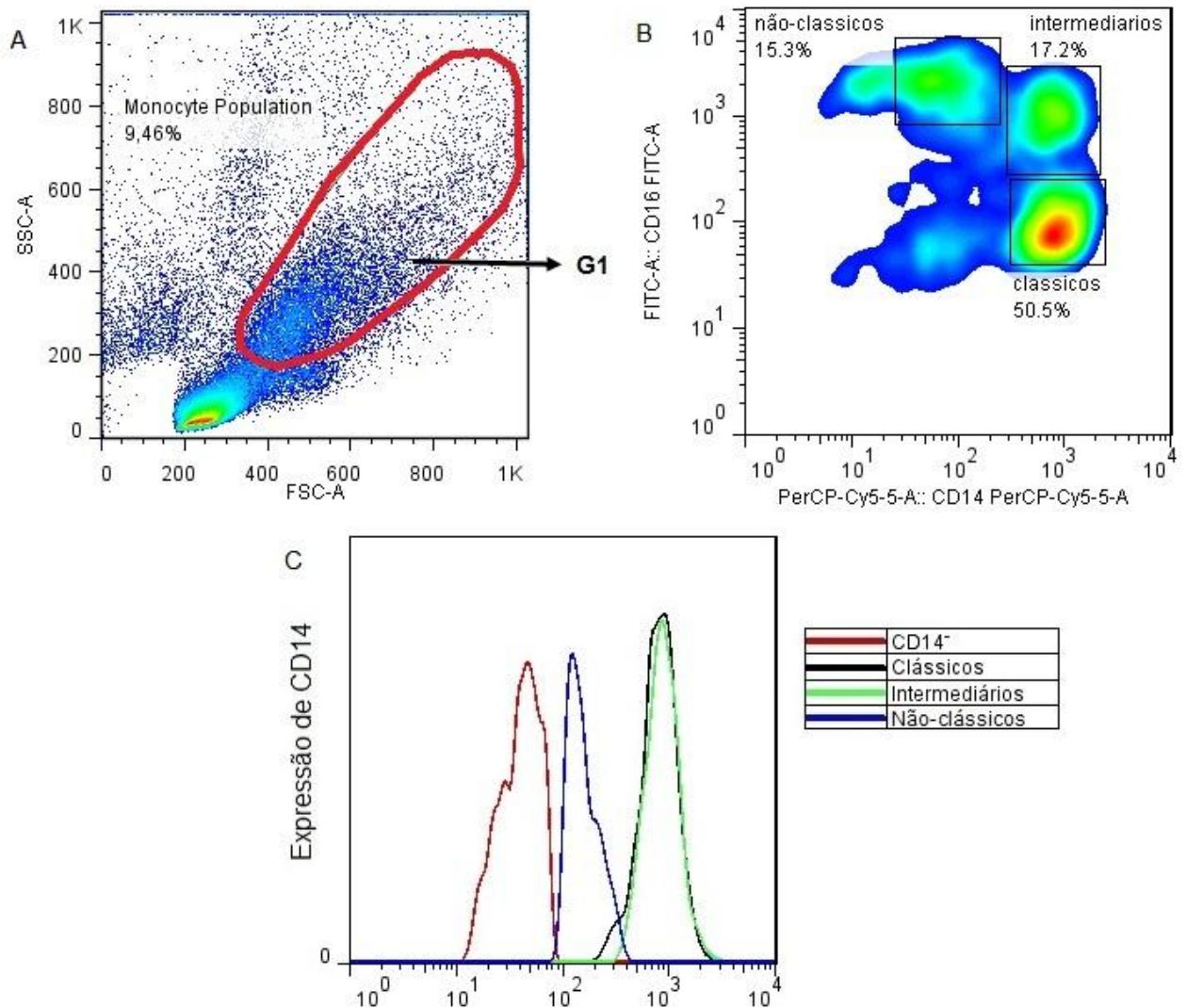


Figura 7: (A) Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando a população de monócitos, região 1 (G1). (B) Subpopulações de monócitos a partir da expressão de CD14 e CD16. (C) Histograma de expressão de CD14 nas subpopulações de monócitos.

4.9 Análise da expressão de citocinas intracelulares

A expressão de citocinas intracelulares IL-10 (clone JES3-19F1, BD Pharmingen), IL-12 (clone C8.6, eBioscience), TGF- β (clone 9016, R&D System), IL-6 (clone MQ2-13A5, BD Pharmingen), e TNF- α (MAb11, eBioscience) na população de monócitos foram analisadas como descrito por Sornasse e colaboradores (1996) (SORNASSE *et al.*, 1996). Em resumo, suspensões com 3×10^5 células foram incubadas em placas de 96 poços por 16 horas a 37°C, 5% de CO₂ na presença ou ausência do antígeno solúvel do *S. mansoni*. Após a incubação, foram adicionados 20 μ L/poço de brefeldina diluída 10X e realizada

nova incubação sob as mesmas condições por 4 horas. As células foram então marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD16, anti-IL-10R, IL-4R α conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), “cycrhome” (CY) ou APC (“Allophycocyanin”). Após a marcação das moléculas de superfície, as placas foram lavadas com PBS azida sódica, fixadas com 200 μ l de formaldeído a 2% em PBS e mantidas a 4°C até o dia seguinte. Após esta etapa, as placas foram centrifugadas e incubadas com 150 μ l/poço do tampão de permeabilização, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-citocinas, conjugados com ficoeritrina (PE), seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida foram feitas sucessivas lavagens utilizando-se o tampão de permeabilização, seguida de ressuspensão das células em 200 μ L de solução de lavagem e transferência para tubos de leitura do FACS. A aquisição foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), num total de 100.000 eventos.

4.10 Análise estatística

Os dados referentes à amostra da população estudada foram apresentados através de médias aritméticas e seus respectivos desvios padrões, ou através da mediana (mínimo – máximo).

Os resultados do fenótipo das células e dos marcadores de ativação celular por citometria de fluxo foram expressos em percentagem de positividade do total de células, ou percentagem de positividade dentro de um grupo celular específico. No caso da expressão das diferentes moléculas nos monócitos, foi utilizada a intensidade de expressão (MIF – Média de Intensidade de Fluorescência), sendo os valores representados por mediana (mínimo-máximo).

Para comparação entre grupos, testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados de acordo com a natureza dos dados gerados, tais como ANOVA e Kruskal Wallis, respectivamente.

Todos os testes estatísticos de hipóteses foram bi-caudais, sendo considerados estatisticamente significantes valores de p inferiores ao nível de significância pré-estabelecidos em 5%.

A representação gráfica foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism® versão 5.0.

4.11 Considerações Éticas

O presente estudo é uma extensão do projeto aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA, intitulado: Avaliação do Grau de Ativação Celular e do Perfil de Citocinas em Indivíduos com Diferentes Graus de Fibrose Hepática Secundária à Esquistossomose (Parecer/Resolução nº 240/2008). No referido projeto foram realizados inicialmente os exames parasitológicos de fezes e a ultrassonografia de abdome, para avaliação do grau de fibrose hepática.

Os participantes do estudo foram todos voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram o termo de consentimento informado. No caso de menores, o consentimento foi assinado por um dos responsáveis.

Todos os exames foram realizados por profissionais da área de saúde habilitados para tal. Todos os indivíduos portadores de enteroparasitoses foram tratados, gratuitamente e, no caso de apresentarem alguma manifestação clínica secundária à esquistossomose, receberam instruções para o tratamento da mesma ou foi encaminhado para o acompanhamento por médicos especializados no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (C-HUPES-UFBA).

5. RESULTADOS

5.1 Características da população de estudo

No presente estudo foram avaliados 40 indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, sendo 17 sem fibrose, 15 com fibrose incipiente e 8 com fibrose moderada a grave (Tabela 1). Nos indivíduos com fibrose moderada a grave a média da idade foi maior comparado com os indivíduos sem fibrose. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição de gênero e na carga parasitária entre os grupos.

Tabela 1: Características da população de estudo

	Sem fibrose (n=17)	Fibrose incipiente (n=15)	Fibrose moderada a grave (n=8)	p
Idade (anos)* (média ± DP)	29.7 ± 12.6	37.2 ± 11.8	46.1 ± 14.2	p<0,05 ^a
Gênero Masculino n (%)**	6 (35,3)	5 (33,3)	2 (25)	p>0,05
Carga parasitária (opg)*** Mediana (min-max)	72 (24-392)	72 (24-600)	66 (24-192)	p>0,05

*ANOVA; **Qui-quadrado; ***Kruskal-Wallis; ^aFibrose moderada a grave *versus* sem fibrose

Os tamanhos do fígado e do baço também foram avaliados nesse estudo (Figura 8). Não houve diferença significativa no tamanho do fígado entre os grupos [Sem fibrose (9,5 ± 1,3 cm); fibrose incipiente (10,3 ± 1,5 cm); fibrose moderada a grave (10,9 ± 2,2 cm)], considerando a medida pela linha médio-clavicular (Figura 8A). Entretanto, no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave o tamanho do baço foi maior (10,9 ± 2,4 cm) em relação ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente (8,3 ± 1,4 cm) e sem fibrose (8,4 ± 1,7 cm), (p<0,005) (FIGURA 8B).

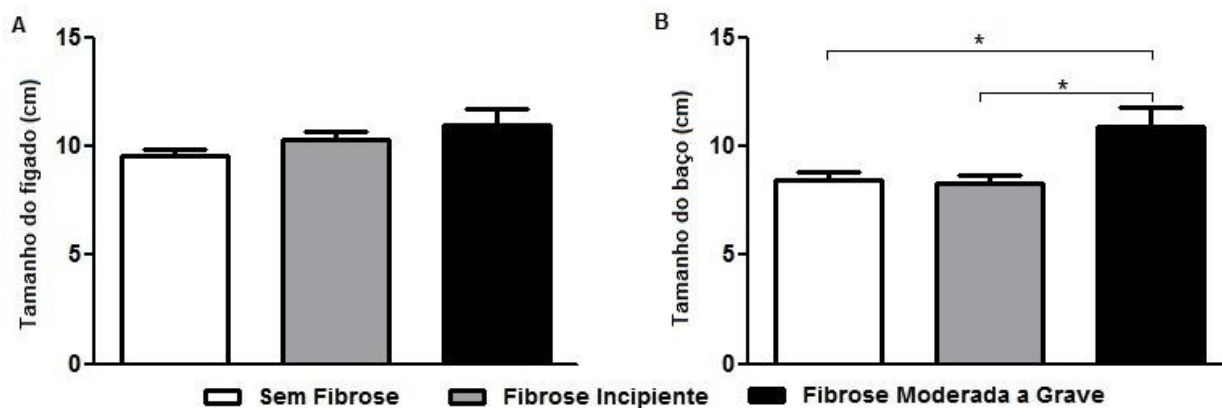


Figura 8: Tamanho do fígado (A), considerando a medida pela linha médio-clavicular e tamanho do baço (B) considerando o maior diâmetro do órgão medido por USG nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (* $p < 0,005$ ANOVA).

5.2 Caracterização fenotípica dos monócitos estimulados com o antígeno solúvel do ovo (SEA) e *ex vivo* nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose

5.2.1 Frequência das subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.

A frequência das subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) foi avaliada nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose e os dados estão representados em mediana (mínimo-máximo) na figura 9. Foi observado que no grupo de indivíduos com fibrose incipiente a frequência dos monócitos intermediários (Figura 9B) e não-clássicos (Figura 9C) em culturas estimuladas com SEA foi mais elevada [17% (7,72%-32,3%); 11,1% (2,71%-27,4%), respectivamente] quando comparada com o grupo de indivíduos sem fibrose [13,8% (3,88%-22,8%); 7,56% (1,88%-24%), respectivamente]. Não foi observada diferença significativa na frequência dos monócitos clássicos entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 9A). Além disso, foi também observado que independentemente do grau de fibrose, a frequência dos monócitos clássicos foi maior em culturas não estimuladas [56,3% (32,3%-73,9%)] e com SEA [50,1% (32%-73,9%)], $p < 0,0001$, quando comparada com a frequência dos monócitos

intermediários [Sem estímulo: 14,35% (6,3-23,4) e SEA: 13,8 (3,88-22,8), $p < 0,0001$] e não-clássicos [Sem estímulo: 5,36% (2,24-26,2) e SEA: 7,5 (1,88-24), $p < 0,0001$]. A frequência de monócitos totais não diferiu significativamente entre os grupos com diferentes graus de fibrose periportal (dados não mostrados).

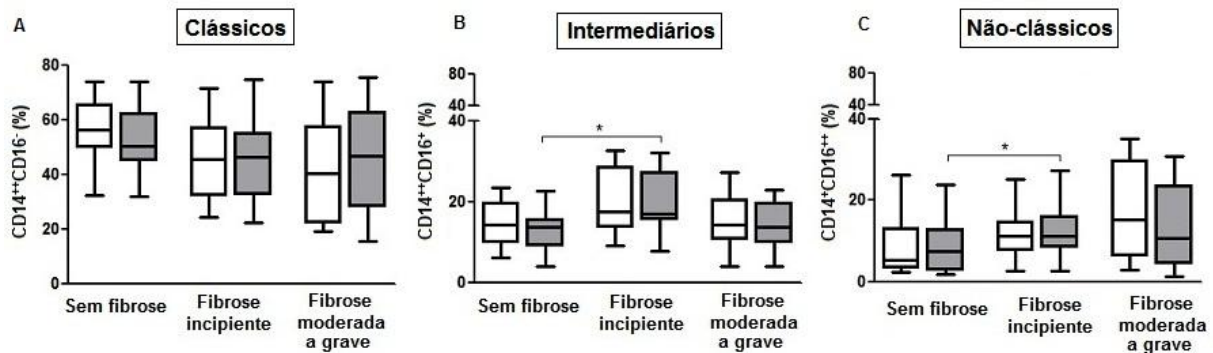


Figura 9: Frequência das subpopulações de monócitos: clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$) (A), intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$) (B) e não-clássicos ($CD14^{+}CD16^{+}$) (C) nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com $10\mu\text{g/mL}$ de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). $*p < 0,05$ (Kruskal Wallis).

A frequência das subpopulações de monócitos foi também avaliada *ex vivo* (Figura 10) e não foi observada diferença significativa entre os grupos com diferentes graus de fibrose periportal. No entanto, a frequência dos monócitos clássicos nos três grupos [Sem fibrose: 54,9% (31,5%-75,4%); fibrose incipiente: 51,5% (4,1%-59,6%) e fibrose moderada a grave: 50% (42,7%-71%)] foi maior quando comparada com a frequência dos monócitos intermediários [Sem fibrose: 8,5% (4,7%-25,1%); fibrose incipiente: 9,9% (4%-18,5%) e fibrose moderada a grave: 15,2% (8,1%-18,6%)] e não-clássicos [Sem fibrose: 13,7% (4,9%-37,3%); fibrose incipiente: 18,8% (12,7%-41%) e fibrose moderada a grave: 19,75% (11,1%-29,7%); $p < 0,005$]. Em relação ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente observou-se também um aumento da frequência dos monócitos não-clássicos [18,8% (12,7%-41%)] quando comparada com a frequência dos monócitos intermediários [9,9% (4%-18,5%); $p < 0,005$].

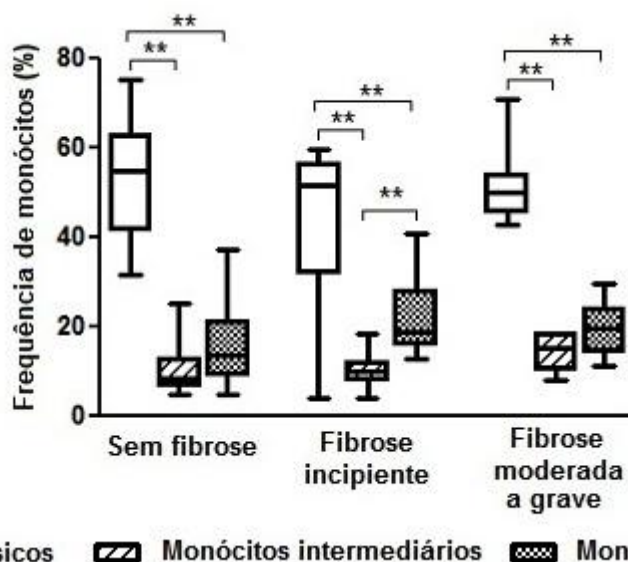


Figura 10: Frequência dos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) em CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. ** $p < 0,005$ (Kruskal Wallis).

5.2.2 Estado de ativação das subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.

As moléculas de ativação: HLA-DR, CD80 e CD86 foram avaliadas nos monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal. Foi observado que no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a expressão do HLA-DR foi maior tanto nos monócitos clássicos (Figura 11A) [Sem estímulo MIF= 1318 (404-2531), SEA MIF= 1981 (906-3419)], quanto nos monócitos intermediários (Figura 11B) [Sem estímulo MIF= 1782 (648-3563), SEA MIF= 2033 (965-4198)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente [Clássicos: Sem estímulo MIF= 492 (278-1623), SEA MIF= 747,5 (313-1766) e Intermediários: Sem estímulo MIF= 807 (278-2079), SEA MIF= 1034 (392-2022)] e sem fibrose [Clássicos: Sem estímulo MIF= 659 (263-1138), SEA MIF= 533 (315-1791) e Intermediários: Sem estímulo MIF= 970 (474-1430), SEA MIF= 733 (486-2733). Todavia, não houve diferença significativa na expressão de HLA-DR nos monócitos não-clássicos entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 11C).

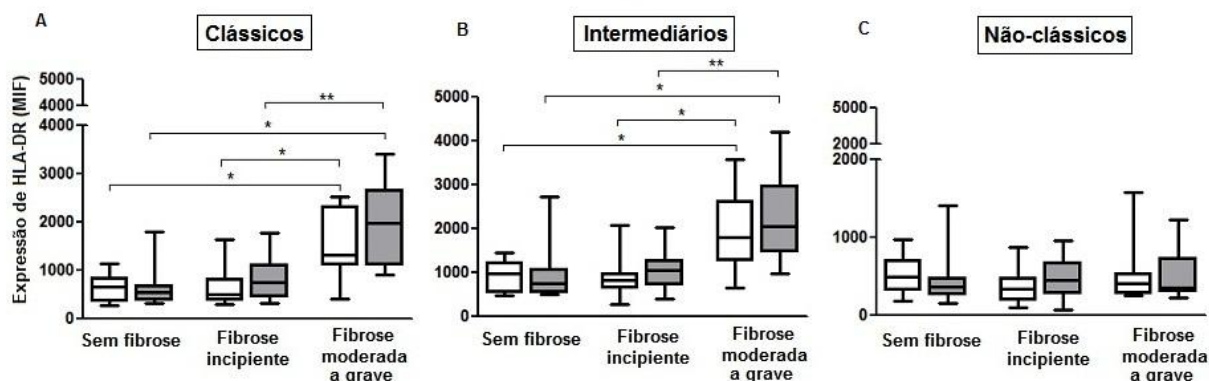


Figura 11: Expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com 10µg/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ (Kruskal Wallis).

Quanto a expressão de HLA-DR *ex vivo* (Figura 12A) foi também observado que nos indivíduos com fibrose moderada a grave houve uma maior expressão de HLA-DR nos monócitos intermediários [MIF= 1265 (186-1666)] quando comparado ao grupo de indivíduos sem fibrose [MIF= 208 (79,2-2756)] e com fibrose incipiente [MIF= 179 (109-1512), $p < 0,05$]. Em relação a expressão de HLA-DR entre as subpopulações de monócitos nos diferentes grupos de pacientes, observou-se uma maior expressão nos monócitos intermediários no grupo de indivíduos sem fibrose [MIF= 208 (79,2-2756)], com fibrose incipiente [MIF= 179 (109-1512) e com fibrose moderada a grave [MIF= 1265 (186-1666)], comparado aos monócitos clássicos desses três grupos [MIF= 104,5 (41,6-544); 87,4 (52-489); 324,5 (116-571), respectivamente]. Além disso, nos grupos de indivíduos com fibrose incipiente e com fibrose moderada a grave a expressão de HLA-DR nos monócitos intermediários foi também mais elevada quando comparado aos monócitos não-clássicos [MIF= 102,9 (41,4-541); 423 (120-774), respectivamente].

A expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nos monócitos foi avaliada *ex vivo* e apresentou um padrão semelhante entre si (Figura 12B e 12C, respectivamente). Não houve diferença significativa na expressão de ambas as moléculas entre os grupos de indivíduos, sendo a expressão de CD80 maior nos monócitos intermediários nos três grupos de indivíduos avaliados [Sem fibrose MIF= 61,4 (28,4-164); fibrose incipiente MIF= 65,2 (28-114); fibrose moderada a grave MIF= 44,2(25,8-163)] quando comparados com os monócitos clássicos [Sem fibrose MIF= 33,7 (25,4-59,5); fibrose incipiente MIF= 36,5 (13-

66,6); fibrose moderada a grave MIF= 30,8 (21,4-44,3) e não-clássicos [Sem fibrose MIF= 29,8 (17,1-66,1); fibrose incipiente MIF= 26,9 (11,5-44,2); fibrose moderada a grave MIF= 24,8 (18,6-61)]. A expressão de CD86 foi de um modo geral mais elevada, mas semelhante a expressão de CD80, foi também maior nos monócitos intermediários nos três grupos de indivíduos avaliados [Sem fibrose MIF= 123 (54,8-272); fibrose incipiente MIF= 116 (62,7-323) e fibrose moderada a grave MIF= 219 (71,8-268)] em relação aos monócitos clássicos [Sem fibrose MIF= 57,3 (28,4-173); fibrose incipiente MIF= 75 (36-243) e fibrose moderada a grave MIF= 153,5 (31,4-182)] e não-clássicos [Sem fibrose MIF= 53,1 (30,7-134); fibrose incipiente MIF= 51,6 (21,1-157) e fibrose moderada a grave MIF= 75,9 (28,3-107)].

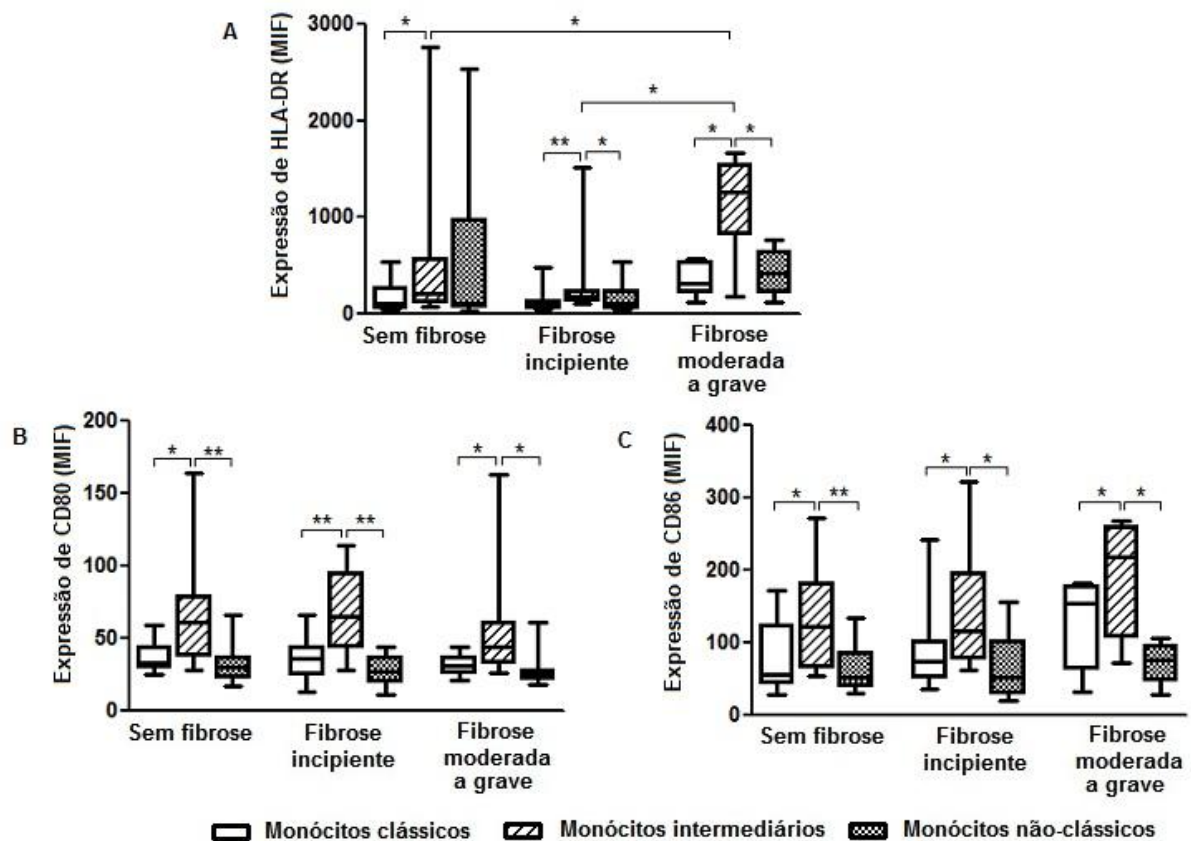


Figura 12: Expressão de HLA-DR (A) e das moléculas co-estimulatórias CD80 (B) e CD86 (C) nas subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ (Kruskal Wallis).

A frequência de CD80 (Figura 13A) e de CD86 (Figura 13B) foram também avaliadas *ex vivo* nas diferentes subpopulações de monócitos. A frequência de CD80 foi maior nos monócitos intermediários nos três grupos de indivíduos

avaliados [Sem fibrose: 14,2% (1,98%-53%); fibrose incipiente: 15,35% (3%-36,9%) e fibrose moderada a grave: 2,88% (0,69%-16%)] em relação aos monócitos clássicos [Sem fibrose: 7,5% (0,37%-16,8%); fibrose incipiente: 4,7% (0,8%-21,5%); fibrose moderada a grave: 1,23% (0,27%-5,9%)] e não-clássicos [Sem fibrose: 1,69% (0,75%-16%); fibrose incipiente: 1,25% (0,3%-8,1%); fibrose moderada a grave: 0,65% (0,14%-3%)]. No grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a frequência de CD80 nos monócitos clássicos [1,23% (0,27%-5,9%)] e intermediários [2,88% (0,69%-16%)] foi menor quando comparada ao grupo de indivíduos sem fibrose [7,5% (0,37%-16,8%); 14,2% (1,98%-53%), respectivamente].

Quanto a molécula CD86 (Figura 13B), observou-se que no grupo de indivíduos com fibrose incipiente a frequência foi mais elevada nos monócitos clássicos [37,4% (17,5%-87%)] e intermediários [15,35% (3%-36,9%)] quando comparada com o grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave [19,8% (4,1%-39%); 2,88% (0,69%-16%, respectivamente)]. Semelhante a CD80, também foi observado que a frequência de CD86 foi maior nos monócitos intermediários nos três grupos de indivíduos avaliados [Sem fibrose: 57% (22,7%-93,4%); fibrose incipiente: 15,35% (3%-36,9%) e fibrose moderada a grave: 2,88% (0,69%-16%)] quando comparados com os monócitos clássicos [Sem fibrose: 27,2% (3%-58,6%); fibrose incipiente: 37,4% (17,5%-87%) e fibrose moderada a grave: 19,8% (4,1%-39%)] e não-clássicos [Sem fibrose: 20% (3,45%-75,6%); fibrose incipiente: 18,9% (6,7%-77,2%) e fibrose moderada a grave: 17,4% (6,6%-45%)].

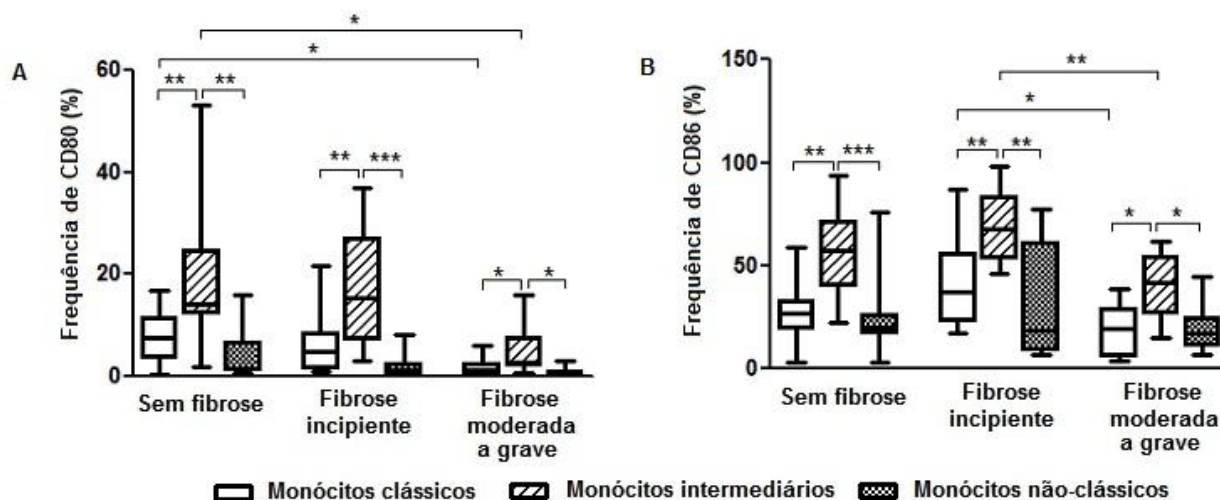


Figura 13: Frequência das moléculas co-estimulatórias CD80 (A) e CD86 (B) nas subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ (Kruskal Wallis).

5.2.3 Expressão de moléculas pró-inflamatórias e pró-fibróticas nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.

A expressão das moléculas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e pró-fibróticas TGF- β e IL-4R α nas subpopulações de monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal está demonstrado, na figura 14.

No grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a expressão de IL-6 (Figura 14A-C) foi maior nas três subpopulações de monócitos [Clássicos: Sem estímulo MIF= 79,8 (28-98,6), SEA MIF= 65,45 (26,5-135); Intermediários: Sem estímulo MIF= 145 (38,4-217), SEA MIF= 131 (36-258) e Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 99,15 (18,5-172), SEA MIF= 87,6 (17,9-231)] quando comparados com o grupo de indivíduos sem fibrose [Clássicos: Sem estímulo MIF= 18,35 (9,75-36), SEA MIF= 21,4 (8,6-62,5); Intermediários: Sem estímulo MIF= 17,9 (12,6-55,5), SEA MIF= 21,85 (12,3-108) e Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 10,8 (7,23-32,8), SEA MIF= 10,6 (6,63-39,2)] e com fibrose incipiente [Clássicos: Sem estímulo MIF= 25,4 (21,1-70,9), SEA MIF= 25,2 (20,7-87,6); Intermediários: Sem estímulo MIF= 33,1 (26,1-117) e Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 16,2 (10,1-93), SEA MIF= 11,1 (15,2-107)]. Além disso, foi também observado que no grupo de indivíduos com fibrose incipiente a expressão de IL-6 nos monócitos

intermediários foi maior [SEA MIF= 31,2 (26-139)] quando comparado ao grupo de indivíduos sem fibrose [SEA MIF= 21,85 (12,3-108)] (Figura 14B).

Em relação a expressão de TNF- α observou-se que no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave houve maior expressão tanto nos monócitos clássicos (Figura 14D) [Sem estímulo MIF= 321 (52-386), SEA MIF= 244 (47,4-324)], intermediários (Figura 14E) [Sem estímulo MIF= 368 (73,1-413), SEA MIF= 261 (62,8-377)] e não-clássicos (Figura 14F) [SEA MIF= 85,6 (24,3-123)] quando comparado ao grupo de indivíduos sem fibrose [Clássicos: Sem estímulo MIF= 20,5 (5,32-86,9), SEA MIF= 20,5 (4,1-108); Intermediários: Sem estímulo MIF= 62,7 (17,4-129), SEA MIF= 48,7 (14,7-125)]; Não-clássicos SEA MIF= 25,65 (8-112)]. No grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave foi ainda observado um aumento da expressão de TNF nos monócitos não-clássicos (Figura 14F), sem estimulação antigênica [MIF= 85,2 (19,6-111)], quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente [MIF= 15,7 (8,5-97,6)]. No grupo de indivíduos com fibrose incipiente observou-se que apenas nos monócitos clássicos [MIF= Sem estímulo 78,8 (22,4-384), SEA MIF= 67,9 (12,9-313)] houve um aumento da expressão desta citocina quando comparado com o grupo de indivíduos sem fibrose (Figura 14D).

Quanto a expressão da citocina pro-fibrótica TGF- β foi também observado que no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave houve uma maior expressão nos monócitos clássicos (Figura 14G) [Sem estímulo MIF= 62,25 (29,1-74,1), SEA MIF= 55,5 (24,1-81,8)], intermediários (Figura 14H) [Sem estímulo MIF= 85,4 (22,5-102), SEA MIF= 64,7 (22,4-115)] e não-clássicos (Figura 14I) [Sem estímulo MIF= 28,5 (13,7-44,2)] quando comparado com o grupo de indivíduos sem fibrose [Clássicos: Sem estímulo MIF= 18,05 (10,4-58,2), SEA MIF= 26,2 (8,9-46,2); Intermediários: Sem estímulo MIF= 21,6 (13-77,9), SEA MIF= 25,6 (12,2-52,8); Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 13,45 (7,6-27,7)]. Além disso, no grupo de indivíduos com fibrose incipiente a expressão de TGF- β nos monócitos clássicos, não estimulados com SEA [MIF= 29,8 (21,9-86)] foi maior quando comparado com grupo de indivíduos sem fibrose [MIF= 18,05 (10,4-58,2)] (Figura 14G).

A expressão do receptor α de IL-4 no grupo de indivíduos sem fibrose foi elevada tanto nos monócitos clássicos (Figura 14J) [Sem estímulo MIF= 66,5

(38,5-199), SEA MIF= 67,15 (37,4-257)], intermediários (Figura 14K) [Sem estímulo MIF= 110 (48,2-319), SEA MIF= 113,5 (50,9-367)] e não-clássicos (Figura 14L) [Sem estímulo MIF= 90,7 (26,3-205); SEA MIF= 103,4 (24,1-230)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente [Clássicos: Sem estímulo MIF= 36,7 (19,5-202), SEA MIF= 38,35 (26-228); Intermediários: Sem estímulo MIF= 53,6 (32,5-316), SEA MIF= 54,1 (42-316); Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 42,25 (21,2-235); SEA MIF= 38 (32,8-217)]. Além disso, no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave observou-se que a expressão deste receptor foi maior também nas três subpopulações de monócitos [Clássicos: SEA MIF= 49,9 (35,5-120); Intermediários: Sem estímulo MIF= 106 (59,7-197), SEA MIF= 103 (62,1-213); Não-clássicos: SEA MIF= 62,6 (42,9-189)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente, sendo que nos monócitos clássicos (Figura 14J) e não-clássicos (Figura 14L) essa diferença foi observada apenas nas culturas estimuladas com SEA.

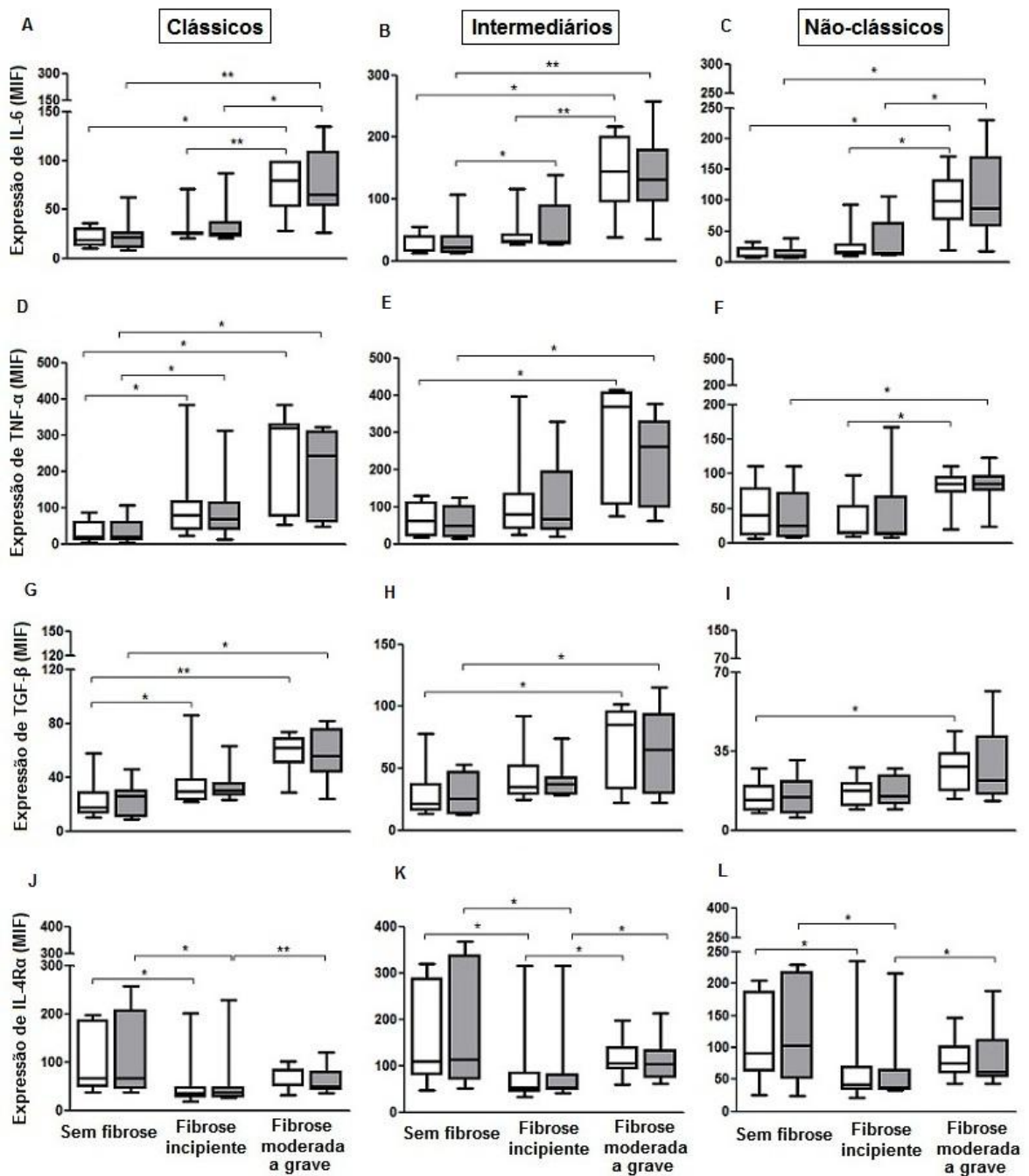


Figura 14: Expressão das moléculas pró-inflamatórias IL-6 (A-C) e TNF- α (D-F) e pró-fibróticas TGF- β (G-I) e IL-4R α (J-L) nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas 10 μ g/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).

A frequência dessas moléculas está demonstrada na tabela 2. Foi observado que no grupo de indivíduos sem fibrose a frequência da citocina TNF- α nos monócitos clássicos foi maior quando estimulados com SEA quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente. Além disso, a sua frequência nos monócitos intermediários foi maior também no grupo de indivíduos sem fibrose em relação ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente e com fibrose moderada a grave, tanto na presença como na ausência do estímulo.

Quanto a citocina TGF- β , a sua frequência nos monócitos não-clássicos foi maior no grupo de indivíduos sem fibrose quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave, na presença ou na ausência do estímulo, e com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente, apenas quando estimulados com SEA. A frequência de IL-6 nos monócitos não-clássicos foi maior também no grupo de indivíduos sem fibrose em relação ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente, na presença do estímulo.

Quanto a frequência das outras moléculas nas subpopulações de monócitos, estimulados ou não com SEA, não foi observada diferença significativa entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal.

Tabela 2: Frequência de subpopulações de monócitos expressando moléculas pró-inflamatórias e pró-fibróticas nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose

		Sem estímulo (%)				SEA (10µg/mL) (%)			
		Sem fibrose	Fibrose incipiente	Fibrose moderada a grave	p	Sem fibrose	Fibrose incipiente	Fibrose moderada a grave	p
Monócitos clássicos	IL-6	2,9 (1,2-6,5)	2,7 (0,67-8,5)	3,3 (1,8-13,8)	p>0,05	3,0 (0,69-8,5)	3,0 (1,6-11,5)	2,9 (1,4-4,9)	p>0,05
	TNF-α	4,3 (0,79-16,2)	2,6 (0,4-8,3)	2,5 (0,6-4,8)	p>0,05	3,6 (1,2-12,0)	1,7 (0,24-7,5)	1,0 (0,75-2,7)	p<0,05 ^a
	TGF-β	1,6 (0,8-6,6)	2,9 (0,9-7,8)	3,1 (2,3-6,4)	p>0,05	3,5 (0,89-12,4)	2,8 (0,6-11,0)	2,0 (1,7-7,5)	p>0,05
	IL-4Rα	3,7 (1,5-10,3)	5,3 (1,0-18,5)	5,2 (2,0-15,8)	p>0,05	7,3 (1,5-18,9)	5,9 (0,88-21,8)	5,2 (3,7-20,9)	p>0,05
Monócitos intermediários	IL-6	10,6 (3,2-27,0)	8,7 (2,6-13,8)	9,5 (3,8-18,6)	p>0,05	10,0 (2,4-33,9)	7,5 (3,2-15,0)	5,3 (2,9-16,0)	p>0,05
	TNF-α	14,1 (3,2-27,8)	4,2 (0,95-10,5)	5,3 (1,6-12,4)	p<0,005 ^a p<0,05 ^b	13,4 (2,4-19,5)	2,3 (0,3-20,9)	2,6 (1,6-4,9)	p<0,005 ^a p<0,05 ^b
	TGF-β	5,0 (0,6-21,1)	6,0 (1,7-12,3)	11,8 (2,0-13)	p>0,05	3,5 (0,4-21,6)	6,0 (1,9-18,4)	7,9 (5,0-11,4)	p>0,05
	IL-4Rα	20,8 (7,3-31,5)	27,8 (4,5-59,3)	36,8 (12,4-56,3)	p>0,05	18,8 (6,9-39,1)	27,4 (10-54,8)	37,3 (15,3-58,5)	p>0,05
Monócitos não-clássicos	IL-6	4,2 (0,14-9,3)	1,3 (0,15-10,5)	3,2 (2,5-4,4)	p>0,05	4,9 (0,36-13,1)	0,39 (0,09-8,9)	2,9 (0,23-9,4)	p<0,05 ^a
	TNF-α	7,5 (0,59-24,8)	1,4 (0,69-8,2)	1,9 (0,5-7,2)	p>0,05	3,7 (0,4-15,9)	1,7 (0,18-12,8)	1,7 (0,8-8,2)	p>0,05
	TGF-β	2,4 (0,36-10,5)	0,89 (0,12-5,5)	0,21 (0,1-5,1)	p<0,05 ^b	6,7 (1,4-16,5)	1,12 (0,1-5,1)	0,58 (0,2-2,0)	p<0,05 ^{a,b}
	IL-4Rα	10,0 (4,8-17,4)	15,5 (7,2-26,4)	17,6 (4,4-32,3)	p>0,05	11,7 (1,3-24,9)	15,6 (5,5-28,8)	25,0 (5,9-43)	p>0,05

^a Sem fibrose vs fibrose incipiente; ^b Sem fibrose vs fibrose moderada a grave

A frequência e expressão do receptor α de IL-4 nas subpopulações de monócitos foram também avaliadas *ex vivo* e não foi observada diferença significativa entre os grupos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 15A e Figura 15B, respectivamente). No entanto, nos grupos de indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente a frequência do IL-4R α foi maior nos monócitos intermediários [9,37% (0,47%-34,3%); 15% (0,52%-27,8%), respectivamente] quando comparados com os monócitos clássicos [3,9% (0,2%-20%); 4,6% (0,17%-12,9%), respectivamente] e não-clássicos [1,9% (0,06%-10,6%); 3,9% (0,09%-11,3%), respectivamente]. Semelhante a frequência, a medida de intensidade de fluorescência do IL-4R α nos grupos de indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente foi maior nos monócitos intermediários [MIF= 45,7 (27,8-77,1); 55,3 (26-101), respectivamente] quando comparados com os monócitos clássicos [MIF= 32,2 (23,2-66,3); 35,1 (17,4-61,8), respectivamente] e não-clássicos [MIF= 31,4 (21,5-46,1); 31 (17-53,5), respectivamente]. No entanto, no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave, a expressão deste receptor nos monócitos intermediários foi maior [MIF= 44,2 (30,8-54,5) em relação aos monócitos não-clássicos [MIF= 26,5 (21,5-59)].

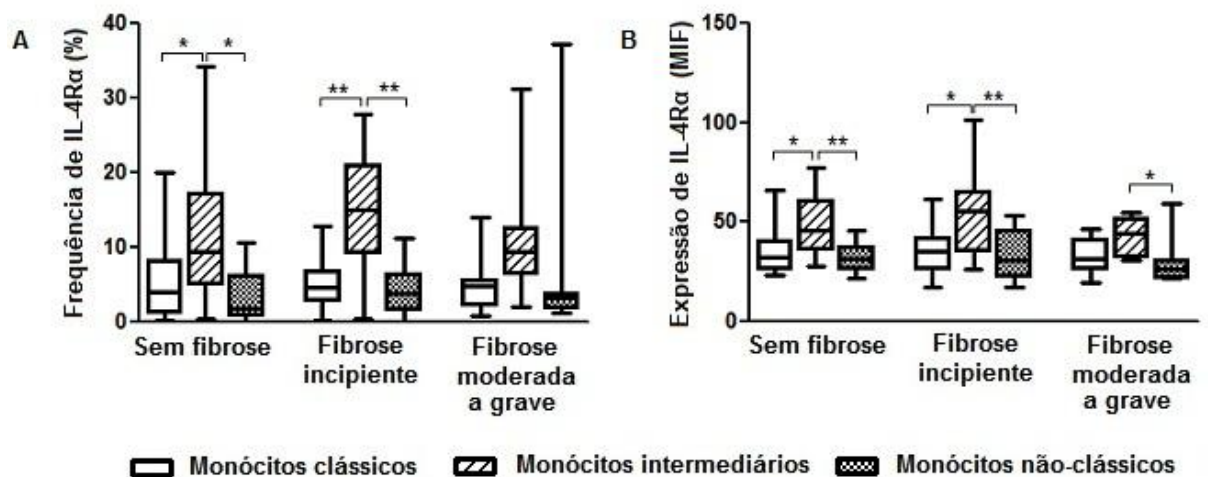


Figura 15: Frequência (A) e expressão (B) do receptor α de IL-4 na subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).

5.2.4 Expressão de moléculas anti-fibróticas e regulatórias nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose.

Na figura 16 é mostrada a expressão da molécula anti-fibrótica (IL-12) e reguladoras (IL-10 e IL-10R) nos monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal.

No grupo de indivíduos com fibrose incipiente a expressão de IL-12 foi maior tanto nos monócitos clássicos (Figura 16A) [Sem estímulo MIF= 464 (87,5-1310) e SEA MIF= 456,5 (97,6-831)], intermediários (Figura 16B) [Sem estímulo MIF= 722,5 (104-1589) e SEA MIF= 635 (117-1180)] e não-clássicos (Figura 16C) [Sem estímulo MIF= 492,5 (52,1-1006) e SEA MIF= 434 (62,1-690)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave [Clássicos: Sem estímulo MIF= 115,5 (85,4-656) e SEA MIF= 117,5 (81-584); Intermediários: Sem estímulo MIF= 144 (113-922) e SEA MIF= 145,5 (83,8-896); Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 67,45 (39,7-618) e SEA MIF= 84,8 (37,5-550)]. Além disso, foi observado que no grupo de indivíduos sem fibrose a expressão de IL-12 foi maior tanto nos monócitos clássicos [Sem estímulo MIF= 408 (86,2-757) e SEA MIF= 416 (57,2-716)] como nos não-clássicos [SEA MIF= 422 (28,4-624)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave, sendo que nos monócitos não-clássicos essa diferença só foi observada na presença de SEA.

Quanto a expressão da molécula reguladora IL-10 nesses monócitos não foi observada diferenças significantes entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 16D-F).

Foi avaliada também a expressão do receptor de IL-10 nas subpopulações de monócitos entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 16G-I). No grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave observou-se que a expressão do IL-10R foi maior tanto nos monócitos clássicos (Figura 16G) [SEA MIF= 62,3 (41,6-90,8)], intermediários (Figura 16H) [Sem estímulo MIF= 118 (83,2-291) e SEA MIF= 151 (93,8-284)] e não-clássicos (Figura 16I) [SEA MIF= 78,6 (61,3-187)] quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente [Clássicos: SEA MIF= 41,75 (25,2-198); Intermediários: Sem

estímulo MIF= 73,8 (38,8-305) e SEA MIF= 85,75 (40,8-291) e Não-clássicos: SEA MIF= 42,35 (24,6-213)], sendo que nos monócitos clássicos e não-clássicos essa diferença só foi observada em culturas estimuladas com SEA. Além disso, no grupo de indivíduos sem fibrose a expressão de IL-10R foi maior nos monócitos clássicos [Sem estímulo MIF= 82,6 (40-211) e SEA MIF= 63,1 (39,7-227)] e não-clássicos [Sem estímulo MIF= 101,4 (37,8-234)] quando comparado ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente [Clássicos: Sem estímulo MIF= 41,45 (25,4-217) e SEA MIF= 41,75 (25,2-198) e Não-clássicos: Sem estímulo MIF= 44,8 (25-243)], sendo que nos monócitos não-clássicos essa diferença só foi observada em culturas não estimuladas.

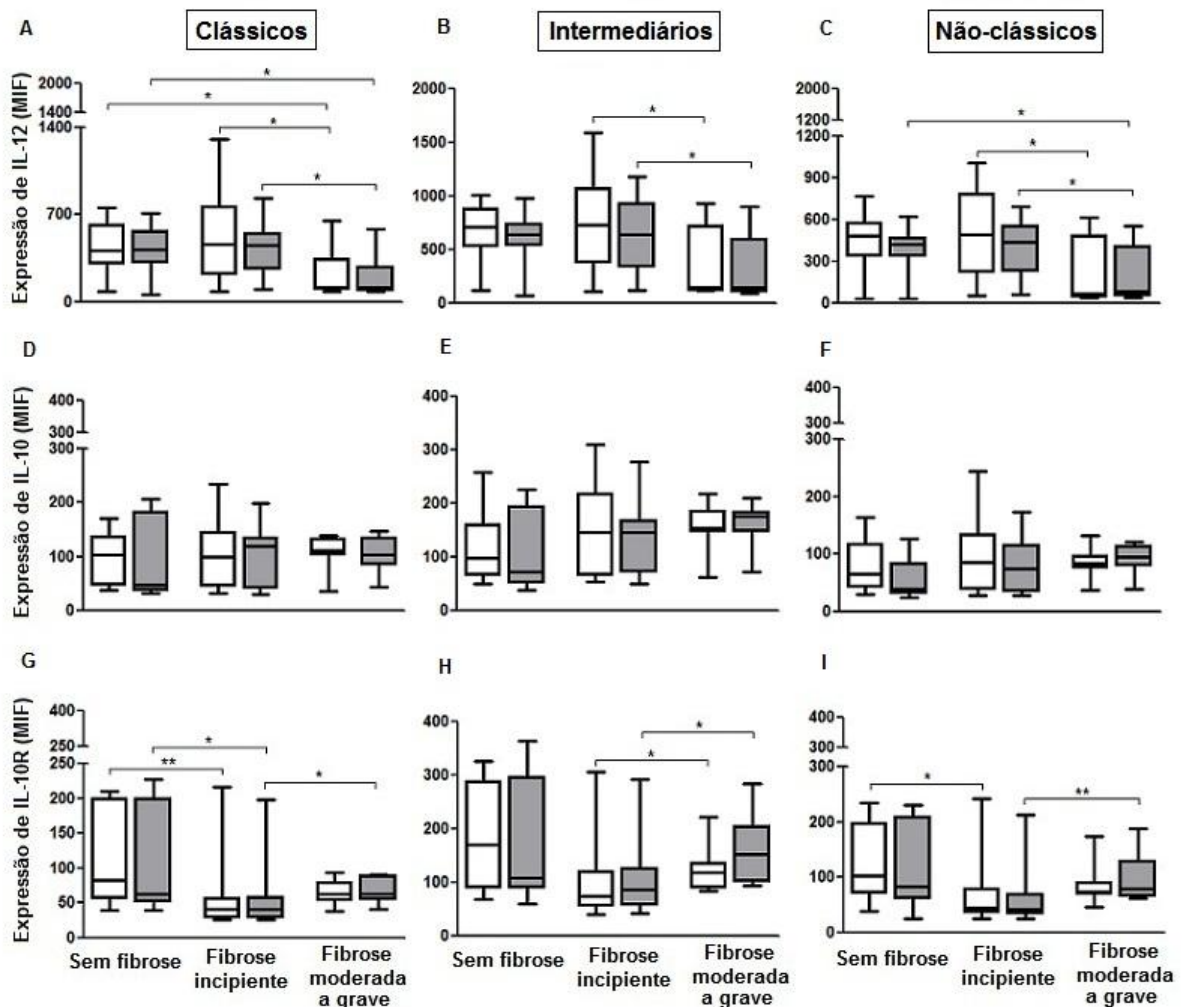


Figura 16: Expressão das moléculas anti-fibrótica IL-12 (A-C) e reguladoras IL-10 (D-F) e IL-10R (G-I) nas subpopulações de monócitos nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose em culturas estimuladas com 10µg/mL de SEA (barra cinza) e sem estímulo (barra branca). *p<0,05 e **p<0,005 (Kruskal Wallis).

A frequência destas moléculas está demonstrada na tabela 3. Nos monócitos clássicos e intermediários foi observado que a frequência de IL-12 foi maior no grupo de indivíduos sem fibrose quando comparado com o grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave (na presença do estímulo) e com fibrose incipiente (na ausência do estímulo), respectivamente. Além disso, foi também observado que a frequência desta citocina nos monócitos clássicos no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave foi maior na ausência do estímulo do que nas culturas estimuladas com SEA.

Quanto a citocina IL-10 foi observada que sua frequência nos monócitos clássicos, na presença do SEA, foi maior no grupo de indivíduos com fibrose incipiente em relação ao grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave. Entretanto, não foi observada diferença significativa dessa molécula nos monócitos intermediários e não-clássicos entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal. Já o receptor de IL-10, a sua frequência nos monócitos intermediários foi maior no grupo de indivíduos com fibrose incipiente e com fibrose moderada a grave quando comparado com o grupo de indivíduos sem fibrose, apenas na presença do SEA.

Quanto a frequência dessas moléculas nos monócitos não-clássicos, não foi observada diferença significativa entre os indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal.

Tabela 3: Frequência de subpopulações de monócitos expressando moléculas anti-fibróticas e regulatórias nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose

		Sem estímulo (%)				SEA (10µg/mL) (%)			
		Sem fibrose	Fibrose incipiente	Fibrose moderada a grave	p	Sem fibrose	Fibrose incipiente	Fibrose moderada a grave	p
Monócitos clássicos	IL-12	3,7 (0,3-12,8)	3,5 (1,5-10,8)	2,9 * (0,3-12,5)	p>0,05	3,4 (0,33-12,2)	1,9 (0,24-9,5)	2,1 (0,5-3,0)	p<0,05 ^b
	IL-10	2,0 (0,73-11,2)	2,0 (0,65-9,8)	0,87 (0,33-3,2)	p>0,05	1,5 (0,16-14,8)	2,25 (0,4-15,6)	1,0 (0,17-4,5)	p<0,05 ^d
	IL-10R	3,9 (1,8-13)	1,7 (8,4-20)	8,2 (4,3-16,2)	p>0,05	4,0 (1,9-24,7)	7,7 (2,0-21,6)	17,3 (3,6-25,6)	p>0,05
Monócitos intermediários	IL-12	17,25 (6,0-32,0)	10,4 (1,8-20,3)	17,8 (1,2-30,1)	p<0,05 ^a	13,4 (3,7-32,9)	11,8 (2,0-39,5)	4,3 (1,7-21,7)	p<0,05
	IL-10	10,7 (1,3-24,7)	12,5 (2,8-20,1)	6,7 (1,7-18,5)	p>0,05	5,7 (0,45-20,6)	12,5 (1,4-24)	4,0 (1,3-15,8)	p>0,05
	IL-10R	19,6 (8,9-33,1)	25,2 (9,0-43,1)	31,2 (12,6-44,1)	p>0,05	16,3 (5,3-29)	26,8 (7,3-44,2)	41,3 (16,4-47)	p<0,05 ^c p<0,005 ^e
Monócitos não-clássicos	IL-12	8,4 (0,13-18,6)	1,7 (0,35-16,2)	1,9 (0,34-15,9)	p>0,05	3,4 (0,25-15,7)	3,1 (0,29-13,9)	2,0 (0,87-13,6)	p>0,05
	IL-10	3,7 (0,33-11,2)	1,7 (0,4-16,8)	1,9 (0,39-3,8)	p>0,05	1,0 (0,36-14,4)	1,4 (0,18-9,2)	1,4 (1,0-2,5)	p>0,05
	IL-10R	10,3 (5,0-21,3)	17,3 (2,8-43,4)	13,3 (7,6-28,6)	p>0,05	8,2 (3,9-26,1)	12,9 (2,5-39,7)	19,2 (6,8-37,6)	p>0,05

^a Sem fibrose vs Fibrose incipiente; ^b Sem fibrose vs Fibrose moderada a grave; ^c Fibrose incipiente vs sem fibrose; ^d Fibrose incipiente vs Fibrose moderada a grave; ^e Fibrose moderada a grave vs sem fibrose * Comparado com Fibrose moderada a grave estimulado com SEA (10µg/mL)

O receptor de IL-10 foi também avaliado *ex vivo* e observou-se que no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a frequência dos monócitos clássicos expressando o receptor de IL-10 foi mais elevada [16,75% (5,4%-29,7%)] quando comparada com o grupo de indivíduos sem fibrose [5,2% (0,25%-11,9%)] e com fibrose incipiente [4,1% (0,3%-12,9%)]. Além disso, no grupo de indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente foi observado uma maior frequência do IL-10R nos monócitos intermediários [13,1% (0,76%-26,2%); 10% (0,71%-20,3%), respectivamente] quando comparada com os monócitos clássicos [5,2% (0,25%-11,9%); 4,1% (0,3%-12,9%), respectivamente]. No entanto, no grupo de indivíduos sem fibrose a frequência do IL-10R nos monócitos intermediários foi também maior quando comparada aos monócitos não-clássicos [6,2% (0,52%-13,2%)] e no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a frequência do IL-10R foi maior nos monócitos clássicos [16,75% (5,4%-29,7%)] quando comparada aos monócitos não-clássicos [2,1% (0,6%-5,86%)] (Figura 17). Quanto a expressão de IL10R (Figura 17B), observou-se maior intensidade de expressão nos monócitos intermediários dos três grupos de indivíduos avaliados [Sem fibrose MIF= 91,8 (30,2-239), fibrose incipiente MIF= 81 (29,5-159) e fibrose moderada a grave MIF= 126 (64,8-155)] em relação aos monócitos clássicos [Sem fibrose MIF= 42,7 (30,1-75,7), fibrose incipiente MIF= 42 (14,5-77,1) e fibrose moderada a grave MIF= 38,9 (32-68,2)] e não-clássicos [Sem fibrose MIF= 39,7 (23,7-72,9), fibrose incipiente MIF= 30 (16-62,7) e fibrose moderada a grave MIF= 26,1 (18-81,5)].

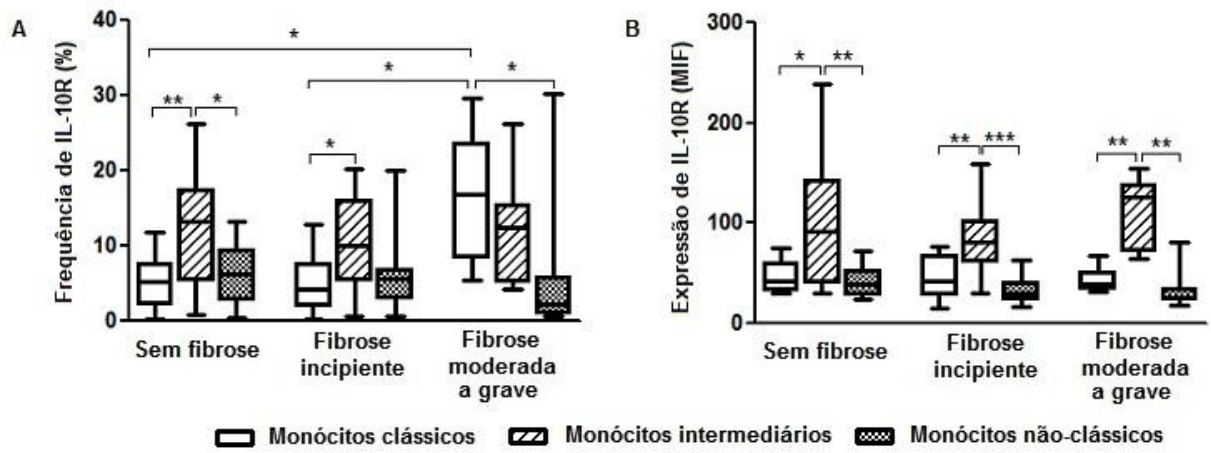


Figura 17: Frequência (A) e expressão (B) do receptor de IL-10 na subpopulações de monócitos de CMSP *ex vivo* de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ (Kruskal Wallis).

6.DISSCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo caracterizar o fenótipo dos monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose mansônica. Foi observado que a média da idade dos indivíduos com fibrose moderada a grave foi maior quando comparada com os indivíduos sem fibrose, o que está de acordo com a literatura em que se observa idade mais elevada nos indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparada aos demais grupos (DE JESUS *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2012). Este fato pode ser explicado pela resposta imune induzida pela constante reexposição ao parasito ao longo da vida, ou pelo lento processo da formação da fibrose. Portanto, os indivíduos mais jovens provavelmente não foram expostos o tempo suficiente para efeitos cumulativos da deposição do colágeno na região periportal (BOOTH *et al.*, 2004). Quanto a carga parasitária, não foi observada diferença entre os grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose. Outros trabalhos têm demonstrado que os indivíduos sem fibrose apresentaram carga parasitária maior quando comparado com os outros grupos (DE JESUS *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2012). No presente estudo, também não foi observado diferença na distribuição dos gêneros entre os grupos, apesar de alguns estudos demonstrarem a importância de fatores associados ao gênero no desenvolvimento da fibrose periportal (SILVA-TEIXEIRA *et al.* 2004; MOHAMED-ALI *et al.*, 1999).

Em relação ao tamanho do fígado, estudos têm mostrado que o tamanho do fígado diminui com o aumento do grau de fibrose associada a esquistossomose (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1989, 1992; RICHTER *et al.*, 1992; HOUSTON *et al.*, 1993), enquanto outros não tem encontrado nenhuma relação entre o tamanho e a fibrose periportal (DOEHRING-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1990). No presente estudo, também não foi observada diferença significativa do tamanho fígado entre os três grupos de indivíduos avaliados. Quanto ao tamanho do baço, alguns estudos não têm encontrado correlação entre esplenomegalia e os graus de fibrose (DOEHRING-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1992; RICHTER *et al.*, 1992). Entretanto, no nosso estudo foi observado que o tamanho do baço dos indivíduos com fibrose moderada a grave foi maior em relação aos demais

grupos, achado concordante com alguns trabalhos (HOMEIDA *et al.*, 1988; DE JESUS *et al.*, 2000).

As células mononucleares estão envolvidas em quase todos os aspectos de doenças crônicas do fígado, especialmente naqueles que levam a fibrogênese. A fibrose é um processo de cicatrização multicelular, onde miofibroblastos que expressam componentes de matriz extracelular têm comunicação cruzada com outras células residentes no fígado ou recrutadas a partir da corrente sanguínea (MARRA *et al.*, 2009). Nos últimos anos, vários estudos têm enfatizado o papel importante de monócitos para a progressão da inflamação e fibrose hepática em modelos experimentais (DUFFIELD *et al.*, 2005; KARLMARK *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2009).

A frequência de diferentes subpopulações de monócitos foi avaliada neste estudo, tanto *ex vivo* quanto em culturas na presença e ausência do antígeno solúvel do ovo (SEA). Foi observado que a frequência dos monócitos clássicos foi maior em relação as demais subpopulações. Os monócitos clássicos correspondem aproximadamente a 90% dos monócitos no sangue periférico (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2011), e um estudo de Liaskou *et al* (2013) sobre as subpopulações de monócitos de indivíduos com doenças crônicas hepáticas também observam uma frequência de aproximadamente 80% dos monócitos clássicos tanto nos pacientes quanto nos indivíduos saudáveis (LIASKOU *et al.*, 2013). Além disso, no nosso estudo foi observado que no grupo de indivíduos com fibrose incipiente existe uma expansão de monócitos intermediários e não-clássicos, na presença do SEA, quando comparada ao grupo de indivíduos sem fibrose.

Quanto ao estado de ativação desses monócitos foram analisadas as moléculas HLA-DR, CD80 e CD86. A expressão de HLA-DR nos monócitos é um pré-requisito importante para uma apresentação de antígeno efetiva às células T CD4⁺. No presente estudo, a expressão de HLA-DR foi avaliada tanto em *ex vivo* como em culturas na presença e ausência do SEA. Foi observado que no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave a expressão de HLA-DR nos monócitos intermediários nas três condições e nos monócitos clássicos nas culturas foi maior quando comparada ao grupo de indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose. Esses resultados indicam que os monócitos de

indivíduos com o grau mais elevado de fibrose são mais ativados do que os outros grupos, contribuindo com o processamento e apresentação de antígeno e ativação de células T.

Além disso, de um modo geral a expressão de HLA-DR nos monócitos intermediários foi maior do que nos monócitos clássicos e não-clássicos. O mesmo foi observado em relação a expressão de CD80 e CD86. Estudos têm mostrado que os monócitos intermediários expressam altos níveis de genes associados ao processamento e apresentação de antígenos (WONG *et al.*, 2011; ZAWADA *et al.*, 2011). No entanto, outros trabalhos envolvendo células de indivíduos saudáveis (WONG *et al.*, 2011) e de indivíduos com leishmaniose cutânea na presença do Sm29 do *Schistosoma mansoni* (BAFICA *et al.*, 2012) não observaram diferenças significativas na expressão de CD80 e CD86 nas três subpopulações de monócitos, o que diferiu do nosso resultado.

A frequência de monócitos clássicos e intermediários expressando CD80 foi maior no grupo de indivíduos sem fibrose quando comparada com aqueles com fibrose moderada a grave. A frequência de CD86 foi maior também nos monócitos clássicos e intermediários no grupo de indivíduos com fibrose incipiente quando comparada ao grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave. As moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 são bem conhecidas pelo papel importante que desempenham durante a iniciação de respostas imune adaptativas e em várias doenças imune-medidas (LENSCHOW *et al.*, 1996; ODOBASIC *et al.*, 2005). Alguns trabalhos em modelo experimental têm mostrado que CD80 e CD86 podem seletivamente induzir respostas do tipo Th1 e Th2, respectivamente (KUCHROO *et al.*, 1995; LENSCHOW *et al.*, 1996). Entretanto, outros estudos mostraram que essa seletividade tem sido difícil estabelecer em humanos (LEVINE *et al.*, 1995; BASHIAN *et al.*, 1997). Neste estudo observou-se uma baixa frequência de monócitos expressando CD80 e CD86 em indivíduos com grau mais elevado de fibrose. A fibrose moderada a grave tem sido associada a uma resposta Th2 exacerbada (DE JESUS, *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006) e Subramanian *et al.* (1997) demonstraram que CD86 pode ser necessário para formação do granuloma induzido por helminto e para expressão de citocinas do tipo Th2 em modelo experimental (SUBRAMANIAN *et al.*, 1997).

Em células T humanas, a ligação de CTLA-4 com CD80 expressa em células dendríticas promove a função reguladora, enquanto que as interações CD86-CD28 representam um potente sinal que interfere nas funções inibitórias das células T reguladoras (ZHENG *et al.*, 2004). Estes dados poderiam justificar essa maior frequência de CD80 no grupo sem fibrose, o que estaria associado na sua indução da supressão da resposta imune e que a maior frequência de CD86 nos monócitos de indivíduos com fibrose incipiente poderia estar associada a uma ausência de regulação no desenvolvimento da fibrose nestes indivíduos. O fato de ambas as moléculas estarem diminuídas nos monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave poderia sugerir uma modulação crônica da resposta imune nestes indivíduos, desde que tem sido demonstrado que a infecção crônica por helmintos induz modulação no sistema imunológico. O papel de CD80 e CD86, entretanto, é controverso em várias doenças e mais estudos são necessários para o entendimento do papel da expressão dessas moléculas na fibrose periportal secundária à esquistossomose.

Para auxiliar no entendimento dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da fibrose periportal secundária à esquistossomose, moléculas de caráter pró-fibróticas e pró-inflamatórias foram também avaliadas nas diferentes subpopulações de monócitos.

A expressão de IL-4R α nas três subpopulações de monócitos foi maior nos indivíduos sem fibrose e com fibrose moderada a grave quando comparada com os indivíduos com fibrose incipiente. Além disso, a frequência de monócitos intermediários expressando IL-4R α e também a expressão da molécula nestas células no grupo de indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente foi maior quando comparada com os monócitos clássicos e não-clássicos, corroborando com os demais achados neste estudo, em que esta subpopulação está mais ativada quando comparada as demais subpopulações. Em modelo experimental as citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis por induzir uma ativação alternativa de monócitos, através da ligação ao receptor α de IL-4. A sinalização através do IL-4R α induz a expressão de arginase, enzima responsável pela conversão de L-arginina em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, portanto, no desenvolvimento da fibrose (HESSE *et al.*, 2001). Estudos envolvendo modelo experimental em *S. mansoni* têm

demonstrado que a responsividade através do IL-4R α é importante para formação do granuloma e sobrevivência do hospedeiro durante a infecção por este helminto (JANKOVIC *et al.*, 1999; HERBERT *et al.*, 2004). No entanto, na literatura são raros os trabalhos relatando a função deste receptor nos monócitos humanos e, em modelo experimental de esquistossomose, o papel IL-4R α permanece controverso.

Em relação a expressão de TGF- β , observou-se elevação nas três subpopulações de monócitos no grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave e nos monócitos clássicos de pacientes com fibrose incipiente quando comparada ao grupo de indivíduos sem fibrose. A TGF- β é uma citocina responsável por múltiplos processos biológicos tais como inflamação, fibrose e reparo tecidual (BLOBE, *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006). Esta citocina induz proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, a sua produção é aumentada no local da fibrose, o que sugere seu papel potencial no estabelecimento da fibrose (FINE e GOLDSTEIN, 1987; BORDER e NOBLE, 1994; VERRECCHIA e MAUVIEL, 2007). Estudo de Souza *et al.* (2012) não observou diferença significativa nos níveis séricos de TGF- β nos grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose (DE SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, outros estudos também não observam diferenças nos níveis de TGF- β em sobrenadantes de CMSP estimulados com SEA entre grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (DE JESUS *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006). No entanto, a produção desta citocina tem sido demonstrada em CMSP de babuínos infectados com *S. mansoni*, o qual sugeriu uma associação com fibrose (FARAH *et al.*, 2000). Possivelmente a expressão de TGF- β por monócitos humanos se associa melhor com a fibrose do que a produção desta citocina por CMSP.

As citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- α também foram avaliadas neste estudo. A expressão de IL-6 foi maior nas três subpopulações de monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparada com os indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose, e maior também nos monócitos intermediários de indivíduos com fibrose incipiente quando comparada com os indivíduos sem fibrose. A IL-6 é uma citocina envolvida numa variedade de papéis importantes na resposta imune, desde a indução de uma resposta

inflamatória de fase aguda até na fibrogênese, uma vez que também induz a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno, bem como a síntese do inibidor de metaloproteinase 1 (TIMP-1) (DUNCAN e BERMAN, 1991; LOTZ e GUERNE, 1991; MIHARA *et al.*, 1996; BARNES *et al.*, 2011). Estudo de Khalil *et al.* (1996) relatam um aumento da produção de IL-6 durante o curso da infecção pelo *S. mansoni* em modelo experimental, como também na formação do granuloma hepático, o que poderia indicar a participação desta citocina na resposta inflamatória granulomatosa (KHALIL *et al.*, 1996). Outro estudo relata que o SEA estimula a produção de IL-6 em culturas de macrófagos isolados de granulomas em modelo experimental (CHENSUE *et al.*, 1994). Nosso estudo dá suporte também à participação de monócitos expressando IL-6 na progressão da fibrose periportal secundária à esquistossomose em humanos.

Por outro lado, no nosso estudo a frequência de IL-6 nos monócitos não-clássicos foi maior no grupo de indivíduos sem fibrose quando comparada com o grupo de indivíduos com fibrose incipiente. Faz-se necessário um acompanhamento dos indivíduos com frequência elevada de monócitos expressando IL-6 para avaliar a possibilidade do aumento da predisposição para o desenvolvimento da fibrose periportal nesses indivíduos.

A combinação de citocinas TGF- β e IL-6 é essencial para a diferenciação das células T naive em Th17 (VELDHOEN, *et al.*, 2006; BETTELLI, *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; KORN *et al.*, 2009). A IL-17 é uma citocina envolvida no desenvolvimento da doença grave pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos nos sítios inflamatórios (TALLIMA *et al.*, 2009) e também tem sido envolvida na patogênese da esquistossomose em modelos experimentais (ANDRADE, 2009; RUTITZKY *et al.*, 2005, 2006). Em nosso estudo, observamos uma maior expressão de IL-6 e TGF- β nos monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave, o que poderia contribuir com a indução de IL-17 e conseqüentemente com o agravamento da doença. No estudo De Souza *et al.* (2012), entretanto, não observou diferenças nos níveis de IL-17 em sobrenadantes de CMSP estimulados com SEA entre os grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (DE SOUZA *et al.*, 2012).

Quanto ao TNF- α , a sua expressão foi maior nos monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparada com os indivíduos sem fibrose

e com fibrose incipiente (monócitos não-clássicos), como também, foi mais expressada nos monócitos clássicos de indivíduos com fibrose incipiente quando comparada com os indivíduos sem fibrose. Estudos realizados com indivíduos com esquistossomose têm mostrado que altos níveis desta citocina produzidos por CMSP estimulados com antígenos de *Schistosoma* são significativamente associado com a presença da fibrose periportal (MWATHA *et al.*, 1998; HENRI *et al.*, 2002; BOOTH *et al.*, 2004). De Souza *et al.* (2012) mostram que os níveis de TNF- α em sobrenadante de CMSP, sem estimulação antigênica, é maior nos indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparada com os indivíduos sem fibrose (DE SOUZA *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos não observam diferenças significativas nos níveis de TNF- α em sobrenadantes de CMSP estimuladas com SEA entre os grupos com diferentes graus de fibrose (DE JESUS *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2012). Outros trabalhos têm sugerido que TNF- α pode ser fundamental para a redução do granuloma e da fibrose hepática em modelo experimental (HOFFMANN *et al.*, 1998). Nosso estudo mostra que os monócitos expressando esta citocina, independente da sua subpopulação, são importantes para desenvolvimento da fibrose. No entanto, semelhante à IL-6, a frequência de monócitos expressando TNF- α , na presença do SEA, foi maior nos monócitos clássicos e intermediários dos indivíduos sem fibrose quando comparada com os indivíduos com fibrose incipiente e com os indivíduos com fibrose moderada a grave. Embora tenha sido baixa a intensidade de expressão de IL-6 e TNF- α nos monócitos de pacientes sem fibrose, eles devem ser monitoradas quanto ao desenvolvimento da fibrose.

Estudos demonstram que os monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de indivíduos saudáveis produzem níveis elevados de IL-6 e TNF- α , quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (WONG *et al.*, 2011). A presença do SEA nas culturas expandiu a população de monócitos expressando TNF- α , IL-6 e TGF- β nos pacientes sem fibrose, entretanto, a expressão destas moléculas por células foi muito baixa nesses pacientes.

Trabalhos realizados com modelo experimental indicam que monócitos/macrófagos não são apenas fundamentais para progressão da fibrose, mas também para regressão da fibrose, uma vez que podem também degradar proteínas da matriz extracelular e exercer ações anti-inflamatórias

(ZIMMERMANN e TACKE, 2011; FALLOWFIELD *et al.*, 2007). Devido a isso, nosso estudo também avalia as moléculas com perfil regulador e antifibrótico.

Em nosso trabalho, a expressão de IL-12 foi maior nos monócitos de indivíduos com fibrose incipiente e sem fibrose (observado nos monócitos clássicos e não-clássicos) quando comparada com os indivíduos com fibrose moderada a grave. Foi também observada uma maior frequência de monócitos expressando esta citocina em indivíduos sem fibrose quando comparada aqueles com fibrose moderada a grave e fibrose incipiente. A citocina IL-12 é conhecida por favorecer respostas do tipo Th1, e os efeitos que a mesma exerce na fibrose são acompanhados pela substituição do padrão de citocinas Th2, que é característica da infecção por *S. mansoni*, por citocinas do tipo Th1 (WYNN *et al.*, 1995). Neste mesmo estudo, os autores também consideram esta citocina como anti-fibrótica por inibir a síntese de colágeno em fibroblastos. Alguns trabalhos têm também mostrado que a inflamação granulomatosa e fibrose hepática em modelo experimental de *S. mansoni* pode ser prevenida com adição de IL-12, considerada uma potente adjuvante indutora de resposta Th1 (WYNN *et al.*, 1994, 1995; MENTINK-KANE *et al.*, 2011). Hoffman *et al.* (1998) demonstram que o desvio da resposta imune de Th2 para Th1, e a manutenção desta resposta é necessária para redução do tamanho do granuloma e prevenção da fibrose hepática (HOFFMANN *et al.*, 1998). Além disso, a IL-12 poderia também ativar os monócitos/macrófagos a expressarem o óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ao invés da arginase (HESSE *et al.*, 2000). Como esperado, os monócitos de indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram uma baixa expressão de IL-12, sendo a resposta Th1 desses pacientes possivelmente insuficiente para controlar o desenvolvimento da fibrose.

As moléculas reguladoras IL-10 e IL-10R foram também avaliadas nos monócitos de indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal. Não foi observada diferença significativa na expressão de IL-10 nos monócitos de indivíduos dos diferentes grupos. Entretanto, a frequência de monócitos clássicos expressando IL-10 foi maior nos indivíduos com fibrose incipiente quando comparada com os indivíduos com fibrose moderada a grave. Vários estudos relatam o papel protetor de IL-10 durante a esquistossomose (BOSSHARDT *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 2000; BOOTH *et al.*, 2004). Tem sido mostrado que

esta citocina pode controlar a resposta excessiva tanto do tipo Th1 quanto Th2, suprimir a ativação de células dendríticas e macrófagos e limitar a hepatotoxicidade induzida por ovos do verme adulto durante a fase aguda da infecção (OSWALD *et al.*, 1992; HOFFMANN *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2004). Os níveis de IL-10 em sobrenadante de culturas de CMSP estimulados com SEA nos indivíduos com fibrose periportal têm sido discordantes na literatura. Alguns autores encontraram níveis elevados desta citocina em indivíduos com fibrose periportal grave quando comparada com os outros graus (DE JESUS *et al.*, 2004) , enquanto outros encontraram níveis mais baixos de IL-10 nos indivíduos com fibrose moderada a grave (ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006). Existe ainda estudo que não encontrou diferença significativa nos níveis desta citocina entre os grupos de indivíduos (DE SOUZA *et al.*, 2012). Trabalhos envolvendo modelo experimental em esquistossomose têm mostrado que a fibrose foi consistentemente aumentada em camundongos deficientes em IL-10 e IL-12 simultaneamente, sugerindo que ambas citocinas interagem para inibir o desenvolvimento de fibrose (HOFFMANN *et al.*, 2000; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

Quanto a expressão do receptor de IL-10 no presente estudo, observou-se uma maior expressão nos monócitos clássicos, assim como uma maior frequência de monócitos intermediários expressando IL-10R nos indivíduos com fibrose moderada a grave e com fibrose incipiente. Esse é um dado inesperado, desde que Herbert *et al.* (2008) demonstram que a administração de anticorpos monoclonais anti-IL-10R em camundongos infectados pelo *S. mansoni* aumentou significativamente a produção de IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-17, como também aumentou o tamanho do granuloma hepático e lesões hepatocelulares (HERBERT *et al.*, 2008). Apesar da elevada expressão de IL-10R nos monócitos clássicos e intermediários dos pacientes com fibrose moderada a grave, estes foram os mais ativados e os que expressaram altos níveis de moléculas pró-fibróticas e pró-inflamatórias, a exemplo de IL-4R α , TGF- β , IL-6 e TNF- α .

São raros os trabalhos que retratam a funcionalidade dessas moléculas reguladoras na fibrose periportal secundária à esquistossomose. As expressões dessas moléculas nos monócitos assim como o seu papel nesta doença permanecem controversas, entretanto o presente estudo traz importantes

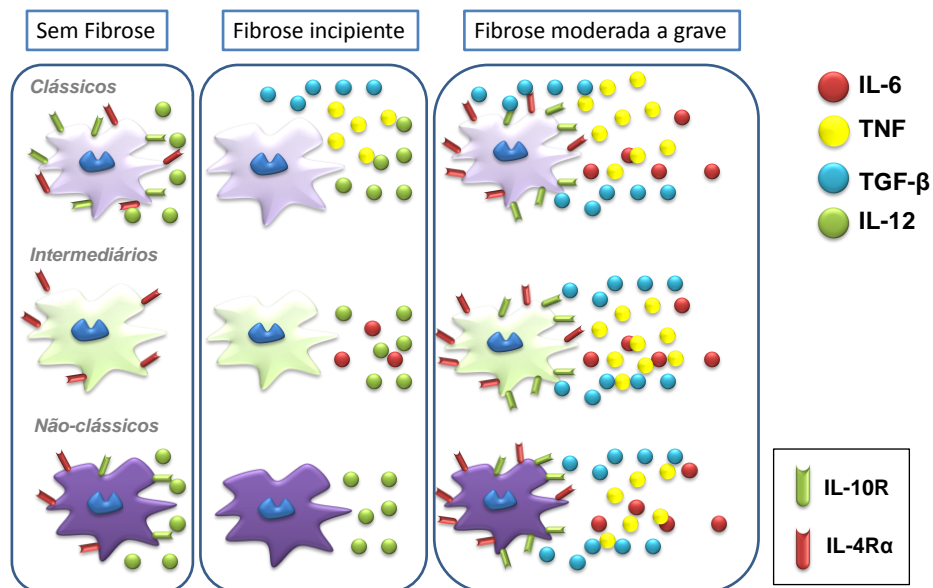
contribuições no entendimento do papel das diferentes subpopulações de monócitos na patogênese da esquistossomose humana.

7.RESUMO DOS RESULTADOS

7.1 Expressão das moléculas co-estimulatórias e receptores de citocinas em ensaio *ex vivo* em monócitos de pacientes esquistossomóticos com diferentes graus de fibrose periportal.

Grau de fibrose / Monócitos	Sem fibrose	Fibrose incipiente	Fibrose moderada a grave
Clássicos	HLA-DR + CD80 + CD86 +	HLA-DR + CD80 + CD86 + IL-4R α + IL-10R +	HLA-DR + CD80 + CD86 + IL-10R +
Intermediários	HLA-DR ++ CD80 +++ CD86 +++ IL-4R α +++ IL-10R +++	HLA-DR ++ CD80 +++ CD86 +++ IL-4R α +++ IL-10R +++	HLA-DR +++ CD80 +++ CD86 +++ IL-4R α +++ IL-10R +++
Não clássicos	CD80 + CD86 + IL-4R α + IL-10R +	HLA-DR + CD80 + CD86 + IL-4R α + IL-10R +	HLA-DR + CD80 + CD86 + IL-4R α + IL-10R +

7.2 Figura representativa da expressão de citocinas e receptores nos monócitos após cultura de pacientes esquistossomóticos com diferentes graus de fibrose periportal.



8.CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que os monócitos de indivíduos com fibrose periportal moderada a grave, independente da subpopulação, participam da imunopatogênese da doença, uma vez que expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas e baixos níveis de citocinas anti-fibróticas.

9. PERSPECTIVAS

Este é o primeiro trabalho nesta área, sendo necessários mais estudos para o melhor entendimento do papel de moléculas expressas nos monócitos na progressão e na regulação da fibrose.

10.REFERÊNCIAS

Abdel-Wahab, M. F., G. Esmat, *et al.* Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. Am J Trop Med Hyg, v.46, n.4, Apr, p.403-8. 1992.

Abdel-Wahab, M. F., G. Esmat, *et al.* Characteristic sonographic pattern of schistosomal hepatic fibrosis. Am J Trop Med Hyg, v.40, n.1, Jan, p.72-6. 1989.

Abraham, D. J., X. Shiwen, *et al.* Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. J Biol Chem, v.275, n.20, May 19, p.15220-5. 2000.

Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol, v.3, n.9, Sep, p.745-56. 2003.

Akira, S., T. Taga, *et al.* Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol, v.54, p.1-78. 1993.

Allen, J. E. e R. M. Maizels. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Rev Immunol, v.11, n.6, Jun, p.375-88. 2011.

Alves Oliveira, L. F., E. C. Moreno, *et al.* Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. Infect Immun, v.74, n.2, Feb, p.1215-21. 2006.

Amiri, P., R. M. Locksley, *et al.* Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. Nature, v.356, n.6370, Apr 16, p.604-7. 1992.

Ancuta, P., R. Rao, *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. J Exp Med, v.197, n.12, Jun 16, p.1701-7. 2003.

Andrade, Z. A. Schistosomal hepatopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.5 Suppl 1, p.51-7. 2004.

Andrade, Z. A Schistosomiasis and liver fibrosis. Parasite Immunol, v.31, n.11, Nov, p.656-63. 2009.

Andrews, R. P., M. B. Ericksen, *et al.* Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. J Biol Chem, v.277, n.39, Sep 27, p.36563-9. 2002.

Araujo, M. I., A. R. De Jesus, *et al.* Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. Eur J Immunol, v.26, n.6, p.1399-403. 1996.

Auffray, C., M. H. Sieweke, *et al.* Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.669-92. 2009.

- Babu, S., V. Kumaraswami, *et al.* Alternatively activated and immunoregulatory monocytes in human filarial infections. J Infect Dis, v.199, n.12, Jun 15, p.1827-37. 2009.
- Bafica, A. M., L. S. Cardoso, *et al.* Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. J Parasitol Res, v.2012, p.520308. 2012.
- Baptista, A. P. e Z. A. Andrade. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100, n.2, Apr, p.183-5. 2005.
- Barbarin, V., Z. Xing, *et al.* Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.288, n.5, May, p.L841-8. 2005.
- Barnes, T. C., M. E. Anderson, *et al.* The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. Int J Rheumatol, v.2011, p.721608. 2011.
- Bashian, G. G., C. M. Braun, *et al.* Differential regulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses by the B-7 homologues, CD80 and CD86. Am J Respir Cell Mol Biol, v.17, n.2, Aug, p.235-42. 1997.
- Bataller, R. e D. A. Brenner. Liver fibrosis. J Clin Invest, v.115, n.2, Feb, p.209-18. 2005.
- Benyon, R. C. e M. J. Arthur. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Semin Liver Dis, v.21, n.3, Aug, p.373-84. 2001.
- Bettelli, E., Y. Carrier, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.235-8. 2006.
- Bica, I., D. H. Hamer, *et al.* Hepatic schistosomiasis. Infect Dis Clin North Am, v.14, n.3, Sep, p.583-604, viii. 2000.
- Bina, J. C. Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão. Rev. Patol. Trop., v.26, p.69-128. 1997.
- Bina, J. C. e A. Prata. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.2, Mar-Apr, p.211-6. 2003.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann, *et al.* Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med, v.342, n.18, May 4, p.1350-8. 2000.

Bogliolo, L., Neves, J. . Ocorrência da hepatite na forma aguda da esquistossomose mansoni, antes da maturação dos vermes e da postura de ovos. An. Fac. Med. Minas Gerais, n.2, p.47-74. 1965.

Booth, M., J. K. Mwatha, *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, v.172, n.2, Jan 15, p.1295-303. 2004.

Border, W. A. e N. A. Noble. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med, v.331, n.19, Nov 10, p.1286-92. 1994.

Bosshardt, S. C., G. L. Freeman, Jr., *et al.* IL-10 deficit correlates with chronic, hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol, v.19, n.8, Aug, p.347-53. 1997.

Bottieau, E., J. Clerinx, *et al.* Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. J Infect, v.52, n.5, May, p.339-45. 2006.

Bottinger, E. P., J. J. Letterio, *et al.* Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. Kidney Int, v.51, n.5, May, p.1355-60. 1997.

Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica 2009.

Burke, M. L., M. K. Jones, *et al.* Immunopathogenesis of human schistosomiasis. Parasite Immunol, v.31, n.4, Apr, p.163-76. 2009.

Cass, C. L., J. R. Johnson, *et al.* Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol Biochem Parasitol, v.155, n.2, Oct, p.84-93. 2007.

Cheever, A. W., J. A. Lenzi, *et al.* Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.7, Oct, p.917-40. 2002.

Cheever, A. W., Y. Xu, *et al.* The role of cytokines in the pathogenesis of hepatic granulomatous disease in *Schistosoma mansoni* infected mice. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.87 Suppl 4, p.81-5. 1992.

Chensue, S. W., K. Warmington, *et al.* Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. Am J Pathol, v.145, n.5, Nov, p.1105-13. 1994.

Chiaromonte, M. G., M. Mentink-Kane, *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. J Exp Med, v.197, n.6, Mar 17, p.687-701. 2003.

Choi, I., H. S. Kang, *et al.* IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. Clin Exp Immunol, v.95, n.3, Mar, p.530-5. 1994.

Cooke, G. S., A. Lavani, *et al.* Acute pulmonary schistosomiasis in travelers returning from Lake Malawi, sub-Saharan Africa. Clin Infect Dis, v.29, n.4, Oct, p.836-9. 1999.

Correa-Oliveira, R., L. C. Malaquias, *et al.* Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, Jan, p.171-7. 1998.

Cros, J., N. Cagnard, *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity, v.33, n.3, Sep 24, p.375-86. 2010.

De Jesus, A. R., A. Magalhaes, *et al.* Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. Infect Immun, v.72, n.6, Jun, p.3391-7. 2004.

De Jesus, A. R., D. G. Miranda, *et al.* Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura. Am J Trop Med Hyg, v.63, n.1-2, Jul-Aug, p.1-4. 2000.

De Jesus, A. R., A. Silva, *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. J Infect Dis, v.185, n.1, Jan 1, p.98-105. 2002.

De Souza Rda, P., L. S. Cardoso, *et al.* Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. J Parasitol Res, v.2012, p.394981. 2012.

Doehring-Schwerdtfeger, E., I. M. Abdel-Rahim, *et al.* Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: evaluation of morbidity. Am J Trop Med Hyg, v.42, n.6, Jun, p.581-6. 1990.

Doehring-Schwerdtfeger, E., C. Kaiser, *et al.* Ultrasound versus clinical examination as indication for *Schistosoma mansoni* associated morbidity in children. Trop Med Parasitol, v.43, n.4, Dec, p.245-8. 1992.

Dooley, S. e P. Ten Dijke. TGF-beta in progression of liver disease. Cell Tissue Res, v.347, n.1, Jan, p.245-56. 2012.

Doumenge, J. P., Ed. Atlas of global distribution of schistosomiasis. Bordeaux, France: University of Bordeaux Press. 1987.

Duffield, J. S., S. J. Forbes, *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. J Clin Invest, v.115, n.1, Jan, p.56-65. 2005.

Duncan, M. R. e B. Berman. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. J Invest Dermatol, v.97, n.4, Oct, p.686-92. 1991.

Dunne, D. W. e A. Cooke. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. Nat Rev Immunol, v.5, n.5, May, p.420-6. 2005.

Falcao, P. L., L. C. Malaquias, *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. Parasite Immunol, v.20, n.10, Oct, p.447-54. 1998.

Fallon, P. G., E. J. Richardson, *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. J Immunol, v.164, n.5, Mar 1, p.2585-91. 2000.

Fallowfield, J. A., M. Mizuno, *et al.* Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. J Immunol, v.178, n.8, Apr 15, p.5288-95. 2007.

Farah, I. O., P. W. Mola, *et al.* Repeated exposure induces periportal fibrosis in Schistosoma mansoni-infected baboons: role of TGF-beta and IL-4. J Immunol, v.164, n.10, May 15, p.5337-43. 2000.

Farid, Z., J. Woody, *et al.* Praziquantel and acute urban schistosomiasis. Trop Geogr Med, v.41, n.2, Apr, p.172. 1989.

Fine, A. e R. H. Goldstein. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. J Biol Chem, v.262, n.8, Mar 15, p.3897-902. 1987.

Frankenberger, M., T. Sternsdorf, *et al.* Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood, v.87, n.1, Jan 1, p.373-7. 1996.

Freedman, D. O. e E. A. Ottesen. Eggs of Schistosoma mansoni stimulate endothelial cell proliferation in vitro. J Infect Dis, v.158, n.3, Sep, p.556-62. 1988.

Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Gastroenterology, v.134, n.6, May, p.1655-69. 2008.

Gallucci, R. M., E. G. Lee, *et al.* IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. J Invest Dermatol, v.126, n.3, Mar, p.561-8. 2006.

Gallucci, R. M., P. P. Simeonova, *et al.* Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. FASEB J, v.14, n.15, Dec, p.2525-31. 2000.

Gately, M. K., B. B. Desai, *et al.* Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). J Immunol, v.147, n.3, Aug 1, p.874-82. 1991.

- Gazzinelli, G. e D. G. Colley. Human immune responses during schistosomiasis mansoni. Rev Soc Bras Med Trop, v.25, n.2, Apr-Jun, p.125-34. 1992.
- Geissmann, F., S. Jung, *et al.* Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, v.19, n.1, Jul, p.71-82. 2003.
- Gelfand, M., V. C. V. De, *et al.* The use of steroids in the earlier hypersensitivity stage of schistosomiasis. Cent Afr J Med, v.27, n.11, Nov, p.219-21. 1981.
- Gordon, S. e F. O. Martinez. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity, v.32, n.5, May 28, p.593-604. 2010.
- Gordon, S. e P. R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, v.5, n.12, Dec, p.953-64. 2005.
- Gryseels, B. The epidemiology of schistosomiasis in Burundi and its consequences for control. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.85, n.5, Sep-Oct, p.626-33. 1991.
- Gryseels, B., K. Polman, *et al.* Human schistosomiasis. Lancet, v.368, n.9541, Sep 23, p.1106-18. 2006.
- Gubler, U., A. O. Chua, *et al.* Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.10, May 15, p.4143-7. 1991.
- Gutierrez-Ruiz, M. C., G. Robles-Diaz, *et al.* Emerging concepts in inflammation and fibrosis. Arch Med Res, v.33, n.6, Nov-Dec, p.595-9. 2002.
- Haas, W., D. Diekhoff, *et al.* Schistosoma mansoni cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. J Parasitol, v.83, n.6, Dec, p.1079-85. 1997.
- Haseeb, M. A., D. J. Shirazian, *et al.* Elevated serum levels of TNF-alpha, sTNF-RI and sTNF-RII in murine schistosomiasis correlate with schistosome oviposition and circumoval granuloma formation. Cytokine, v.15, n.5, Sep 7, p.266-9. 2001.
- Henri, S., C. Chevillard, *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, v.169, n.2, Jul 15, p.929-36. 2002.
- Herbert, D. R., C. Holscher, *et al.* Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. Immunity, v.20, n.5, May, p.623-35. 2004.
- Herbert, D. R., T. Orekov, *et al.* IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. J Immunol, v.181, n.10, Nov 15, p.7214-20. 2008.

Herbert, D. R., T. Orekov, *et al.* IL-4R alpha expression by bone marrow-derived cells is necessary and sufficient for host protection against acute schistosomiasis. J Immunol, v.180, n.7, Apr 1, p.4948-55. 2008.

Hesse, M., A. W. Cheever, *et al.* NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. Am J Pathol, v.157, n.3, Sep, p.945-55. 2000.

Hesse, M., M. Modolell, *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J Immunol, v.167, n.11, Dec 1, p.6533-44. 2001.

Hesse, M., C. A. Piccirillo, *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. J Immunol, v.172, n.5, Mar 1, p.3157-66. 2004.

Hoffmann, K. F., P. Caspar, *et al.* IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. J Immunol, v.161, n.8, Oct 15, p.4201-10. 1998.

Hoffmann, K. F., A. W. Cheever, *et al.* IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. J Immunol, v.164, n.12, Jun 15, p.6406-16. 2000.

Homeida, M., S. Ahmed, *et al.* Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection as determined by ultrasound: a study in Gezira, Sudan. Am J Trop Med Hyg, v.39, n.2, Aug, p.196-201. 1988.

Houston, S., M. Munjoma, *et al.* Use of ultrasound in a study of schistosomal periportal fibrosis in rural Zimbabwe. Acta Trop, v.53, n.1, Mar, p.51-8. 1993.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science, v.260, n.5107, Apr 23, p.547-9. 1993.

Iarotski, L. S. e A. Davis. The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire survey. Bull World Health Organ, v.59, n.1, p.115-27. 1981.

Issa, R., X. Zhou, *et al.* Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. Gastroenterology, v.126, n.7, Jun, p.1795-808. 2004.

Jankovic, D., M. C. Kullberg, *et al.* Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. J Immunol, v.163, n.1, Jul 1, p.337-42. 1999.

Joseph, A. L. e D. L. Boros. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. J Immunol, v.151, n.10, Nov 15, p.5461-71. 1993.

Karlmark, K. R., R. Weiskirchen, *et al.* Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. Hepatology, v.50, n.1, Jul, p.261-74. 2009.

Katz, N., P. M. Coelho, *et al.* Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. J Parasitol, v.56, n.5, p.1032-3. 1970.

Kershenobich Stalnikowitz, D. e A. B. Weissbrod. Liver fibrosis and inflammation. A review. Ann Hepatol, v.2, n.4, Oct-Dec, p.159-63. 2003.

Khalil, R. M., L. Hultner, *et al.* Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice with *Schistosoma mansoni*. Immunology, v.89, n.2, Oct, p.256-61. 1996.

Kimura, T., I. Sakaida, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-alpha production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Biochem Biophys Res Commun, v.231, n.3, Feb 24, p.557-60. 1997.

King, C. L., I. Malhotra, *et al.* B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. J Immunol, v.160, n.7, Apr 1, p.3578-84. 1998.

Korn, T., E. Bettelli, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.485-517. 2009.

Kreider, T., R. M. Anthony, *et al.* Alternatively activated macrophages in helminth infections. Curr Opin Immunol, v.19, n.4, Aug, p.448-53. 2007.

Kubo, Y., M. Yasunaga, *et al.* Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor alpha inhibitors. Hepatology, v.23, n.1, Jan, p.104-14. 1996.

Kuchroo, V. K., M. P. Das, *et al.* B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell, v.80, n.5, Mar 10, p.707-18. 1995.

Kulkarni, A. B. e S. Karlsson. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. Am J Pathol, v.143, n.1, Jul, p.3-9. 1993.

Kumar, V., Abbas, A.K., and Fausto, N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: (Ed.). Pathologic basis of disease. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders, 2005. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis, p.87-118

Lambertucci, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.35, n.5, Sep-Oct, p.399-404. 1993.

Lambertucci, J. R., A. A. Rayes, *et al.* Acute schistosomiasis: report on five singular cases. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.92, n.5, Sep-Oct, p.631-5. 1997.

Laporte, S. L., Z. S. Juo, *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. Cell, v.132, n.2, Jan 25, p.259-72. 2008.

Leask, A. e D. J. Abraham. TGF-beta signaling and the fibrotic response. FASEB J, v.18, n.7, May, p.816-27. 2004.

Lenschow, D. J., K. C. Herold, *et al.* CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. Immunity, v.5, n.3, Sep, p.285-93. 1996.

Lenzi, H. L., A. C. Sobral, *et al.* Participation of endothelial cells in murine schistosomiasis. Braz J Med Biol Res, v.21, n.5, p.999-1003. 1988.

Leroy, E. C., M. I. Trojanowska, *et al.* Cytokines and human fibrosis. Eur Cytokine Netw, v.1, n.4, Oct-Nov, p.215-9. 1990.

Levine, B. L., Y. Ueda, *et al.* CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. Int Immunol, v.7, n.6, Jun, p.891-904. 1995.

Li, M. O., Y. Y. Wan, *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol, v.24, p.99-146. 2006.

Liaskou, E., H. W. Zimmermann, *et al.* Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. Hepatology, v.57, n.1, Jan, p.385-98. 2013.

Loeffler, D. A., S. K. Lundy, *et al.* Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Infect Dis, v.185, n.11, Jun 1, p.1650-6. 2002.

Lotz, M. e P. A. Guerne. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). J Biol Chem, v.266, n.4, Feb 5, p.2017-20. 1991.

Louis, H., J. L. Van Laethem, *et al.* Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. Hepatology, v.28, n.6, Dec, p.1607-15. 1998.

Lukacs, N. W. e D. L. Boros. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. Clin Immunol Immunopathol, v.68, n.1, Jul, p.57-63. 1993.

- Ma, X., J. M. Chow, *et al.* The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. J Exp Med, v.183, n.1, Jan 1, p.147-57. 1996.
- Machado, M. M., Rosa, A.C.F, Oliveira, I. R. S., Cerri, G. G. Aspectos ultrasonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. Radiologia Brasileira, v.35, n.1, p.41-45. 2002.
- Magalhaes, A., D. G. Miranda, *et al.* Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.5 Suppl 1, p.21-6. 2004.
- Malhotra, I., J. Ouma, *et al.* In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. J Clin Invest, v.99, n.7, Apr 1, p.1759-66. 1997.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.231-4. 2006.
- Marra, F., S. Aleffi, *et al.* Mononuclear cells in liver fibrosis. Semin Immunopathol, v.31, n.3, Sep, p.345-58. 2009.
- Martinez, F. O., L. Helming, *et al.* Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol, v.27, p.451-83. 2009.
- Massague, J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem, v.67, p.753-91. 1998.
- Mathieson, W. e R. A. Wilson. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. Int J Parasitol, v.40, n.5, Apr, p.617-28. 2010.
- Mccartney-Francis, N. L., M. Frazier-Jessen, *et al.* TGF-beta: a balancing act. Int Rev Immunol, v.16, n.5-6, p.553-80. 1998.
- Mckenzie, G. J., P. G. Fallon, *et al.* Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. J Exp Med, v.189, n.10, May 17, p.1565-72. 1999.
- Mentink-Kane, M. M., A. W. Cheever, *et al.* Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. Gastroenterology, v.141, n.6, Dec, p.2200-9. 2011.
- Mihara, M., Y. Moriya, *et al.* IL-6-soluble IL-6 receptor complex inhibits the proliferation of dermal fibroblasts. Int J Immunopharmacol, v.18, n.1, Jan, p.89-94. 1996.

Miloux, B., P. Laurent, *et al.* Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. FEBS Lett, v.401, n.2-3, Jan 20, p.163-6. 1997

Mitchell, C., D. Couton, *et al.* Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. Am J Pathol, v.174, n.5, May, p.1766-75. 2009.

Mohamed-Ali, Q., N. E. Elwali, *et al.* Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human schistosoma mansoni infections: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. J Infect Dis, v.180, n.4, Oct, p.1298-306. 1999.

Moore, K. W., A. O'garra, *et al.* Interleukin-10. Annu Rev Immunol, v.11, p.165-90. 1993.

Mori, R., T. Kondo, *et al.* Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. FASEB J, v.16, n.9, Jul, p.963-74. 2002.

Mosser, D. M. e J. P. Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol, v.8, n.12, Dec, p.958-69. 2008.

Munder, M., F. Mollinedo, *et al.* Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. Blood, v.105, n.6, Mar 15, p.2549-56. 2005.

Muppidi, J. R., J. Tschopp, *et al.* Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. Immunity, v.21, n.4, Oct, p.461-5. 2004.

Murata, T., J. Taguchi, *et al.* Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system. Int J Hematol, v.69, n.1, Jan, p.13-20. 1999.

Murray, P. J. e T. A. Wynn. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. J Leukoc Biol, v.89, n.4, Apr, p.557-63. 2011.

Mwatha, J. K., G. Kimani, *et al.* High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. J Immunol, v.160, n.4, Feb 15, p.1992-9. 1998.

Nelms, K., A. D. Keegan, *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biological functions. Annu Rev Immunol, v.17, p.701-38. 1999.

Nelson, D. R., G. Y. Lauwers, *et al.* Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. Gastroenterology, v.118, n.4, Apr, p.655-60. 2000.

O'shea, J. J. e P. J. Murray. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. Immunity, v.28, n.4, Apr, p.477-87. 2008.

Ochoa, J. B., A. C. Bernard, *et al.* Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. Ann Surg, v.233, n.3, Mar, p.393-9. 2001.

Odobasic, D., A. R. Kitching, *et al.* CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. Kidney Int, v.68, n.2, Aug, p.584-94. 2005.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 12 de agosto de 2012

Oswald, I. P., T. A. Wynn, *et al.* Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.18, Sep 15, p.8676-80. 1992.

Parsons, C. J., M. Takashima, *et al.* Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. J Gastroenterol Hepatol, v.22 Suppl 1, Jun, p.S79-84. 2007.

Passlick, B., D. Flieger, *et al.* Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood, v.74, n.7, Nov 15, p.2527-34. 1989.

Pearce, E. J. e A. S. Macdonald. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol, v.2, n.7, Jul, p.499-511. 2002.

Poli, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Mol Aspects Med, v.21, n.3, Jun, p.49-98. 2000.

Prata, A. R. A. E. A. Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni*. n.1 ed. 1984.

Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE). VI Conferência Nacional de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde 1977.

Raes, G., R. Van Den Bergh, *et al.* Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. J Immunol, v.174, n.11, Jun 1, p.6561; author reply 6561-2. 2005.

Richter, J., S. Monteiro Eda, *et al.* Sonographic organometry in Brazilian and Sudanese patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and its relation to the risk of bleeding from oesophageal varices. Acta Trop, v.51, n.3-4, Aug, p.281-90. 1992.

Rossol, M., S. Kraus, *et al.* The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. Arthritis Rheum, v.64, n.3, Mar, p.671-7. 2012.

Rouzaut, A., M. L. Subira, *et al.* Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. Biochim Biophys Acta, v.1451, n.2-3, Sep 21, p.319-33. 1999.

Rutitzky, L. I., J. R. Lopes Da Rosa, *et al.* Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. J Immunol, v.175, n.6, Sep 15, p.3920-6. 2005.

Rutitzky, L. I. e M. J. Stadecker. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101 Suppl 1, Sep, p.327-30. 2006.

Schramm, G. e H. Haas. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. Microbes Infect, v.12, n.12-13, Nov, p.881-8. 2010.

Seki, E., S. De Minicis, *et al.* CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. Hepatology, v.50, n.1, Jul, p.185-97. 2009.

Silva-Teixeira, D. N., C. Contigli, *et al.* Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. Clin Diagn Lab Immunol, v.11, n.3, May, p.627-30. 2004.

Sornasse, T., P. V. Larenas, *et al.* Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. J Exp Med, v.184, n.2, Aug 1, p.473-83. 1996.

Steinmann, P., J. Keiser, *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis, v.6, n.7, Jul, p.411-25. 2006.

Subramanian, G., J. W. Kazura, *et al.* B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. J Immunol, v.158, n.12, Jun 15, p.5914-20. 1997.

Sun, L., M. C. Louie, *et al.* New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.300, n.3, Mar, p.L341-53. 2011.

Symmers, W. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. J Pathol Bacteriol, v.9, p.237-239. 1904.

Tacke, F. e G. J. Randolph. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, v.211, n.6-8, p.609-18. 2006.

Tallima, H., M. Salah, *et al.* Transforming growth factor-beta and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis *mansoni*. Cytokine, v.48, n.3, Dec, p.239-45. 2009.

Thompson, K., J. Maltby, *et al.* Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. Hepatology, v.28, n.6, Dec, p.1597-606. 1998.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.5, May, p.349-63. 2002.

Trinchieri, G. e P. Scott. Interleukin-12: basic principles and clinical applications. Curr Top Microbiol Immunol, v.238, p.57-78. 1999.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity, v.24, n.2, Feb, p.179-89. 2006.

Verrecchia, F. e A. Mauviel. Transforming growth factor-beta and fibrosis. World J Gastroenterol, v.13, n.22, Jun 14, p.3056-62. 2007.

Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose. 2007.

Warren, K. S. Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Bull N Y Acad Med, v.44, n.3, Mar, p.280-94. 1968.

Watford, W. T., M. Moriguchi, *et al.* The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. Cytokine Growth Factor Rev, v.14, n.5, Oct, p.361-8. 2003.

Wong, K. L., J. J. Tai, *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood, v.118, n.5, Aug 4, p.e16-31. 2011.

Wynn, T. A. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol, v.21, p.425-56. 2003.

Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.524-9. 2007.

Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol, v.214, n.2, Jan, p.199-210. 2008.

Wynn, T. A., A. W. Cheever, *et al.* An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. Nature, v.376, n.6541, Aug 17, p.594-6. 1995.

Wynn, T. A., A. W. Cheever, *et al.* IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. J Immunol, v.160, n.9, May 1, p.4473-80. 1998.

Wynn, T. A., I. Eltoum, *et al.* Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of Schistosoma mansoni and exogenous

IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. J Exp Med, v.179, n.5, May 1, p.1551-61. 1994.

Wynn, T. A., R. W. Thompson, *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis. Immunol Rev, v.201, Oct, p.156-67. 2004.

Yang, J., J. Chen, *et al.* Effect of interleukin 6 deficiency on renal interstitial fibrosis. PLoS One, v.7, n.12, p.e52415. 2012.

Yoshida, A., Y. Koide, *et al.* IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. Biochem Biophys Res Commun, v.198, n.3, Feb 15, p.857-61. 1994.

Zawada, A. M., K. S. Rogacev, *et al.* SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. Blood, v.118, n.12, Sep 22, p.e50-61. 2011.

Zheng, Y., C. N. Manzotti, *et al.* CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. J Immunol, v.172, n.5, Mar 1, p.2778-84. 2004.

Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol, v.81, n.3, Mar, p.584-92. 2007.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, v.116, n.16, Oct 21, p.e74-80. 2010.

Zimmermann, H. W. e F. Tacke. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. Inflamm Allergy Drug Targets, v.10, n.6, Dec, p.509-36. 2011.

11. ANEXOS

11.1 Ficha de avaliação ultrassonográfica – USG

IDENTIFICAÇÃO	
1. Nome: _____	Identificação: _____
2. Comunidade: _____	
3. Data da avaliação: ____/____/____	
1 – FÍGADO	
1.1 Dimensões	
1.1.1 Medida da linha média (cm): _____	
1.1.2 Medida da linha médio-clavicular (cm): _____	
1.1.3 Lobo direito abaixo do RCD:	(a) Sim, sem (b) Sim, à (c) Não
inspiração profunda	
inspiração profunda	
1.1.4 Lobo esquerdo abaixo do AX:	(a) Sim, sem inspiração profunda (b) Sim, à inspiração profunda (c) Não
1.2 Características da superfície do fígado:	(a) Regulares (b) Irregulares
1.3 Textura do parênquima hepático	
1.3.1 Múltiplas áreas ecogênicas no fígado (espaços porta):	(a) Presentes (b) Ausentes
1.3.2 Atenuação do feixe acústico posterior:	(a) Presentes (b) Ausentes
1.4 Espessura de 4 espaços periportais (entre a 1ª e a 2ª divisão após os ramos esquerdo e direito da veia porta) (mm): 1. (_____) 2. (_____) 3. (_____) 4. (_____) Média _____	
1.5 Espessura de 4 espaços periportais distais (entre a 2ª e a 3ª divisão após os ramos esquerdo e direito da veia porta) (mm): 1. (_____) 2. (_____) 3. (_____) 4. (_____) Média _____	
1.6 Maior diâmetro da veia porta extra hepática (mm): _____	
1.7 Diâmetro da veia porta (localização: ponto médio entre a entrada do hilo hepático e sua bifurcação dentro do fígado) (mm): _____	
1.8 Espessura da parede da veia porta (mm): _____	

2 – VESÍCULA BILIAR

2.1 Espessura da parede (mm): _____

2.2 Presença de cálculos: (a) Sim (b) Não

3 – BAÇO

3.1 Tamanho do baço (cm): _____

3.2 Presença de pontos ecogênicos no parênquima do baço: (a) Sim (b) Não

3.3 Diâmetro da veia esplênica (mm):

3.3.1 Linha média (distal): _____

3.3.2 Hilo esplênico (proximal): _____

3.4 Presença de calcificação na parede da veia esplênica: (a) Sim (b) Não

3.5 Veias gástricas curtas:

(a) Individualizadas, medindo _____ mm

(b) Não individualizadas

3.6 Sinais de varizes:

3.6.1 Esôfago distal: (a) Sim (b) Não

3.6.2 Fundo gástrico: (a) Sim (b) Não

3.6.3 Hilo esplênico: (a) Sim (b) Não

3.7 Ascite: (a) Presente (b) Ausente

3.8 Outros achados ultra-sonográficos relevantes:

3.9 Classificação: Média dos 4 espaços periportais centrais:

() GRAU 0 < 3 mm

() GRAU I 3 – 4,9 mm

() GRAU II 5 – 7 mm

() GRAU III > 7 mm

11.2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Para Participar Do Estudo

Nome do Projeto: Caracterização fenotípica dos monócitos de pacientes com fibrose periportal secundária à esquistossomose.

Investigador Principal: Maria Ilma Andrade Santos Araújo, médica, Serviço Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

Nome do Paciente:

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo caracterizar os tipos de monócitos entre os indivíduos com diferentes manifestações clínicas secundária à esquistossomose.

Esta participação implica na sua concordância responder a um questionário com perguntas sobre exposição a água do rio, submeter-se a exames clínicos, além de ultrassonografia de abdome e da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Participação Voluntária:

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

Finalidade do estudo:

Este estudo tem a finalidade de avaliar a influência da verminose no aparecimento de manifestações clínicas, a exemplo da hepatoesplenomegalia.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos. Você doará 20mL de sangue, em caso de criança e 40 mL de sangue no caso dos adultos, que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

Duração do Estudo:

Após a assinatura do termo de consentimento, sua participação no estudo terá uma duração máxima prevista de 12 meses.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados

na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análise dos Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Estudos que contribuem para identificação dos mecanismos envolvidos nas diferentes manifestações clínicas causadas pela infecção pelo *Schistosoma mansoni*, podem levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a prevenção do aparecimento destas manifestações.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais, você será tratado gratuitamente e, no caso de observarmos a presença de alguma manifestação clínica você receberá instruções para o tratamento da mesma ou será encaminhado para o acompanhamento por médicos especializados no HUPES.

Custos:

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

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Maria Ilma Araujo, coordenadora do projeto, médica do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua Padre Feijó, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Ambulatório Magalhães Neto, na pessoa do Dr. Antônio Barata, no endereço Rua Padre Feijó, 240 – Canela, telefone (071) 3203-2740.

Consentimento:

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

Assinatura do Participante

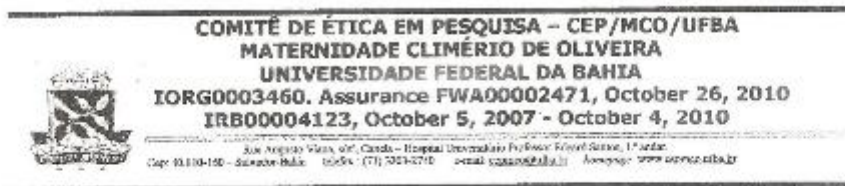
RG nº

Assinatura do Pesquisador

RG nº

Local: _____ Data ____/____/____ Hora: _____

11.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa




PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA Nº 240/2008

Para análise e deliberação deste Institucional a Professora, Doutora, **Maria Ilma Andrade Santos Araújo**, Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa “**Avaliação do Grau de Ativação Celular e do Perfil de Citoninas em Indivíduos com Diferentes Graus de Fibrose Hepática Secundária a Esquistossomose**”, aprovado por este Colegiado em 14 de Maio de 2008 através do Parecer/Resolução N.º 043/2008, encaminhou, em 21 de Outubro de 2008, o atendimento correspondente a recomendação constante no retro Parecer mencionado.

Inexistindo na proposição analisada conflito administrativo, processual e ético que contraindique a incorporação pretendida e a consequente continuidade executória local do Estudo, fica a mesma **aprovada** por esta Instância. ✓

APROVADO

Salvador, 29 de Outubro de 2008


 - Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (ã) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apenas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo)